



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOCIÊNCIAS**

**DO CLÁSSICO À INOVAÇÃO EM SEXAGEM DE AVES:
SUSTENTABILIDADE NO USO DO PCR CONVENCIONAL PARA NOVOS
GRUPOS E BUSCA PELA EXPRESSÃO DE NOVO GENE SEXO-
ESPECÍFICO COM POTENCIAL PARA IMUNOSSEXAGEM**

SABRINA THAIS FABICHAKI

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná
2024



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOCIÊNCIAS**

**DO CLÁSSICO À INOVAÇÃO EM SEXAGEM DE AVES:
SUSTENTABILIDADE NO USO DO PCR CONVENCIONAL PARA NOVOS
GRUPOS E BUSCA PELA EXPRESSÃO DE NOVO GENE SEXO-
ESPECÍFICO COM POTENCIAL PARA IMUNOSSEXAGEM**

SABRINA THAIS FABICHAKI

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Carla Vermeulen Carvalho Grade

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná
2024

SABRINA THAIS FABICHAKI

**DO CLÁSSICO À INOVAÇÃO EM SEXAGEM DE AVES:
SUSTENTABILIDADE NO USO DO PCR CONVENCIONAL PARA NOVOS
GRUPOS E BUSCA PELA EXPRESSÃO DE NOVO GENE SEXO-
ESPECÍFICO COM POTENCIAL PARA IMUNOSSEXAGEM**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

BANCA EXAMINADORA

Dr(a). Carla Vermeulen Carvalho Grade
Orientador(a)
UNILA

Dr. Hermes José Schmitz
Examinador(a)
UNILA

Dr(a). Andrezza Maria Felício Ament
Examinador(a)
USP

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná, 31 de agosto de 2024.

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - CENTRAL

F118

Fabichaki, Sabrina Thais.

Do clássico à inovação em sexagem de aves: sustentabilidade no uso do PCR convencional para novos grupos e busca pela expressão de novo gene sexo-específico com potencial para imunosexagem / Sabrina Thais Fabichaki. - Foz do Iguaçu, 2024.

130 f.: il., color.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, Programa de Pós-Graduação em Biociências. Foz do Iguaçu - PR, 2024.

Orientador: Grade, Carla Vermeulen Carvalho.

1. Aves. 2. Cromossomos sexuais - Heterogametas. 3. Genes - Transcrição. 4. Espécies - Preservação. 5. Galinhas. I. Grade, Carla Vermeulen Carvalho. II. Título.

CDU 575:598.261

AGRADECIMENTOS

Sem dúvidas nenhuma, esses anos só foram possíveis graças a uma rede de pessoas incríveis que trabalharam junto comigo de diversas formas, desde processos laboratoriais, até emocionais. Afinal de contas, todos pertencemos a uma soma de fatores que constituem nosso ser íntegro... Somos nossos currículos, nossos sonhos, nossas conquistas, nossos desejos, nossa família, nossos amigos. Somos a ciência, mas também a crença, os hobbies, as risadas, os momentos compartilhados de dor e alegria. Portanto, cada segundo vivido, os quais não retornam mais, fazem sermos verdadeiramente únicos e assim desbravamos o processo, pois é no processo que descobrimos cada uma das partes que nos constitui.

Primeiramente, gostaria de agradecer pela oportunidade de, novamente, desenvolver ciência em uma Universidade como a UNILA. Além disso, meus sinceros agradecimentos ao PPGBC e toda equipe que, em todos os momentos, auxiliaram de forma formidável na evolução do presente projeto. Ainda, agradeço ao programa de demanda social da CAPES pelo auxílio financeiro, o qual permitiu o desenrolar de todas as atividades associadas.

Novamente, fui agraciada pela oportunidade de desenvolver diferentes áreas e pedaços de Sabrina, juntamente com uma das mulheres mais incríveis que já conheci. Carla, é adorável poder prosperar ao seu lado, você se tornou para mim, uma referência em diferentes aspectos nesse processo de consciência que temos sobre a Terra. Todo tempo que compartilhamos juntas me inspirou de diferentes formas, em me tornar uma pessoa cada vez melhor. Obrigada pela força, pelos abraços, conselhos, pelas conversas, e principalmente, pelo ótimo exemplo de mulher na ciência, ética, trabalhadora e inteligentíssima! Já vivemos tantos processos juntas: extensão, IC, TCC, estágio docência, mestrado... Espero que essa nossa nova conquista juntas, não seja uma despedida, mas um "Até logo". Sua existência está em mim, independente do tempo ou do local onde estiver!

Mas, como era de se esperar, muitos outros professores colaboraram de diferentes formas com o passar dos meses. Meus sinceros agradecimentos e gratidão às professoras Maria Leandra, Maria Cláudia, Rafaella e Danúbia. Mulheres, vocês foram momentos de luz essencial em diferentes etapas do processo, o que fez com que essa monografia pudesse estar sendo publicada neste momento. Obrigada pelas experiências! Da mesma forma, os professores Kelvinson e Gleisson também foram imprescindíveis para o sucesso do projeto. Eu me sinto completamente orgulhosa de ter sido orientada por professores como todos vocês! Sei que "quem faz a universidade" são os alunos, mas gostaria de deixar claro que: nada ali seria possível sem a presença e interferência de vocês! Vocês fazem TODA a diferença na vida de cada profissional que nasce ali.

No dia a dia do laboratório, existem algumas pessoas nas quais estão arduamente nos acompanhando, ou então garantindo o resto de sanidade

mental que nos resta. E essas pessoas, não poderiam ficar de fora nesse momento. Em primeiro lugar, meus sinceros agradecimentos, respeito e admiração pela equipe técnica dos laboratórios! Eu sei que quase enlouqueci muitos de vocês, mas nada no laboratório é possível na ausência dessa equipe! Pessoinhas lindas, dos laboratórios aos lados, também garantiram minha sanidade ou terapias coletivas (contêm ironia) em momentos cruciais. E pra vocês, desejo todo sucesso e conquistas na vida: Angelo, Adrielle, Ema e Quemilly. Também existem outros seres de luz trabalhando mais próximos que me trouxeram esperança na humanidade... Eliezer, Gustavo, Mateo, Andrés, Fernando e Bernie: vocês são brilhantes, me orgulho de cada um, e de poder fazer parte dessa história!

Um salve em especial para a galera do café! Bhrenno, Padre (vulgo Francisco), Fernando(s), Rogério (Fields), Lucas, Bella e Giih. Vocês tornaram tudo mais suportável e me proporcionaram conversas, ideias e reflexões, além de me mostrarem e despertarem gostos que nem eu mesmo sabia que tinha. Além desses, Sharon, você tem sido como uma irmã em Foz do Iguaçu, saiba que estarei sempre aqui por ti, e lhe agradeço imensamente seu apoio em todos os momentos (únicos e inesquecíveis) que já compartilhamos até aqui. Um enorme agradecimento em especial para Beatriz (que não contente em invadir meu TCC, invadiu minha dissertação também). Bia, obrigada por construir essa história junto comigo, são os pequenos momentos, os abraços, o apoio e as risadas, que fazem cada momento e cada dia serem especiais. Também gostaria de enfatizar a importância da presença do Mestre Pola em minha vida, não somente como mestre em artes marciais, mas como um pai. Você me ensinou sobre resiliência, cuidado e respeito, sua presença traz luz na vida das pessoas, tenho orgulho de ti! Ao Kelvyn: sou imensamente grata por sua existência em minha vida, você tem me ensinado o significado de companheirismo! Obrigada por estar ao meu lado me apoiando em todos os momentos.

“Quem faz o seu melhor, faz tudo o que se pode esperar dele” - Helena Blavatsky. E com essa frase, gostaria de homenagear minha mãe, Mara. Minha rainha, você me ensinou ser a mulher destemida de hoje, tudo que sou é graças ao seu empenho em dar o melhor pra mim e meu irmão, Du. Você acreditou em mim, lutou por mim, chorou por mim e sorriu por mim. Escrevo essa pequena dedicatória a você com lágrimas nos olhos, pois somente nós três sabemos toda a trajetória e tudo que suportamos para chegar até aqui. Você é minha maior referência de força, determinação, independência e coragem nessa existência. Du, tudo isso está sendo possível hoje, graças a ti, também. Você me inspira a ser uma pessoa melhor, e me traz imensa alegria em saber que, onde eu estiver nesse mundo, terá uma metade minha, que eu sempre posso confiar. Se hoje estou conquistando mais um degrau da minha vida, esse título é pertencente a NÓS.

Mãe e Du, vocês são parte de mim!

FABICHAKI, Sabrina Thais. 2024. **Do clássico à inovação em sexagem de aves:** sustentabilidade no uso do PCR convencional para novos grupos e busca pela expressão de novo gene sexo-específico com potencial para imunosexagem. Orientadora: GRADE, Carla Vermeulen Carvalho. 138 f. Dissertação (Mestrado) - PPG-BC (Programa de Pós-Graduação em Biociências), UNILA (Universidade Federal da Integração Latino-Americana), Foz do Iguaçu.

RESUMO

O dimorfismo sexual consiste em diferenças morfológicas, fisiológicas ou comportamentais entre fêmeas e machos de indivíduos da mesma espécie. A distinção de indivíduos fêmeas e machos de aves é de extrema importância para diferentes setores da ecologia, ornitologia e conservação. Contudo, o dimorfismo sexual nem sempre é aparente a olho nu e, em algumas espécies de aves, pode ser inexistente. Atualmente, a metodologia mais utilizada para a sexagem no Brasil é através de técnica de PCR, utilizando *primers* comerciais, seguida de corrida em gel de agarose. Apesar dessa técnica apresentar resultados positivos com custos relativamente baixos por amostra, é necessária uma equipe técnica especializada, equipamentos e reagentes onerosos. De maneira alternativa, a utilização de anticorpos monoclonais para imunosexagem já é realizada em algumas espécies de mamíferos. Com auxílio de um anticorpo monoclonal específico para o antígeno HY (exclusivo masculino) ligado a fatores de fluorescência, a distinção do cromossomo sexual de gametas pode ser realizada de forma rápida, segura e eficaz. Com a intenção de propor uma metodologia semelhante que pudesse ser utilizada na produção de um kit rápido de sexagem para aves, em trabalho anterior, realizamos um levantamento *in silico* de proteínas sexo-específica de aves (usando *Gallus gallus*) presentes na membrana celular de células sanguíneas. Utilizando ferramentas e plataformas de bioinformática, foi identificada uma proteína predita (que chamaremos provisoriamente de proteína SMEFC - "*sex-specific marker expressed from the female chromosome*"), ainda não caracterizada, proveniente do cromossomo W, com estrutura transmembranar e domínio extracelular preditos. Tal proteína apresenta baixa homologia com outras estruturas proteicas e uma boa conservação entre as espécies de aves. Diante desse cenário, no presente trabalho foi verificada a presença do mRNA da proteína SMEFC em amostras sanguíneas de galinhas, através da metodologia de PCR por transcriptase reversa (RT-PCR). Para isso, utilizaram-se pares de *primers* específicos para a sequência de mRNA, desenhados previamente. Apesar de inúmeras tentativas e adaptações, os resultados levantados foram inconclusivos, visto que foi possível observar um anelamento inespecífico em indivíduos machos, impedindo a determinação, dessa forma, de que o mRNA da proteína SMEFC seria sexo-específico. Sendo assim, análises futuras com *primers* mais específicos são necessárias. Concomitantemente, foi analisada a funcionalidade da sexagem comercial pelos *primers* P0, P2 e P8, em comparação à metodologia mais usada que utiliza apenas o conjunto P2/P8. Foram testadas não somente espécies já sexadas pelo conjunto dos três iniciadores como seis novas espécies não

testadas anteriormente, segundo a literatura. Por fim, buscando inovar e agir com sustentabilidade na ciência, foram utilizados kits de extração de DNA viral excedentes do período da Covid, adaptando à utilização na extração de DNA do canhão de penas das nove diferentes espécies sexadas com os *primers* P0/P2/P8. O uso do conjunto dos três iniciadores mostrou um excelente desempenho na distinção visual em gel de agarose a 1,5 %, para diferentes espécies pertencentes a distintos grupos, ressaltando a confiabilidade nos resultados da sexagem e a conservação molecular da região CHD, amplificada.

Palavras-chave: aves; heterogamético; transcrito; preservação; galinha.

FABICHAKI, Sabrina Thais. 2024. **From classic to innovation in bird sexing: sustainability in the use of conventional PCR for new groups and the search for the expression of a new sex-specific gene with potential for immunosexing.** Advisors: GRADE, Carla Vermeulen Carvalho. 138 s. Master's thesis (Master's degree) - PPG-BC (Graduate Program in Biosciences), UNILA (Federal University of Latin American Integration), Foz do Iguaçu.

ABSTRACT

Sexual dimorphism consists of morphological, physiological or behavioral differences between female and male individuals of the same species. The distinction of female and male individuals of birds is extremely important for different areas of ecology, ornithology and conservation. However, sexual dimorphism is not always apparent to the naked eye and in some bird species, may be nonexistent. Currently, the most used method for sexing in Brazil is through the PCR technique, using sets of commercial primers, followed by an agarose gel electrophoresis. Although this technique provides positive results at a relatively low cost per sample, it requires a specialized technical team and expensive equipment and reagents. Alternatively, the use of monoclonal antibodies for immunosexing is already used in some mammalian species. With the help of a monoclonal antibody specific for the HY antigen (male exclusive) linked to fluorescence factors, the distinction of the sex chromosome of gametes can be achieved quickly, safely and effectively. With the intention of proposing a similar method that could be used in the production of a fast sexing kit for birds, in a previous work we carried out an *in silico* survey of bird sex-specific proteins (using *Gallus gallus*) present in the cell membrane of blood cells. Using bioinformatic tools and platforms, we identified a putative protein (which we will provisionally call SMEFC - “sex-specific marker expressed from the female chromosome”), a yet uncharacterized protein coded from the W chromosome, with a putative transmembrane structure and extracellular domain. This protein shows low homology with other proteic structures and good conservation between bird species. Considering this context, in the current study, we verified the presence of SMEFC protein mRNA in chicken blood samples using reverse transcriptase PCR (RT-PCR). To this end, we used pairs of specific primers designed previously for the mRNA sequence. Despite numerous attempts and adjustments, the results were inconclusive, since non-specific annealing could be observed in male individuals, thus not confirming that the mRNA of the SMEFC protein was sex-specific. Future analyses with more specific primers must be performed. Concurrently, the functionality of commercial sexing using primers P0, P2 and P8 was analyzed, in comparison to the most used methodology that uses only the P2/P8 set. We tested not only species already sexed by the set of three initiators, but also six new species not previously tested, according to the literature. Finally, in attempt to innovate and act with sustainability in science, viral DNA extraction kits surplused from the Covid period were used adapting to the use on feather calamus DNA extraction from the nine different species sexed with the P0/P2/P8 primers. The use of the three primers set showed excellent performance in visual distinction on 1.5% agarose gel for different species

belonging to different groups, highlighting the reliability of the sexing results and the molecular conservation of the amplified CHD region.

Keywords: *birds; heterogametic; transcript; preservation; chicken.*

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Filogenia representativa e ilustrativa da Árvore da Vida de Aves.....	19
Figura 1. Filogenia representativa e ilustrativa da Árvore da Vida de Aves (continuação).....	20
Figura 2. Filogenias comparadas	21
Figura 3. DS morfológico acentuado	23
Figura 4. Aves com e sem DS aparente	26
Figura 5. Sistema reprodutivo do galo	27
Figura 6. Sistema reprodutivo de galinha	29
Figura 7. Determinação do sexo em machos homogaméticos e fêmeas heterogaméticas.....	31
Figura 8. Desenvolvimento embrionário do sistema reprodutor	32
Figura 8. Desenvolvimento embrionário do sistema reprodutor (continuação)	33
Figura 8. Desenvolvimento embrionário do sistema reprodutor (continuação)	34
Figura 9. Cromossomos da <i>G. gallus</i>	38
Figura 10. Cromossomos sexuais da galinha.....	42
Figura 11. Sexagem por PCR, cromossomo e região de interesse.....	47
Figura 12. Alinhamento de P0/P2/P8	49
Figura 13. Análise de PCR virtual para os <i>primers</i> PAR 1	67
Figura 14. Análise de BLAST entre sequências	68
Figura 15. Teste dos kits de PCR.....	70
Figura 16. Teste com temperaturas de amplificação para SMEFC	71
Figura 17. PCR com machos e fêmeas e 51°C para anelamento	72
Figura 18. PCR com macho e fêmea em 53°C para anelamento.....	72
Figura 19. Resultado de PCR virtual utilizando <i>primers</i> SMEFC.....	74
Figura 20. Animais modelo em citações do PubMed.....	83
Figura 21. Algumas das montagens do genoma de <i>G. gallus</i>	84
Figura 22. Expressão de genes sexo-específicos e genes do cromossomo W87	
Figura 23. Ordens e espécies analisadas	95
Figura 24. Teste de kits de PCR com <i>primers</i> P2/P8	101
Figura 25. Teste dos diferentes kits em gel de agarose mais concentrado...	102
Figura 26. Padronização do protocolo PCR multiplex para sangue de <i>G. gallus</i>	103
Figura 27. PCR dos controles positivos usando os <i>primers</i> P0/P2/P8 e 48°C de anelamento.....	107

Figura 28. Diferentes espécies testadas para PCR multiplex.....	108
Figura 29. Gradiente de temperatura em amostra de <i>S. similis</i> fêmea.....	109
Figura 30. Resultado de PCR realizado com DNA de diferentes espécies sem adição do <i>primer</i> P0	110
Figura 31. Estruturas das penas.....	115

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Dispersão dos dados de extração de RNA conforme protocolos....	79
Gráfico 2. Relação entre quantidade de sangue e concentração de DNA total (ng/uL).....	106

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Protocolos metodológicos	55
Tabela 2. Pares de <i>primers</i>	64
Tabela 3. Gradientes de temperaturas	65
Tabela 4. Variáveis da eletroforese	66
Tabela 5. Teste com kits de extração de RNA.....	69
Tabela 6. Extração de RNA de machos.....	71
Tabela 7. PCR virtual com <i>primers</i> para sequência SMEFC	74
Tabela 8. Quantidade e qualidade de RNA total extraído de sangue de <i>G. Gallus</i> por diferentes protocolos.....	77
Tabela 9. Parâmetros testados para PCR e corrida de eletroforese.....	99
Tabela 10. Testes de kits de extração	100
Tabela 11. Extração de DNA com kit VIOGENE.....	100
Tabela 12. Parâmetros de extração de DNA de cálcamo de penas	104

SUMÁRIO

1 REFERENCIAL TEÓRICO	16
1.1 Aves: Importância ecológica e econômica.....	16
1.1.1 <i>Diversidade de aves.....</i>	17
1.2 Gonocorismo e dimorfismo sexual em aves	21
1.3 O sistema reprodutor das aves	26
1.3.1 <i>Sistema reprodutor dos machos.....</i>	26
1.3.2 <i>Sistema reprodutor das fêmeas</i>	28
1.3.3 <i>Desenvolvimento do sistema reprodutor das aves</i>	29
1.4 Sistemas cromossômicos de determinação sexual.....	35
1.4.1 <i>Sistema XY de determinação sexual.....</i>	35
1.4.2 <i>Sistema ZW de determinação sexual</i>	36
1.4.3 <i>Os cromossomos Z e W.....</i>	37
1.4.4 <i>Hipóteses de superdosagem ou genes sexo-específicos.....</i>	40
1.4.5 <i>Regulação molecular da diferenciação sexual em aves</i>	42
1.4.6 <i>Fatores epigenéticos e ambientais.....</i>	43
1.5 Sexagem.....	45
1.5.1 <i>Sexagem em aves: Importância e métodos.....</i>	46
1.6 Proteínas de membrana para sexagem e proteína SMEFC – "Sex Specific Marker Expressed From The Female Chromosome"	49
2 OBJETIVOS	52
2.1 Geral	52
2.2 Específicos	52
CAPÍTULO 1 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE SMEFC EM CÉLULAS DO SANGUE DE <i>G. gallus</i>	53
3 MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1 Coleta das amostras sanguíneas	53
3.2 Extração do RNA total da amostra	53
3.3 Síntese de cDNA e RT-PCR.....	61
3.4 Eletroforese em gel	64
3.5 Análises de bioinformática	65
3.5.1 <i>PCR virtual.....</i>	65
3.5.2 <i>BLAST</i>	66
4 RESULTADOS	67
4.1 Primeiro bloco de experimentos – Protocolo 1 de extração de RNA e primers PAR 1.....	67
4.1.1 <i>Extração de RNA de fêmeas e síntese de cDNA.....</i>	67

4.1.2 Padronização do protocolo de PCR	67
4.1.3 Testes com amostras de machos.....	69
4.1.4 Análises de bioinformática	70
4.2 Segundo bloco de experimentos – Novos protocolos de extração e primers PAR 8.....	73
5.1 Genoma de <i>G. gallus</i> e seus desafios.....	78
5.2 Extração de RNA e suas dificuldades	83
6 CONCLUSÃO.....	88
CAPÍTULO 2 - SEXAGEM MOLECULAR CONVENCIONAL EM AVES, NOVAS APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS.....	89
3 MATERIAL E MÉTODOS	89
3.1 Extração de DNA	89
3.1.1 Amostras sanguíneas	89
3.1.2 Amostras de cálamos de pena.....	90
3.2 Sexagem convencional por PCR.....	93
4 RESULTADOS	96
4.1. Extrações de DNA Total proveniente de amostras de sangue de <i>G. Gallus</i>	96
4.2 PCR e eletroforese em gel para a sexagem convencional com os <i>primers</i> P2 e P8.....	96
4.3 Extração de DNA proveniente do cálamos de penas de aves de diferentes espécies.....	99
4.4 PCR com conjunto de <i>primers</i> P0/P2/P8 para as amostras de DNA de penas das diferentes espécies eleitas	102
5 DISCUSSÃO.....	106
5.1 Utilização de DNA para sexagem de <i>G. gallus</i> com os <i>primers</i> P2 e P8.....	106
5.2 Utilização do <i>primer</i> P0	108
5.3 Utilização de amostras de penas para extração de DNA	108
5.4 Sexagem molecular utilizando conjunto de <i>primers</i> P0/P2/P8 a partir de penas de novas espécies.....	111
6 CONCLUSÃO.....	114
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
8 ANEXOS.....	138
Anexo A – Certificado Comissão de Ética no Uso de Animais	138

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Aves: Importância ecológica e econômica

A América do Sul é um território conhecido por ser o “Continente das Aves” devido à riqueza e diversidade de espécies na região (HAUPT, 2006). Dentre os países, Brasil, Colômbia e Peru são aqueles que possuem o maior número de espécies, seguido do Equador, Bolívia, Venezuela e Argentina (DEVELEY, 2021). Em sua 13ª edição, o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO) registrou 1971 espécies de aves no território brasileiro, sendo elas nativas, migrantes reprodutivos ou sazonais não reprodutivos e ocasionais/acidentais (PACHECO, *et al.*, 2021). Apesar dessa abundância de espécies de aves presentes no Brasil, muitas delas estão em ameaça de extinção. Segundo dados do Sistema de Avaliação do Risco de Extinção da Biodiversidade (SALVE), do ICMBio, 54,5% das aves estão em estado de vulnerabilidade, 31,5% em perigo de extinção e 13,6% criticamente em perigo de extinção (ICMBIO, 2024).

Apesar da capacidade que algumas espécies de aves possuem para se adaptar a novos habitats (BILAL, *et al.*, 2021), algumas situações representam as maiores ameaças à biodiversidade global. Por exemplo, a expansão de terras agrícolas e pastagens é responsável pelo declínio das populações de 74% de todas as aves globalmente ameaçadas no mundo, assim como a extração seletiva de madeira (50%), espécies invasoras (39%), caça e captura (35%) e mudanças climáticas severas (33%) (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2018).

Tanto no ecossistema, quanto para a sociedade humana, as aves desempenham diversos papéis importantes para manter o equilíbrio. Muitas espécies realizam controle de pragas nos sistemas agrícolas, reduzindo infestações de insetos, pequenos mamíferos e pássaros granívoros, como também de ervas daninhas, consequentemente, aumentando os rendimentos das colheitas. Além disso, as aves são importantes dispersoras de sementes, promovendo a biodiversidade e também auxiliando que espécies de plantas se regenerem em áreas degradadas. Além disso, estima-se que mais de 920 espécies de aves distribuídas no mundo, se alimentam de néctar e acabam por polinizar flores. Adicionalmente, muitas aves contribuem para a limpeza de ambientes, pois, ao se alimentar de animais mortos, removem resíduos, regulam doenças e ciclam nutrientes. Por fim, também realizam ciclagem de nutrientes

de ambientes aquáticos para terrestres, já que aves marinhas depositam nutrientes para a terra (WHELAN, *et al.*, 2015; MARIYAPPAN, *et al.*, 2023).

Além desses benefícios, estudos comprovam que as aves estão relacionadas com o bem estar da sociedade. Na Europa, foi demonstrado que a riqueza de espécies de aves está positivamente relacionada com a satisfação com a vida (METHORST, *et al.*, 2021). A riqueza e abundância de espécies de aves também estão ligadas ao bem-estar pessoal e da vizinhança de 9 cidades no sudeste da Austrália (LUCK, *et al.*, 2011). Adicionalmente, ouvir o canto dos pássaros pode reduzir o estresse psicológico (MEDVEDEV, *et al.*, 2015).

Apesar de sua relevância, o valor econômico adequado desses serviços para a agricultura, biodiversidade e ecossistema ainda é debatido. A falta de estudos concretos para compreender os serviços ecossistêmicos e a conscientização da sociedade sobre esses benefícios prejudica a preservação e conservação desses animais e seus habitats. Assim, é necessária uma avaliação ampla e profunda acerca dos benefícios econômicos que as aves podem gerar, e também entender as consequências do declínio das espécies e a sua extinção, para aumentar o apoio às espécies e se possível, como sociedade, promover a conservação (WHELAN, *et al.*, 2015; MARIYAPPAN, *et al.*, 2023).

No Brasil, algumas ações legais podem ser tomadas com esse intuito. Uma das soluções legais autorizadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) para preservação das espécies é possibilitar a criação de aves em cativeiros (BRASIL, 2008). Outras ações também podem ser tomadas, como designar áreas protegidas (públicas e privadas), gerir diretamente as espécies de aves (intervindo diretamente por meio de manejo de recursos-chave, como reprodução, alimentação e controle de predadores), ou estimular programas de educação ambiental para apoio público (DEVELEY, 2021).

1.1.1 *Diversidade de aves*

Análises taxonômicas obtidas através de diversas metodologias estimam que existam atualmente entre 10 a 11 mil espécies vivas de aves no mundo, sendo esse um dos grupos mais abundantes e diversos (STILLER, *et al.*, 2024). Árvores moleculares disponibilizadas pelo endereço eletrônico *BirdTree* (sem data) indicam um total de 9.993 espécies reconhecidas de aves, distribuídas em 158 clados (JETZ,

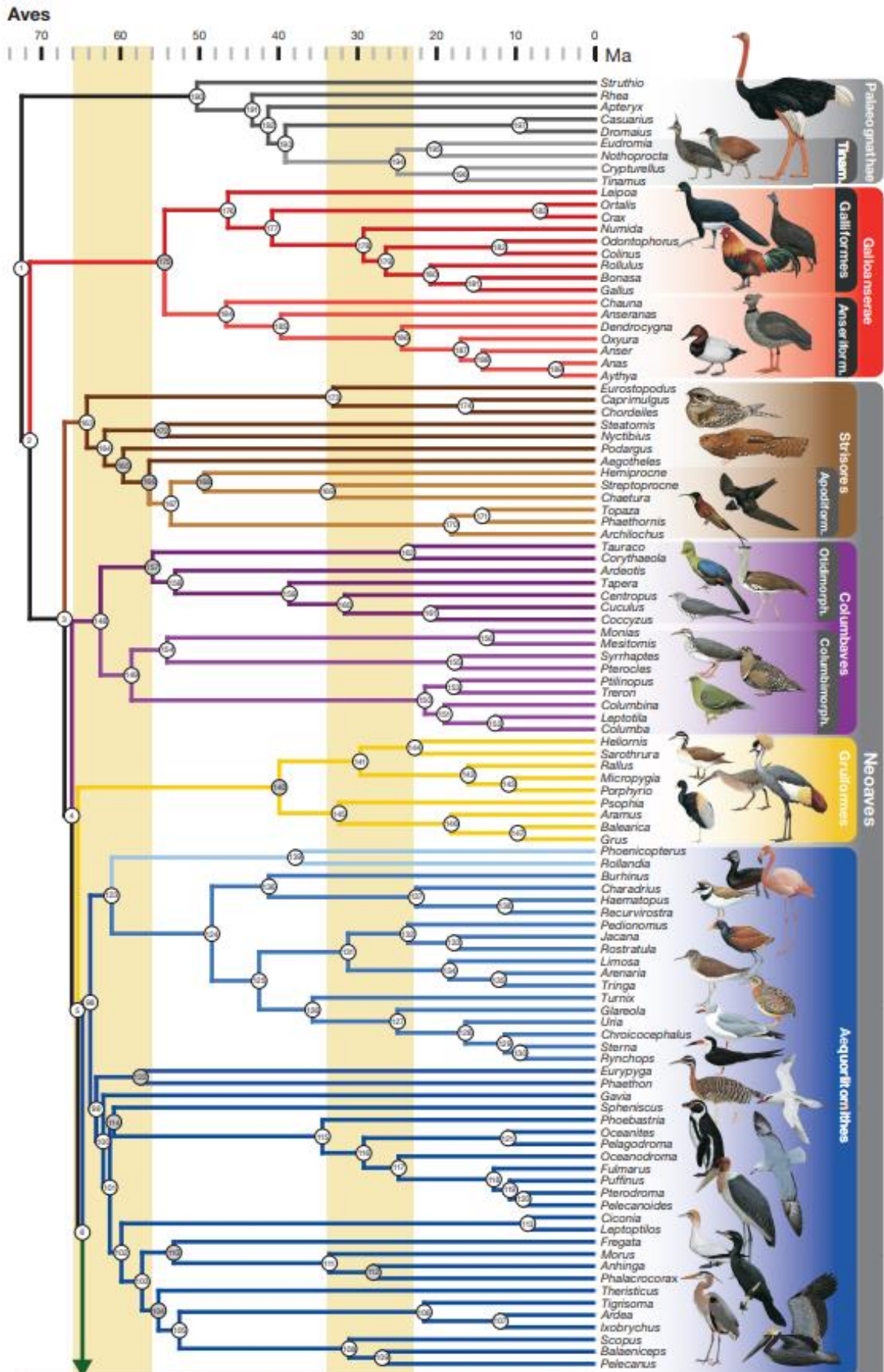
et al., 2012). Em outra ferramenta de acesso gratuito denominada *Tree of life*, baseada na classificação de Sereno (1999), o leitor tem acesso a uma variada gama de informações de grupos e espécies de aves, sendo possível interagir e desmembrar cada grupo para uma análise mais detalhada do objeto de estudo (TREE OF LIFE WEB PROJECT, 1999).

A partir dos avanços no sequenciamento de nova geração (NGS), novas informações genéticas e levantamentos sobre a diversidade de aves surgem diariamente. A figura 1 ilustra a riqueza em espécies e suas relações evolutivas com base em análises bayesianas, contendo 259 aves de base (PRUM, *et al.*, 2015).

O primeiro grupo observado na parte superior da figura representa os Paleognathae (em cinza, onde encontram-se aves como avestruz e ema), sendo considerada uma superordem, juntamente com os Neognathae (Neoaves, em cinza escuro, separados por cinco clados irmãos). Entre eles, em vermelho, observa-se o clado pertencente aos Galloanserae, onde encontra-se a galinha doméstica *Gallus gallus* (*G. gallus*). Já nos clados irmãos pertencentes às Neoaves, pode-se observar: Strisores (em marrom, exemplo: beija-flor), Columbaves (em roxo, exemplo: pombos), Gruiformes (em amarelo, exemplo: saracuras), Aequorlitorithes (em amarelo, clado de aves aquáticas) e Inopinaves (em verde, exemplo: corujas e todos os Passeriformes) (PRUM, *et al.*, 2015).

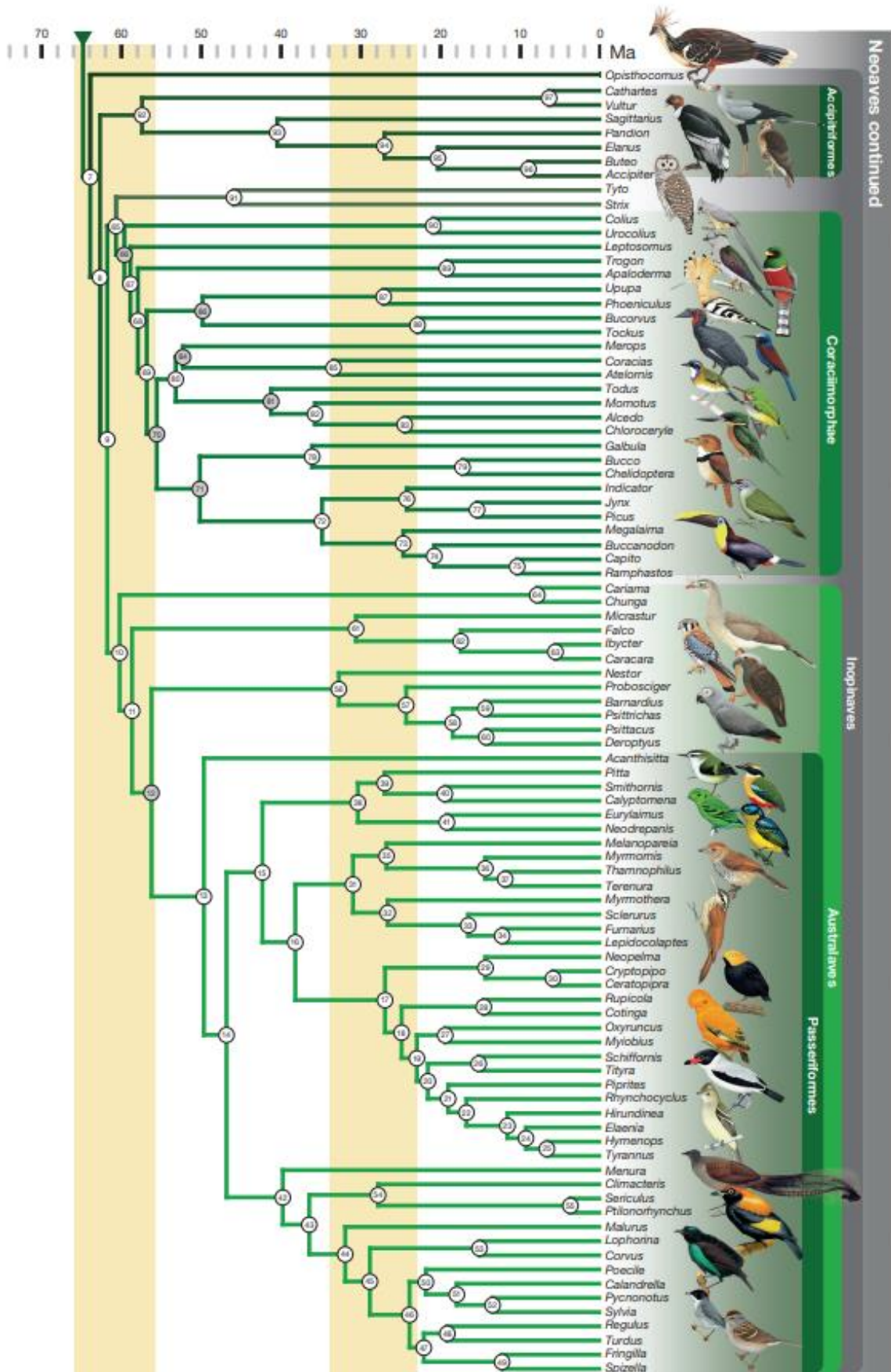
Alguns aspectos associados aos estudos com aves podem gerar dificuldades para a produção de árvores filogenéticas, tais como a diversidade de espécies amostradas, os métodos filogenéticos, as regiões genômicas utilizadas e os eventos evolutivos complexos, como a hibridização antiga (STILLER, *et al.*, 2024), limitando assim a total compreensão de diversidade e evolução entre as linhagens (FENG, *et al.*, 2020), principalmente das aves modernas (STILLER, *et al.*, 2024). Estudos mais recentes revelam novas relações entre os grupos de aves. No trabalho de Stiller e colaboradores (2024), uma nova árvore filogenética foi descrita, a partir de dados obtidos de 63.430 *loci* intergênicos (regiões que apresentam menores forças de seleção), integrando 92% do total de diversidade de famílias taxonômicas e suportando 363 espécies. Na figura 2, observa-se a comparação da nova árvore filogenética (à esquerda) com a árvore filogenética descrita por Prum, *et al.*, 2015 (à direita) (STILLER, *et al.*, 2024).

Figura 1. Filogenia representativa e ilustrativa da Árvore da Vida de Aves



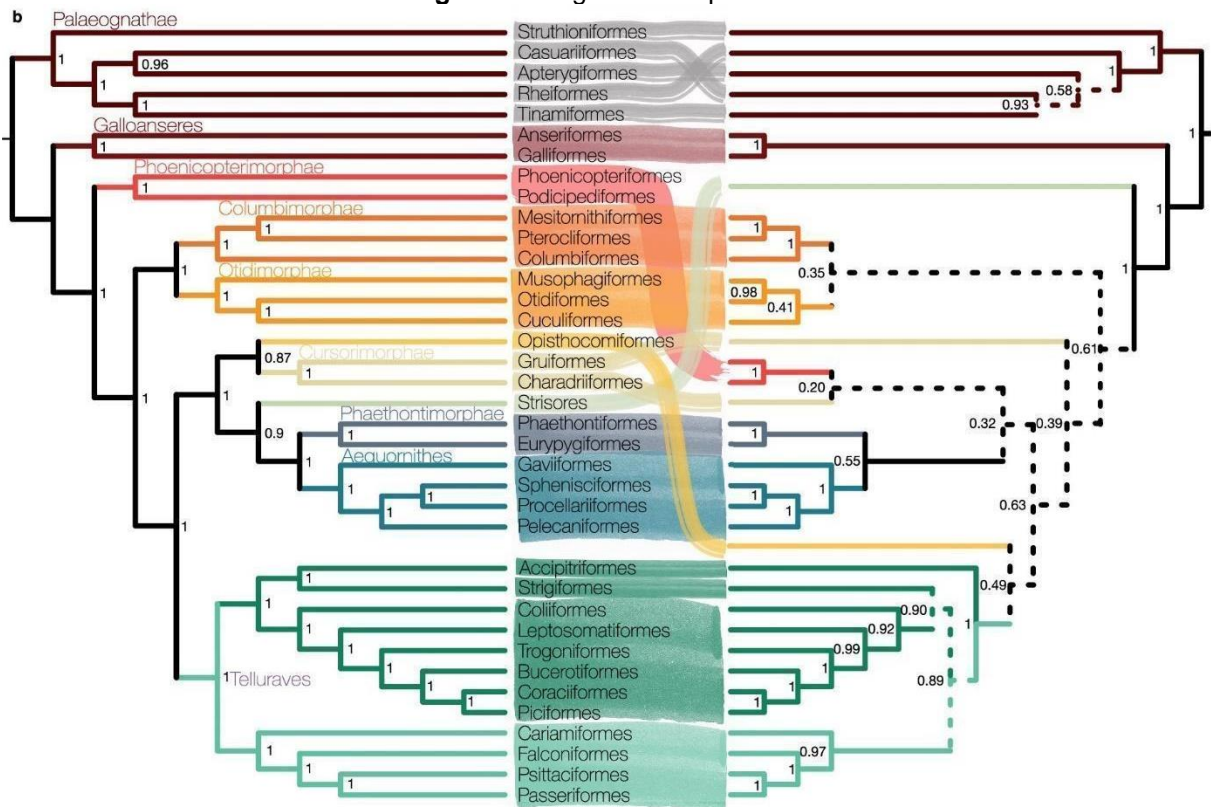
Fonte: adaptada de Prum, et al., (2015).

Figura 1. Filogenia representativa e ilustrativa da Árvore da Vida de Aves (continuação)



Fonte: adaptada de Prum, et al., (2015).

Figura 2. Filogenias comparadas



Fonte: adaptada de Stiller, *et al.* (2024).

Legenda: comparação entre a árvore filogenética de Prum, *et al.* (2015) (direita) e Stiller, *et al.* (2024) (esquerda).

Buscando correlacionar tais árvores filogenéticas descritas, uma das principais elucidções citadas está associada aos ajustes dos grupos comparando com suas características morfológicas (STILLER, *et al.*, 2024). Esse ajuste de concordância entre a nova topologia e a morfologia dos indivíduos (STILLER, *et al.*, 2024), auxilia no entendimento da grande diversidade de espécies, assim como diversidade em comportamento e dimorfismo (PRUM, *et al.*, 2015; WINK, 2021), demonstrando a maior explosão em diversidade e separação morfológica associada aos períodos históricos (STILLER, *et al.*, 2024).

1. 2 Gonocorismo e dimorfismo sexual em aves

Assim como diversas espécies do reino animal, as aves também apresentam um comportamento/aspecto denominado gonocorismo: característica individual em existir como apenas um dos sexos, ou seja, fenômeno de apresentação como espécime exclusivamente feminina ou masculina (HOLUB & SHACKELFORD, 2022). Dentro de tal característica, destaca-se a produção de gametas nos sexos separados,

havendo assim a necessidade de combinação de dois gametas distintos para a produção de um indivíduo. Essas combinações genéticas e morfológicas geram uma gama de informações e abundância de diversidade, fazendo com que ambos os sexos assumam diferentes espaços dispostos ecologicamente. As diferenças entre os gametas aplicam-se também em diferentes nichos, ou papéis, ocupados pelos dois tipos sexuais de indivíduos da mesma espécie, seja comportamental, social, morfológico ou outros (HOLUB & SHACKELFORD, 2022), denominado dimorfismo sexual (DS) (WINK, 2021).

O DS é um fenômeno de diferenciação morfológica, estrutural, fisiológica e molecular entre os sexos biológicos de organismos da mesma espécie. Essas características podem ser observadas em diferentes espécies das mais variadas linhagens animais existentes (LOVICH & GIBBONS, 1990; KOHLRAUSCH, *et al.*, 2003; AVELAR, 2007; REZENDE-PINTO, 2007; MESQUITA, *et al.*, 2010; MAROCHI, *et al.*, 2016). O DS surgiu através de um longo processo de desenvolvimento progressivo de fatores ligados ao sexo e sofreu aprimoramento por meio da seleção natural (VALENZUELA, 2009). O dimorfismo pode se apresentar de forma distinta nas diferentes espécies, abrangendo desde insetos até mamíferos e, ainda, sofrer alterações provocadas pelo ambiente ou em resposta a várias substâncias. Sendo assim, vale ressaltar que tais características não podem ser consideradas universais, pois sofrem influência de fatores externos (LOVICH & GIBBONS, 1990; BECKER, 2016).

Geralmente, as diferenças entre os sexos são mais aparentes na morfologia, sendo a característica mais acometida pelo DS, mas existem características anatômicas intrínsecas, como a determinação do processo estrutural de algum órgão, ou então características moleculares, que não apresentam expressão fenotípica visível. Também pode-se observar diversidades em tamanho e massa corporal, vocalização, coloração e características corporais associadas ao desempenho social dos indivíduos, representando uma fascinante manifestação da diversidade biológica (LOVICH & GIBBONS, 1990; AVELAR, 2007; REZENDE-PINTO, 2007; MESQUITA, *et al.*, 2010; MAROCHI, *et al.*, 2016). Alguns dos exemplos mais memoráveis de DS são observados nas aves (figura 3).

Figura 3. DS morfológico acentuado

Fonte: adaptadas de Dick Daniels, 2014; Luiza Mallmann, 2020; Patrícia Nicoloso, 2022; Rafael Boni, 2022.

Legenda: (A) *Anas clypeata*; (B) *Procnias nudicollis*; (C) *Rauenia bonariensis*.

O DS em aves exibe um papel ecológico notório, sendo utilizado como forma de conquista em processos de acasalamento, reconhecimento de tons na plumagem indicando parentesco, sobrevivência em ambientes de predação e estratégias de forrageamento e caça (DUNN, *et al.*, 2001; VAN DAMME, *et al.*, 2008; IGIC, *et al.*, 2010; MESQUITA, *et al.*, 2010; MAGGI, 2017). Alguns parâmetros de DS são mais facilmente distinguíveis a olho nu, e, portanto, utilizados para comparação entre os sexos de uma determinada espécie. Um exemplo é o tamanho corporal, visto que a massa corporal feminina pode sofrer variações devido aos períodos de oviposição. Dongmo e colaboradores (2015), relatando a discussão de diferenças em massa corporal entre os sexos de *Andropadus latirostris* - protônimo de *Eurillas latirostris*, ou seja, primeiro nome legítimo de um táxon (AVIBASE, sem data) - enfatizam que a análise do comprimento da asa deve ser utilizada como caractere mais confiável para distinção de tamanho corporal, principalmente levando em consideração as mudanças ocasionadas nos períodos de reprodução. Ainda, os autores destacam que indivíduos da mesma espécie podem apresentar DS distinto quando comparados a grupos

geograficamente separados. No caso de *A. latirostris*, além do DS aparente em tamanho corporal dos machos, relacionado à competitividade masculina, os indivíduos também se diferem quanto ao tamanho do bico, quando são comparadas as duas regiões geográficas de estudo: Camarões e Gana (DONGMO, *et al.*, 2015).

Apesar do DS ser amplamente difundido entre as espécies de aves, pode-se considerar ainda o comportamento reprodutivo como um fator de influência na seleção sexual e, conseqüentemente, no dimorfismo entre os sexos. Ou seja, espécies de aves que apresentam comportamentos monogâmicos geralmente sofrem pressões de seleção sexual menor quando comparadas a espécies de aves não monogâmicas. Sendo assim, recursos associados a tamanho corporal, vocalização e plumagem, podem ser mais evidentes em espécies com maior competição associada ao acasalamento e dispersão de material genético (DONGMO, *et al.*, 2015; VALCU, *et al.*, 2023). Um exemplo de ave monogâmica que apresenta pouco ou nenhum DS é o grou-comum, de espécie *Grus grus* (ALONSO, *et al.*, 2019). Essa espécie, com comportamentos de exclusividade em pares para reprodução, apresenta plumagem com coloração sem distinção entre os sexos, tendo como DS apenas uma leve diferença em relação ao tamanho e massa corporal (figura 4A) (ALONSO, *et al.*, 2019). Ainda que aves com comportamento monogâmico apresentem distinções, principalmente relacionadas ao tamanho corporal (VALCU, *et al.*, 2023), as variações em plumagem extravagantes estão majoritariamente associadas à competição sexual por parceiros (DARWIN, 2018; VALCU, *et al.*, 2023). Outro exemplo, são as araras-canindé, caracterizadas por comportamentos monogâmicos, o qual pode perdurar todo período fértil da vida de cada indivíduo, contribuindo para o sucesso reprodutivo da espécie (PEREIRA, *et al.*, 2021). Essa espécie de araras, como muitos outros Psittacidae, não apresenta DS aparente entre os sexos, sendo necessária a realização de sexagens moleculares, principalmente quando há intenção de reinserção desses animais na natureza (PEREIRA, *et al.*, 2021). Enquanto isso, aves como os tangarás (*Chiroxiphia caudata*), descritos por seus comportamentos sexuais não monogâmicos, apresentam um DS mais aparente, o que pode ser caracterizado pela competitividade, onde o macho apresenta danças, exibindo sua plumagem e vocalização para seleção sexual, realizada pelas fêmeas (figura 4B) (BOBATO, 2014).

Além desse fator comportamental e social, outros fatores sociocomportamentais também afetam diretamente o DS de aves, entre eles destacam-se o comportamento migratório (DONGMO, *et al.*, 2015; VALCU, *et al.*,

2023) e padrões sazonais (REZENDE-PINTO, 2007; THOMÉ, *et al.*, 2007). Fêmeas de Parulidae representam um bom exemplo de adaptação nas cores da plumagem ocasionada pelo comportamento migratório como uma ferramenta de defesa contra a predação que pode ocorrer durante o trajeto percorrido (SIMPSON, *et al.*, 2015).

Algumas espécies, por outro lado, não apresentam nenhuma diferença visível entre os indivíduos dos diferentes sexos (figura 4C) (AVELAR, 2007). Algumas aves, por exemplo, são caracterizadas pelo DS inexistente, ou então, diferenças não visíveis a olho nu, em suas fases imaturas e adultas (AVELAR, 2007; MAGGI, 2017). Como a capacidade visual de aves se distingue do ser humano, algumas nuances na coloração da plumagem entre os organismos podem não ser percebidas, dificultando a distinção dos sexos desses animais (MAGGI, 2017). Ainda, em algumas espécies, a diferença ou especialização na coloração da plumagem pode ocorrer apenas na fase adulta, como no caso de *Psittacula krameri*. Nessa espécie, os machos adultos apresentam um colar avermelhado ao redor do pescoço, enquanto as fêmeas não sinalizam nenhuma marcação (SABAT, *et al.*, 2016) (figura 4D). Em casos de ausência de DS, ou presença de dimorfismo não visível a olho nu, existem metodologias que utilizam raios UV em plumagens para verificar as diferenças entre os sexos (CUTHILL, *et al.*, 1999). Ainda, técnicas não invasivas de identificação de canto dos pássaros, separados ou em duetos, podem ser utilizadas com alta confiabilidade, tanto por audição, quanto por análise espectrográfica, como no caso do *Dendrocygna viduata*, *Fulica americana* e *Streptopelia decaocto*, os quais não apresentam DS visível (VOLODIN, *et al.*, 2015) (figuras 4E, 4F e 4G, respectivamente).

Independente do DS externo de machos e fêmeas, internamente o sistema reprodutor é único para cada sexo, sendo que o masculino produz espermatozoides que serão depositados no corpo da fêmea, uma vez que a fecundação é interna. As pesquisas acerca do sistema reprodutor de aves, bem como seu desenvolvimento e regulação molecular, utilizam como seu principal animal modelo a galinha doméstica (*G. gallus*), conforme é trazido nos itens a seguir.

Figura 4. Aves com e sem DS aparente



Fonte: adaptadas de Ingrid Tylar, 2013; Rodrigo Conte, 2013; Carlos Moura, 2018; Criação de Animais, 2018; Andy Hay/Rspb *In Wilder*, 2020; Daniel Sosa Ruiz, 2020; BGENET, 2022.

Legenda: (A) *Grus grus* sem DS; (B) DS em *Chiroxiphia caudata* com macho à esquerda e a fêmea à direita; (C) casal de *Anas fulvigula* sem DS; (D) *Psittacula krameri* com DS; (E) *Dendrocygna viduata* sem DS; (F) *Fulica americana* sem DS; (G) *Streptopelia decaocto* sem DS.

1.3 O sistema reprodutor das aves

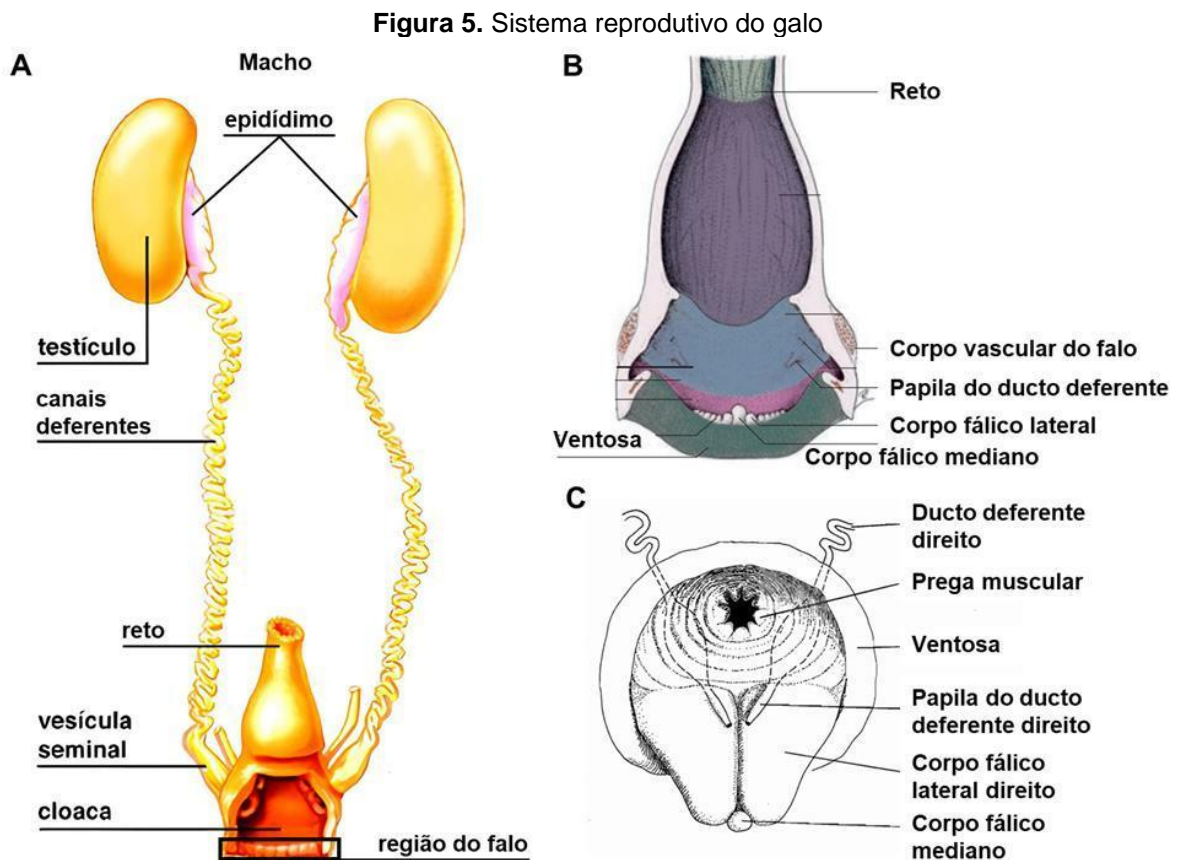
1.3.1 Sistema reprodutor dos machos

O sistema reprodutor de galos (figura 5A) é composto de dois testículos dispostos dentro da cavidade abdominal, próximos aos rins (SILVA, 2020). São órgãos ovais, que variam de tamanho segundo a estação, clima, idade e época reprodutiva (KÖNIG, *et al.*, 2016). Eles produzem espermatozoides e hormônios sexuais, principalmente testosterona. Os espermatozoides produzidos nos testículos são armazenados e maturados nos epidídimos (pequenos ductos, representados em rosa

claro na figura 5A), que estão conectados diretamente aos testículos (DA ROCHA JUNIOR, 2007).

Do epidídimo saem os ductos deferentes (figura 5A) (SILVA, 2020), que são tubos longos e enrolados, passando ao longo do comprimento do corpo do galo, sendo o primeiro local de armazenamento de espermatozoides. Esses ductos deferentes desembocam na cloaca, caracterizada por ser a saída comum tanto para o sistema reprodutivo como digestivo e urinário das aves (figura 5A) (RUTZ, *et al.*, 2007).

Na extremidade caudal da cloaca, e não aparente em repouso, é encontrado um aparelho copulatório rudimentar (figura 5B), não tão desenvolvido como o de mamíferos, que ajuda na transferência de espermatozoides para a fêmea. Essa estrutura é composta de um falo (figura 5C), que possui um corpo fálico mediano e duas papilas laterais, chamadas de corpos fálcos laterais. Para formar uma pequena ereção, uma linfa é produzida inchando as papilas. Ainda assim, durante a cópula, o falo não penetra na cloaca da galinha, mas esta se abre, expondo a extremidade do oviduto onde o sêmen é depositado (ROMÃO, 2011; SILVA, 2020).



Fonte: adaptadas de King, 2002; Societat Ornitològica Amics Del Vendrell, 2014; König, *et al.*, 2016.
Legenda: (A) Esquema do aparelho reprodutivo do galo; (B) Localização mais detalhada do aparelho copulatório; (C) Falo.

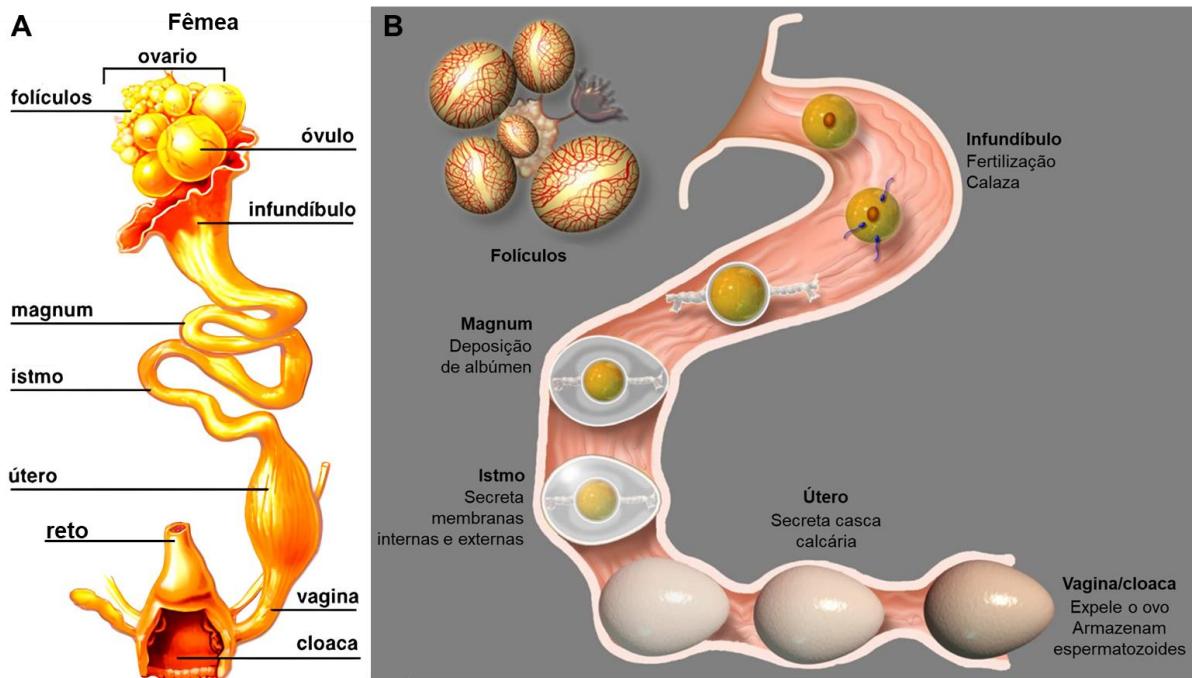
1.3.2 Sistema reprodutor das fêmeas

O sistema reprodutor de galinhas (figura 6A) é altamente eficiente e adaptado para a produção contínua de ovos, sendo um processo cíclico que pode ocorrer quase diariamente durante o período de postura. O sistema reprodutor feminino inclui o ovário esquerdo, único funcional nas galinhas adultas (SILVA, 2020), que consiste em vários folículos de tamanhos diferentes, contendo os ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento. O ovário se comunica com a cloaca através de um tubo chamado oviduto, no qual o óvulo passa até a cloaca. Ele é dividido em várias partes com funções específicas: o infundíbulo, com formato de funil que captura o óvulo liberado do ovário e é onde ocorre a fertilização se houver espermatozoides presentes, bem como a formação da calaza (membrana fibrosa, esbranquiçada, que auxilia na estabilização da gema de forma centralizada na clara); o magnum, a parte mais longa do oviduto que secreta a clara (albumina) do ovo; o istmo, a parte mais curta do oviduto, que secreta as membranas internas e externas da casca do ovo; o útero, que secreta a casca calcária do ovo; e a vagina, parte final do oviduto antes da cloaca, que tem função de transportar o ovo para fora (figura 6B) (FREITAS, *et al.*, 2011).

A cloaca é a câmara onde o ovo é expelido pelo corpo da galinha e, como no macho, serve de saída comum para o sistema reprodutivo, digestivo e urinário. Na junção útero-vaginal existem glândulas hospedeiras que armazenam espermatozoides após a cópula, por três a quatro semanas, permitindo a fertilização de múltiplos ovos ao longo do tempo (RUTZ, *et al.*, 2007).

No caso da galinha, sua reprodução é por ovoviviparidade, ou seja, o embrião se desenvolve, no início, dentro do aparelho reprodutor da fêmea e posteriormente é expelido pela cloaca, completando seu desenvolvimento de 21 dias fora do corpo da mãe (SILVA, 2020).

Figura 6. Sistema reprodutivo de galinha



Fonte: adaptadas de Societat Ornitològica Amics Del Vendrell, 2014; Veterinary Histology, 2017.
Legenda: (A) Esquema do aparelho reprodutivo da galinha; (B) Oviduto e formações de estruturas.

1.3.3 Desenvolvimento do sistema reprodutor das aves

O desenvolvimento do sistema reprodutor das aves é marcado por uma série de processos biológicos que determinam o sexo e influenciam o desenvolvimento das gônadas. O mecanismo central que controla o desenvolvimento sexual é cromossômico e, diferente dos mamíferos, nas aves o sexo é determinado por um sistema ZW: as fêmeas possuem dois cromossomos sexuais diferentes (ZW) e os machos têm dois cromossomos idênticos (ZZ) (CLINTON & HAINES, 1999). A fêmea heterogamética, com o cromossomo W, desempenha um papel crucial na determinação do sexo, enquanto os machos homogaméticos, com a presença de dois cromossomos Z, resultam no desenvolvimento masculino (figura 7) (CLINTON & ZHAO, 2023). Esse sistema de determinação sexual e os cromossomos Z e W serão mais amplamente discutidos adiante, no item 1.4.

O sistema reprodutor tem origem no mesoderma intermediário (figura 8A), semelhante ao sistema urinário, com o qual está interligado (HIRST, *et al.*, 2018). No terceiro dia de desenvolvimento, as cristas urogenitais, provenientes do mesoderma intermediário, se projetam da parede do corpo para a cavidade peritoneal (figura 8B), formando os ductos mullerianos e os ductos de Wolff entre os dias 4,0 e 4,5. As células

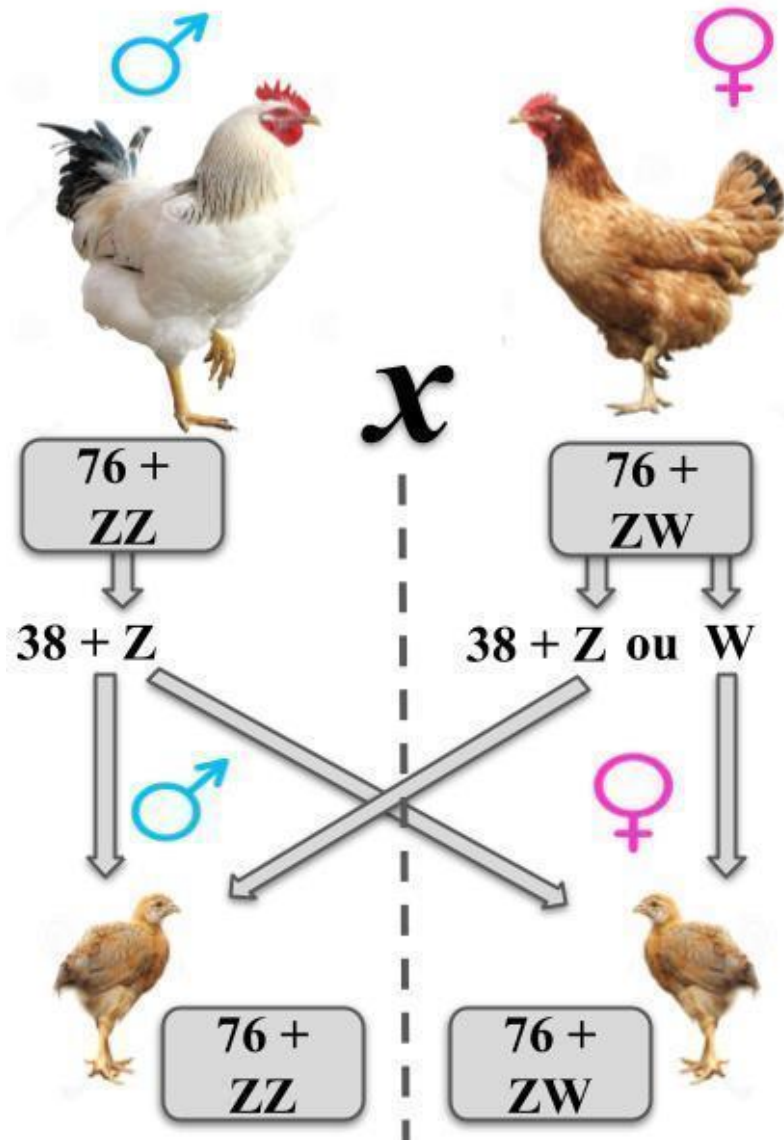
germinativas primordiais, ou suas células precursoras, que darão origem aos gametas, estão presentes desde o início do desenvolvimento do embrião, e são provenientes da área pelúcida da região do blastoderme. Elas entram no sistema vascular e, aproximadamente no dia 3,5, colonizam as gônadas em formação (YAMAMOTO, *et al.*, 2007; HIRST, *et al.*, 2018; ROLY, *et al.*, 2020), e lá expandem em número (figura 8C). Esse ainda é um estágio indiferenciado, sendo indeterminado se a gônada se desenvolverá em testículo ou ovário. No dia 5, a proliferação de células epiteliais, invadindo o estroma mesenquimal, dá origem aos cordões sexuais primários (figura 8D). A partir do dia 6, inicia a diferenciação sexual das gônadas (BELLAIRS & OSMOND, 2014; CLINTON & ZHAO, 2023).

Em machos, no quinto dia, os cordões sexuais primários formam os cordões testiculares, e os túbulos de Wolff provenientes do sistema urinário se conectam formando o rete testis (ou rede testicular) (figura 8E). Essa conexão não ocorre na fêmea. Nos dias 7-8, os ductos mullerianos começam a degenerar simultaneamente na direção caudal-cranial, desaparecendo no dia 12,5 (figura 8F). Além disso, no dia 13 as células germinativas primordiais, dentro das gônadas, iniciam a divisão e diferenciação em espermatogônias (BELLAIRS & OSMOND, 2014; IMAIMATSU, *et al.*, 2022; TAN, *et al.*, 2024).

Após o dia 20, os cordões sexuais primários, que formam os cordões testiculares, se canalizam e formam os túbulos seminíferos. Posteriormente, a rede testicular fornece passagem para os espermatozoides dentro dos túbulos seminíferos para os túbulos mesonéfricos ou de Wolff, que, por sua vez, formam o epidídimo. O ducto de Wolff já não cumpre a função de ducto excretor e se torna o ducto deferente, que transporta os espermatozoides para a cloaca (figura 8G) (BELLAIRS & OSMOND, 2014; MURASHIMA, *et al.*, 2015).

Nas fêmeas, as células germinativas primordiais, que entraram nas gônadas por volta do dia 3,5, a partir do dia 10, sofrem morte celular diferencial em ambas as gônadas, sendo maior na direita, atrofiando o ovário (BELLAIRS & OSMOND, 2014) (figura 8H). Nos dias 7-8, os cordões sexuais primários nas fêmeas se expandem, formando a medula do ovário. Outro cordão, o sexual secundário, também proveniente das células epiteliais, se torna o córtex (figura 8I). No dia 7, as células germinativas primordiais presentes no córtex se diferenciam em oogônias.

Figura 7. Determinação do sexo em machos homogaméticos e fêmeas heterogaméticas

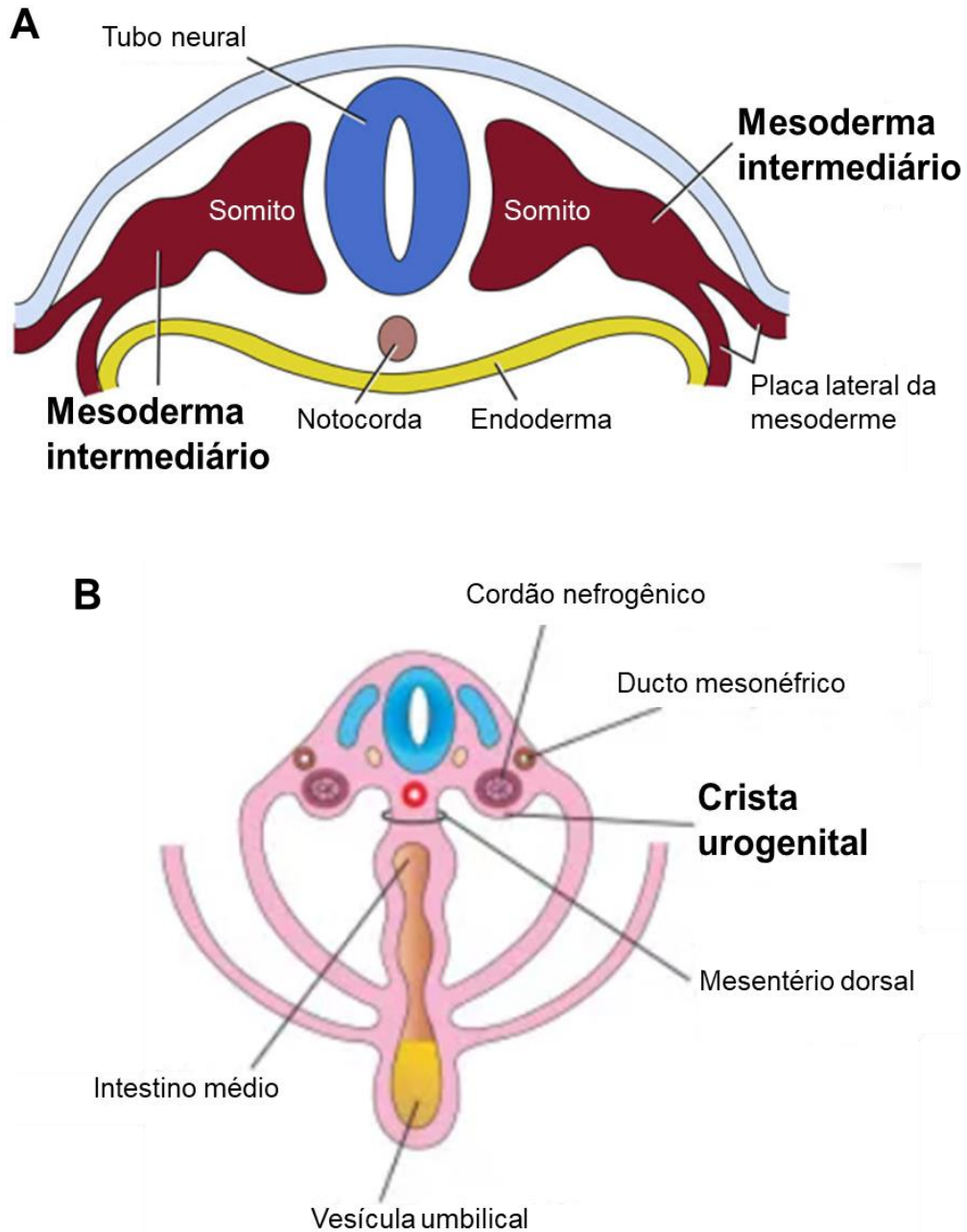


Fonte: a autora.

Legenda: adultos apresentam 76 cromossomos autossômicos + dois cromossomos sexuais e geram gametas contendo 38 cromossomos autossômicos + um cromossomo sexual. A junção dos dois gametas, geram novos indivíduos.

No dia 8, o ducto mulleriano direito da fêmea começa a degenerar, desaparecendo no dia 18 (figura J). Por volta do dia 11, o ducto mulleriano esquerdo na fêmea modifica-se em óstio, regiões glandulares e glândula da casca, com fusão à cloaca (BELLAIRS & OSMOND, 2014).

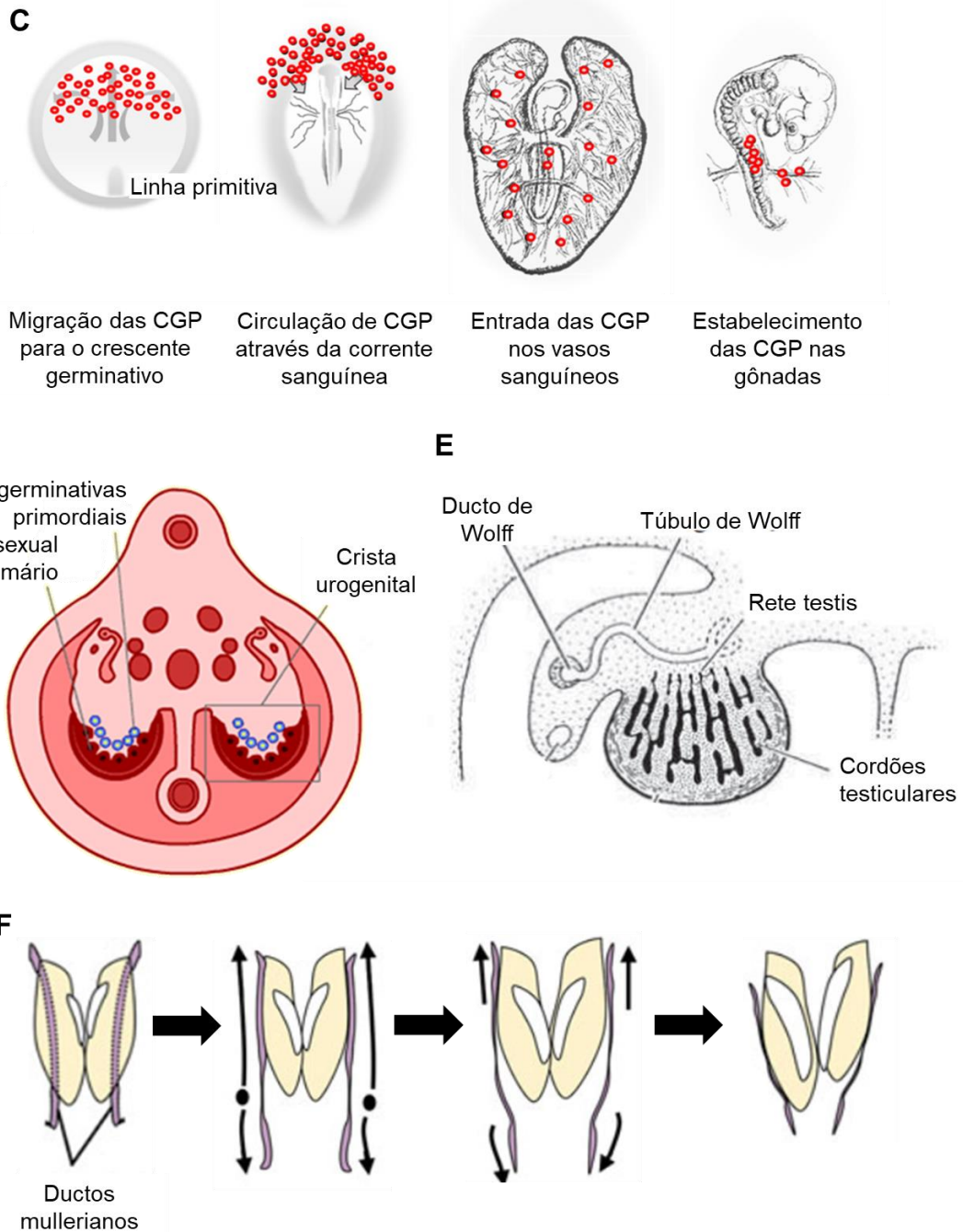
Figura 8. Desenvolvimento embrionário do sistema reprodutor



Fonte: adaptadas de Schoenwolf, *et al.*, 2014.

Legenda: (A) Corte transversal do embrião em desenvolvimento inicial, mostrando diversas estruturas, com ênfase no mesoderma intermediário; (B) Corte transversal mostrando a posição da crista urogenital.

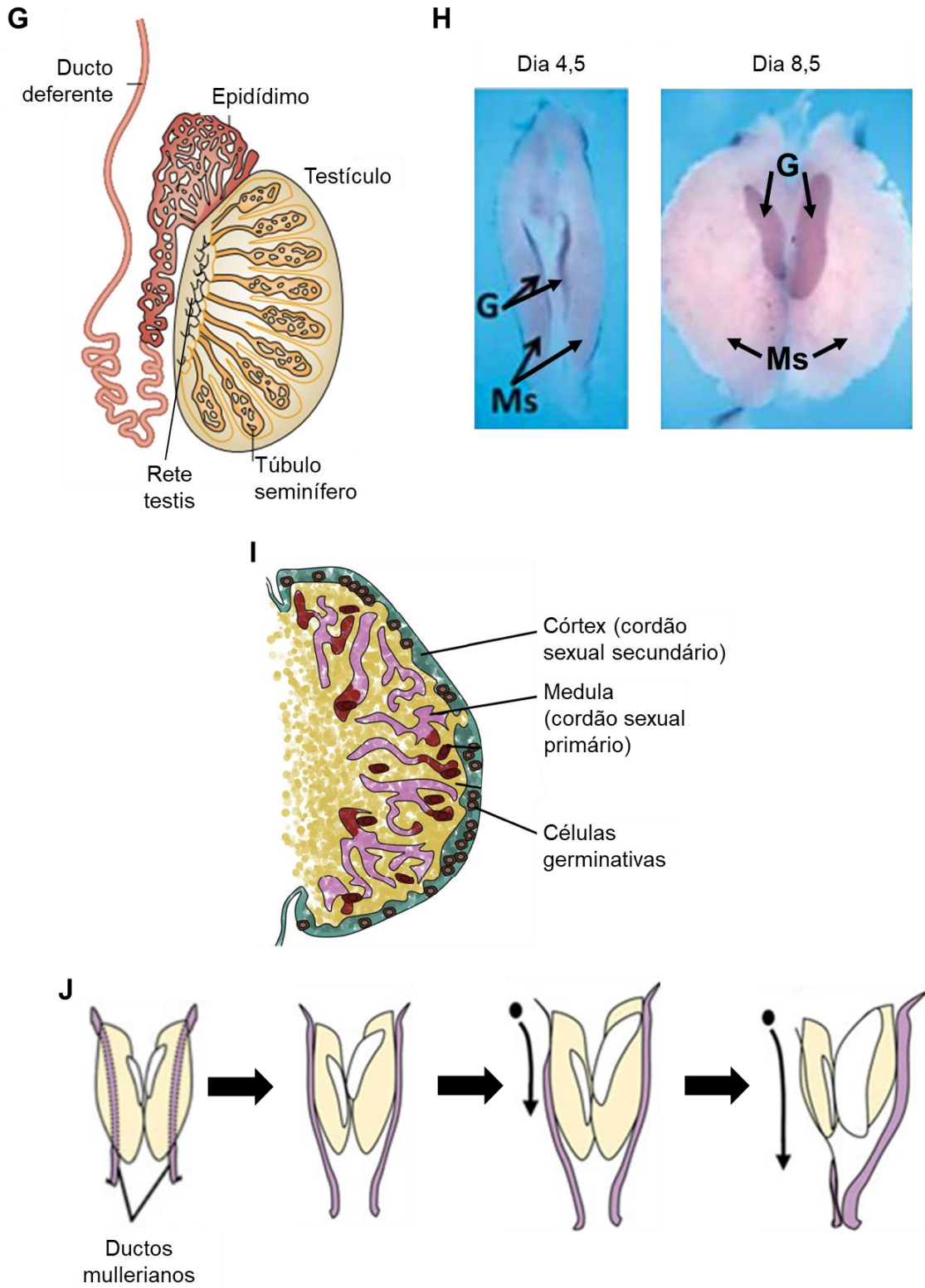
Figura 8. Desenvolvimento embrionário do sistema reprodutor (continuação)



Fonte: adaptadas de WGBH Educational Foundation, 2001; Gilbert, 2003; Kim & Han, 2018; Tan, *et al.*, 2024.

Legenda: **(C)** Migração das células germinativas primordiais (CGP) em quatro fases do desenvolvimento até o estabelecimento nas gônadas; **(D)** Localização dos cordões sexuais primários; **(E)** Formação da rete testis envolvendo o túbulo de Wolff e os cordões testiculares; **(F)** Degeneração caudal-cranial dos ductos mullerianos.

Figura 8. Desenvolvimento embrionário do sistema reprodutor (continuação)



Fonte: adaptadas de Cooke & Saunders, 2002; Major & Smith, 2016; Estermann, *et al.*, 2020; Tan, *et al.*, 2024.

Legenda: **(G)** Estruturas formadas envolvidas na passagem dos espermatozoides para a cloaca; **(H)** Desenvolvimento diferencial das gônadas (G) femininas, também mostrando o rim mesonéfrico (Ms); **(I)** Medula e córtex formados pelos cordões sexuais primário e secundário; **(J)** Degeneração do ducto mulleriano direito.

1.4 Sistemas cromossômicos de determinação sexual

Todo o complexo processo de evolução dos cromossomos sexuais levou ao surgimento de indivíduos com carga cromossomal diferente entre os dois sexos, sendo um deles heterogamético (XY ou ZW) e outro, homogamético (XX ou ZZ) (KAISER & BACHTROG, 2010). Além dos sistemas de determinação sexual XY e ZW, existem outros sistemas que podem influenciar no desenvolvimento sexual do embrião, ou então, mais de um sistema de determinação sexual trabalhando em conjunto, como no caso de alguns anfíbios (MALTEMPI, 2017). No presente trabalho, iremos ressaltar algumas características e informações relevantes levando em consideração apenas os sistemas de determinação sexual XY e ZW, visto que são os mais estudados para fins de sexagem.

1.4.1 Sistema XY de determinação sexual

O sistema de determinação sexual XY é o mais estudado por ser aquele apresentado pelos mamíferos. Nesse caso, os indivíduos fêmeas apresentam duas cópias do cromossomo X (homogamético), enquanto os indivíduos machos apresentam uma cópia do cromossomo X e uma cópia do cromossomo Y (heterogamético) (SOUZA, 2003). Considera-se, portanto, que o cromossomo X é caracterizado por conter informações relacionadas ao desenvolvimento de características femininas, ao passo que o cromossomo Y é associado às características masculinas (SCOTT, 2014). Sabe-se que alguns *loci* ligados aos cromossomos sexuais podem gerar uma expressão distinta de fatores ou antígenos entre fêmeas e machos (MIGNEROT & COELHO, 2016; ROSSETTI, 2016).

Em seu trabalho, Muller (1996) demonstrou, através da rejeição de implantes teciduais entre indivíduos machos e fêmeas, a existência de um antígeno denominado HY (gene *Smcy*, proveniente do cromossomo Y) em diferentes tecidos de indivíduos machos. As fêmeas que receberam o transplante sofreram rejeições através das células T citotóxicas ao identificarem o antígeno HY (MULLER, 1996). Adicionalmente, sabe-se que o antígeno HY é conservado entre diferentes grupos de mamíferos, como os humanos, e novas pesquisas envolvendo sua função, conservação e utilização para sexagem, vêm sendo realizadas (MULLER, 1996; DAMIANI, *et al.*, 2000; MATTA, 2003; SOUZA, 2003).

No cromossomo Y, encontram-se diferentes genes, ligados ou não à diferenciação sexual do embrião. O gene *Sry*, por exemplo, está diretamente associado ao aparecimento de características masculinizantes no indivíduo, e pode ser considerado um dos fatores principais desse processo (ROSSETTI, 2016). O *Sry*, que começa a ser expresso nas células pré-Sertoli, é responsável por ativar a expressão do gene *SOX9*, também importante para o desenvolvimento testicular, e induz a diferenciação de células pré-Sertoli em células de Sertoli. Essas células passarão por diversas transformações, formando os cordões testiculares que envolvem as células germinativas. Outras cascatas de genes são ativadas, como *DMRT1*, *AMH*, *SOX8* e *9*. Nas gônadas da fêmea, com a falta de *Sry*, outros genes são regulados positivamente, como o *WNT*, *WNT4* e *RSPO1*, assim como *FOXL2*, *TGFβ* e *FST* que diferenciam as células da granulosa até o início da foliculogênese (JIMÉNEZ, *et al.*, 2021; OKASHITA & TACHIBANA, 2021).

1.4.2 Sistema ZW de determinação sexual

De forma inversa ao sistema XY de determinação sexual, no sistema ZW observa-se a presença de dois cromossomos diferentes nas fêmeas: uma cópia do cromossomo Z e uma cópia do cromossomo W (HANDLEY, *et al.*, 2004). Ou seja, nesse sistema os indivíduos heterogaméticos são as fêmeas, enquanto os indivíduos machos apresentam duas cópias do cromossomo Z (homogamético) (HANDLEY, *et al.*, 2004). Da mesma forma que nos mamíferos, os cromossomos sexuais também apresentam uma expressão de genes diferente ou um gradiente de expressão distinto entre os dois sexos (ELLEGREN, 2001). Entretanto, a maior parte dos cromossomos sexuais Z e W estão na forma condensada (heterocromatina), porém, possuem grande importância na expressão de cascatas de genes ligados à formação de gônadas e desenvolvimento embrionário (ROSSETTI, 2016). Existem poucos estudos sobre as características e funcionalidades do cromossomo W, e considera-se que a determinação entre os sexos poderia ser realizada através de um gradiente de concentração proveniente do cromossomo Z (WALDRIGUES, 1982; ROSSETTI, 2016). O gene *DMRT1*, localizado no cromossomo Z, seria o mais indicado para a determinação sexual, pois, em comparação com o embrião fêmea, é expresso em altos níveis no embrião macho. Com dois alelos, cria-se uma “dose dupla” para que as gônadas se desenvolvam em testículos. Em contrapartida, o cromossomo W, com

o tamanho reduzido, não possui um gene determinante muito claro, portanto, até o momento, não parece ter função nessa determinação (CLINTON & ZHAO, 2023).

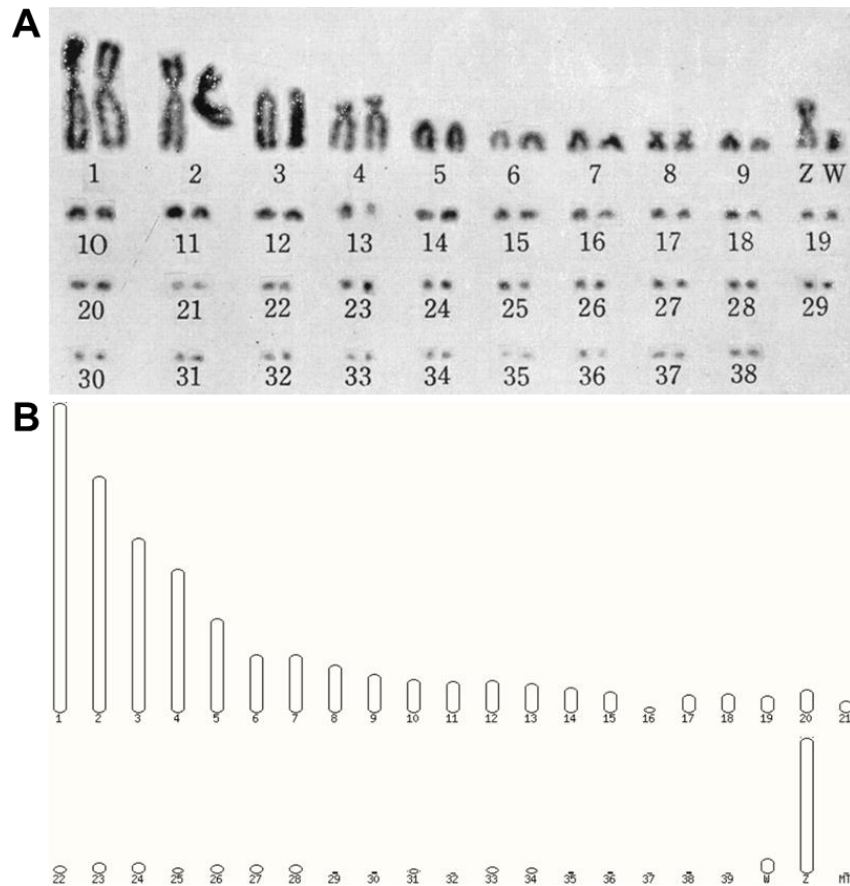
1.4.3 Os cromossomos Z e W

Segundo dados do NCBI (VERTEBRATE GENOMES PROJECT, 2021), *G. gallus* contém 38 pares de cromossomos autossômicos e um par de cromossomos sexuais (figura 9). Atualmente, esses cromossomos são caracterizados em 9 macrocromossomos (maiores que 35 Mb na montagem do genoma), incluindo o Z, e 30 microcromossomos (menores que 30 Mb). Desses cromossomos, 28 são telocêntricos, e o restante são metacêntricos e submetacêntricos (ADEMOLA, *et al.*, 2020; SMITH, *et al.*, 2023). Ainda, existe uma classificação para os microcromossomos de tamanho menor (média 3,9 Mb), conhecidos como cromossomos dot, que, no caso de *G. gallus* são numerados como: 16, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37 e 38. Eles são caracterizados pelo alto teor de GC, maior densidade de genes e um nível elevado de metilação do DNA. São frequentemente enriquecidos com genes de manutenção celular, conhecidos como genes *housekeeping*, que codificam proteínas com funções essenciais para o organismo, como o metabolismo, síntese de proteínas, reparo do DNA, estabilidade genômica e transporte de moléculas (HUANG, *et al.*, 2023).

No núcleo celular, os microcromossomos interagem frequentemente entre si e se agrupam. Consequentemente, eles estão em menor contato com os macrocromossomos, diminuindo a probabilidade de fusão com eles (SMITH, *et al.*, 2023). Devido às características de riqueza, de CG e densidade gênica, as montagens genômicas dos microcromossomos eram complexas e tinham diversas lacunas. Atualmente, foi possível identificar essas regiões, graças a utilização de leituras longas (SMITH, *et al.*, 2023).

Segundo dados encontrados no Ensembl (2024), pode-se contabilizar no genoma de *G. gallus* 1.053.332.251 pares de bases. Quanto à contagem de genes, são preditos 17.007 genes codificadores, 13.040 genes não codificantes (sendo 1.089 pequenos genes não codificantes, 11.946 genes longos não codificantes e 5 genes diversos não codificantes). Além disso, contabiliza-se 61 pseudogenes e 72.689 transcrições gênicas, que podem ou não codificar uma proteína.

Figura 9. Cromossomos da *G. gallus*



Fonte: Takagi & Makino, 1966; Ensembl, 2024.

Legenda: pares de cromossomos autossômicos e o par sexual: **(A)** corado com Giemsa e **(B)** virtual.

Os cromossomos Z e W também possuem diferenças de tamanho, assim como o X e o Y de mamíferos. No caso dos mamíferos, o cromossomo X compreende cerca de 7% do genoma, sendo um dos macrocromossomos, contrastando com o microcromossomo W, no caso das aves, que ocupa aproximadamente 1,5% (CLINTON & HAINES, 1999).

Pouco é conhecido sobre a total constituição, funcionalidade dos genes presentes nos cromossomos sexuais de aves e fatores de determinação sexual dos indivíduos, devido à numerosa quantidade de regiões repetitivas e/ou conservadas em heterocromatina (ROSSETTI, 2016). Os cromossomos sexuais podem se apresentar de formas distintas em diferentes espécies. Por exemplo, os cromossomos sexuais Z e W de aves pertencentes ao grupo das ratitas apresentam muita similaridade entre si quando comparados a outras aves. Enquanto a maior parte dos grupos de aves apresentam o cromossomo sexual W com menor tamanho e predominantemente heterocromático em comparação ao cromossomo Z, as ratitas

apresentam cromossomos Z e W cariologicamente indistinguíveis ou levemente distintos (SCHARTL, 2004).

Almejando conhecer melhor a evolução e características dos cromossomos de aves, em especial o par de cromossomos sexuais, Marriadassou e colaboradores (2021) realizaram o sequenciamento do material genético de diferentes espécies do gênero *Gallus* e realizaram análises filogenéticas com o DNA cromossomal e DNA mitocondrial. A topologia da árvore filogenética produzida através da análise dos cromossomos autossômicos em relação aos cromossomos sexuais indicou um comportamento distinto entre eles em relação aos indicativos de evolução presentes nesses materiais genéticos, assim como do DNA mitocondrial. Como o cromossomo W e o DNA mitocondrial são produtos herdados maternalmente, acreditava-se que ambos apresentavam comportamentos similares filogeneticamente. Entretanto, as análises sugerem uma maior aproximação da história evolutiva do cromossomo W com os cromossomos autossômicos do que com o DNA mitocondrial (MARRIADASSOU, *et al.*, 2021).

Essa hipótese pode ser sustentada pela presença de regiões PAR (regiões pseudo-autossômicas) nos cromossomos sexuais, estimadas em 5 Mb de comprimento em *G. gallus*. Tratam-se de sequências que apresentam homologias entre os pares de cromossomos sexuais (X e Y no caso dos mamíferos, e Z e W no caso de aves), compartilhando genes em ambos os sexos. Pela região PAR compartilhar genes homólogos, é sabido que, durante a meiose, os cromossomos sofrem recombinação nessas porções, auxiliando na manutenção e integridade genômica, segregando corretamente o material genético para as células germinativas (MARRIADASSOU, *et al.*, 2021). Adicionalmente, o tamanho das regiões PAR é proporcionalmente distinto nas diferentes espécies de aves (XU & ZHOU, 2020).

O cromossomo Z da galinha é grande e rico em genes, com 82 Mb abrigando mais de 1000 genes, altamente conservados entre as aves. Por outro lado, o cromossomo W parece ter se degradado em diversos grupos de aves, resultando em um tamanho menor, com 55 Mb, composto majoritariamente de sequências repetitivas no DNA, e rico em sítios para as enzimas de restrição XhoI, EcoR1 e Ssp1. Além disso, é um cromossomo que possui menos genes, e é amplamente heterocromático (AYERS, *et al.*, 2013; BELLOT, *et al.*, 2017). A quantidade de genes presentes no cromossomo W também varia de uma literatura para outra. Pode-se encontrar trabalhos descrevendo que a galinha possui 28 genes (LIN, *et al.*, 2023) enquanto

outros contabilizam 36 (RALLABANDI, *et al.*, 2019). Verifica-se que, mesmo em estudos de transcriptoma, é difícil conseguir estimar a quantidade de genes e descrevê-los, agregando dificuldades na determinação de genes sexo-específicos no genoma de galinhas (AYERS, *et al.*, 2013).

Assim como a estrutura dos cromossomos sexuais, o processo de determinação sexual não é claramente entendido. Genes candidatos presentes no cromossomo W, atuando como determinantes feminilizantes, ainda não foram claramente evidenciados (XU & ZHOU, 2020), mas é possível encontrar estudos relacionando alguns genes potenciais para a feminilização de células germinativas primordiais, como os da família *SMAD* (*SMAD2W* e *SMAD7B*), *HINTW*, *SUB1W*, *KCMF1W* e *MIER3W* (ICHIKAWA, *et al.*, 2022b). Por outro lado, também se acredita que existam genes pertencentes ao cromossomo Z responsáveis pelo processo conhecido como dosagem, interferindo como fator fundamental para a determinação sexual dos indivíduos (BIRCHLER, 2009; SIGEMAN, *et al.*, 2018; XU & ZHOU, 2019; CHEN, *et al.*, 2020; XU & ZHOU, 2020; BELLOT & PAGE, 2021).

1.4.4 Hipóteses de superdosagem ou genes sexo-específicos

Apesar do exato mecanismo que regula o desenvolvimento dos órgãos sexuais de aves ser desconhecido, a literatura propõe dois mecanismos diferentes: o modelo de gene dominante, sugerindo que um gene específico no cromossomo W atuaria de maneira semelhante ao gene *Sry* nos mamíferos, onde sua expressão desencadearia o desenvolvimento dos ovários nas fêmeas (ZW) e sua ausência nos machos (ZZ) resultaria no desenvolvimento dos testículos (CLINTON & ZHAO, 2023). Por outro lado, o modelo de dose gênica (ou superdosagem) propõe que a determinação do sexo em *G. gallus* seria baseada na proporção entre o número de cromossomos Z e o número de conjuntos de autossomos (BIRCHLER, 2009; JULIEN, *et al.*, 2012; SIGEMAN, *et al.*, 2018; XU & ZHOU, 2019; CHEN, *et al.*, 2020; XU & ZHOU, 2020; BELLOT & PAGE, 2021).

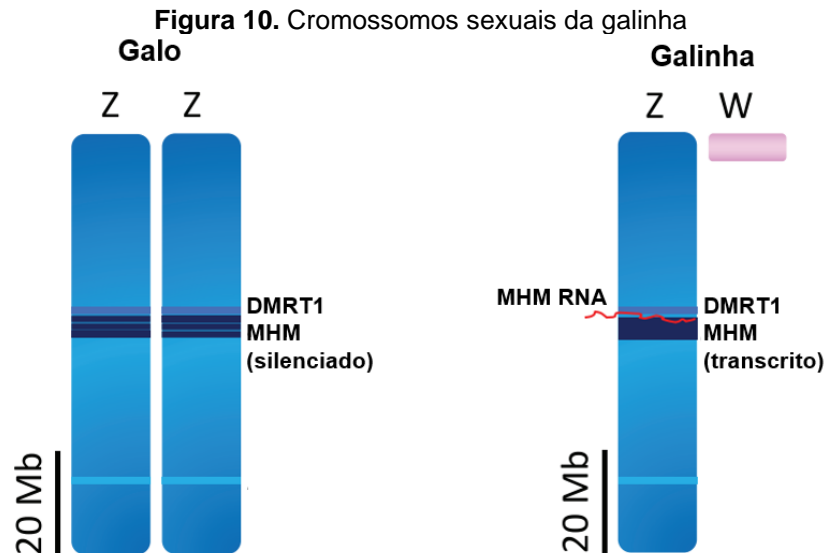
Na hipótese de superdosagem, considera-se que há um equilíbrio de expressão gênica entre os sexos, de forma a compensar a diferença no número de cromossomos entre indivíduos heterogaméticos e homogaméticos. Ou seja, a fêmea possui um sistema ZW, enquanto o macho possui ZZ. Diferente dos mamíferos, as aves não possuem uma inativação completa de um cromossomo sexual, assim, ambos são

funcionais na regulação da expressão gênica. No entanto, a expressão dos genes ligados ao Z é parcialmente ajustada, para equilibrar a dosagem entre machos e fêmeas: as fêmeas reduzem a expressão dos genes ligados ao Z pela metade, enquanto a expressão gênica do W (que tem poucos genes funcionais) se ajusta para complementar a dosagem do Z (JULIEN, *et al.*, 2012; XU & ZHOU, 2020). Ainda, na fêmea, existe uma sequência no cromossomo Z, chamada MHM (*Male HyperMethylated*), que é hipometilada e os genes adjacentes seriam responsáveis por essa compensação, diferente do macho, onde esta região é hipermetilada resultando em silenciamento dos genes. O *DMRT1*, um gene responsável pela masculinização, fica localizado próximo a essa região, e estudos sugerem que a hipometilação e expressão do MHM nas fêmeas contribuiria para o silenciamento da expressão de *DMRT1* nas células gonadais da fêmea (figura 10) (HIRST, *et al.*, 2018; SMITH, *et al.*, 2023). Outro exemplo de como a dosagem pode ser um fator que contribui para a diferenciação sexual é o gene *MIER3*, localizado no cromossomo W. O nível de expressão do *MIER3* em ambos os sexos da galinha é diferente: é significativamente mais alto nas gônadas femininas em comparação com as masculinas, influenciando assim o desenvolvimento gonadal das fêmeas (LIN, *et al.*, 2023).

Evolutivamente, é provável que os genes presentes no cromossomo W, que conferem os fenótipos femininos, essenciais para a sobrevivência e reprodução, sejam mantidos no genoma devido à sensibilidade à dosagem ou manutenção, enquanto outras variantes que não têm uma função essencial, são eliminadas. Isto é, em vez de haver pressão seletiva para genes determinantes feminilizantes, a seleção purificadora mantém uma composição gênica conservada, que dá preferência aos genes essenciais (XU & ZHOU, 2020). Por exemplo, dos 28 genes encontrados no cromossomo W, nenhum é expresso exclusivamente na fêmea, ou seja, apresentam homólogos no cromossomo Z, sugerindo que as funções desses genes não são limitadas ou exclusivas ao desenvolvimento das características sexuais femininas (HIRST, *et al.*, 2017).

Já na hipótese de determinação sexual através da ativação de genes sexo-específicos, defende-se que haja genes e, conseqüentemente, características, que se apresentam de forma distinta a depender do sexo molecular, ou seja, do conjunto de cromossomos sexuais recebidos dos progenitores. Teoricamente, esses genes desempenhariam papéis específicos bem definidos a depender do sexo, tanto molecularmente, quanto fisiológica e comportamentalmente (XU & ZHOU, 2020). Ou

seja, embora o cromossomo W tenha um papel na determinação do sexo feminino, a feminilização pode ser mais complexa e envolver a interação de múltiplos genes e cromossomos (MANK, et al., 2010).



Fonte: adaptada de Hirst, et al., 2018.

Legenda: cromossomos Z e W mostrando o locus MHM e o gene *DMRT1*.

No galo, genes importantes seriam expressos para o desenvolvimento dos testículos, como os *DMRT1*, *HEMGN*, *AMH*, *SOX9* e *SF-1*. Na galinha, alguns genes são fundamentais para a formação dos ovários e conversão hormonal: *FOXL2*, aromatase, *17b-HSD*, *CAPN5* e *GPR56* e *HINTW* (que bloqueia a função masculinizante) (BABA, et al., 2018; HIRST, et al., 2018).

1.4.5 Regulação molecular da diferenciação sexual em aves

A diferenciação sexual em aves é um processo complexo e altamente regulado, envolvendo uma interação de múltiplos fatores genéticos e hormonais (AYERS, et al., 2013; HIRST, et al., 2018; JIN, et al., 2020). Pouco se conhece sobre a regulação desse processo, mas alguns genes já foram relacionados à diferenciação sexual.

Em machos, conforme mencionado acima, o gene *DMRT1* localizado no cromossomo Z é crucial para a diferenciação das gônadas masculinas. *DMRT1* atua como um regulador principal que inicia o desenvolvimento dos testículos e promove a expressão de outros genes importantes, como *SOX9*, *AMH* e *HEMGN* (LEE, et al., 2021). A expressão de *SOX9* é necessária para a formação das células de Sertoli. As

células pré-Sertoli produzem o AMH (hormônio anti-Mülleriano), que faz os ductos de Müller, precursores dos ovidutos nas fêmeas, regredirem. Já o gene *HEMGN*, expresso depois do *DMRT1*, mas antes do *SOX9*, no núcleo das células pré-Sertoli, possivelmente está envolvido com a diferenciação dos testículos e induz direta ou indiretamente a expressão de *SOX9* (NAKATA, *et al.*, 2013). Além do *DMRT1* e *SOX9*, o gene *SF-1* também está envolvido na diferenciação gonadal. *SF-1* é importante para a regulação da expressão de genes que controlam a produção de esteroides e a formação das gônadas (BABA, *et al.*, 2018).

Em fêmeas, com a falta de expressão do *DMRT1*, as gônadas mostram uma diminuição nos níveis de *SOX9* e aumento da expressão da aromatase e *FOXL2*, que estão altamente correlacionadas e tem um papel importante no desenvolvimento e diferenciação do ovário (GOVOROUN, *et al.*, 2004; LEE, *et al.*, 2021). Como a expressão do *FOXL2* ocorre antes da aromatase, alguns autores indicaram a possibilidade de que o gene *FOXL2* regule a aromatase, sendo possível que exista um ciclo regulador de feedback entre ambos (HUDSON, *et al.*, 2005), embora outros autores tenham observado que o *FOXL2* não interfere na expressão de aromatase (MAJOR, *et al.*, 2019).

A aromatase (*CYP19A1*) é uma enzima essencial para a conversão hormonal. Quando expresso, o gene da aromatase promove a produção de estradiol nas fêmeas (JIN, *et al.*, 2020), envolvido no desenvolvimento e ativação do folículo primordial (ZHAO, *et al.*, 2017). O gene *HINTW* também é expresso nas duas gônadas cumprindo o papel de influenciar no desenvolvimento gonadal assimétrico, o próprio desenvolvimento ovariano e também a diferenciação e manutenção das características sexuais do embrião fêmea (SUN, *et al.*, 2023).

1.4.6 Fatores epigenéticos e ambientais

Além dos fatores genéticos, os fatores epigenéticos também desempenham papéis significativos na determinação do sexo e no desenvolvimento gonadal em aves. Os mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA e modificações das histonas, também regulam a expressão gênica, sem alterar a sequência do DNA, durante a determinação do sexo e a diferenciação gonadal. Por exemplo, os padrões de metilação no DNA de *G. gallus*, em ambos os sexos, são semelhantes. No entanto, existem algumas regiões específicas que apresentam diferenças epigenéticas, como

MHM, hipermetilado em machos e hipometilado nas fêmeas, conforme mencionado anteriormente (SUN, *et al.*, 2019). Modificações pós-transcricionais do mRNA também são importantes alterações epigenéticas que influenciam na diferenciação das gônadas, regulando expressões gênicas chave. Por exemplo, níveis elevados de metilação no transcrito estão associados ao aumento da expressão de certos genes, como o *SOX9* nas gônadas masculinas e a aromatase nas gônadas femininas (LI, *et al.*, 2022b).

Já uma modificação epigenética da proteína de empacotamento de DNA histona H3, chamada H3K27ac, expressa muito antes do desenvolvimento e diferenciação sexual, é crucial para o desenvolvimento assimétrico das gônadas femininas. Os níveis mais elevados de H3K27ac na gônada esquerda fazem com que ela se desenvolva em um ovário, enquanto menores níveis na direita geram a sua atrofia (JIANG, *et al.*, 2022). Essas modificações podem ser influenciadas por fatores ambientais e podem ter efeitos de longo prazo na fisiologia reprodutiva das aves.

Nas aves, a determinação sexual é mais ligada à genética, e a temperatura não desempenha um papel na determinação do sexo em si, como ocorre em algumas espécies de répteis, como tartarugas e crocodilos (DURANT, 2011), mas pode influenciar outros aspectos do desenvolvimento sexual e comportamental após a determinação do sexo ter ocorrido (CREWS, 2003). Por exemplo, existe uma relação da temperatura de incubação com a mortalidade frequente de determinado sexo. Já foi demonstrado que a temperatura de incubação em diferentes faixas de 35,0 – 37,0°C influencia significativamente as proporções sexuais secundárias, com maior mortalidade de embriões femininos, onde as temperaturas mais baixas apresentam maior impacto na mortalidade (DURANT, 2016). De forma semelhante, embriões incubados de 36,7 - 38,7°C, mostraram que, nas temperaturas mais baixas (36,7°C e 37,2°C) houve uma maior proporção de machos desenvolvidos. No entanto, a partir da temperatura de 37,7°C, a proporção de fêmeas começou a aumentar, e a temperatura de 38,7°C resultou em uma predominância de fêmeas (YILMAZ, *et al.*, 2011). Esses resultados possibilitam compreender como as alterações climáticas e outros fatores ambientais podem afetar as populações de aves quanto às proporções sexuais (DURANT, 2016).

Mudanças nos níveis hormonais durante o desenvolvimento embrionário, como a exposição a estrogênios ou androgênios exógenos, também podem resultar diretamente em anomalias no desenvolvimento sexual. Um exemplo é a exposição a

inibidores de aromatase em embriões de galinhas, que induziu a reversão sexual significativa e anomalias no desenvolvimento gonadal. As galinhas tratadas apresentavam gônadas direita semelhantes a testículos, menores e inférteis, enquanto a esquerda parecia ovários ou ovotestes. Nestes últimos a superfície se apresentava de forma irregular, com folículos de tamanhos variados e alguns abortivos. O ducto Mulleriano esquerdo foi preservado, mas a parte posterior do ducto direito não. As fêmeas tratadas mantiveram um baixo nível de atividade da aromatase, mas ainda assim maior que o dos machos (VAILLANT, *et al.*, 2001). De forma semelhante, a exposição a androgênios pode resultar em masculinização de fêmeas. Adicionalmente, a exposição de embriões ao estradiol pode induzir características femininas, mesmo em machos genéticos. Essa exposição inicial pode ter efeitos temporários e não permanentes em machos, pois com nove semanas, os machos expostos ao estradiol apresentaram um fenótipo correspondente ao seu genótipo (BRUGGEMAN, *et al.*, 2002).

1.5 Sexagem

A sexagem caracteriza-se pela definição do sexo biológico (fêmea ou macho) de diferentes indivíduos de uma mesma espécie (PEREIRA, *et al.*, 2021). Existem diversos tipos de sexagem. Algumas metodologias utilizam aspectos mais ligados à morfologia do animal, como as medições corporais (MAROCHI, *et al.*, 2016) e laparoscopia (LEITE, *et al.*, 2022). Os exames de imagem, como tomografia por ressonância magnética nuclear (GRANDO, 2002) ou ultrassonografia em tempo real (SANTOS, *et al.*, 2006) também podem ser utilizados.

Em mamíferos, outros métodos também estão sendo frequentemente pesquisados, como a escolha do sexo na produção de animais de interesse, através da sexagem espermática, que pode ser realizada por diversas técnicas, como a citometria de fluxo (SHARPE & EVANS, 2009), imunossexagem (MATTA, 2003), nanopartículas magnéticas (DOMÍNGUEZ, *et al.*, 2018) e Sexed Ultra™ (GONZÁLEZ-MARÍN, *et al.*, 2018).

Adicionalmente, a sexagem pode ser realizada através de perfil hormonal, uma vez que a fêmea tem elevados níveis de estradiol e os machos, testosterona (DA SILVA LOPES, 2015), bem como por métodos celulares, por visualização da cromatina sexual (MOREIRA, 2015) e moleculares, com PCR (reação em cadeia da

polimerase) (IGIC, *et al.*, 2010). Essas diversas técnicas podem ser aplicadas para diferentes espécies de animais (LOVICH & GIBBONS, 1990; KOHLRAUSCH, *et al.*, 2003; AVELAR, 2007; REZENDE-PINTO, 2007; THOMÉ, *et al.*, 2007; MAROCHI, *et al.*, 2016).

1.5.1 Sexagem em aves: Importância e métodos

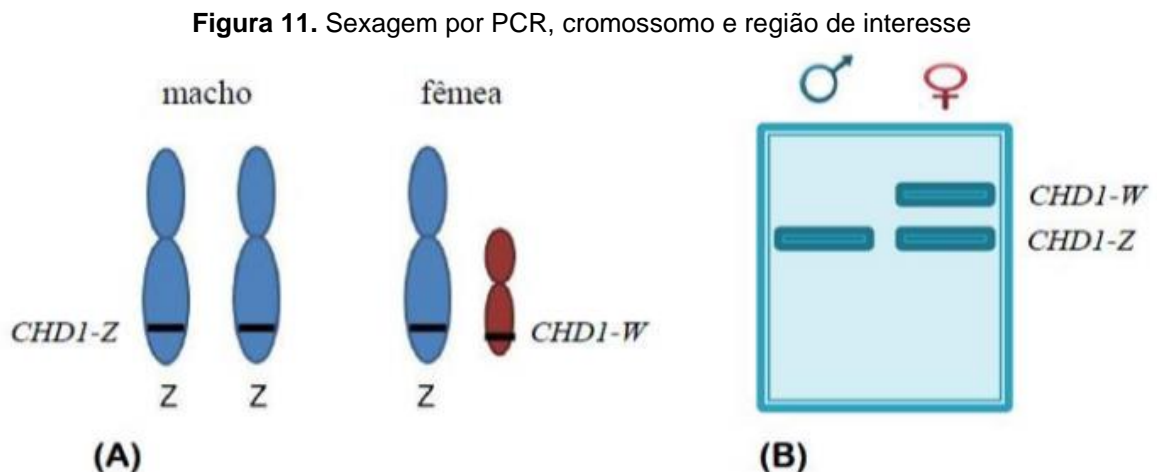
A sexagem de animais e, em particular de aves, apresentou um grande crescimento nos últimos anos, seja para linhagens de corte ou para animais domésticos, auxiliando no manejo, tomadas de decisões, conservação e pesquisa (OLIVEIRA, *et al.*, 2014; WILLHELM, 2014; SILVA, *et al.*, 2021). Muitas das espécies que não apresentam um dimorfismo sexual aparente e que são criadas em cativeiros requerem um protocolo de sexagem seguro e eficaz, auxiliando na procriação desses animais e no comércio legal (VIEIRA, *et al.*, 2009). Adicionalmente, o procedimento auxilia os centros de conservação, contribuindo na reprodução em cativeiro, possibilitando a formação de casais heterossexuais, com posterior soltura ou reintrodução na natureza (ANTONIO, *et al.*, 2021).

Com esse intuito, diferentes técnicas de sexagem de aves foram desenvolvidas a fim de contribuir na conservação e pesquisas de campo realizadas por profissionais da ornitologia. Algumas técnicas de sexagem de aves envolvem laparoscopia, citogenética, tomografia por ressonância magnética, radioimunoensaio (RIA), e LAMP (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*) (JÚNIOR & YAMASHITA, 2001; RASO & WERTHER, 2004; DIAS, *et al.*, 2006; KANCHANAPHUM, 2018). Entretanto, essas metodologias apresentam algumas desvantagens como: dano físico ao animal, equipamentos onerosos, equipe técnica especializada e impossibilidade de aplicação a larga escala, em campo ou em indivíduos imaturos (GRANDO, 2002; DIAS, *et al.*, 2006; KANCHANAPHUM, 2018).

Assim, as metodologias mais utilizadas atualmente envolvem a extração do material genético, hibridização de regiões específicas, e ampliações por PCR (CERIT, *et al.*, 2007; STEINER, *et al.*, 2016). O procedimento de PCR é conhecido por sua eficácia, rapidez, exatidão e por não gerar riscos biológicos ao indivíduo sexado (CERIT, *et al.*, 2007). Essa técnica baseia-se na identificação dos alelos CHD1 (Chromo Helicase DNA-binding gene 1) encontrados nos cromossomos sexuais,

através de pares de *primers* específicos (P2/P8, 1237L/1272H ou 2250F/2718R) (RAMOS, *et al.*, 2021).

A combinação dos *primers* P2 e P8, utilizada desde 1998, por Griffiths e colaboradores, é responsável por reconhecer a região CHD1 de cada cromossomo (CHD1-Z e CHD1-W), amplificando a porção de interesse, que possui tamanho diferente em Z e em W, o que pode ser identificado posteriormente com auxílio de um gel de agarose, através de bandas distintas. Para indivíduos machos, apenas uma banda é visível (de aproximadamente 300 pb), correspondente à região CHD1-Z, e para as fêmeas, há a presença de duas distintas bandas: uma representando o alelo CHD1-Z, e outra o alelo CHD1-W (de aproximadamente 400 pb) (JERONIMO, 2016; PAMULANG & HARYANTO, 2021) (figura 11).



Fonte: adaptada de Jeronimo, 2016.

Legenda: (A) Representação dos alelos CHD1 (*Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1*) presentes nos cromossomos sexuais de aves. (B) Representação do comportamento de bandas encontradas em gel de agarose, em protocolo de eletroforese, utilizando *primers* comerciais para fragmentos CHD1-Z e CHD1-W.

Apesar de muitos estudos utilizarem esses mesmos dois iniciadores para análise de sexo molecular de aves (ÇAKMAK, *et al.*, 2017; KROCZAK, *et al.*, 2021; PAMULANG & HARYANTO, 2021; PEREIRA, *et al.*, 2021), muitas dificuldades para a distinção da amplificação dos dois alelos, ocasionadas por tamanhos de íntrons muito semelhantes entre os sexos, ainda são observadas (HAN, *et al.*, 2009). Para auxiliar na problemática de sexagem com os iniciadores P2/P8, foi desenvolvido um PCR multiplex com a presença de um *primer* adicional: P0 (HAN, *et al.*, 2009). Esse iniciador produz um amplificado correspondente à ligação da sequência do gene CHD-W, em conjunto ao *primer* P2, mas com 100 pb a mais que o amplificado entre P2-P8,

o que torna a visualização em gel mais eficaz. A ligação específica no cromossomo W é dada devido a uma mutação no penúltimo nucleotídeo do *primer* P0 (figura 12). Essa mutação somada a um nucleotídeo distinto na sequência do cromossomo Z, impede o anelamento específico desse *primer* à região de interesse, pareando, dessa forma, apenas na sequência correspondente ao cromossomo W, que apresenta o nucleotídeo final idêntico ao do iniciador (HAN, *et al.*, 2009).

Figura 12. Alinhamento de P0/P2/P8



Fonte: Han, *et al.*, 2009.

Legenda: sequência de nucleotídeos e posição dos *primers* P0, P8 e P2 de uma região dos genes CHD na galinha doméstica ("Gallus") e no tentilhão-zebra ("Zebra").

Assim, a combinação P0, P2 e P8 (P0/P2/P8) (figura 12) é importante para a determinação precisa do sexo em várias espécies de aves, mesmo naquelas onde as variações de tamanho intrônicas são pequenas ou inexistentes (HAN, *et al.*, 2009), especialmente em espécies que são morfologicamente monomórficas ou que apresentam dimorfismo sexual apenas em estágios adultos, facilitando assim a coleta de dados mais precisos sobre as populações de aves (ÇAKMAK, *et al.*, 2017). Apesar de existirem relativamente poucas aplicações realizadas até o momento com esse conjunto de *primers* (P0/P2/P8), há estudos viabilizando essa sexagem para espécies das famílias Anatidae, Phasianidae, Falconidae, Ciconiidae, Accipitridae, Laridae, Cacatuidae, Strigidae, Caprimulgidae, Picidae, Fringilidae, Corvidae, Spheniscidae, Struthionidae (HAN, *et al.*, 2009), Columbidae, Psittaculidae, Psittacidae (PASTIU, *et al.*, 2023), Phaethontidae (NUNES, *et al.*, 2013) pertencentes às ordens Anseriformes, Galliformes, Ciconiiformes, Falconiformes, Charadriiformes, Psittaciformes, Strigiformes, Caprimulgiformes, Piciformes, Passeriformes, Sphenisciformes,

Struthioniformes, Columbiformes, Pelecaniformes (HAN, *et al.*, 2009; NUNES, *et al.*, 2013; PASTIU, *et al.*, 2023), assim como para diferentes espécies de pinguins (POLITO, *et al.*, 2012; GORMAN, *et al.*, 2014). Entretanto, muitas espécies pertencentes a esses e outros grupos ainda não foram testadas com o conjunto dos três *primers*.

Considerando o potencial de aplicação do conjunto de *primers* P0/P2/P8 e a grande diversidade de aves ainda não sexadas por esta metodologia, um dos objetivos do presente trabalho foi padronizar o uso destes iniciadores e testar sua aplicação em novas espécies/grupos, conforme será discutido adiante, no capítulo 2. Adicionalmente, considerou-se a importância da adequação da amostra inicial usada no processamento (ÇAKMAK, *et al.*, 2017; KROCZAK, *et al.*, 2021; PAMULANG & HARYANTO, 2021; PEREIRA, *et al.*, 2021). Como já aderido por diferentes empresas de sexagem, assim como descrito em diferentes estudos, as amostras de penas têm se mostrado uma fonte eficaz para a metodologia de extração de DNA total. Conforme descrito em alguns estudos (POLITO, *et al.*, 2012; ÇAKMAK, *et al.*, 2017; KROCZAK, *et al.*, 2021; PAMULANG & HARYANTO, 2021; YIMTRAGOOL & CHANGTOR 2022; ÇOBANOĞLU, *et al.*, 2023; PASTIU, *et al.*, 2023), diferentes regiões da estrutura da pena, apresentam resultados satisfatórios em concentração de DNA, para posterior sexagem, visando dessa forma o bem-estar animal através da coleta de amostras minimamente invasivas. Entretanto, as metodologias de extração do DNA das penas ainda são bastante debatidas e testadas por diferentes protocolos disponíveis (YIMTRAGOOL & CHANGTOR, 2022; ÇOBANOĞLU, *et al.*, 2023). As extrações geralmente são realizadas utilizando-se protocolos específicos que envolvem lise das amostras através do uso de químicos (SILVA, *et al.*, 2011), podendo ser associados à altas temperaturas (ASLAM, *et al.*, 2024), lise mecânica com uso de equipamentos (TURCU, *et al.*, 2023) e/ou kits comerciais específicos (VUCICEVIC, *et al.*, 2012). No presente trabalho, buscamos otimizar uma forma de extração de DNA visando o aproveitamento máximo de recursos, conforme será discutido adiante, no capítulo 2.

1.6 Proteínas de membrana para sexagem e proteína SMEFC – "Sex Specific Marker Expressed From The Female Chromosome"

Embora eficaz, a técnica de PCR deve ser realizada em laboratório utilizando equipamentos e reagentes específicos, bem como mão de obra especializada. Assim,

criadores e conservacionistas dependem de empresas prestadoras deste serviço, geralmente localizadas nos grandes centros, como a Ampligen em Maringá-PR, Sékula e o Laboratório Veterinária Preventiva em Curitiba-PR, Anilhas Capri e Nova Unigen em São Paulo-SP, a Tecsa laboratório e o ZooGene em Belo Horizonte-MG. Amostras de penas devem ser enviadas por correio para a realização da sexagem, o que dificulta o trabalho no interior do país e em campo. Assim, o desenvolvimento de novas tecnologias mais práticas e acessíveis, como por exemplo kits caseiros, se faz necessário para facilitar o trabalho de pesquisadores e produtores.

Com o avanço nos estudos e desenvolvimento de anticorpos monoclonais, a imunosexagem de gametas avançou como uma técnica segura, eficaz e rápida (MATTA, 2003). Trata-se da identificação de proteínas presentes em membranas celulares de apenas um dos sexos da espécie estudada (BRITO, *et al.*, 2018). Um anticorpo é capaz de reconhecer especificamente o antígeno de escolha e, com auxílio de coluna magnética, utilizando tampão e ímã (MATTA, 2003), é possível realizar a separação das células contendo a proteína sexo-específica.

Atualmente, técnicas de sexagem de sêmen de diferentes espécies de mamíferos, incluindo equinos (SOUZA, 2003), caprinos (BRITO, *et al.*, 2021), entre outros, através da imunosexagem, já estão sendo utilizadas para comercialização. A metodologia se baseia na identificação do antígeno HY de mamíferos, presente em diferentes células de indivíduos masculinos, incluindo os espermatozoides (MATTA, 2003; SOUZA, 2003; VAN TILBURG, *et al.*, 2006). Até o momento um antígeno sexo-específico não foi ainda encontrado em aves, que poderia ser utilizado para elaboração de testes rápidos de sexagem por imunocromatografia.

A fim de identificar proteínas com potencial para uso em técnicas de sexagem rápida, utilizando imunosexagem em testes imunocromatográficos de fluxo lateral, por exemplo, em trabalho prévio (FABICHAKI, 2021) foi realizado um levantamento *in silico* de proteína sexo-específica para aves (usando como organismo de estudo *G. gallus*). Foram consideradas características ideais para esta seleção: proteína proveniente do cromossomo W; com estrutura predita transmembranar; presença em células sanguíneas; baixa homologia com outras sequências proteicas da mesma espécie; e alta conservação entre diferentes espécies. A partir dessas análises, foi eleita como melhor candidata uma proteína predita ainda não caracterizada (Ensembl: ENSGALG00000047434; UniProt: A0A3Q2UGW9; NCBI/mRNA: XM_040655274.1), nomeada provisoriamente SMEFC - "*sex specific marker expressed from the female*

chromosome". Entre as características que levaram a eleger a proteína SMEFC como ideal para posteriores estudos, se destacam o fato de ela ser proveniente do cromossomo W, possuir estrutura transmembranar e domínio extracelular preditos, além de haver registros de que seu mRNA foi encontrado em amostras sanguíneas de galinhas fêmeas. Adicionalmente, tal proteína apresenta baixa homologia com outras estruturas proteicas da mesma espécie (no máximo 41,07%) e apresenta uma boa conservação entre diferentes espécies de aves (com porcentagem máxima de 89,9%) (FABICHAKI, 2021). Com base nesses resultados, considera-se que a proteína SMEFC apresenta grande potencial para estudos adicionais, visando sua utilização em metodologias de imunossexagem a partir de amostras sanguíneas de aves. Ainda em trabalho prévio, foram desenhados pares de *primers* específicos para o mRNA da proteína SMEFC.

Assim, utilizando as informações levantadas a respeito da proteína SMEFC de *G. gallus* nos bancos de dados disponíveis e considerando (i) a escassez de ferramentas mais práticas para imunossexagem em aves, e (ii) a dificuldade de acesso à técnicas clássicas de sexagem por PCR por criadores e conservacionistas das regiões do interior do país, no capítulo 1 do presente trabalho buscamos verificar a presença do mRNA do gene *SMEFC* em células sanguíneas de *G. gallus*, visando o potencial desta proteína na aplicação da imunossexagem de aves. Além disso, conforme mencionado anteriormente, apesar da literatura trazer bons resultados relacionados à sexagem com o conjunto de *primers* P0/P2/P8, muitas espécies e famílias de aves ainda não foram testadas. Dessa forma, em seu segundo capítulo, o presente estudo busca verificar a viabilidade da realização de sexagem por P0/P2/P8 para nove espécies, sendo seis espécies não previamente testadas na literatura, utilizando um método que visa a sustentabilidade e o bem-estar animal.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Desenvolver técnicas mais acessíveis e eficientes para a sexagem de aves, através da busca por novas moléculas sexo-específicas e da otimização de protocolo pré-estabelecido.

2.2 Específicos

- a. Verificar a presença do mRNA de SMEFC de forma sexo-específica em células sanguíneas de galinha (capítulo 1);
- b. Otimizar a extração de DNA de aves a partir de amostras de penas de diferentes espécies de aves (capítulo 2);
- c. Otimizar protocolo de sexagem por PCR, utilizando diferentes pares de *primers* e espécies de ave, visando a economia de recursos (capítulo 2).

CAPÍTULO 1 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE SMEFC EM CÉLULAS DO SANGUE DE *G. gallus*

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras sanguíneas

O presente projeto foi aprovado pela CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) - UNILA, para execução dos procedimentos envolvidos (processo 23422.0001086/2023-27). Foram coletados até 2 mL de sangue de seis indivíduos de sexo conhecido (*G. gallus*), sendo eles três fêmeas: Gertrudes, Mafalda e Ginger; e três machos: Chicken Little, Heihei e Rocky. A coleta foi realizada através do sistema vascular das aves (ROCHA, *et al.*, 2020), com o auxílio e supervisão de profissionais veterinários, associados à clínica veterinária FaunaVet, situada em Foz do Iguaçu - PR, Brasil e em parceria com o criadouro Casa Das Aves, situado em Medianeira - PR. Para a coleta, foram utilizados tubos de 3 mL contendo anticoagulante EDTA, realizando homogeneização suave da amostra para evitar coagulação do sangue (ROCHA, *et al.*, 2020). Adicionalmente, para análises de comparações, amostras de dois indivíduos (Ginger e Rocky) receberam também um conservador de RNA total (LifeGuard Soil Preservation - QIAGEN) juntamente com uma porção do sangue coletado, em proporção 1:1 (1 mL de sangue para 1 mL de conservante), além das amostras sanguíneas sem conservador desses mesmos indivíduos. Todas as amostras foram então levadas ao laboratório, alíquotadas em microtubos com 100 μ L, e armazenadas em refrigeração a -20°C .

3.2 Extração do RNA total da amostra

Foram utilizados diferentes kits comerciais, assim como adaptações, para testes de qualidade e eficácia na extração de RNA total do sangue de aves, sempre seguindo as orientações do fabricante. Para verificação da qualidade e quantidade do RNA total das amostras, foi utilizado o espectrofotômetro Nanodrop One da ThermoFisher, comparando os resultados dos diferentes protocolos empregados. Imediatamente após o processamento descrito, as amostras foram submetidas à

síntese de cDNA e, quando houve excedente, este foi armazenado em freezer a -20° C.

Os kits comerciais utilizados, foram: a) SV Total RNA Isolation System (PROMEGA); b) NZY Total RNA Isolation kit (NZYTECH); c) Quick-DNA/RNA Viral MagBead (ZYMO RESEARCH); d) NucleoSpin RNA Isolation (BIOANALYSIS); e) Quick-RNA Whole Blood (ZYMO RESEARCH); f) Quick-Zol (Trizol) (LUDWIG). Buscando a otimização dos resultados, por vezes foram incluídas adaptações ao protocolo do fabricante, adicionando passos como a utilização de DNase, colunas de afinidade disponibilizados pelos kits citados acima, centrifugações (peletização) da amostra inicial, e/ou tratamentos adicionais de lavagens, totalizando 11 protocolos. Na tabela 1, pode-se observar os kits utilizados, assim como as adaptações empregadas em cada um deles, enumerando os protocolos para melhor entendimento dos procedimentos descritos a seguir, bem como dos resultados.

Tabela 1. Protocolos metodológicos

NÚMERO DO PROTOCOLO	KIT	ADAPTAÇÃO
1	SV Total RNA Isolation System (PROMEGA)	N/A.
2	NZY Total RNA Isolation kit (NZYTECH)	N/A.
3	Quick-DNA/RNA Viral MagBead (ZYMO RESEARCH) + Adaptação com DNase do kit PROMEGA e BIOANALYSIS	Protocolo da ZYMO com a adição de um passo final de tratamento com DNase, disponibilizada pelos kits mencionados, conforme instruções do fabricante.
4	NucleoSpin RNA Isolation (BIOANALYSIS)	N/A.
5	NucleoSpin RNA Isolation (BIOANALYSIS)	Centrifugação inicial da amostra e diminuição no número de lavagens da coluna, visando concentrar melhor a quantidade final de RNA.
6	Quick-RNA Whole Blood (ZYMO RESEARCH) - Células nucleadas	Protocolo para células sanguíneas nucleadas, disponibilizado pelo fabricante.
7	Quick-RNA Whole Blood (ZYMO RESEARCH) - Células peletizadas	Protocolo para células sanguíneas iniciando com uma centrifugação prévia de 4000 RPM por 15 minutos, disponibilizado pelo fabricante.
8	Quick-RNA Whole Blood (ZYMO RESEARCH) - Células nucleadas + peletização	Protocolo para células sanguíneas nucleadas disponibilizado pelo fabricante, adicionando uma centrifugação prévia de 4000 RPM por 15 minutos.
9	Quick-Zol (LUDWIG)	N/A
10	Quick-Zol (LUDWIG) + Adaptação com DNase e	Protocolo da Ludwig com adição de um passo de passagem pela coluna do kit Quick-RNA Whole Blood (ZYMO RESEARCH) ao final do protocolo do

	limpeza utilizando a coluna do kit da ZYMO.	Quick-Zol, buscando retirar impurezas da amostra final.
11	Quick-Zol (LUDWIG) + Adaptação com DNase e limpeza utilizando a coluna do kit da BIOANALYSIS.	Protocolo da Ludwig com adição de um passo de passagem pela coluna do kit NucleoSpin RNA Isolation (BIOANALYSIS) ao final do protocolo do Quick-Zol, buscando retirar impurezas da amostra final.

Fonte: a autora.

Legenda: relação de kits de extração de RNA e adaptações empregadas no processo.

Protocolo 1:

1. Adição de 175 uL de RNA Lysis Buffer em 50 uL de amostra descongelada, seguida de homogeneização;
2. Adição de 350 µL de Tampão de Diluição de RNA (RDA, azul). Agitação por inversão de 3 a 4 vezes;
3. Aquecimento de 70°C por 3 minutos;
4. Centrifugação a 12000 RPM por 10 minutos;
5. Transferência do sobrenadante para tubo limpo;
6. Adição de 200 µL de etanol a 95% ao lisado clarificado, seguida de boa homogeneização;
7. Transferência de material total para tubo limpo contendo coluna de afinidade de RNA;
8. Centrifugação a 12000 RPM por 1 minuto, seguida do descarte do líquido filtrado excedente;
9. Adição de 600 uL de RNA Wash Solution;
10. Centrifugação a 12000 RPM por 1 minuto, seguida pelo descarte do líquido filtrado;
11. Em gelo: adição de 40 uL de Yellow Core Buffer + 5 uL MnCl₂ + 5 uL DNase
- I. Transferência dessa solução diretamente sobre a membrana da coluna;
12. Incubação por 15 minutos em temperatura ambiente;
13. Adição de 200 uL de DNase Stop;
14. Centrifugação a 12000 RPM por 1 minuto;
15. Adição de 600 uL de RNA Wash Buffer;
16. Centrifugação a 12000 RPM por 1 minuto, seguida pelo descarte do líquido filtrado;
17. Adição de 250 uL de RNA Wash Buffer;
18. Centrifugação a 12000 RPM por 2 minutos;

19. Transferência da coluna para tubo de coleta novo e livre de RNases;
20. Adição de 30 uL de RNA-free water;
21. Centrifugação a 12000 RPM por 1 minuto;
22. Armazenamento da amostra em -20 °C.

Protocolo 2:

1. Adição de 350 uL NR + 3,5 uL β -mercaptoethanol em 100 uL de amostra, seguida por agitação em vórtex;
2. Adição de 350 uL de etanol 70%, seguida de homogeneização;
3. Transferência do conteúdo total para a coluna azul de afinidade de RNA;
4. Centrifugação a 13000 RPM por 30 segundos, seguida pelo descarte do líquido filtrado;
5. Adição de 350 uL de NI;
6. Centrifugação a 13000 RPM por 30 segundos, seguida pelo descarte do líquido filtrado;
7. Adição de 95 uL de Digestion Mix (90 uL de Digestion Buffer + 10 uL DNase I) diretamente sobre a membrana da coluna;
8. Incubação por 15 minutos a temperatura ambiente;
9. Adição 200 uL de NWR1;
10. Centrifugação a 13000 RPM por 1 minuto, seguida pelo descarte do líquido filtrado;
11. Adição de 600 uL de NWR2;
12. Centrifugação a 13000 RPM por 1 minuto, seguida por uma repetição desse tópico e descarte do líquido;
13. Transferência da coluna para tubo de coleta novo e livre de RNases;
14. Adição de 50 uL de RNA-free water;
15. Centrifugação a 13000 RPM por 1 minuto;
16. Armazenamento da amostra em -20 °C.

Protocolo 3:

1. Adição de 100 uL de DNA/RNA Shield em 100 uL de amostra;
2. Adição de 400 uL de Viral DNA/RNA Buffer, seguida por homogeneização;
3. Adição de 10 uL de MagBinding Beads, seguida por agitação em vórtex por 10 minutos;

4. Transferência do tubo para um suporte magnético, e, após a peletização das beads, descarte do sobrenadante;
5. Adição de 250 uL de MagBead DNA/RNA Wash 1, seguida por homogeneização;
6. Transferência do tubo para um suporte magnético, e, após a peletização das beads, descarte do sobrenadante;
7. Adição de 250 uL de MagBead DNA/RNA Wash 2, seguida por homogeneização;
8. Transferência do tubo para um suporte magnético, e, após a peletização das beads, descarte do sobrenadante;
9. Adição de 250 uL de etanol 100%, seguida por homogeneização;
10. Transferência do tubo para um suporte magnético, e, após a peletização das beads, descarte do sobrenadante;
11. Adição de 250 uL de etanol 100%, seguida por homogeneização;
12. Em gelo: (a) adição de 40 uL de Yellow Core Buffer + 5 uL MnCl₂ + 5 uL DNase I (Kit PROMEGA) ou (b) adição de 95 uL do mix: 10 uL de rDNase + 90 uL rDNase Buffer (Kit BIOANALYSIS). Transferência dessa solução diretamente sobre as beads seguido por homogeneização;
13. Incubação por 15 minutos em temperatura ambiente;
14. Adição de (a) 200 uL de DNase Stop (Kit PROMEGA) ou (b) 200 uL de RAW2 (Kit BIOANALYSIS) seguida por homogeneização;
15. Transferência do material total para tubo limpo livre de RNase;
16. Transferência do tubo para um suporte magnético, e, após a peletização das beads, descarte do sobrenadante;
17. Secagem das beads em bloco de aquecimento à 30 °C por 10 minutos;
18. Adição de 30 uL de RNase-Free Water, homogeneizando bem;
19. Transferência do tubo para um suporte magnético, e, após a peletização das beads, transferência do sobrenadante para tubo limpo livre de RNases;
20. Armazenamento da amostra em -20 °C.

Protocolo 4:

1. Adição de 350 uL de RA1 + 3,5 uL de β -mercaptoethanol em 100 uL de amostra, seguida por agitação em vórtex;
2. Transferência da mistura total na coluna com filtro violeta;

3. Centrifugação a 10390 RPM por 1 minuto;
4. Descarte do filtro e adição de 350 mL de etanol 70% na solução filtrada em tubo limpo, seguida de duas agitações em vórtex por 5 segundos;
5. Transferência da mistura para a coluna de afinidade de RNA (azul);
6. Centrifugação a 10390 RPM por 30 segundos;
7. Descarte de sobrenadante e transferência da coluna para tubo limpo;
8. Adição de 350 uL de MDB;
9. Centrifugação a 10390 RPM por 1 minuto;
10. Adição de 95 uL do mix de DNase (10 uL de rDNase + 90 uL rDNase Buffer), diretamente sobre a membrana da coluna;
11. Incubação de 15 minutos a temperatura ambiente;
12. Adição de 200 uL de RAW2;
13. Centrifugação a 10390 RPM por 30 segundos, seguida pelo descarte do líquido filtrado;
14. Adição de 600 uL de RA3;
15. Centrifugação a 10390 RPM por 30 segundos, seguida pelo descarte do líquido filtrado;
16. Adição de 250 uL de RA3;
17. Centrifugação a 10390 RPM por 30 segundos, seguida pelo descarte do líquido filtrado;
18. Transferência da coluna para um tubo limpo, livre de RNase;
19. Adição de 40 uL de RNase-free Water;
20. Centrifugação a 10390 RPM por 1 minuto;
21. Armazenamento da amostra em -20 °C.

Protocolo 5:

1. Centrifugação prévia da amostra total em 4000 RPM por 15 minutos; seguida pelo descarte do sobrenadante;
2. O protocolo seguiu os mesmos passos a partir do item 1 do protocolo 4, com exceção da realização dos itens 16 e 17.

Protocolo 6:

1. Adição de 1 mL de DNA/RNA Shield (1x) em 50 uL de amostra, seguida por agitação em vórtex;

2. Centrifugação para diminuição de espuma formada;
3. Adição de 800 uL de PK Digestion Buffer e 20 uL de Proteinase K, homogeneizando suavemente por 5 minutos;
4. Incubação por 30 minutos a 55 °C;
5. Adição de 1870 uL de Isopropanol, seguida por agitação em vórtex;
6. Transferência do material total para a coluna IICG (verde);
7. Centrifugação a 12130 RPM por 30 segundos, seguida do descarte do líquido filtrado;
8. Transferência da coluna para um tubo limpo, livre de RNases;
9. Adição de 200 uL de RNA Recovery Buffer;
10. Centrifugação a 12130 RPM por 30 segundos, seguida do armazenamento em tudo limpo, livre de RNase do líquido filtrado;
11. Verificação da quantidade de volume total e adição do mesmo volume em etanol 100%;
12. Transferência da mistura para a coluna IC (branca);
13. Centrifugação a 12130 RPM por 30 segundos, seguida do descarte do líquido filtrado;
14. Adição de 400 uL de RNA Wash Buffer;
15. Centrifugação a 12130 RPM por 30 segundos, seguida do descarte do líquido filtrado;
16. Adição de 40 uL do mix DNase I (5 uL de DNase I + 35 uL de DNA Digestion Buffer), diretamente sobre a membrana da coluna;
17. Incubação por 15 minutos à temperatura ambiente;
18. Adição de 400 uL de RNA Prep Buffer;
19. Centrifugação a 12130 RPM por 30 segundos, seguida do descarte do líquido filtrado;
20. Adição de 700 uL de RNA Wash Buffer;
21. Centrifugação a 12130 RPM por 2 minutos, seguida do descarte do líquido filtrado;
22. Adição de 400 uL de RNA Wash Buffer;
23. Centrifugação a 12130 RPM por 1 minuto, seguida do descarte do líquido filtrado;
24. Transferência da coluna para um tubo limpo, livre de RNase;
25. Adição de 15 uL de RNase-free Water;

26. Centrifugação a 12130 RPM por 1 minuto;
27. Armazenamento da amostra em -20 °C.

Protocolo 7:

1. Centrifugação prévia de 200 uL de amostra total em 4000 RPM por 15 minutos, seguida pelo descarte do sobrenadante;
2. Adição de 300 uL de DNA/RNA Shield (1x);
3. Adição de PK Digestion Buffer + 15 uL de Proteinase K;
4. Incubação de 30 minutos em 55 °C, seguida por agitação em vórtex;
5. Centrifugação a 15000 RPM por 2 minutos, transferindo o sobrenadante para tubo limpo livre de RNases;
6. Verificação da quantidade de volume total e adição do mesmo volume em RNA Recovery Buffer, seguida de homogeneização;
7. Transferência do conteúdo total para a coluna IICG (verde);
8. Centrifugação a 12130 RPM por 30 segundos, transferindo o sobrenadante para tubo limpo livre de RNases;
9. O protocolo seguiu os mesmos passos a partir do item 11 do protocolo 6.

Protocolo 8:

1. Centrifugação prévia de 200 uL de amostra total em 4000 RPM por 15 minutos, seguida pelo descarte do sobrenadante;
2. Adição de 1 mL de DNA/RNA Shield (1x);
3. O protocolo seguiu os mesmos passos a partir do item 2 do protocolo 6.

Protocolo 9:

1. Adição de 1 mL de Quick-Zol à 100 uL de amostra, seguida de homogeneização;
2. Incubação durante 10 minutos à temperatura ambiente (RT °C);
3. Adição de 0,2 mL de clorofórmio, seguida de agitação;
4. Incubação por 5 minutos à RT °C;
5. Centrifugação durante 15 minutos a 13000 RPM a 4 °C;
6. Transferência da fase aquosa contendo o RNA para um tubo novo, inclinando ambos os tubos em 45 °, para evitar danos ou desperdício da amostra;

7. Adição de 0,5 mL de isopropanol à fase aquosa separada seguida de agitação em vórtex;
8. Incubação por 10 minutos à RT °C;
9. Centrifugação durante 10 minutos a 12000 RPM a 4 °C;
10. Descarte do sobrenadante;
11. Ressuspensão do pellet em 1 mL de etanol 75% gelado. Agitação em vórtex, seguida de centrifugação por 5 minutos a 11000 RPM a 4 °C;
12. Descarte do etanol;
13. Secagem do pellet de RNA à RT °C por aproximadamente 10 minutos;
14. Ressuspensão do pellet em 20 uL de água livre de RNase;
15. Incubação em bloco de aquecimento por 10 minutos a 55 °C para melhor homogeneização do pellet em água;
16. Armazenamento em freezer a -20 °C.

Protocolo 10:

1. O protocolo seguiu os mesmos passos a partir do item 1 ao 10 do protocolo 9;
2. Ressuspensão do pellet em 1 mL de etanol 75% gelado. Agitação em vórtex;
3. O protocolo seguiu os mesmos passos a partir do item 12 do protocolo 6.

Protocolo 11:

1. O protocolo seguiu os mesmos passos a partir do item 1 ao 10 do protocolo 9;
2. Ressuspensão do pellet em 1 mL de etanol 75% gelado. Agitação em vórtex;
3. O protocolo seguiu os mesmos passos a partir do item 5 do protocolo 4.

3.3 Síntese de cDNA e RT-PCR

Para realização da síntese de cDNA das amostras, foram testados dois kits. O primeiro kit testado foi o iScript Select cDNA Synthesis (BIO-RAD). Conforme instruções do fabricante, inicialmente foram adicionados 4 uL de 5X iScript Select

Reation, somado de 2 uL de Random *primer* ou Oligo DT *primer*, seguido do volume necessário para a concentração de cerca de 500 ng de amostra de RNA, adicionando mais 1 uL de iScript Reverse Transcriptase e complementando a reação com RNA-free Water para uma solução total de 20 uL de reação. Foram realizados testes prévios usando os distintos *primers* disponibilizados pelo fabricante: Random e Oligo DT, os quais têm por característica o alinhamento de forma distinta nas moléculas de RNA presentes na amostra. Os Oligos DT *primers* são responsáveis pelo anelamento nas regiões de cauda Poli A das moléculas de mRNA, desse modo, amplificando a fita complementar apenas das moléculas de mRNA (NAM, *et al.*, 2002). Já os Random *primers*, têm por característica alinhamentos aleatórios nas diferentes moléculas de RNA, amplificando a fita complementar de todas as moléculas de RNA presentes na amostra, não especificamente dos mRNA (NARDON, *et al.*, 2009). Ficou estabelecido que os *primers* Random seriam utilizados nos experimentos, por terem apresentado melhores resultados (dados não mostrados neste trabalho).

Adicionalmente, foi testado o kit GoTaq 2-step RT-qPCR System (PROMEGA). Conforme instruções do fabricante, foram utilizados 2 uL de RNA (cerca de 500 ng), adicionando 1 uL de Oligo *primer* e 1 uL de Random *primer*, seguido de 4 uL de GoScript™ 5X Reaction Buffer, somando 2 uL de MgCl₂, 1 uL de PCR Nucleotide Mix, 0,5 uL de Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor, seguido de 1 uL de GoScript™ Reverse Transcriptase.

Para identificação da região específica do mRNA de interesse, foi utilizado inicialmente o PAR 1 de *primers*, seguido por testes com o PAR 8 cujas sequências e características estão disponíveis na tabela 2, conforme descrito por Fabichaki (2021). Como controle positivo, foi eleito o gene G6PDH (AI981686) (tabela 2), conforme descrito por Slawinska, *et al.*, 2021 e De Boever, *et al.*, 2008.

Quatro kits de PCR foram testados para amplificação do material genético descrito acima: a) GoTaq G2 colorless Master Mix (PROMEGA), onde, conforme instruções do fabricante, foram utilizados 5,5 uL de RNA-free Water, somado a 1 uL de cada *primer* (*Forward* + *Reverse*), seguido de 5 uL de cDNA e 12,5 uL de GoTaq® G2 Colorless Master Mix, 2X; b) NZYTaQ II 2x Green Master Mix (NZYTECH), onde, conforme instruções do fabricante, foram utilizados 5,5 uL de RNA-free Water, somado a 1 uL de cada *primer* (*Forward* + *Reverse*), seguido de 5 uL de cDNA e 12,5 uL de NZYTaQ II 2x Green Master Mix; c) QIAGEN OneStep RT-PCR, onde, conforme instruções do fabricante, foi utilizado 1,5 uL de cada *primer* (*Forward* + *Reverse*), mais

1 uL de dNTP, somado a 5 uL de 5X QIAGEN One Step Buffer, seguido de 1 uL de Enzyme Mix, mais o volume suficiente para uma concentração de 500 ng de RNA, completando 25 uL de reação total com RNA-free Water; e d) Class Five Hot Start Taq DNA Polimerase (NEOBIO) onde, conforme instruções do fabricante, foram utilizados 17,5 uL de RNA-free Water, somado a 1 uL de cada *primer* (*Forward* + *Reverse*), seguido de 1 uL de cDNA, 5 uL de 5X ClassFive Buffer e 0,5 uL de Class Five Hot Start Taq DNA Polimerase.

Tabela 2. Pares de *primers*

Proteína	Pares de <i>primers</i>	T _m (°C)	Tamanho do Amplicon
Proteína SMEFC PAR 1	<i>Forward primer</i> 1 GAGAGAGCGGAACCTGAACC 20 <i>Reverse primer</i> 1 GGCTAATGAGCTCTCGGCTT 20	60.11 59.89	278 pb
Proteína SMEFC PAR 8	<i>Forward primer</i> 1 AGAGAGCGGAACCTGAACCC 20 <i>Reverse primer</i> 1 AGTACACTTGGATCCGGCAA 20	61.55 59.02	530 pb
G6PDH	<i>Forward primer</i> 1 CGGGAACCAAATGCACTTCGT 21 <i>Reverse primer</i> 1 GGCTGCCGTAGAGGTATGGGA 21	61.75 63.44	122 pb

Fonte: adaptada de Fabichaki, 2021.

Legenda: *primers* para o mRNA da proteína SMEFC, obtidos pelo NCBI e *primer housekeeping*. T_m: temperatura média de anelamento para realização dos testes para cada fita dos pares de *primers*.

Para os testes em termociclador (EVEN, modelo Thermal cycler T960), foram utilizados os seguintes processamentos:

Para os kits da PROMEGA e NZYTECH: primeiro ciclo de desnaturação: 94 °C por 3 minutos, seguido por testes de 30, 35 ou 40 ciclos de: a) Anelamento: XX (variáveis tabela 3) por 30 segundos; b) Amplificação: 72 °C por 50 segundos, e c) Desnaturação: 94 °C por 20 segundos. Em seguida, uma ciclagem final de: a) Anelamento: XX (variáveis tabela 3) por 1 minuto; b) Amplificação: 72 °C por 10 minutos, e c) Estabilização: 4 °C por 24 horas.

Já, para o kit da QIAGEN, foi realizada transcrição reversa a 50 °C por 30 minutos, seguida da desnaturação da transcriptase à 95 °C por 15 minutos. Após, seguiram-se 35 ciclos de: a) Anelamento: XX (variáveis tabela 3) por 45 segundos; b) Amplificação: 72 °C por 1 minuto, e c) Desnaturação: 94 °C por 45 segundos. Em seguida, uma corrida final de: a) Anelamento: XX (variáveis tabela 3) por 1 minuto; b) Amplificação: 72 °C por 10 minutos, e c) Estabilização: 4 °C por 24 horas.

Diversos testes com diferentes temperaturas de anelamento para os pares de *primers* foram realizados, como demonstra a tabela 3. Adicionalmente, testes modificando a quantidade de ciclos no protocolo de PCR também foram realizados.

Tabela 3. Gradientes de temperaturas

PRIMERS	TEMPERATURAS TESTADAS (°C)										
PAR 1	49,5	51,0	53,0	55,0	57,0	59,5	60,0	61,3	63,0	64,5	67,7
PAR 8	48,0	50,1	52,1	54,8	56,3	58,1	60,1	62,0	-	-	-
G6PDH	57,0	58,0	61,0	62,5	63,2	63,8	64,0	64,4	64,5	-	-

Fonte: a autora.

Legenda: temperaturas testes para anelamento dos diferentes pares de *primers* para cDNA.

O protocolo final estabelecido foi utilizando o kit de cDNA da BIO-RAD, com os Random *primers*, somado ao kit de PCR da PROMEGA, com a programação no termociclador correspondendo a 35 ciclos e com as temperaturas de anelamento para PAR 1 (53 °C), Par 8 (NÃO DEFINIDO) e G6PDH (64 °C).

3.4 Eletroforese em gel

Para análise dos resultados obtidos através da amplificação por RT-PCR descrita anteriormente, foi produzido gel de agarose a 1,5% (dissolvido em TBE 1X: TRIS 0,13 M (pH 7,6), ácido bórico a 45 M e EDTA a 2,5 mM).

Após testes com intercalantes (Blue green – NOVA BIOTECNOLOGIA; Blue green - LGC BIOTECNOLOGIA; gel red – SIGMA; Cybr Green - THERMO FISHER), e diferentes quantidades de amplicon (tabela 4), ficou definida a utilização de 5 uL de amplicon ou marcador de peso molecular de 100 bp (LUDWIG) + 3 uL de Blue Green (NOVA BIOTECNOLOGIA) para a aplicação das amostras em cada poço. O gel foi então submerso em TBE 1X e submetido à tensão de 100 V por 2H e 15 minutos, em cuba de eletroforese (LOCCUS, modelo LPS 4000V). Tal protocolo foi definido após testes de otimização, que incluíram variáveis de voltagem, tempo de corrida, volume de amostra e intercalante utilizado (tabela 4). O padrão de bandas foi analisado em transiluminador UV (LOCCUS, modelo L-pix EX e LOCCUS, modelo L-PIX).

Tabela 4. Variáveis da eletroforese

PARÂMETRO	VARIÁVEIS					
Voltagem da corrida de eletroforese	60 V	80 V	100 V	120 V	-	-
Tempo de corrida de eletroforese	1:40 H	2:00 H	2:15 H	2:20 H	2:30 H	2:40 H
Volume de amostra total em cada poço	1 uL	2 uL	3 uL	5 uL	7 uL	-

Fonte: a autora.

Legenda: parâmetros e seus diferentes testes realizados durante o protocolo de eletroforese.

3.5 Análises de bioinformática

3.5.1 PCR virtual

Visando verificar a possibilidade de anelamentos inespecíficos gerados através dos testes com os *primers* desenhados em trabalho anterior, foram realizadas análises de PCR virtual. O protocolo utilizado seguiu os mesmos passos das análises desenvolvidas por Fabichaki (2021). Foi utilizado o site NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), e pesquisado pelo ID do mRNA de interesse para o presente estudo (XM_040655274.1). Na página de descrição, à direita, foi selecionada a ferramenta “*Pick Primers*”, onde foi carregada uma nova página, com espaços para preenchimento das sequências de *primer forward* e *primer reverse*. Ao adicionar essas informações com os *primers* correspondentes ao PAR 1, por exemplo, foram retirados dois nucleotídeos de cada iniciador: o primeiro nucleotídeo do *primer forward* e o último nucleotídeo do *primer reverse* (indicado pelas setas na figura 13). Após carregar os resultados obtidos, agora correspondentes ao alinhamento dos *primers* com 19 nucleotídeos, foram analisadas as sequências de alinhamentos inespecíficos e, a cada nova análise, diminuindo um nucleotídeo a mais, até chegar a um *primer* com apenas 15 nucleotídeos.

Figura 13. Análise de PCR virtual para os primers PAR 1

Fonte: a autora.

Legenda: (A) Seta indica o nucleotídeo proveniente do *primer Forward* que foi retirado para análise. (B) Seta indica o nucleotídeo proveniente do *primer Reverse* que foi retirado para análise.

3.5.2 BLAST

Para verificar a similaridade entre a sequência alvo de interesse e os anelamentos inespecíficos gerados a partir da diminuição de nucleotídeos (simulando uma degradação e/ou anelamento inespecífico em extremidade oposta a extensão da Taq Polimerase), foram gerados BLASTs entre todas as sequências encontradas. Para tal, foi utilizada a ferramenta BLAST entre nucleotídeos, disponível pelo NCBI (conforme protocolo de FABICHAKI, 2021). Ao selecionar a opção “Align two or more sequences” (apontado na figura 14), é gerado um novo espaço para inserção da sequência de análise. Foi usado o primeiro quadro para o mRNA da proteína SMEFC e o segundo, para as sequências com anelamentos inespecíficos.

Figura 14. Análise de BLAST entre sequências

Fonte: a autora.

Legenda: tela de apresentação da ferramenta BLAST disponibilizada pelo NCBI. (A) Seta indica a opção para alinhamento entre duas ou mais sequências de interesse.

4 RESULTADOS

4.1 Primeiro bloco de experimentos – Protocolo 1 de extração de RNA e primers PAR 1

4.1.1 Extração de RNA de fêmeas e síntese de cDNA

As análises iniciais foram realizadas com sangue de duas fêmeas de *G. gallus* (Gertrudes e Mafalda), e utilização dos protocolos 1 e 2 para extração de RNA. A partir dos resultados observados em NanoDrop (tabela 5), o protocolo 1 foi eleito como o mais eficiente, e o RNA extraído a partir dele foi utilizado para síntese de cDNA.

Tabela 5. Teste com kits de extração de RNA

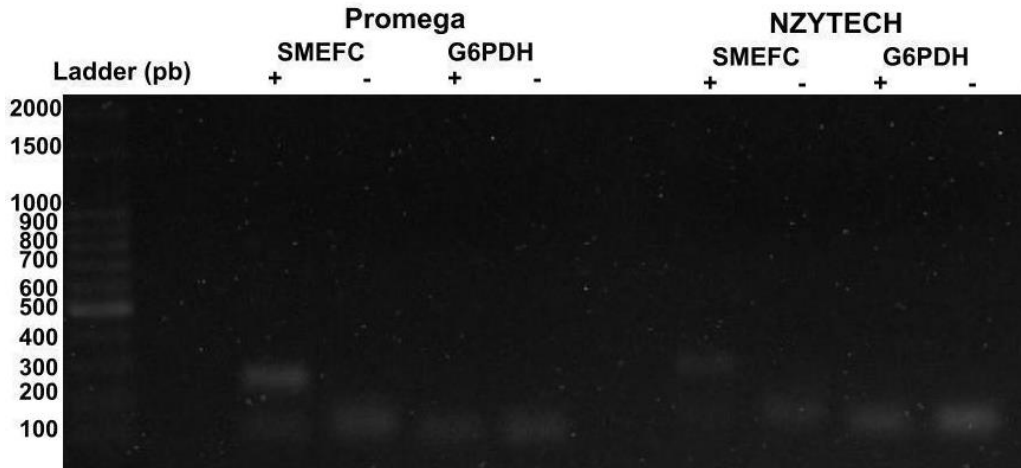
KIT DE EXTRAÇÃO	Concentração (ng/μL)	A260/280	A260/230
Protocolo 1 (Gertrudes)	35,0	1,97	0,29
Protocolo 1 (Mafalda)	134,7	1,87	1,05
Protocolo 2 (Gertrudes)	21,3	1,45	0,28
Protocolo 2 (Mafalda)	5,9	0,82	0,27

Fonte: a autora.

Legenda: resultados obtidos através do equipamento NanoDrop One, após extração de RNA total de amostras sanguíneas.

4.1.2 Padronização do protocolo de PCR

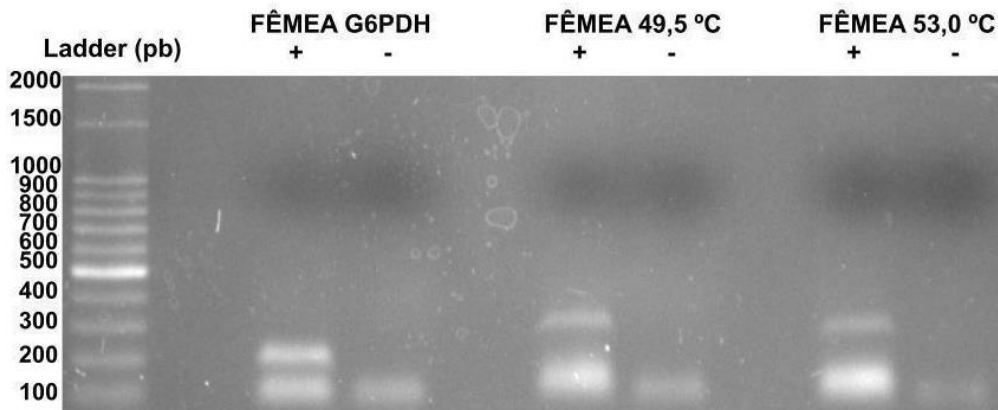
Utilizando o cDNA sintetizado, foram iniciados os experimentos para testar os primers SMEFC PAR 1 (tamanho esperado do amplicon de 278 pb) e primer *housekeeping* G6PDH (tamanho esperado do amplicon de 122 pb, segundo DE BOEVER, *et al.*, 2008) e estabelecer o melhor kit de PCR para a amplificação. Foram testados os kits GoTaq G2 colorless Master Mix (PROMEGA) e NZYtaq II 2x Green Master Mix (NZYTECH). Considerando a informação fornecida pelo fabricante dos primers, a primeira temperatura de anelamento testada foi 57°C. Conforme pode ser observado na figura 15, foi encontrada uma banda para SMEFC na altura esperada, utilizando ambos kits de PCR. Entretanto, os primers controles (G6PDH) aparentemente não se anelaram à sequência de interesse na temperatura de 57 °C em nenhum dos casos. Devido à presença de uma banda mais visível, o kit GoTaq G2 colorless Master Mix (PROMEGA) foi escolhido para dar continuidade aos testes.

Figura 15. Teste dos kits de PCR

Fonte: a autora.

Legenda: resultados obtidos em gel de eletroforese a 1,5% para amostras de sangue de fêmea, contendo *primers* SMEFC PAR 1 e G6PDH, e PCR realizado com kits da Promega e NZYTECH. (+) amostras contendo DNA. (-) controles negativos.

Buscando adequar o anelamento e amplificação do par de *primers* controle (G6PDH), foram em seguida testadas algumas temperaturas (conforme tabela 3 na seção de Materiais e Métodos), tendo sido eleita a temperatura de 64°C como a mais eficiente, e usada a partir de então (figura 16).

Figura 16. Teste com temperaturas de amplificação para SMEFC

Fonte: a autora.

Legenda: resultado do gel de eletroforese a 1,5% para amostras de sangue de fêmea, contendo *primers* SMEFC PAR 1 (a 49,5 e 53,0°C) e G6PDH. (+) amostras contendo DNA. (-) controles negativos.

Após alguns problemas com contaminações e dificuldades de reprodução dos resultados, optou-se pelo teste de um novo gradiente de temperatura para o anelamento do PAR 1 da proteína SMEFC, tendo sido testadas diversas temperaturas (conforme tabela 3). Notou-se que a amplificação estava ocorrendo em uma faixa de temperatura entre 49,5 a 53 °C (figura 16).

4.1.3 Testes com amostras de machos

Uma vez estabelecido o melhor protocolo para extração de RNA, síntese de cDNA e PCR em fêmeas, foi realizada coleta e extração de RNA de dois indivíduos machos (Chicken Little e HeiHei) (tabela 6).

Tabela 6. Extração de RNA de machos

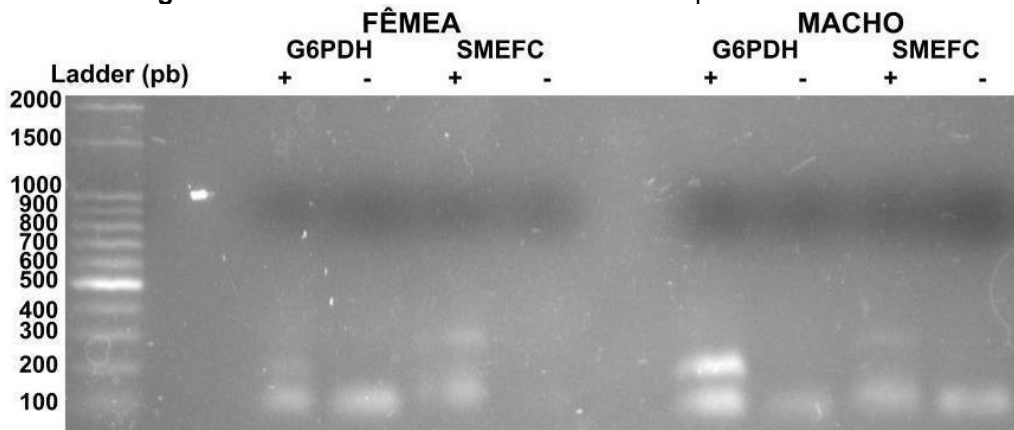
INDIVÍDUO	Concentração (ng/ μ L)	A260/280	A260/230
CHICKEN LITTLE	88,0	1,94	1,82
HEIHEI	51,8	1,94	1,55

Fonte: a autora.

Legenda: resultados obtidos através do equipamento NanoDrop One, após extração de RNA total de amostras sanguíneas.

Considerando que os melhores resultados de alinhamento para fêmeas foram observados entre 49 e 53°C, o primeiro teste realizado com machos e fêmeas foi feito em uma temperatura intermediária (51°C) (figura 17). Porém, a análise do gel demonstrou que os indivíduos machos apresentaram anelamento inesperado, exibindo uma banda de aproximadamente 200-300 pb, semelhante ao tamanho esperado para o anelamento de fêmeas (figura 17).

Figura 17. PCR com machos e fêmeas e 51°C para anelamento

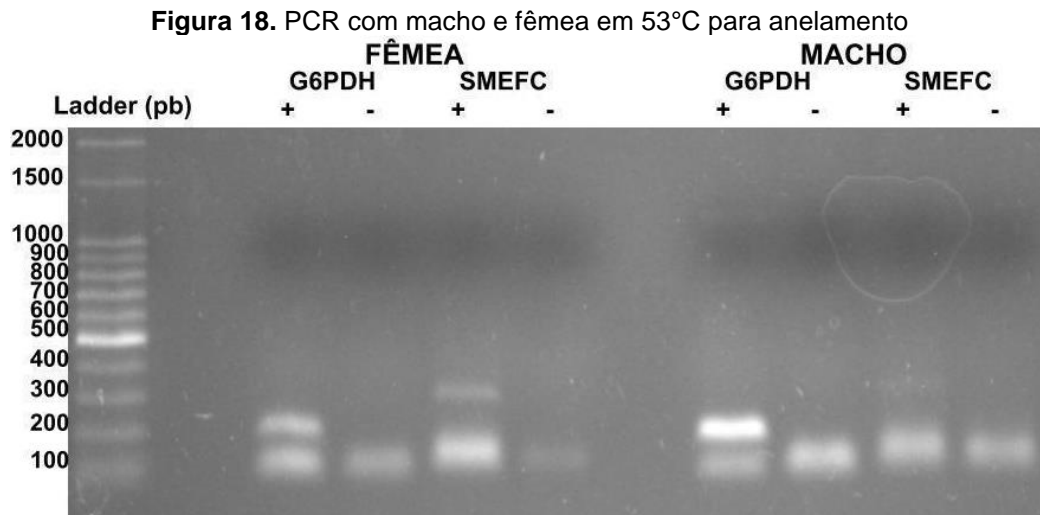


Fonte: a autora.

Legenda: resultado do gel de eletroforese a 1,5% para amostras de sangue de fêmea e macho, contendo *primers* SMEFC PAR 1 e G6PDH. (+) amostras contendo DNA. (-) controles negativos.

Após investigação bibliográfica, verificou-se que temperaturas maiores tendem a gerar maior especificidade de anelamentos, porém temperaturas muito altas impedem anelamentos, enquanto temperaturas baixas geram anelamentos inespecíficos (DE BOEVER, *et al.*, 2008; ÇAKMAK, *et al.*, 2017). Assim, foi realizada

nova tentativa, utilizando a temperatura de 53°C (figura 18), porém também foi observada uma banda fraca para as amostras de macho, presente na mesma altura correspondente às bandas dos indivíduos fêmeas. Quantidades diferentes de ciclos de PCR também foram testadas, porém sem sucesso (dados não mostrados). Por se tratar de uma banda fraca, o pouco material proveniente do PCR não constituía quantidade suficiente para um sequenciamento da amostra.



Fonte: a autora.

Legenda: resultado do gel de eletroforese a 1,5% para amostras de sangue de fêmea e macho, contendo *primers* SMEFC PAR 1 e G6PDH. (+) amostras contendo DNA. (-) controles negativos.

4.1.4 Análises de bioinformática

Visando investigar a presença de uma banda fraca em amostras de machos no PCR com *primers* para SMEFC, julgou-se necessário realizar novas análises de bioinformática. Para isso, foi inicialmente realizado um PCR virtual com a sequência de mRNA de SMEFC e o par de *primers* PAR 1 utilizados nos testes laboratoriais, porém retirando um nucleotídeo de cada iniciador (como descrito no tópico 3.5.1), para verificar a possibilidade de alinhamento inespecífico. Como resultado, observou-se anelamentos inespecíficos do PAR 1 de *primers* SMEFC com 19 nucleotídeos (figura 19). As sequências foram então verificadas, através de BLAST entre elas e a sequência de interesse (mRNA da proteína SMEFC), e apenas a primeira apresentou 100% de anelamento. Aparentemente essa sequência com 100% de compatibilidade é uma cópia da sequência de mRNA da proteína SMEFC, pois apresenta a mesma sequência, representando possivelmente uma duplicação dos bancos de dados do NCBI (figura 19).

Figura 19. Resultado de PCR virtual utilizando *primers* SMEFC

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	AGAGAGCGGAACCTGAACC	Plus	19	2377	2395	59.02	57.89	2.00
Reverse primer	GGCTAATGAGCTCTCGGCT	Minus	19	2653	2635	59.25	57.89	6.00
Product length	277							

Products on intended targets
 >XM_040655274.1 PREDICTED: Gallus gallus transcription factor 4-like (LOC121108224), mRNA

product length = 277
 Forward primer 1 AGAGAGCGGAACCTGAACC 19
 Template 2377 2395

Reverse primer 1 GGCTAATGAGCTCTCGGCT 19
 Template 2653 2635

Products on potentially unintended templates
 >XM_046934441.1 PREDICTED: Gallus gallus transcription factor 4-like (LOC121108224), mRNA

product length = 277
 Forward primer 1 AGAGAGCGGAACCTGAACC 19
 Template 2377 2395

Reverse primer 1 GGCTAATGAGCTCTCGGCT 19
 Template 2653 2635

>XM_040701153.2 PREDICTED: Gallus gallus RTF1 homolog, Paf1/RNA polymerase II complex component (RTF1), transcript variant X1, mRNA

product length = 273
 Forward primer 1 AGAGAGCGGAACCTGAACC 19
 Template 176 ..C...GA.....G... 194

Reverse primer 1 GGCTAATGAGCTCTCGGCT 19
 Template 448 A.G.GC.....A... 430

Fonte: a autora.

Legenda: seta preta indica a sequência idêntica à sequência do mRNA de SMFC, contendo todos os mesmos parâmetros. Setas vermelhas indicam a sequência com anelamento inespecífico e o tamanho de amplicon correspondente.

Apesar de as outras sequências não apresentarem alinhamentos perfeitos com o mRNA de interesse, uma comparação entre os tamanhos do comprimento dos amplicons produzidos em cada um dos anelamentos inespecíficos revelou que, um dos potenciais produtos (*PREDICTED: Gallus gallus RTF1 homolog, Paf1/RNA polymerase II complex component (RTF1)*), proveniente do cromossomo 5, apresenta um amplicon de 273 pb, tamanho similar ao observado nos experimentos com machos (figura 19). Portanto, hipotetizou-se que um anelamento inespecífico do *primer* PAR 1 em machos pode estar amplificando o mRNA proveniente deste outro gene, o que explicaria a presença de uma banda fraca nas amostras masculinas e em altura muito similar à banda feminina esperada (contendo 278 pb).

Assim, optou-se pela utilização de um novo par de *primers*, uma vez que outros três pares haviam sido desenhados em trabalho prévio (tabela 2, no tópico 3.3) (FABICHAKI, 2021). Para definição do par mais específico, realizou-se as mesmas análises virtuais com outros pares de *primers*, e considerou-se que o conjunto de *primers* PAR 8 apresenta melhor compatibilidade com a sequência desejada e menor

probabilidade de anelamento inespecífico (tabela 7), sendo compatível com outras seqüências apenas quando retirados 4 nucleotídeos de cada um dos iniciadores.

Tabela 7. PCR virtual com *primers* para seqüência SMEFC

PARES DE PRIMERS	Quantidade de nucleotídeos		Alinhamentos inespecíficos	Tamanho do amplicon
	FOR	REV		
PAR 1	20 (100%)	20 (100%)	NO	278
	19	19	>XM_046936343.1 XM_004937174.5	1712
			>XM_046919695.1 + 19 VARIANTES	273
	18	18	>XM_040656816.1	214 E 208
	17	17	>XM_040671878.2 + 3 VARIANTES	1955
			>XM_040656816.1	213 E 207
PAR 2	20 (100%)	20 (100%)	NO	359
	19	19	>XM_040658092.2 >XM_425565.8	597
			>XM_046936343.1 >XM_004937174.5	2091
			>XM_046899151.1	811
			>XM_046920670.1 + 7 VARIANTES	804
			>NM_001031381.3	237
	18	18	COM A PRÓPRIA SEQUÊNCIA	432
			>XM_040658092.2 >XM_425565.8	596
			>XM_040671666.2	111
			>NM_001031381.3	235
			>XM_046936343.1 >XM_004937174.5	2089
			>XM_046923946.1	1260
			>XM_046898447.1 + 4 VARIANTES	1264
	17	17	>XM_046899151.1	809
			COM A PRÓPRIA SEQUÊNCIA	431
			>XM_040670579.2	3750
>XM_040670578.2			3720	
>XM_046923946.1			1259	
>XM_046898447.1 + 4 VARIANTES			1263	
PAR 3	20 (100%)	20 (100%)	NO	553
	19	19	>XM_040667963.2 >XM_040698161.2	3323

			>XM_046943167.1	1547
			>XM_046906542.1	526
	18	18	>XM_040685305.2 + 4 VARIANTES	933
			>XM_040648897.2 >XM_040648896.2	936
	17	17	>XM_040685305.2 + 3 VARIANTES	932
			>XM_040648897.2 + 4 VARIANTES	935
PAR 8	20	20	NO	530
	19	19	NO	-
	18	18	NO	-
	17	17	NO	-
	16	16	>XM_040674142.2 >XM_421749.8	101

Fonte: a autora.

Legenda: análise *in silico* dos *primers* PAR 8. Resultados obtidos através da plataforma NCBI.

4.2 Segundo bloco de experimentos – Novos protocolos de extração e *primers* PAR 8

Considerando a aquisição de um novo par de *primers* (PAR 8), foi necessário iniciar um novo bloco de experimentos para definir a temperatura de anelamento. Além disso, as amostras de RNA e cDNA haviam praticamente se esgotado. Outro fator complicador foi o término de ambos os kits de extração de RNA utilizados nos protocolos 1 e 2, e havia poucos recursos para obtenção de novo kit. Portanto, foi realizado levantamento bibliográfico para estabelecer qual o melhor método de extração de RNA a partir de sangue de aves, e iniciou-se uma bateria de testes para verificar a melhor forma de realizar o RT-PCR para as próximas análises. Na literatura, um estudo comparando três métodos de extração concluiu que o kit Quick-RNA Whole Blood (ZYMO RESEARCH) seria o mais apropriado para extração de RNA de sangue de ave (KOMINI & BOUNAS, 2022), e, portanto, esse kit foi adquirido com a verba restante. Em adição, outros kits e reagentes foram emprestados para testes.

Um dos protocolos testados foi utilizando kit de RT-PCR de apenas um passo (QIAGEN ONE STEP RT-PCR). Apesar de tentativas de alteração em diversas variáveis (concentração de *primer*, dNTP, temperatura, quantidade de ciclos), os resultados para essa metodologia apresentaram, em sua maioria, contaminações nos controles negativos.

Seguindo o procedimento inicial, testou-se os protocolos de 3 a 11 (conforme tabela 1 da seção de Materiais e Métodos) para extração de RNA, seguido de síntese de cDNA e PCR utilizando os kits e *primers* controle, já padronizados previamente. Entretanto, em nenhuma das tentativas obteve-se sucesso.

Supondo que o fracasso nas adaptações de protocolos de extração de RNA do sangue total de aves era devido ao tempo de armazenamento das amostras sanguíneas em congelador, foi realizada uma nova coleta de sangue de um indivíduo macho (Rocky) e um indivíduo fêmea (Ginger) de *G. gallus*. Para cada um dos indivíduos, foram coletados 2 mL de sangue, sendo 1 mL acrescido de conservante de RNA (LifeGuard Soil Preservation – QIAGEN) e armazenado em tubo com EDTA, enquanto o outro 1 mL de sangue foi armazenado apenas com EDTA. Após a obtenção de novas amostras sanguíneas, novas tentativas de extração de RNA foram realizadas utilizando os protocolos 4, 6, 7, 8, 9 e 10.

Adicionalmente, buscando otimizar a quantidade inicial de células para a extração, incluiu-se um passo de centrifugação prévia das amostras, para formar um pellet de células. Também foram incluídos tratamentos adicionais de limpeza com tampões e tratamentos com DNase. Apesar de todos os procedimentos testados terem resultado em amostras com valores de concentração de RNA detectáveis por NanoDrop (conforme tabela 8), todas as tentativas de RT-PCR realizadas após a extração também foram sem sucesso, inclusive para os testes utilizando o *primer* controle, G6PDH.

Tabela 8. Quantidade e qualidade de RNA total extraído de sangue de *G. Gallus* por diferentes protocolos

PROTOCOLOS	CONCENTRAÇÃO (ng/uL)	A260/280	A260/230
Protocolo 3	3,50	1,75	0,08
Protocolo 3	4,60	2,48	0,25
Protocolo 4	8,30	2,37	0,91
Protocolo 4	7,00	2,14	0,66
Protocolo 4	14,70	2,15	1,09
Protocolo 4	21,50	2,08	1,04
Protocolo 4	20,40	2,07	1,15
Protocolo 4	20,20	2,10	1,08
Protocolo 4	98,82	2,09	1,73
Protocolo 4	13,80	2,15	0,69
Protocolo 4	9,40	2,07	0,69
Protocolo 5	8,20	2,29	0,69
Protocolo 6	49,30	2,06	2,01

Protocolo 6	19,10	1,98	1,79
Protocolo 6	23,00	1,95	1,01
Protocolo 6	24,60	2,03	1,59
Protocolo 6	18,90	1,85	1,28
Protocolo 6	16,50	1,91	1,13
Protocolo 6	60,00	2,02	1,77
Protocolo 6	29,60	1,99	1,45
Protocolo 6	16,60	1,90	1,16
Protocolo 7	40,70	1,91	1,94
Protocolo 7	298,90	1,87	2,26
Protocolo 7	1104,00	1,88	2,42
Protocolo 7	548,30	1,89	2,42
Protocolo 7	282,59	1,87	2,27
Protocolo 7	36,68	1,94	1,83
Protocolo 7	80,19	1,89	2,08
Protocolo 7	18,75	1,88	1,25
Protocolo 7	19,53	1,86	1,54
Protocolo 7	280,00	1,87	2,30
Protocolo 8	49,70	1,97	1,84
Protocolo 8	218,00	2,05	2,09
Protocolo 9	285,08	1,83	0,84
Protocolo 9	123,60	1,90	1,45
Protocolo 10	9,10	1,81	0,69
Protocolo 10	29,60	1,85	1,71
Protocolo 10	15,10	1,66	0,85
Protocolo 11	20,20	1,92	0,80

Fonte: a autora.

Legenda: resultados obtidos através de NanoDrop. Em preto: Resultados das amostras sanguíneas SEM conservante de RNA. Em vermelho: Resultados das amostras sanguíneas COM conservante de RNA.

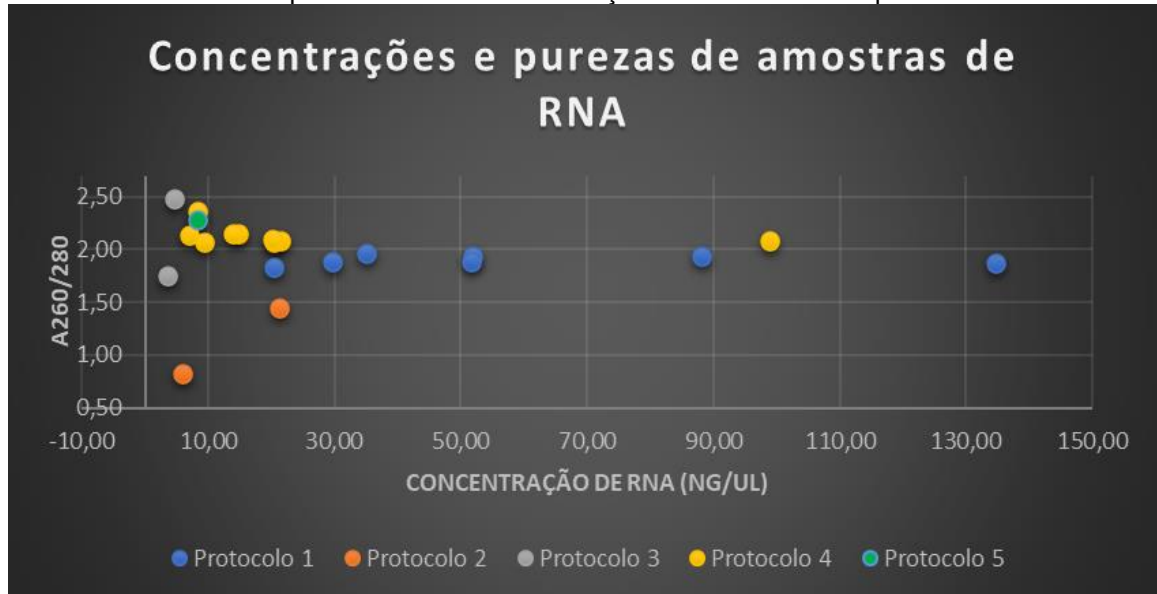
Abaixo, pode-se observar também uma relação de dispersão dos valores de concentração de RNA obtidos entre todos os protocolos testados (tabela 8), analisando sua concentração em relação aos valores de pureza do parâmetro A260/280, visto que valores próximos a 2,00 indicam amostras mais puras, enquanto valores dispersos, indicam contaminação por proteínas (gráficos 1 A e B). De acordo com os resultados, o melhor protocolo para extração permaneceu sendo o protocolo 1, onde, apesar das concentrações não serem tão altas como o protocolo 7, as amostras extraídas se mantiveram em uma faixa de razão A260/280 mais próxima a 2,00, como desejado. Ainda que o protocolo 4 também apresente valores próximos a 2,00 de A260/280, este apresentou concentrações de DNA total inferiores quando comparado ao protocolo 1.

Novamente, por constatar que nenhum dos resultados de PCR apresentavam bandas nos géis de agarose, mesmo com valores de extração de RNA altos e razões consideradas de amostras puras, algumas hipóteses foram levantadas: a) a enzima para produção de cDNA não estava funcionando adequadamente. Foi então testado outro kit para a produção de um novo cDNA (GoTaq 2-step RT-qPCR System - PROMEGA), sem sucesso; b) a Polimerase não estava funcionando. Testes usando amostras de DNA e também substituição por outra polimerase (Class five Hot Start Taq DNA Polimerase - NEOBIO) também não demonstraram resultados positivos; c) o RNA extraído estava em grandes quantidades, porém degradado; d) as amostras extraídas pelo protocolo 1 poderiam estar contaminadas com DNA, o que explicaria os anelamentos apenas com os produtos provenientes do protocolo 1. Porém, além da utilização de DNases em todos os protocolos utilizados, ao realizar testes com a utilização de DNA + *primer housekeeping* (G6PDH), foi observado um anelamento inespecífico (com tamanho de banda superior à esperada com RNA, entre 900 - 1000 pb), indicando que o *primer* G6PDH tem a capacidade de se anelar em molécula de DNA, além de RNA, entretanto produzindo uma banda de tamanho muito diferente (dados não mostrados). Esse fato deve-se pelo alinhamento de cada um dos *primers* em uma região diferente de dois éxons, ou seja, cada iniciador se alinha numa sequência de um éxon diferente, contendo intron entre eles (OLIAS, *et al.*, 2014). O tamanho superior da banda produzida utilizando DNA indica que, nas amostras anteriores, testadas com cDNA, não houve contaminações com DNA genômico, pois não foi observada banda nesta altura do gel. Esse resultado sugere que as ampliações obtidas pelo *primer* controle nas amostras que observamos nas figuras 15, 16, 17 e 18, se tratavam de cDNAs puros, validando também o anelamento obtido pelo PAR 1. Ou seja, acredita-se que não houve contaminação de DNA genômico nas amostras anteriores das quais obteve-se resultados positivos, portanto essa problemática foi descartada ao analisar as hipóteses de não anelamento com os *primers* PAR 8.

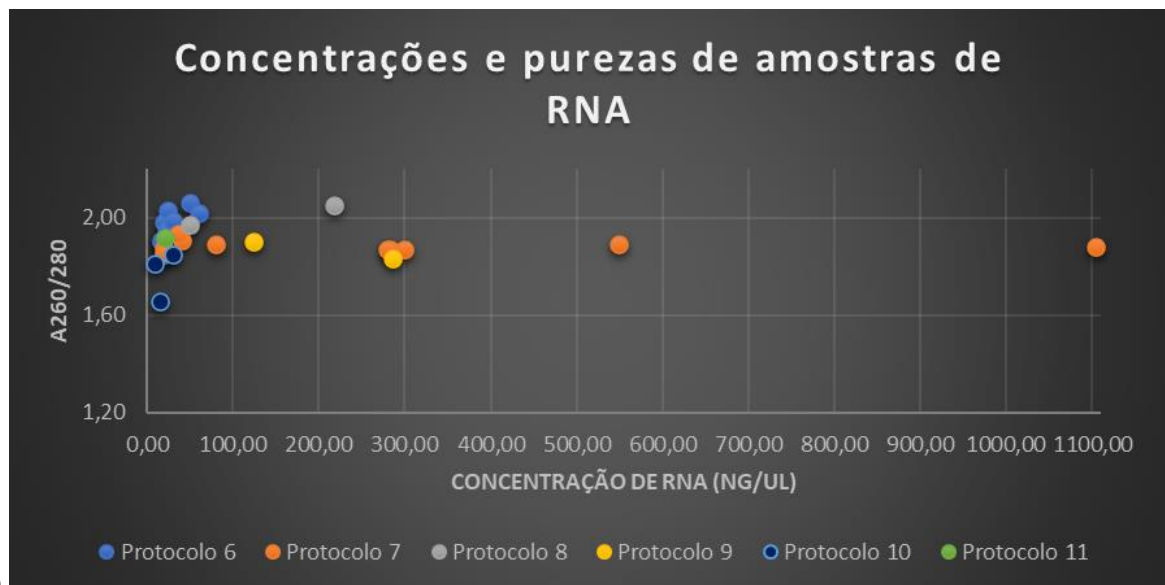
Após os inúmeros testes realizados para extração de RNA sem sucesso, e com o término do kit para síntese de novo cDNA, foi realizada uma última tentativa, utilizando amostras remanescentes de cDNA armazenadas, provenientes de extração realizada com o protocolo 1 de sangue de fêmeas. Felizmente, foram obtidos resultados positivos com o *primer housekeeping*, sem contaminação aparente (dados não mostrados). Com isso, o *primer* PAR 8 (SMEFC) foi ressuspenso e testado em

gradiente de temperaturas (tabela 3 da seção de Materiais e Métodos). Entretanto, nenhuma banda foi observada no procedimento de eletroforese realizado, indicando alguma das opções: a) não há presença de RNAm de SMEFC em sangue de fêmeas de *G. gallus*; b) a integridade do RNA/cDNA está comprometida ou c) o gradiente de temperatura realizado não foi satisfatório para o anelamento dos *primers* PAR 8.

Gráfico 1. Dispersão dos dados de extração de RNA conforme protocolos



(A)



(B)

Fonte: a autora.

Legenda: (A) Protocolos 1 a 5; (B) Protocolos 6 a 11.

5 DISCUSSÃO

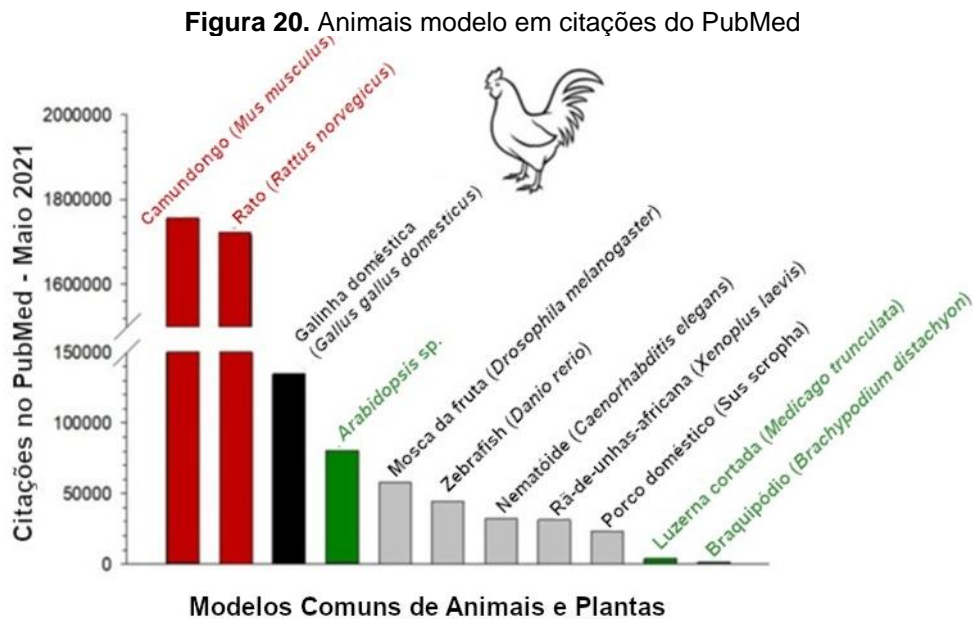
5.1 Genoma de *G. gallus* e seus desafios

O desenvolvimento de novas tecnologias para sexagem de aves é importante pois teria papel em diferentes frentes de interesse da ornitologia, auxiliando não somente no processo de sexagem para diferentes aves em si, como facilitando o procedimento no dia a dia de conservadores, pesquisadores e comerciantes. No presente trabalho, buscamos caracterizar uma molécula com potencial uso em imunossexagem. A ideia de um kit caseiro de sexagem seria possível caso alguma molécula diferencialmente expressa em tecidos (especialmente o sangue) de fêmeas e machos fosse identificada. Em estudos prévios, elencamos a proteína predita SMEFC (Ensembl: ENSGALG00000047434; NCBI/mRNA: XM_040655274.1) como candidata por supostamente ser codificada por um gene presente no cromossomo W, exclusivo de fêmeas de aves. Adicionalmente, segundo nossas análises, aparenta ter domínio transmembrana e estar presente na membrana celular de células do sangue de galinha.

Apesar dos indícios, a proteína ainda é apenas predita, ou seja, anotada usando métodos de predição genética. A montagem de genomas gera como resultado uma sequência longa de DNA, organizada por reconstrução computacional a partir da leitura de sequências menores. A partir da montagem, realiza-se a anotação deste genoma, onde softwares específicos buscam por informações biologicamente relevantes nesta longa sequência, como por exemplo regiões supostamente codificantes (EKBLUM & WOLF, 2014). Uma boa anotação depende diretamente de uma boa montagem, e sempre haverá erros no processo.

A galinha doméstica é o terceiro animal modelo mais utilizado em pesquisa científica (figura 20), segundo um levantamento de 2021, realizado através da plataforma PubMed (<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>>) (FLORES-SANTIN & BURGGLEN, 2021). A utilização de *G. gallus* como modelo animal em diversas pesquisas inclui algumas vantagens, como: a sua longa história e utilização como modelo de pesquisa; disponibilidade de diferentes raças com características de interesse e, além disso, sua grande eficácia como animal de produção, gerando grandes quantidades de carne e ovos. No entanto, sua utilização também apresenta desvantagens. A intensa seleção artificial à qual a galinha foi submetida levou à perda

de diversidade genética e ao desenvolvimento de respostas fisiológicas que podem não ser representativas de aves em geral (FLORES-SANTIN & BURGLEN, 2021).



Fonte: adaptada de: Flores-Santin & Burglen, 2021.

Legenda: associação entre diferentes modelos de estudos genômicos e quantidade de citações disponíveis pela plataforma PubMed, em Maio de 2021.

No caso de estudos genômicos, o avanço de ferramentas e tecnologias, além da produção de bancos de dados com informações genéticas disponíveis gratuitamente, levaram ao aumento no desenvolvimento e interesse de pesquisadores em relação aos estudos com galinhas (CHENG & BURT, 2018). Além do frango de corte representar um importante alimento para a sociedade atual, outros estudos genéticos, principalmente envolvendo o desenvolvimento embrionário, fizeram com que *G. gallus* ganhasse um importante papel como animal modelo não mamífero (ANTIN & KONIECZKA, 2005; ICHIKAWA, *et al.*, 2022a). Tais estudos auxiliaram em diversas pesquisas para diferentes áreas, não somente avícolas, tornando a galinha um dos animais modelos mais viáveis e com um grande desenvolvimento na anotação do genoma e na caracterização do transcriptoma (ANTIN & KONIECZKA, 2005; CHENG & BURT, 2018).

Existem mais de 20 sites de acesso gratuito, como Ensembl (<<https://www.ensembl.org/index.html>>), NCBI (<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>), AvianNet (<<http://www.chicken-genome.org/>>), Centro de Sequenciamento Genômico da Universidade de Washington (WUGSC) (<<http://genome.wustl.edu/projects/chicken/>>), Universidade da Califórnia em Santa

Cruz (UCSC) (<<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?db=caeRem2>>), entre outros, que apresentam diversos dados do genoma de *G. gallus*, variando quanto à estrutura dos dados fornecidos, linguagens de programação e outros bancos de dados associados (ANTIN & KONIECZKA, 2005). Além disso, é possível encontrar diversas informações relatadas em diferentes estudos ômicos, envolvendo desenvolvimento de vários tecidos embrionários, transcriptoma ou montagens de cromossomos artificiais bacterianos (BAC), utilizando *G. gallus* como animal modelo (ANTIN & KONIECZKA, 2005; CHENG & BURT, 2018).

A primeira montagem do genoma da galinha foi publicada em 2004 (HILLIER, *et al.*, 2004), e, desde então, diversas novas versões buscaram aprimorar as informações (figura 21). Por exemplo, duas montagens de genoma que são utilizadas como referência atualmente são a GRCg6a, criada pelo Genome Reference Consortium (GRC) em 2018, e a bGalGal1.mat.broiler.GRCg7b (ou GRCg7b), a mais atual, lançada pelo Projeto Genoma de Vertebrados (VGP), em 2021 (HUANG, *et al.*, 2023). Entretanto, a montagem GRCg6a foi recentemente removida do banco de dados do NCBI, o que geralmente ocorre devido a problemas encontrados durante o processamento padrão de anotação do genoma, como erros de qualidade nos dados ou atualizações significativas (NCBI, 2024a; 2024b).

Figura 21. Algumas das montagens do genoma de *G. gallus*

GenBank	RefSeq	Name	Level	Date	Action
GCA_000002315.5	GCF_000002315.6	GRCg6a	Chromosome	Mar 27, 2018	⋮
GCA_000002315.5	GCF_000002315.5	GRCg6a	Chromosome	Mar 27, 2018	⋮
GCA_000002315.4	n/a	GRCg6	Chromosome	Feb 2, 2018	⋮
GCA_000002315.3	GCF_000002315.4	Gallus_gallus-5.0	Chromosome	Dec 16, 2015	⋮
GCA_000002315.2	GCF_000002315.3	Gallus_gallus-4.0	Chromosome	Nov 22, 2011	⋮
GCA_000002315.1	GCF_000002315.2	Gallus_gallus-2.1	Chromosome	Nov 1, 2006	⋮
GCA_000002315.1	GCF_000002315.1	Gallus_gallus-2.1	Chromosome	Nov 1, 2006	⋮

Fonte: NCBI, 2024a.

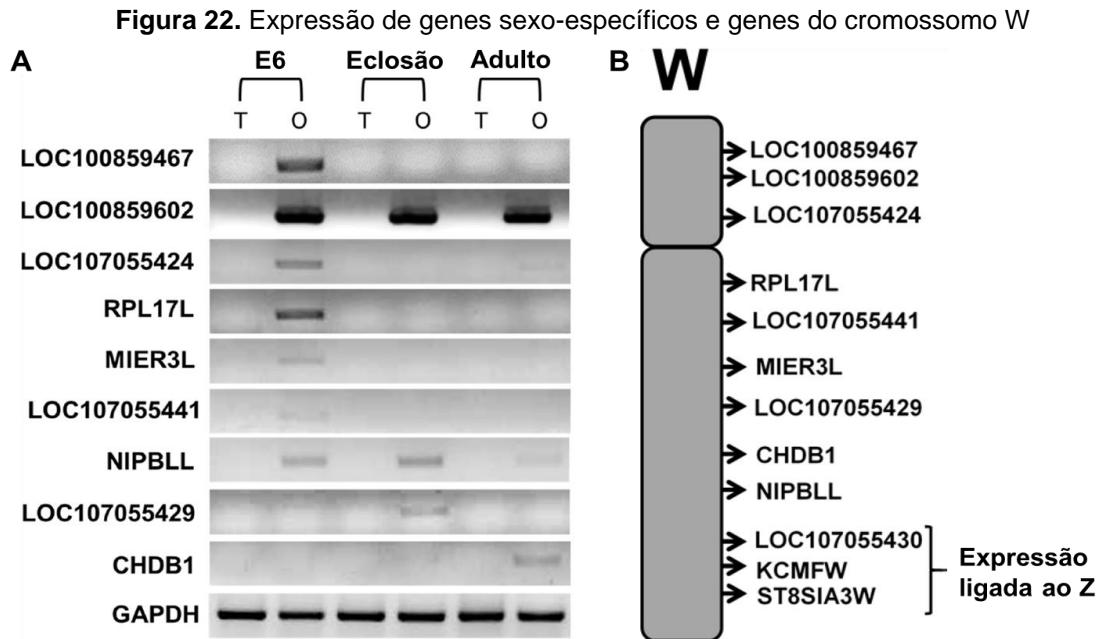
Mesmo sendo um modelo de grande importância econômica e para a pesquisa, o genoma da galinha ainda apresenta diversas lacunas, devido às dificuldades associadas ao seu estudo, como a grande proporção de GC em algumas regiões do genoma das aves, as regiões ricas em repetições e a negligência de estudos e análises dos microcromossomos ricos em genes, levando a perdas de informações nos sequenciamentos (WEISSENSTEINER & SUH, 2019; PIÉGU, *et al.*, 2020). Ainda

que a galinha doméstica seja a representação de ave com maior informação genética em bancos de dados disponíveis online, novos estudos de genômica, transcriptoma e proteoma se fazem necessários para complementarização dos dados e robustez dos resultados obtidos (CHENG & BURT, 2018; DU & GUO, 2022). Adicionalmente, atualizações nesses sistemas são realizadas frequentemente, conforme o desenvolvimento de novas publicações de materiais e/ou pesquisas, com intuito de melhorar a montagem do genoma desse animal modelo. Cada site/página de banco de dados contém links de acesso as outras páginas, formando uma rede de troca de informações, porém nem sempre esses bancos de dados são atualizados concomitantemente, gerando inconsistências quando são comparadas sequências de dois ou mais bancos de dados (RODRIGUES, 2023), o que dificulta os estudos.

O presente trabalho foi realizado a partir de estudos *in silico* prévios (FABICHAKI, 2021), que utilizaram a versão então disponível do genoma (GRCg6a). Entretanto, com a nova atualização (GRCg7b), os dados para SMEFC foram removidos e já não são encontrados na plataforma Ensembl, sendo possível ainda visualizar as sequências correspondentes na plataforma NCBI. Isso pode significar inconsistências nas montagens do genoma e/ou a inexistência do transcrito antes encontrado através de algoritmos do software, dado que pode ser averiguado realizando as análises de presença/ausência do mRNA em questão e posterior sequenciamento, em amostras da espécie estudada. Buscando elucidar essas questões, nosso grupo atualmente está realizando a atualização das análises *in silico* utilizando diferentes bancos de dados, incluindo a nova montagem do genoma de *G. gallus* (GRCg7b), e espera-se encontrar mais informações a respeito de SMEFC que possam auxiliar no seu estudo como potencial gene sexo-específico proveniente do cromossomo W.

Um estudo recente (RALLABANDI, *et al.* 2019), avaliando por RT-PCR a expressão de 36 genes relacionados ao cromossomo W, encontrou um conjunto de nove genes expressos exclusivamente em fêmeas de *G. gallus*, em vários estágios de desenvolvimento, no sistema reprodutivo da ave. Sete desses genes foram encontrados ativos no dia embrionário 6 (E6): *NIPBLL*, *MIER3L*, *LOC100859467* (*RASA1*), *RPL17L*, *LOC100859602*, *LOC107055424* (*ZNF-532L*) e *LOC107055441*. Três genes foram encontrados expressos durante a eclosão: *LOC100859602*, *NIPBLL* e *LOC107055429*. Por fim, três desses genes encontravam-se expressos em adultos: *CHDB1*, *LOC100859602* e *NIPBLL*. Observou-se que o *LOC100859602* foi

constantemente expresso em todos os três estágios de desenvolvimento (figura 22-A). Esses genes foram anotados utilizando técnicas *in silico* e a ferramenta *UCSC genome browser* (figura 22-B), buscando identificar genes específicos feminilizantes provenientes do cromossomo sexual que auxiliam na determinação sexual e gonadal em diferentes etapas do desenvolvimento (RALLABANDI, *et al.*, 2019).



Fonte: adaptada de Rallabandi, *et al.*, 2019.

Legenda: (A) Resultado de RT-PCR sobre a expressão específica dos sexos, analisando os testículos (T) e ovários (O) em vários estágios de desenvolvimento - dia embrionário 6 (E6), eclosão e adulto; (B) Localização dos genes específicos femininos e genes homólogos em Z.

Dessa forma, observando o estudo de genes expressos de maneira sexo-específica, acredita-se que é possível que a proteína SMEFC realmente seja expressa dessa mesma forma. Entretanto, ainda que o PAR 1 de *primers* para SMEFC tenha indicado sua possível expressão em fêmeas, a presença de uma banda fraca em machos apontou para um potencial alinhamento inespecífico, que impediu a conclusão definitiva. Esse alinhamento inesperado também pode estar relacionado ao sequenciamento pobre das aves, que acaba por manter desconhecidas as informações de determinados cromossomos, como discutido acima. Apesar dos testes de BLAST realizados previamente (FABICHAKI, 2021) não apontarem homologias com outros genes, é possível que haja genes similares em cromossomos diferentes, como o Z, ainda não claramente descritos na literatura ou na montagem do genoma nas plataformas atuais. Nessas análises pôde-se observar, por exemplo, que, até mesmo proteínas como a *FAF*, descrita por Ayers e colaboradores (2012) por sua

expressão gonadal feminina e sem homologias aparentes, apresentaram novas homologias com o cromossomo Z (77,33%, segundo FABICHAKI, 2021), na montagem do genoma disponibilizada pelo NCBI no momento da análise (GRCg6a).

Para contornar o problema encontrado com o uso do PAR 1, verificando a confiabilidade do uso de dados de plataformas online e a presença ou ausência de sequências homólogas ao SMEFC em amostras sanguíneas, foi decidido por recomeçar as investigações com um novo par de *primers* (PAR 8). Entretanto, nos deparamos com um novo desafio: o próprio RNA.

5.2 Extração de RNA e suas dificuldades

A molécula de RNA caracteriza-se por sua instabilidade, ocasionada por se tratar de uma fita simples de fácil degradação, especialmente quando em contato com enzimas, como as RNases. Ainda, na classe dos RNAs, há algumas separações por categorias de funcionalidade, como os RNAs mensageiros, transportadores, ribossomais, microRNAs, entre outros (GUO, *et al.*, 2022; LI, *et al.*, 2022a). Todo esse conjunto de moléculas encontra-se no interior celular, seja no núcleo ou no citoplasma (LI & GUO, 2022; ROLBAND, *et al.*, 2022). Com isso, ao realizar a extração de RNA total de qualquer tipo de amostra utilizando um kit comercial, entende-se que o material extraído se trata não somente do RNA de interesse para o estudo, nesse caso o mRNA, como também o conjunto de todas as outras classes de RNAs presentes na amostra bruta.

Ademais, por se tratar de uma molécula instável, ao realizar a extração, agregados à extração podem agir como contaminantes ou causadores de degradação da molécula de interesse, fazendo com que a molécula de estudo esteja presente pós extração, porém com níveis de degradações que interferem diretamente na amplificação posterior realizada por PCR (KIM, *et al.*, 2022), sendo a principal molécula causadora de degradação, a RNase (FATTORINI, *et al.*, 2020).

As RNases são ribonucleases presentes no núcleo e no citosol, que degradam as moléculas de RNA em nucleotídeos, controlando assim a quantidade de RNA na célula. Além do papel na regulação do metabolismo do RNA intra ou extracelular, essas enzimas também possuem atividade antiviral, antibacteriana e antifúngica, bem como envolvimento com proliferação celular, prevenção de apoptose, entre outros (SUN, *et al.*, 2022). Essas RNases podem realizar suas funções sozinhas ou em

complexos de degradação de RNA, reciclando nucleotídeos e até mesmo decompondo RNAs aberrantes, que produziram proteínas prejudiciais ao indivíduo. A degradação do RNA pelas RNases é influenciada por diversos fatores, como a sequência/estrutura dos RNAs, presença de ribossomos durante a tradução (que podem proteger os *loci* vulneráveis), alteração da estrutura do RNA por helicases que modificam sua acessibilidade às RNases, entre outros. As RNases podem ser classificadas em endonucleases, que clivam dentro da cadeia de ácido nucleico, e as exonucleases, que removem nucleotídeos a partir das extremidades das cadeias de ácido nucleico (ARRAIANO, *et al.*, 2010).

Para pesquisas que envolvem RNA, algumas medidas devem ser tomadas para não haver contaminação da amostra, como: utilizar pipetadores automáticos exclusivos para manipulação de RNA, além de pontas de pipeta descartáveis com filtro e tubos de microcentrífuga livres de RNase; autoclavar vidrarias e plásticos para manipular o RNA, além de preparar soluções, tampões, água tratada com inibidores como DEPC (pirocarbonato de dietila); usar detergentes e soluções de H₂O₂ (3%) para limpar dispositivos de eletroforese, seguido de um enxágue com água tratada com DEPC; armazenar soluções em alíquotas pequenas e descartá-las após o uso para evitar contaminação cruzada; evitar usar materiais ou soluções que tenham sido usados para outros propósitos no laboratório; utilizar DEPC para inativar traços de RNase em soluções, vidraria e plásticos; inibidores proteicos de RNase também são recomendados durante a extração e purificação de RNA; trocar frequentemente as luvas para evitar contaminação e estar atento à contaminação de partes do corpo que podem entrar em contato com equipamentos e superfícies de trabalho (GREEN & SAMBROOK, 2019).

Mesmo tomando todos os cuidados necessários durante a extração e manipulação da amostra de RNA, para análise da quantidade e qualidade do RNA presente após a extração, verificando assim sua integridade, algumas técnicas podem ser empregadas. No presente trabalho, a metodologia de quantificação e qualificação disponível para aplicação se tratava do espectrofotômetro NanoDrop One, capaz de analisar amostras de DNA, RNA e proteínas em diferentes comprimentos de ondas, detectando compostos com volumes baixos de amostras, contendo bons custos e eficácia.

Os parâmetros de absorbância A260/A280 e A260/230 detectados pelo Nanodrop podem sinalizar possíveis contaminações em amostras de extração de RNA

total, sejam elas ocasionadas por proteínas, DNA ou compostos orgânicos. Para a extração de RNA total segundo diretrizes obtidas nos manuais do espectrofotômetro NanoDrop One, os valores esperados, caracterizando uma solução pura em RNA, são de ~2,00 para A260/A280 e para A260/A230. Valores inferiores ao estabelecido, normalmente estão relacionados à contaminação pelo tampão utilizado para a estabilização da amostra, porém espera-se que essa alteração não interfira nos próximos passos de produção de cDNA e realização de PCR (LIU, *et al.*, 2015; OHASHI, *et al.*, 2017; DA SILVA JÚNIOR, *et al.*, 2018). Nesse caso, os protocolos que melhor se aproximaram aos parâmetros esperados foram os protocolos 1, 6, 7 e 8. Entretanto, mesmo em altos valores de concentração obtidos após a extração (por exemplo com o protocolo 7), se a amostra estiver constituída por moléculas com alto grau de degradação, não haveria anelamento com os *primers*.

A extração da molécula de RNA em si já é um procedimento que demanda muito cuidado e sensibilidade em cada passo, e esse fator se agrava ainda mais quando associamos a dificuldade da amostra selecionada para a análise (KIM, *et al.*, 2022). O sangue de aves contém hemácias nucleadas, ou seja, ao contrário de mamíferos que apresentam glóbulos vermelhos sem núcleo em sua fase especializada, em aves, assim como em alguns répteis, essas células possuem núcleos mesmo em suas fases maduras (KIM, *et al.*, 2022). A presença do núcleo também impacta na presença de outras moléculas, como as nucleases, que influenciam diretamente na condição do RNA da amostra (KOMINI & BOUNAS, 2022). Além de um maior número de diferentes tipos de RNAs presentes na amostra de sangue de aves, o que pode interferir diretamente devido a interações entre essas moléculas (ZHANG & GUO, 2022), enzimas que apresentam capacidades degradadoras também influenciam não somente na quantidade de RNA acessível para extração, como também na qualidade dessas moléculas. Adicionalmente, destaca-se a variabilidade de expressão genética entre os indivíduos, fazendo com que possa haver também diferentes níveis de expressões genéticas entre os indivíduos da mesma espécie, interferindo nas quantidades de RNAs disponíveis nas amostras estudadas (KIM, *et al.*, 2022).

Diferentes estudos que utilizaram esse mesmo tipo de amostra também discutem a dificuldade na padronização de um protocolo ótimo qualitativa e quantitativamente, relacionando a dificuldade associada à característica do sangue de aves (LIU, *et al.*, 2015; KIM, *et al.*, 2022). Adicionalmente, existe uma dificuldade

associada ao armazenamento e acondicionamento das amostras (LIU, *et al.*, 2015, KOMINI & BOUNAS, 2022). Liu e colaboradores (2015) relatam que a eficiência do RNA proveniente de células nucleadas decai imediatamente após a coleta da amostra, principalmente se mantida em temperatura ambiente, sem o uso de estabilizadores ou então acondicionada de forma errada. Com isso, observa-se a necessidade de realizar, não somente uma alíquotagem ideal das amostras, como também a coleta em períodos relativamente curtos, evitando assim o congelamento excessivo e a degradação. Ainda, existem estudos demonstrando que o congelamento dessas amostras em $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por determinado período de tempo se torna mais viável do que quando comparado ao congelamento em $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (KIM, *et al.*, 2022).

Adicionalmente, é desencorajado o descongelamento e congelamento consecutivo de uma alíquota, o que pode acarretar na modificação das estruturas celulares ocasionadas pela formação de cristais de água ao ser submetido a temperaturas muito baixas (LIU, *et al.*, 2015). Apesar deste procedimento ter sido evitado durante o processamento do material coletado, destacamos aqui um problema técnico encontrado em meio aos procedimentos: mais de uma vez, houve a necessidade de desligamento do fornecimento de energia elétrica no Campus no qual as amostras estavam acondicionadas, levando ao aumento relativo de temperatura, o que também pode ter influenciado diretamente na qualidade das moléculas de estudo. Com isso, podemos concluir que a associação das dificuldades inerentes em realizar a extração de moléculas de RNA com qualidade somada aos pontos acima mencionados, pode ter resultado na obtenção de quantidades/concentrações relativamente altas da molécula, porém provavelmente com sua integridade comprometida. Existem alguns métodos capazes de verificar a integridade do RNA (ou RIN - *RNA Integrity Number*) da amostra, como o equipamento Bioanalyzer, que gera um valor de RIN através de um dispositivo de eletroforese microfluídica utilizando marcação da fita com corantes de fluorescência e analisando assim a sua integridade (KIM, *et al.*, 2022; ICHIKAWA, *et al.*, 2022b). Entretanto, não dispomos de tal equipamento para fazer essa avaliação. De forma alternativa, análises de integridade da amostra pura de RNA em gel de agarose também foram realizadas, todas sem sucesso (dados não mostrados).

O kit de extração de RNA também é um interferente na quantidade e qualidade da extração. Segundo Komini & Bounas (2022), o kit da ZYMO, utilizado nos protocolos 6, 7 e 8 do presente projeto, seria a melhor opção para a extração de RNA

especificamente para esse tipo de amostra: sangue nucleado de aves. Porém, através da análise dos nossos resultados, podemos observar que o kit da PROMEGA, utilizado no protocolo 1, promoveu uma melhor extração do material de RNA total, não pela sua concentração, mas sim pela sua qualidade, gerando resultados supostamente positivos quando submetidos ao protocolo de PCR utilizando os *primers* de estudo. Em contrapartida, os protocolos 2 e 3 do presente projeto geraram os piores resultados para nossas amostras. Apesar do uso do kit Quick-DNA/RNA Viral MagBead gerar bons valores de concentração e pureza nas amostras de DNA (conforme será discutido no capítulo 2), tal resultado não foi encontrado quando associado ao uso de Dnases, buscando pela extração do RNA. Da mesma forma, o kit referente ao protocolo 2, NZY Total RNA Isolation kit, não apresentou condições favoráveis para a extração de RNA de qualidade quando associado às amostras sanguíneas de aves.

Apesar da metodologia de extração de RNA ter sido otimizada, a falta de reagentes ao final do projeto impediu que todos os testes necessários com o PAR 8 de *primers* fossem realizados. Foi possível apenas realizar testes iniciais em busca da melhor temperatura de anelamento, ainda sem sucesso. Esse valor é gerado através da fórmula de Wallace, realizado considerando a quantidade de ligações CG (citocina-guanina), devido ao fato de apresentarem ligações triplas e portanto, serem mais estáveis em suas quebras e/ou anelamentos (LIU, *et al.*, 2015). Além disso, outros fatores incluindo buffers, pH, agentes desnaturantes, comprimento da molécula e condições de armazenamento, assim como o tempo armazenado, também podem influenciar na temperatura de anelamento dessas moléculas (LIU, *et al.*, 2015), sendo necessários ainda testes futuros para estabelecer se o PAR 8 será capaz de indicar a expressão sexo-específica de SMEFC.

6 CONCLUSÃO

Após todos os testes realizados no presente trabalho, foi possível verificar que o protocolo 1 de extração de RNA a partir de amostras de sangue de *G. gallus* (utilizando o kit SV Total RNA Isolation System - PROMEGA) foi o mais eficiente para as análises de RT-PCR. Verificou-se que a melhor temperatura de anelamento para o par de *primers* controle (G6PDH) foi de 64°C (amplicon com ~200-150 pb; amplicon esperado de 122 pb). Para o PAR 1 de SMEFC, o alinhamento em fêmeas foi possível em uma faixa de 49 a 53°C, tendo sido observados resultados até 57°C (amplicon com ~250-300 pb; tamanho esperado em 278 pb). Para machos, o PAR 1 apresentou uma banda fraca com temperaturas de alinhamento de 51 e 53°C (amplicon com ~250-300 pb), indicando um possível alinhamento inespecífico, possivelmente do cromossomo 5 (amplicon esperado de 273 pb), impedindo a conclusão definitiva de expressão de SMEFC exclusivamente feminina. Alternativamente ao PAR 1, o PAR 8 de SMEFC não mostrou alinhamento nas temperaturas testadas (entre 48 e 62°C). Testes futuros com o PAR 8 ou outros pares de *primers*, ou ainda diretamente com anticorpos para SMEFC, poderão ser empregados para verificar a possível expressão de SMEFC exclusivamente em células sanguíneas de fêmeas, indicando-a como potencial proteína para testes de imunossexagem de aves.

CAPÍTULO 2 - SEXAGEM MOLECULAR CONVENCIONAL EM AVES, NOVAS APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Extração de DNA

Para a extração de DNA total, foram utilizados dois tecidos: sangue proveniente das mesmas coletas descritas no item 3.1 do capítulo 1; e cálamos de penas, provenientes de indivíduos de diferentes espécies e idades, conforme disponibilidade do fornecedor (Criadouro Casa Das Aves – Medianeira – PR). Utilizou-se então três diferentes kits comerciais para a extração, todos seguindo as instruções dos fabricantes, sendo dois para amostras sanguíneas, e um para amostras de cálamos de penas, conforme descrito abaixo.

3.1.1 Amostras sanguíneas

O DNA proveniente das amostras sanguíneas de *G. gallus* foi extraído utilizando dois procedimentos distintos. No primeiro deles, foi aplicado o kit Geno Plus Genomic DNA Extraction Miniprep System (VIOGENO). Conforme instruções do fabricante, foram utilizados 20 uL de amostra inicial, adicionados 180 uL de tampão de lise (*Lysis Buffer*), seguido de homogeneização. Em seguida, foram adicionados 20 uL de proteinase K e a amostra foi levada ao vórtex por 20 segundos. Em temperatura de 60 °C, as amostras foram incubadas durante 1 hora, sendo homogeneizadas com vórtex a cada 12 minutos. Posteriormente, foram adicionados 300 uL de tampão Fx Buffer e a solução submetida ao vórtex, seguido de adição de 200 uL de etanol 100 % e novamente levado ao vórtex. Toda essa mistura foi inserida na coluna de afinidade para DNA e centrifugada a 8000 RPM durante 2 minutos, seguido do descarte do filtrado. Após, foram adicionados 500 uL de WS Buffer e centrifugado por 2 minutos a 10000 RPM, seguido de adição de 500 uL de WS Buffer e centrifugação por 2 minutos a 10000 RPM. Para eluição do material genético contido na coluna de afinidade, a coluna foi transferida para um tubo limpo, livre de DNases, e acrescentados 100 uL de água livre de Dnase aquecida em 70 °C, sendo

incubado por 5 minutos, para então ser submetido a centrifugação a 10000 RPM por 2 minutos. O armazenamento das amostras foi realizado a -20 °C.

Para o segundo procedimento, foi utilizado o kit NZY Tissue gDNA Isolation kit (NZYTECH). Conforme instruções dos fabricantes, foram utilizados 200 uL de amostra inicial, sendo adicionados 25 uL de proteinase K e 200 uL de tampão NL Buffer. Seguiu-se com a homogeneização em vórtex e incubação a 56 °C durante 13 minutos, sendo, em seguida, adicionados 210 uL de etanol 100% e homogeneizado por vórtex. Transferiu-se toda a mistura para uma coluna de afinidade de DNA e centrifugado por 1 minuto a 13000 RPM. Descartou-se o filtrado e foram adicionados 500 uL de tampão NWI sobre a coluna, com posterior centrifugação a 13000 RPM por 1 minuto. Novamente foi descartado o filtrado e adicionados 600 uL de tampão NW2, seguido de centrifugação por 1 minuto a 13000 RPM, sendo descartado o líquido filtrado. Para melhor secagem da coluna de afinidade, foi realizada uma nova centrifugação por 2 minutos a 13000 RPM e então a coluna foi transferida para um tubo limpo, livre de DNases. Adicionou-se 100 uL de solução NE (aquecido a 70 °C) e foi centrifugado a 13000 RPM por 2 minutos. A amostra final coletada foi armazenada em freezer a -20 °C.

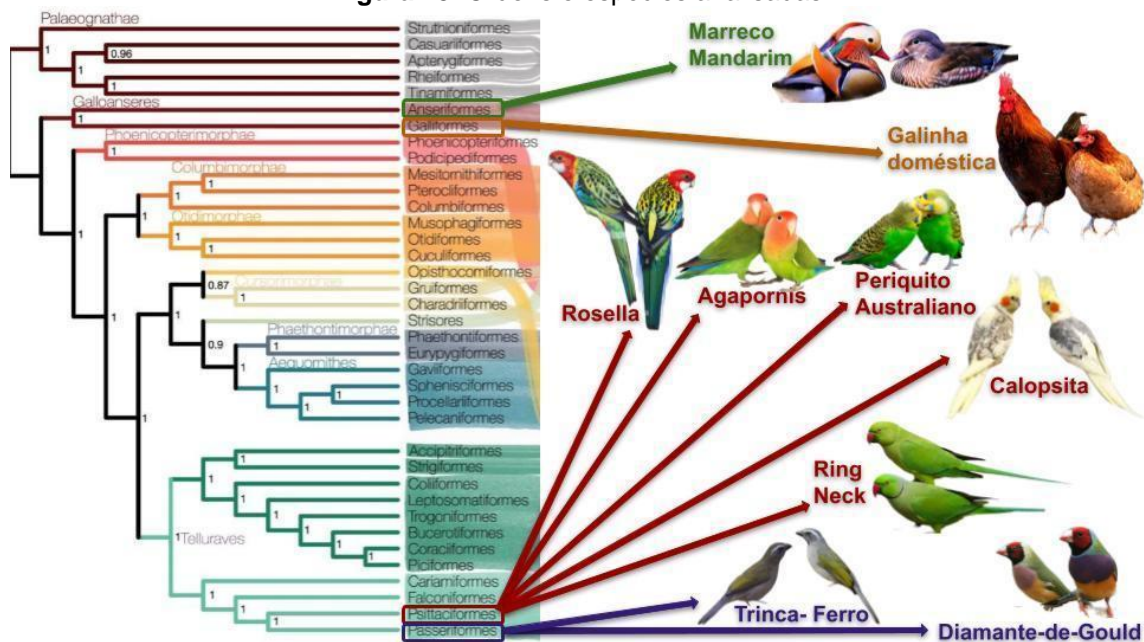
Ao final realizou-se a quantificação de DNA extraído, assim como os parâmetros de pureza de todas as amostras, utilizando o Nanodrop One da ThermoFischer.

3.1.2 Amostras de cálamos de pena

Foi realizado um levantamento bibliográfico de espécies de aves disponíveis para a obtenção de amostras e que, ao mesmo tempo, ainda não haviam sido testadas para a sexagem utilizando os *primers* P0/P2/P8. As espécies eleitas para o teste foram: *Aix galericulata* (marreco-mandarim, família Anatidae), *Agapornis roseicollis* (agaporne, família Psittaculidae), *Melopsittacus undulatus* (periquito-australiano, família Psittacidae), *Platycercus eximius* (rosella, família Psittacidae), *Erythrura gouldiae* (diamante-de-gould, família Estrildidae) e *Saltator similis* (trinca-ferro, família Thraupidae) (figura 23). Além do valor comercial intrínseco associado às espécies eleitas mencionadas acima, destacando-as como indivíduos de alta relevância para estudo, comércio e

interesse local, cinco das seis novas espécies escolhidas não apresentam dimorfismo sexual (apenas a espécie marreco-mandarim difere-se visualmente entre fêmea e macho), enfatizando dessa forma a necessidade de estudos de sexagem molecular associados a essas espécies. Adicionalmente, também foram utilizadas espécies já sexadas com o conjunto de *primers*, como controle positivo: *Psittacula krameri* (ring neck) (PASTIU, *et al.*, 2023), *G. gallus domesticus* (garnizé) e *Nymphicus hollandicus* (calopsita) (HAN, *et al.*, 2009) (figura 23). Nos testes iniciais de extração de DNA de penas, com o controle positivo de ring neck, foram realizadas as extrações de seis distintos indivíduos com testes cegos (apenas o responsável do Criadouro Casa das Aves tinha conhecimento dos sexos de cada indivíduo, previamente identificados pelos números de anilhas/identificações particulares).

Figura 23. Ordens e espécies analisadas



Fonte: Adaptado de STILLER, *et al.*, 2024.

Legenda: esquematização e ilustração das ordens e espécies de todas as aves testadas com PCR multiplex.

Foram utilizadas de três a cinco penas de cada indivíduo, sendo no mínimo um macho e uma fêmea para cada espécie citada acima. Por se tratarem de indivíduos de espécies e idades distintas, algumas amostras de penas apresentavam maior quantidade de sangue em seus bulbos (também conhecida como canhão, região interna ao cálamo das penas, onde se encontram vasos vasculares), enquanto outras apresentavam cálamos contendo bulbos mais

secos. As penas coletadas foram armazenadas em sacolas plásticas transparentes estéreis e transportadas em temperatura ambiente diretamente para o laboratório no JU-UNILA, para posteriores análises.

Com auxílio de um bisturi estéril, realizou-se a secção de cada cálamo de pena, obtendo-se pedaços com diâmetros de cerca de 1 mm, que foram armazenados em microtubos e destinados à pesagem. Em seguida, as amostras, previamente identificadas, foram submetidas ao protocolo de extração de DNA, utilizando o kit Quick-DNA/RNA Viral MagBead da ZYMO RESEARCH. Apesar deste kit ser indicado para a extração de DNA viral de amostras de tecidos moles, utilizado principalmente na época do COVID, buscou-se executar a sustentabilidade na ciência, adaptando-o para o presente projeto. Conforme instruções do fabricante, foram adicionados 200 uL de DNA/RNA Shield e 5 uL de Proteinase K, homogeneizado e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente, seguido da adição de 400 uL de tampão Viral DNA/RNA, e submetido a homogeneização. Após, foram adicionados 10 uL de MagBinding Beads, seguido por agitação em vórtex por 10 minutos. O tubo foi então transferido para um suporte magnético, e, após a peletização das *beads*, descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 250 uL de solução MagBead DNA/RNA Wash 1, seguido por homogeneização e transferência do tubo para um suporte magnético, onde, após a peletização das *beads*, descartou-se o sobrenadante. Foram adicionados 250 uL de solução MagBead DNA/RNA Wash 2, seguido por homogeneização e transferência do tubo para um suporte magnético, onde, após a peletização das *beads*, descartou-se o sobrenadante. Em seguida, foram adicionados 250 uL de etanol 100%, seguido por homogeneização e transferência do tubo para um suporte magnético, onde, após a peletização das *beads*, descartou-se o sobrenadante. Novamente, foram adicionados 250 uL de etanol 100%, seguido por homogeneização. Foi então realizada a transferência do material total para tubo limpo livre de Dnase, seguido da transferência do tubo para um suporte magnético, onde, após a peletização das *beads*, descartou-se o sobrenadante. Por fim, foi realizada a secagem das *beads* em bloco de aquecimento a 55 °C por 10 minutos, e adicionados 30 uL de DNase-Free Water, seguido por homogeneização e transferência do tubo para um suporte magnético, onde, após a peletização das *beads*, foi armazenado o sobrenadante em tubo limpo livre de DNase. Após extração e ressuspensão do material

genético em água livre de DNase, as amostras foram quantificadas e qualificadas através do aparelho Nanodrop One então armazenadas em freezer a -20 °C.

3.2 Sexagem convencional por PCR

Inicialmente, foram realizados testes com dois diferentes kits de enzimas de PCR: a) GoTaq G2 colorless Master Mix (PROMEGA); conforme instruções do fabricante, foi utilizado 1 uL de cada *primer* (P2 e P8), acrescido de 500 ng de DNA, 12,5 uL de GoTaq® G2 Colorless Master Mix, 2X e água livre de DNase para completar os 25 uL de solução; b) NZYTaQ II 2x Green Master Mix (NZYTECH); conforme instruções do fabricante, foi utilizado 1 uL de cada *primer* (P2 e P8), seguido de 500 ng de DNA, 12,5 uL de NZYTaQ II 2x Green Master Mix e água livre de DNase para completar os 25 uL de solução. Após análises, padronizou-se o uso do Mix proveniente da fabricante PROMEGA para todas as seguintes sexagens.

As análises de sexagem convencional foram realizadas com as amostras sanguíneas de *G. gallus*, utilizando os pares de *primers* descritos por Griffiths, *et al.*, (1998) e Cerit, *et al.*, (2007) (P8 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3') e P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3')), seguindo o protocolo descrito pelos autores. Para o primeiro teste, as amostras foram submetidas ao processo de amplificação por PCR: primeiro ciclo de desnaturação: 94 °C por 1 minuto e 30 segundos. 30 ciclos de: (a) anelamento: 48 °C por 45 segundos; (b) amplificação: 72 °C por 45 segundos; (c) desnaturação: 94 °C por 30 segundos. Uma corrida final de: (a) anelamento: 48 °C por 1 minuto; (b) amplificação: 72 °C por 5 minutos. Estabilização: 4 °C por 24 horas.

Em seguida, foi realizada eletroforese em gel, a 1,5%, com tampão TBE 1X e marcador de peso molecular de 1000 pb. Para cada poço do gel de eletroforese, foram aplicados 5 uL de Xilol + 2 uL de gel red + 5 uL de produto de PCR ou marcador de peso molecular. Foram testadas diferentes voltagens e tempos para padronização do protocolo, além de terem sido incluídos controles negativos, sem adição de DNA.

Como não obtivemos sucesso, foram feitas adaptações ao protocolo original através de atualização da literatura (HIDAYAT, *et al.*, 2021; KROCZAK, *et al.*, 2021; PAMULANG & HARYANTO, 2021). Assim, novos parâmetros foram

determinados para a PCR, conforme segue: primeiro ciclo de desnaturação: 94 °C por 3 minutos. 35 ciclos de: (a) desnaturação: 94 °C por 20 segundos; (b) anelamento: 48 °C por 30 segundos; (c) amplificação: 72 °C por 50 segundos. Uma corrida final de amplificação: 72 °C por 10 minutos e estabilização 4 °C por 24 horas.

Após o procedimento, o resultado foi analisado por gel de agarose a 1,5%, utilizando tampão TBE 1X com corrida de 100 V por 100 minutos. Segundo a literatura, os fragmentos esperados deveriam possuir cerca de 300 pb para a região CHD-Z e 400 pb para a região CHD-W (PAMULANG & HARYANTO, 2021). Levando em consideração esse valor, foi optado pela utilização do padrão de bandas de 100 pb. Adicionalmente, outras variáveis, como concentrações diferentes de gel de agarose, diferentes temperaturas de ciclagem ou tempo de corrida de eletroforese foram testadas. Todos os diferentes parâmetros utilizados podem ser observados na tabela 9. Adicionalmente, foi utilizado o *primer* P0 (5'-ATTGAGTTGGAACCAGAICA-3'), (HAN, *et al.*, 2009), juntamente com o conjunto de *primers* P2/P8 (chamado daqui em diante de PCR multiplex, incluindo os três *primers*).

Tabela 9. Parâmetros testados para PCR e corrida de eletroforese

PARÂMETRO	Variáveis						
Temperatura de anelamento	48 °C	50,1 °C	51 °C	52 °C	55 °C	-	-
Concentração do gel de agarose	1,5%	3%	-	-	-	-	-
Voltagem da corrida de eletroforese	60 V	80 V	100 V	120 V	-	-	-
Tempo de corrida de eletroforese	1:40 H	2:00 H	2:20 H	2:30 H	2:50 H	3:00 H	3:20 H
Volume de amostra total em cada poço	1 uL	2 uL	3 uL	5 uL	7 uL	-	-

Fonte: a autora.

Legenda: diferentes parâmetros foram testados para padronização do protocolo de sexagem convencional de aves.

Finalmente, a padronização do procedimento de PCR para ambos os conjuntos de *primers* (P2/P8 ou P0/P2/P8) ficou definida seguindo os seguintes padrões: primeiro ciclo de desnaturação: 94 °C por 3 minutos. 35 ciclos de: (a) desnaturação: 94 °C por 20 segundos; (b) anelamento: 48 °C por 30 segundos; (c) amplificação: 72 °C por 50 segundos. Uma corrida final de amplificação: 72

°C por 10 minutos e estabilização 4 °C por 24 horas. Após testes com diferentes intercalantes de DNA (Blue Green – NOVA BIOTECNOLOGIA; Blue Green - LGC BIOTECNOLOGIA; Gel Red – SIGMA; Cybr Green - THERMO FISHER), e diferentes quantidades de amplicon (tabela 9), para visualização dos resultados do processo de PCR, foi padronizado a corrida em gel de agarose à 1,5%, a 100 V durante 2 horas e 15 minutos, no sistema de eletroforese LPS-4000V (LOCCUS), utilizando em cada poço: 5 uL de amostra + 3 uL de Blue Green (NOVA BIOTECNOLOGIA), e marcador de peso molecular de 100 pb (LUDWIG). O padrão de bandas foi analisado em transiluminador L-Pix EX (LOCCUS).

Após padronização do protocolo de PCR para as amostras de sangue de *G. gallus*, utilizando o conjunto dos três iniciadores acima citados, estendeu-se a técnica para as análises de DNA extraído a partir de cálamo de penas das diferentes espécies de aves. Para critérios de comparação e verificação do sexo molecular dos indivíduos selecionados para análise, foi realizada a sexagem com os dois métodos para as mesmas amostras de DNA provenientes do cálamo de penas: com os *primers* P2/P8, e com os *primers* P0/P2/P8.

4 RESULTADOS

4.1. Extrações de DNA Total proveniente de amostras de sangue de *G. Gallus*

Com o intuito de dar início aos testes de sexagem molecular convencional em aves, abrangendo espécies e grupos ainda não analisados, inicialmente, foram testados dois kits de extração de DNA total para as amostras sanguíneas coletadas anteriormente (amostras obtidas de um indivíduo fêmea - Gertrudes): Geno Plus Genomic DNA Extraction Miniprep System (VIOGENE) e NZY Tissue gDNA Isolation kit (NZYTECH) (resultados na tabela 10).

Tabela 10. Testes de kits de extração

KIT DE EXTRAÇÃO	Concentração (ng/ μ L)	A260/280	A260/230
VIOGENE (GERTRUDES)	56,9	1,87	1,85
NZYTECH (GERTRUDES)	10,7	1,22	0,33
NZYTECH (MAFALDA)	13,7	1,32	0,68

Fonte: a autora.

Legenda: resultados obtidos através do equipamento NanoDrop One, após extração de DNA total de amostras sanguíneas.

Análises ao espectrofotômetro NanoDrop One demonstraram que a extração utilizando o kit da VIOGENE foi mais eficiente (tabela 10), tendo esse kit sido escolhido para as análises posteriores, que incluíram a extração a partir de sangue de mais um indivíduo fêmea (Mafalda) e dois machos (Chicken Little e HeiHei) de *G. gallus* (tabela 11).

Tabela 11: Extração de DNA com kit VIOGENE

INDIVÍDUO	Concentração (ng/ μ L)	A260/280	A260/230
MAFALDA	44,0	1,39	0,56
CHICKEN LITTLE	36,6	1,57	0,86
HEIHEI	39,8	1,68	1,11

Fonte: a autora.

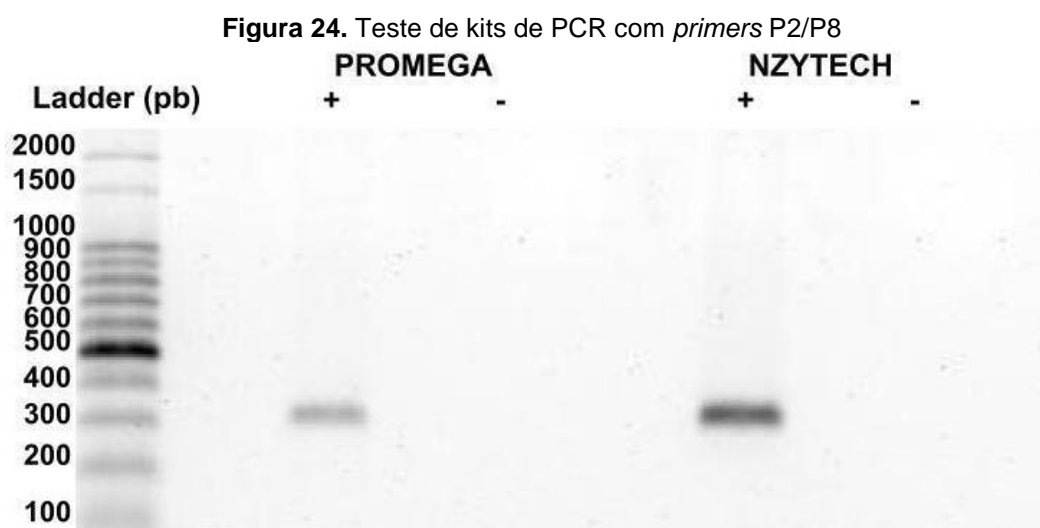
Legenda: resultados obtidos através do equipamento NanoDrop One, após extração de DNA total de amostras sanguíneas.

4.2 PCR e eletroforese em gel para a sexagem convencional com os primers P2 e P8

Para a realização do processo de PCR na sexagem convencional, foram inicialmente utilizadas amostras de sangue de fêmea e testados dois kits

distintos, usando os *primers* P2 e P8, sendo eles: GoTaq® G2 Colorless Master Mix (PROMEGA) e NZYTaQ II 2x Green Master Mix (NZYTECH) (figura 24), seguindo todas as instruções dos fabricantes.

Após diversos ajustes nos padrões de corrida, pode-se observar uma boa separação das bandas do marcador de peso molecular, e a presença de apenas uma banda nas colunas 1 e 3 (amostras de PCR contendo DNA). Entretanto, esperava-se que as amostras com DNA apresentassem 2 bandas distintas, visto que o material genético era pertencente a um indivíduo fêmea (Gertrudes). Já as colunas 2 e 4 (amostras negativas) não apresentaram nenhum resíduo ou banda, indicando ausência de contaminação no processo de PCR (figura 24).



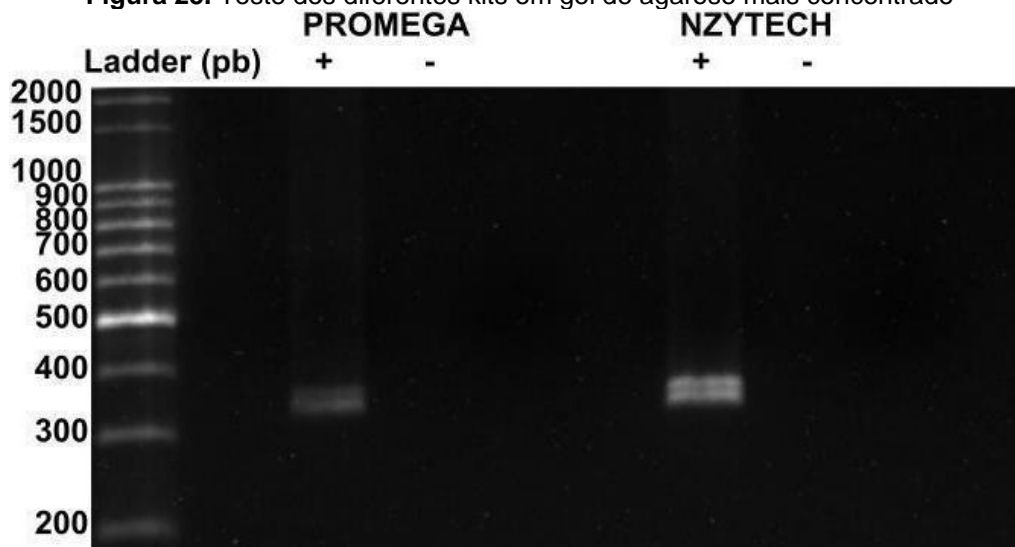
Fonte: a autora.

Legenda: resultado eletroforese 1,5%, utilizando *primers* P2/P8. (+) amostras contendo DNA; (-) controle negativo.

Uma nova análise literária foi realizada, buscando identificar o fator limitante ao aparecimento da segunda banda. Segundo Krocak, *et al.*, em seus trabalhos de 2021 e 2022, os fragmentos resultantes da amplificação utilizando *primers* P2 e P8 podem apresentar tamanhos muito próximos, sendo, portanto, recomendada a utilização de géis de agarose mais concentrados, como de 3%.

Foi então realizada nova corrida, dessa vez em gel 3%, e, como resultado, foi observada a presença de duas bandas para a fêmea, correspondentes aos amplicons com cerca de 340 e 360 pb, conforme o esperado (ÇAKMAK, *et al.*, 2017) (figura 25).

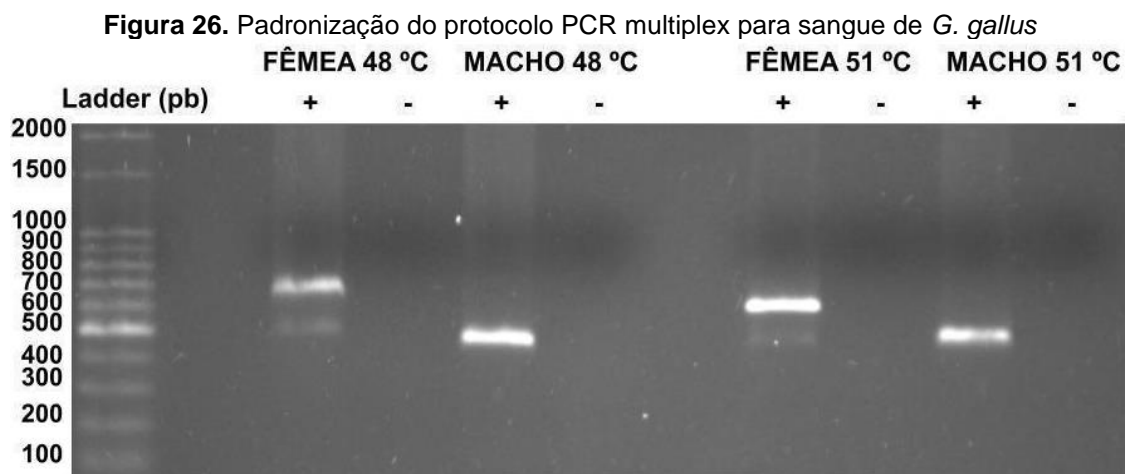
Figura 25. Teste dos diferentes kits em gel de agarose mais concentrado



Fonte: a autora.

Legenda: resultado eletroforese 3%, utilizando *primers* P2/P8. (+) amostras contendo DNA; (-) controle negativo.

Porém, buscando replicar tais resultados com outros indivíduos, não foi obtida a separação de bandas nas fêmeas. Foram realizadas discussões e novas tentativas alterando variáveis como quantidade de amostra (amplicon) de cada poço, capacidade das grandezas (W e mA) da fonte de eletroforese, assim como tempo e voltagem de cada corrida. Adicionalmente, novas revisões bibliográficas foram realizadas, buscando otimizar e replicar os resultados de sexagem molecular convencional. Porém nenhum desses fatores auxiliou na eficácia do protocolo. Portanto, foi decidido pela aquisição de um novo *primer*: P0. Seguindo as análises, foram testadas diferentes temperaturas de PCR para a amplificação do DNA, juntamente com o conjunto de *primers* P0/P2/P8. Por fim, foi realizada uma eletroforese e constatou-se que as melhores temperaturas para a produção das diferentes bandas no indivíduo feminino ficaram entre a faixa de 48 °C a 51 °C, pois foi possível verificar que esse conjunto de *primers* é capaz de anelar e amplificar em diferentes temperaturas (figura 29). Foram realizados testes com as amostras de DNA dos quatro indivíduos de *G. gallus* disponíveis: “Gertrudes”, “Mafalda” (duas fêmeas), “Chicken Little” e “HeiHei” (dois machos). Como resultado, foi verificada a presença de uma banda forte em machos (com cerca de 500 pb) e duas bandas para fêmeas: uma banda fraca (com cerca de 500 pb) e uma banda forte (com cerca de 600 pb) (figura 26). Dessa forma, foi padronizada a sexagem molecular convencional utilizando DNA proveniente de amostras de sangue de *G. gallus*.



Fonte: a autora.

Legenda: resultados eletroforese 1,5%, *primers* P0, P2 e P8. (+) amostras contendo DNA; (-) controle negativo.

4.3 Extração de DNA proveniente do cálcamo de penas de aves de diferentes espécies

Para testes do DNA total extraídos a partir de amostras do cálcamo de penas, foram utilizados, inicialmente, os controles positivos de ring neck (*Psittacula krameri*) (PASTIU, *et al.*, 2023), testando o kit Quick-DNA/RNA Viral MagBead da ZYMO RESEARCH, utilizado em protocolos de detecção de amostras de COVID. Como pode-se observar nos resultados detalhados na tabela 12, o protocolo foi validado para esse tipo de experimento, apresentando valores satisfatórios para o prosseguimento dos testes.

Para a extração do material genético das penas coletadas, alguns parâmetros foram avaliados, como: sexo previamente conhecido, peso total das penas segmentadas, quantidade de sangue presente no canhão das penas e os valores de quantidade e qualidade de DNA, disponibilizados pelo Nanodrop One. Na tabela 12, pode-se observar os dados obtidos e a relação de indivíduos testados.

Tabela 12. Parâmetros de extração de DNA de cálcamo de penas

Espécie	Sexo	Peso das penas (g)	Quantidade de sangue	Concentração DNA (ng/μL)	A 260/280	A 260/230
Trinca-ferro (<i>Saltator similis</i>)	F	0,0209	Penas secas	26,8	1,53	0,05
	M	0,0077	Penas secas	17,3	1,45	0,68

	F	0,0440	Penas com sangue	318,9	2,01	1,79
Rosellas-eximius (<i>Platycercus eximius</i>)	F	0,1866	Bastante sangue	1.372,8	1,95	1,71
	M	0,0544	Penas com sangue	417,0	1,85	0,29
Diamante-de-gould (<i>Erythrura gouldiae</i>)	F	0,0359	Penas secas	328,3	1,91	0,83
	M	0,0352	Penas secas	213,7	1,84	0,83
Agaporne (<i>Agapornis roseicollis</i>)	F	0,0046	Pouco sangue	306,1	1,97	0,29
	M	0,0739	Penas com sangue	598,0	1,94	1,09
Periquito-australiano (<i>Melopsittacus undulatus</i>)	F	0,0530	Bastante sangue	911,7	1,91	1,09
	M	0,0679	Penas com sangue	1.061,9	1,87	1,71
Marreco-mandarim (<i>Aix galericulata</i>)	F	0,0603	Penas super secas	41,4	1,71	0,63
	M	0,0794	Penas super secas	34,0	1,65	0,07
Calopsitas (<i>Nymphicus hollandicus</i>)	? (1)	0,1120	Penas com sangue	536,9	0,55	0,61
	? (2)	0,4045	Penas com sangue	709,4	1,84	0,63
	? (3)	0,1336	Penas com sangue	242,1	1,82	0,31
	? (4)	0,1411	Penas com sangue	986,5	1,83	0,63
Garnizé (<i>Gallus gallus</i>)	F	0,0473	Penas super secas	74,6	1,81	0,59
Ring Neck (<i>Psittacula krameri</i>)	? (0097)	-	Bastante sangue	936,9	1,95	1,42
	? (1998)	-	Bastante sangue	746,1	1,98	2,09
	? (1949)	-	Bastante sangue	1.738,8	2,04	1,68
	? (0118)	-	Bastante sangue	1.082,5	2,37	1,98
	? (1997)	-	Penas com sangue	103,9	1,67	0,40
	? (0112)	-	Penas com sangue	66,9	1,97	0,21

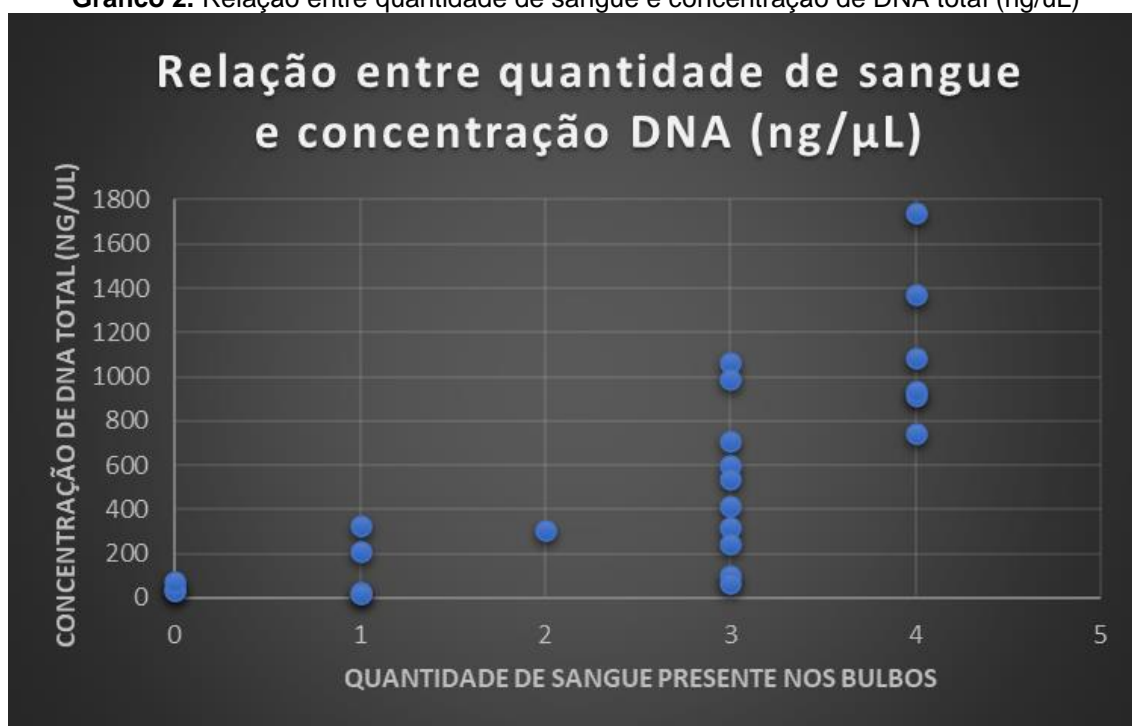
Fonte: a autora.

Legenda: resultados obtidos no processamento e extração de DNA total de cálamos de penas de diferentes espécies, através do equipamento NanoDrop One. M: macho; F: fêmea; ?: sexo desconhecido.

Observou-se que cálamos de penas contendo maior quantidade de sangue resultaram em melhores concentrações e qualidades do DNA obtido (gráfico 2). Penas mais secas tiveram valores baixos de materiais genéticos

isolados e maiores taxas de contaminação, indicado pelo valor de A260/230 (contaminações por proteínas) e A260/230 (contaminações por compostos orgânicos). A idade dos indivíduos analisados também foi um fator que influenciou os resultados, sendo que animais mais jovens apresentaram maiores quantidades de DNA extraído, considerando o maior volume de sangue presente no cálamus das penas, ainda que se tratavam de penas menores, comparadas aos indivíduos adultos (dados não mostrados).

Gráfico 2. Relação entre quantidade de sangue e concentração de DNA total (ng/uL)



Fonte: a autora.

Legenda: gráfico de dispersão onde: eixo x representa a quantidade de sangue (ng/uL); eixo y representa a concentração total de DNA em cada amostra, onde: (0) penas super secas; (1) penas secas; (2) penas com pouco sangue; (3) penas com sangue; (4) penas com bastante sangue.

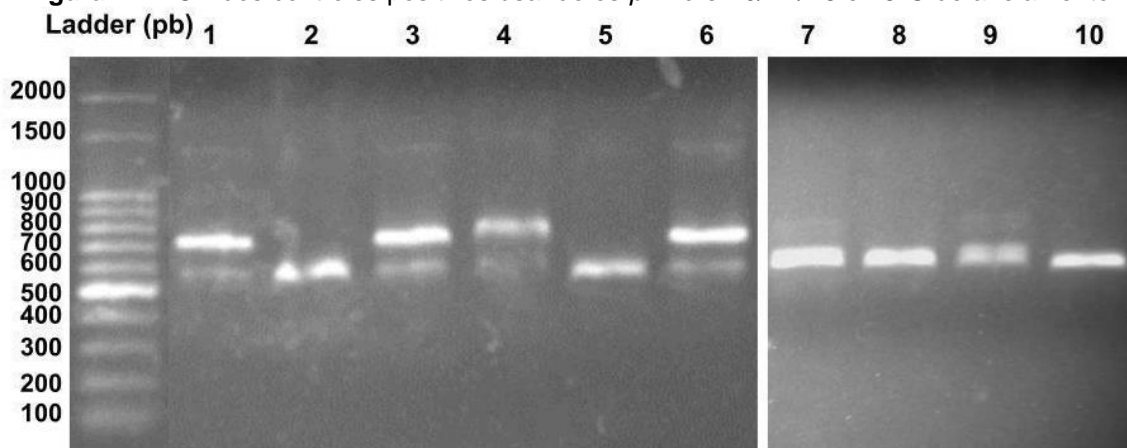
Para ser possível a visualização de correlação entre a quantidade de sangue presente nos cálamus das penas, e os valores e concentração de DNA total e contaminações relacionadas, foi desenvolvida uma escala numérica crescente representando um gradiente de quantidade de sangue presente nos bulbos onde: (0) representam as penas mais secas (super secas) extraídas, (1) representam penas secas, (2) representam penas com pouco sangue, (3) representam penas com sangue, e (4) representam as penas com cálamus contendo bulbos repletos de sangue (bastante sangue). Sendo assim, foi

possível elaborar uma correlação entre os valores de quantidade de sangue em cada cálam, com os valores finais de concentração de DNA total das amostras a partir da extração pelo kit da ZYMO RESEARCH (gráfico 2), permitindo a identificação visual dos dados gerados e a relação proporcional da quantidade de sangue com o aumento na concentração de DNA total extraído. É possível verificar que há uma relação direta entre a quantidade de sangue disponível no cálam e a quantidade de DNA extraído.

4.4 PCR com conjunto de *primers* P0/P2/P8 para as amostras de DNA de penas das diferentes espécies eleitas

Testou-se inicialmente o protocolo com duas das espécies controle (ring neck e calopsitas, com sexos desconhecidos) (HAN, *et al.*, 2009) (figura 27). Em ambas as espécies, observou-se em fêmeas duas bandas claramente separadas, uma com cerca de 550 a 600 pb e outra com cerca de 700 pb, enquanto machos apresentaram apenas uma banda com cerca de 550 a 600 pb. Posteriormente, foram comparados os resultados obtidos com a relação sexual dos indivíduos com o Criadouro Casa das Aves, onde obteve-se 100% de correspondência.

Figura 27. PCR dos controles positivos usando os *primers* P0/P2/P8 e 48°C de anelamento



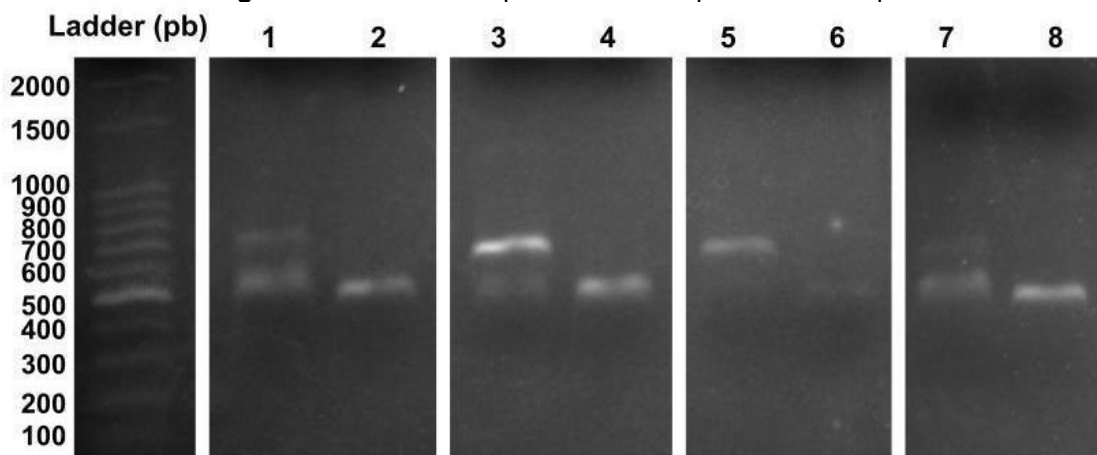
Fonte: a autora.

Legenda: resultados de eletroforese em gel a 1,5%. Observa-se 6 indivíduos ring neck (colunas 1-6), sendo fêmeas: duas bandas claramente separadas (1, 3, 4, 6); machos: apenas uma banda (2, 5); e quatro indivíduos de calopsita onde: fêmeas contém duas bandas separadas (7 e 9) e machos com apenas uma banda (8 e 10).

Em seguida, foram realizados os mesmos testes para as demais espécies propostas, caracterizadas por não apresentarem informações de sexagem com

P0/P2/P8 disponíveis na literatura. Para as espécies de agaporne, rosella, periquito-australiano, e diamante-de-gould, todos os indivíduos fêmeas apresentaram duas bandas segregadas aparentes (figura 28). Já os machos dessas mesmas espécies, apresentaram apenas uma banda, conforme o esperado (figura 28). Ao comparar os diferentes resultados obtidos com os dados do criador de aves que disponibilizou as amostras, foi possível observar 100% de correspondência da sexagem por características de dimorfismo sexual de cada animal com seu sexo molecular. Já para as espécies de trinca-ferro, marreco-mandarim e garnizé, nenhum resultado foi obtido, ou seja, não foi observada nenhuma banda para o indivíduo macho e nem para a fêmea. Os resultados negativos podem ser devido a: (a) baixo valor de DNA total extraído associado ao tipo de amostra testada (cálamo queratinizado e sem presença de sangue); (b) valores de A_{260}/A_{230} baixos, sugerindo contaminação por compostos orgânicos, ou seja, baixa qualidade de extração; (c) temperatura de anelamento inadequada para as espécies testadas. De fato, as penas desses indivíduos eram mais antigas e apresentavam-se muito secas.

Figura 28. Diferentes espécies testadas para PCR multiplex

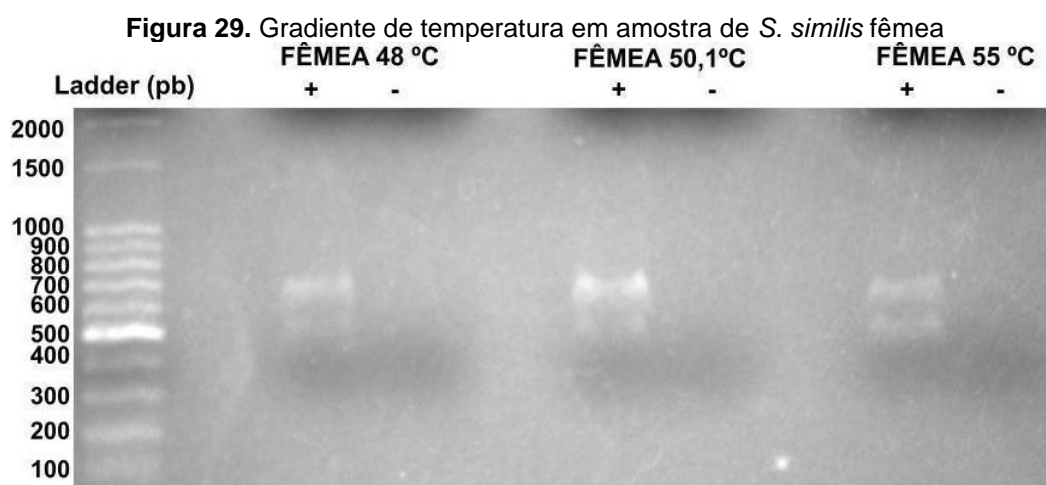


Fonte: a autora.

Legenda: resultados em gel de eletroforese a 1,5%, *primers* P0, P2 e P8, 48°C de anelamento. Colunas: (1) Rosella fêmea; (2) Rosella macho; (3) Periquito fêmea; (4) Periquito macho; (5) Diamante-de-gould fêmea; (6) Diamante-de-gould macho; (7) Agapornis fêmea; (8) Agapornis macho.

Em nova tentativa de extração, foi obtida amostra de uma fêmea de trinca-ferro mais jovem, apresentando maiores concentrações de sangue no cálamo da pena, o que, conseqüentemente, gerou valores de DNA mais concentrados após a extração (tabela 12, terceiro indivíduo de *Saltator similis*). Para verificar a

hipótese de temperatura de anelamento inadequada, foi realizado o mesmo protocolo já estabelecido, porém incluindo um novo gradiente de temperatura entre 48 a 55 °C (figura 29). Como é possível observar na figura 29, esse teste indicou que o anelamento ocorreu nas três temperaturas testadas, incluindo 48°C usada previamente, indicando que a característica da pena coletada (mais secas ou com maior presença de sangue), e conseqüentemente a concentração e qualidade do DNA extraído, foi o fator limitante para a primeira amplificação gerada pelos *primers* P0/P2/P8.



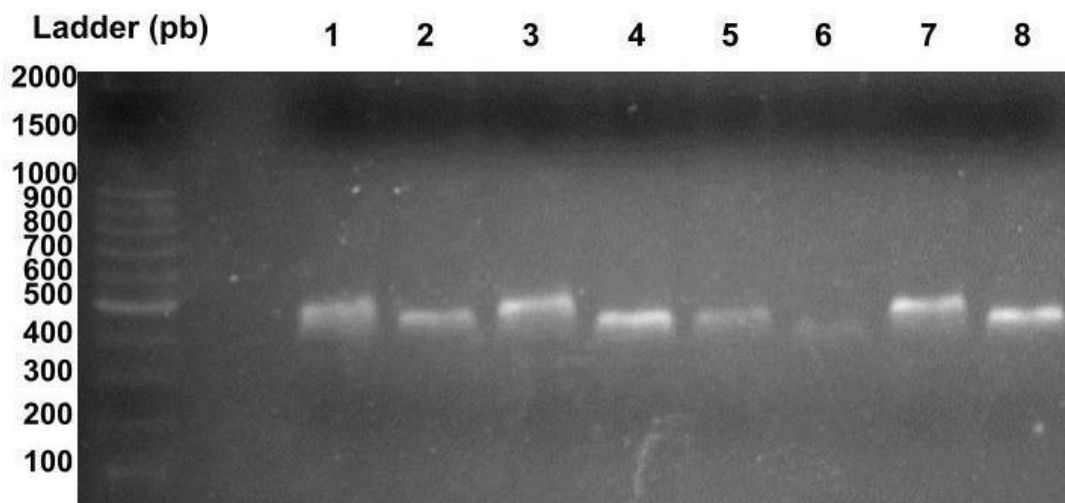
Fonte: a autora.

Legenda: resultados em gel de eletroforese a 1,5%, *primers* P0, P2 e P8. (+) amostras contendo DNA; (-) controle negativo.

Por fim, foi realizada uma comparação com as mesmas amostras de DNA analisadas acima (figura 28) com PCR multiplex, porém, dessa vez, amplificando apenas com os *primers* P2 e P8, sem a adição do *primer* P0. A figura 30 mostra os resultados de sexagem de rosella, periquito-australiano, diamante-de-gould e agaporne, onde é possível notar que as duas bandas esperadas para as fêmeas usando apenas os *primers* P2 e P8 são de difícil distinção, uma vez que se encontram apenas levemente separadas, mesmo após longo período de corrida (ÇAKMAK, *et al.*, 2017). Observou-se ainda que as bandas aparentes para ambos os sexos de todas as espécies se apresentaram com peso/tamanho molecular muito similar, dificultando a diferenciação entre fêmea e macho. Assim, conclui-se que a utilização do *primer* P0 em associação com os *primers* P2/P8 facilita e auxilia, de forma visual, a caracterização do sexo molecular de aves de diferentes espécies e grupos, sugerindo sua aplicação como ferramenta

de sexagem molecular, tornando os resultados mais confiáveis, mesmo para espécies já sexadas pelo método tradicional (P2/P8). Além disso, ressalta-se que o kit para extração de DNA próprio para DNA de vírus, excedente dos tempos de COVID, pode ser utilizado para a extração de DNA de cálamos de penas, focando na sustentabilidade e aproveitamento máximo de recursos.

Figura 30. Resultado de PCR realizado com DNA de diferentes espécies sem adição do *primer* P0



Fonte: a autora.

Legenda: resultados em gel de eletroforese a 1,5%, *primers* P2 e P8. Colunas: (1) Rosella fêmea; (2) Rosella macho; (3) Periquito fêmea; (4) Periquito macho; (5) Diamante-de-gould fêmea; (6) Diamante-de-gould macho; (7) Agapornis fêmea; (8) Agapornis macho.

5 DISCUSSÃO

5.1 Utilização de DNA para sexagem de *G. gallus* com os *primers* P2 e P8

Diferentemente da molécula de RNA, o DNA é formado por hélices em fita dupla, descoberto a partir de difração de raios X, por Rosalind Franklin e Maurice Wilkins (DA SILVA, 2010). Sendo assim, o DNA tem por característica uma maior estabilidade quanto a degradação e desnaturação em diferentes matrizes, o que é crucial para a manutenção e replicação das informações genéticas (OLIVEIRA, *et al.*, 2004). Portanto, é possível perceber uma maior facilidade quanto à extração desse tipo de molécula em diferentes amostras, resultando em melhores valores de concentração e qualidade. Da mesma forma como foi realizado no capítulo 1, a extração inicial de DNA ocorreu a partir de amostras sanguíneas de *G. gallus*. Como as células sanguíneas de galinhas são nucleadas (KIM, *et al.*, 2022), o DNA pode ser encontrado em maior volume e de maneira mais estável, com maior facilidade para extração (KIM, *et al.*, 2022), como foi possível verificar pelos valores de extração, quantificação e qualificação da molécula de DNA obtidos no presente trabalho. Além disso, destaca-se a capacidade de estabilização da molécula congelada após extração, que pode ser armazenada a -20 °C durante meses (YIMTRAGOOL & CHANGTOR, 2022). Alguns estudos relatam que a molécula de DNA é capaz de permanecer estável em temperatura ambiente por alguns dias, não implicando na capacidade de utilização posterior (OLIVEIRA, *et al.*, 2002). De fato, devido à sua estabilidade estrutural, é sabido que o DNA sobrevive por muitos anos, inclusive no solo sem preservação de fóssil, tendo já sido utilizado para sequenciamento de DNA de espécies de plantas e animais já extintas há milhares de anos (WILLERSLEV, *et al.*, 2003).

Atualmente, a forma mais eficaz para a sexagem de aves por PCR ainda se trata da identificação de regiões especificamente contidas nos cromossomos sexuais Z e W. Com a falta de achados de genes sexo-específicos, e sabendo que existem maiores estudos e testes para o gene CHD1 em aves, esse alvo ainda continua sendo o mais utilizado, com diversos conjuntos de *primers*, como: 2550F/2718F (ÇAKMAK, *et al.*, 2017; YIMTRAGOOL & CHANGTOR, 2022);

CHD1F/CHD1R (ÇAKMAK, *et al.*, 2017); P2/P8 (GRIFFITHS, *et al.*, 1998; ÇAKMAK, *et al.*, 2017, HIDAYAT *et al.*, 2021; KROCZAK, *et al.*, 2021; PAMULANG & HARYANTO, 2021); 1237L/1272H (RAMOS, *et al.*, 2021; PEREIRA *et al.*, 2021). Devido à gama de estudos relacionados à utilização dos *primers* P2 e P8, com aplicações realizadas desde 1998, por Griffiths e colaboradores, até a atualidade, contemplando uma ampla distribuição dos testes em diferentes espécies de aves (ÇAKMAK, *et al.*, 2017, HIDAYAT *et al.*, 2021; KROCZAK, *et al.*, 2021; PAMULANG & HARYANTO, 2021), este conjunto de iniciadores foi eleito para as análises do sexo molecular das aves no presente estudo.

Apesar do procedimento ter sido padronizado, a observação de bandas distintas é difícil, e por vezes, não foi possível, como já relatado por outros autores (HAN, *et al.*, 2009). Segundo Griffiths e colaboradores (1998), espera-se a separação de duas bandas no indivíduo fêmea, sendo elas com tamanhos variados entre 316 a 419 pb, a depender da espécie (ÇAKMAK, *et al.*, 2017). Entretanto, mesmo seguindo todos os padrões de PCR e eletroforese, utilizados nesse e outros estudos, não houve resultado satisfatório para padronizar o protocolo de tal forma, especialmente devido à necessidade de um tempo elevado de corrida em gel, o que acabou por superaquecer o tampão de corrida, e possivelmente desnaturar e degradar, pelo menos parcialmente, as amostras. Tentativas de resfriar a cuba de corrida não foram eficientes para solucionar este problema.

Por se tratar de galinha doméstica, as bandas esperadas podem sofrer mudanças devido a mutações em regiões de íntrons menos conservados (GRIFFITHS, *et al.*, 1998). Kroczak e colaboradores (2021), por exemplo, relatam uma diferença de apenas 17 pb entre os alelos amplificados dessa espécie, dificultando a visualização da separação no resultado de eletroforese. Em diferentes espécies, esses resultados de amplificações podem ter entre 10 a 80 pb de diferença entre os alelos Z e W, o que dificulta ainda mais a separação de bandas (PAMULANG & HARYANTO, 2021). Assim como nos trabalhos citados acima, os resultados do presente trabalho sinalizam uma baixa diferença entre os íntrons dos alelos W e Z na linhagem testada. Essa dificuldade encontrada está em acordo com as problemáticas envolvendo a sexagem

molecular convencional de aves (HAN, *et al.*, 2009; ÇAKMAK, *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2021).

5.2 Utilização do *primer* P0

Uma vez que já possuíamos no laboratório o par de *primers* P2 e P8, e considerando as informações dos demais *primers* descritos, optou-se como melhor opção, pela aquisição do *primer* P0. A partir de amostras de sangue de *G. gallus*, no presente trabalho a utilização do conjunto de três *primers* resultou em duas bandas claramente distinguíveis. Notou-se que a banda mais baixa apresenta cerca de 500 pb, enquanto a banda superior, em torno de 650 a 700 pb. Na literatura, descreve-se que o *primer* P0 é responsável por produzir uma banda com 100 pb a mais quando comparada ao transcrito resultante dos *primers* P2/P8 (HAN, *et al.*, 2009). Nas análises obtidas, pode-se observar uma diferença maior no tamanho molecular entre as duas bandas (de 150 a 200 pb). Apesar de não se tratar de grande diferença, essa pode estar associada às mutações pontuais na espécie estudada e/ou linhagem eleita, como discutido no tópico acima.

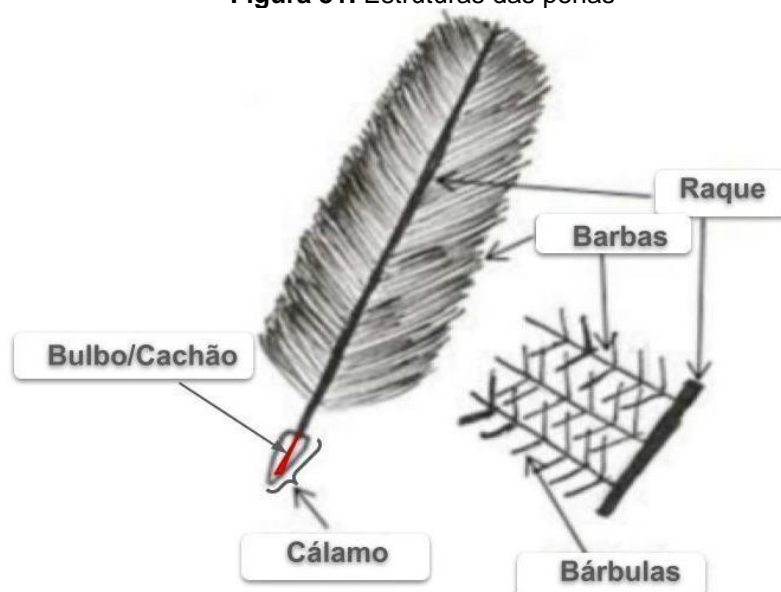
5.3 Utilização de amostras de penas para extração de DNA

Com a padronização do protocolo de sexagem molecular com o conjunto de três *primers*, foi realizado estudo para definir novas espécies a serem sexadas, bem como a possibilidade de outro tipo de fonte de DNA. Os seguintes pontos foram considerados: (a) aves de pequeno porte apresentam pouco conteúdo total de sangue, o que dificultaria a amostragem por tecido sanguíneo e representaria risco para a vida dos indivíduos estudados; (b) bem-estar animal no procedimento de coleta; (c) amostras que apresentem quantidades significativas de DNA; (d) amostras que se apresentem estáveis para transporte até o laboratório; (e) amostras de fácil acesso para criadores/pesquisadores e/ou conservadores. Conforme descrito em alguns estudos (POLITO, *et al.*, 2012; ÇAKMAK, *et al.*, 2017; KROCZAK, *et al.*, 2021; PAMULANG & HARYANTO, 2021; YIMTRAGOOL & CHANGTOR 2022; ÇOBANOĞLU, *et al.*, 2023; PASTIU, *et al.*, 2023), foi eleita a utilização de penas para o presente estudo,

considerando a facilidade e eficácia nas análises de extração e utilização do DNA para posteriores testes.

As penas de aves são constituídas por diferentes regiões (figura 31) e se apresentam de formas distintas em diferentes partes do corpo do indivíduo, podendo haver regiões onde não há plumagem (FOTH & RAUHUT, 2020). Apesar da morfologia da pena sofrer alterações, sempre são mantidos alguns aspectos estruturais em comum, sendo eles: cálamo, raque, barbas e bárbulas (SILVA, 2020).

Figura 31. Estruturas das penas



Fonte: adaptado de Silva, 2020.

Legenda: esquematização das regiões morfologicamente distintas em penas de aves. A região vermelha destacada representa o bulbo, onde encontram-se maiores concentrações de vasos sanguíneos.

O cálamo, constituído pelo bulbo/canhão somado às regiões queratinizadas e armação de revestimento (figura 31), corresponde à estrutura de inserção na pele, servindo como uma âncora entre pele e pena, com característica oca e contato indireto em uma malha muscular, sendo nutrido com grande número de vasos vasculares (FOTH & RAUHUT, 2020; YIMTRAGOOL & CHANGTOR, 2022). Ao contrário dos cálamos, as raques não apresentam característica oca em seu interior, mas sim uma medula esponjosa com células medulares (FOTH & RAUHUT, 2020). Yimtragool & Changtor (2022) apresentaram dados consistentes de análises quanto à eficácia da extração de DNA e sexagem molecular através da extração de diferentes partes da pena.

Visando o bem-estar animal e o aprimoramento das técnicas de sexagem de aves, os autores extraíram DNA tanto do cálamo, quanto da raque e barbas, para posterior sexagem (YIMTRAGOOL & CHANGTOR, 2022). As concentrações de DNA, assim como sua qualidade e garantia de sexagem assertiva foram superiores em amostras de DNA provenientes do cálamo. Essa foi a região eleita para o procedimento de extração de DNA no presente trabalho. As espécies selecionadas para os testes posteriores foram eleitas de acordo com a literatura e a disponibilidade do Criadouro Casa das Aves.

Após a coleta das penas, consultou-se alguns estudos que analisam o desenvolvimento do melhor método de extração de DNA, para aplicação de análises moleculares utilizando o cálamo de penas (YIMTRAGOOL & CHANGTOR, 2022). Segundo Yimtragool & Changtor (2022), uma melhor extração do material genético total é realizada através do protocolo de lise enzimática com diferentes reagentes e sete dias de agitação, enquanto que Çobanoğlu e colaboradores (2023) descrevem um maior rendimento de qualidade e quantidade utilizando protocolos de kits comerciais. Buscando agir com sustentabilidade, inovando na forma de gestão de insumos e aderindo à química verde na tentativa de diminuição de descarte de reagentes e compostos químicos, foi sugerida a reutilização dos kits de extração de DNA/RNA, adquiridos para testes diagnósticos e excedidos do tempo de COVID. Apesar de se tratar de um kit com foco na extração de material genético viral, esse foi capaz de isolar boas quantidades de DNA presentes na amostra, sem distinção de organismos ou espécies. Vale ressaltar também, que tal kit de extração têm por característica a análise de amostras líquidas ou tecidos moles: plasma, soro, urina, células em meio de cultura, sangue, saliva, células em suspensão, swabs e amostras de biópsia (segundo o fabricante: ZYMO RESEARCH). Como as amostras eleitas para as análises tratavam-se de tecidos duros, onde não haveria uma dissolução prévia, optou-se pela fragmentação mecânica de cada cálamo analisado em pequenas partes (PASTIU, *et al.*, 2023), para aumentar a superfície de contato dos reagentes inclusos no kit em relação à amostra total. O procedimento se mostrou eficiente e suficiente para as análises de sexagem molecular.

Apesar da efetividade na metodologia, pode-se observar que a extração de DNA total das amostras pode sofrer interferências devido a alguns parâmetros que influenciam diretamente na quantidade e qualidade da amostra, sendo eles:

- a) Idade do indivíduo: indivíduos mais velhos apresentam cálamos mais secos (queratinizados), com pouca ou nenhuma presença de vasos sanguíneos em seu interior, enquanto penas frescas apresentam melhores resultados quando comparado a penas secas (YIMTRAGOOOL & CHANGTOR, 2022).
- b) Porte da espécie e estrutura das penas: dependendo da espécie (como os trinca-ferros) o porte do animal é inferior, contendo poucas gramas e, conseqüentemente, penas muito pequenas. Nesses casos, para a coleta, priorizou-se o bem-estar animal, não excedendo o máximo de 5 penas. Contudo, por se tratar de animais pequenos com plumagem pequena, o peso da amostra, a área de contato e conseqüentemente a concentração de DNA foi drasticamente inferior (ÇOBANOĞLU, *et al.*, 2023);
- c) Quantidade de sangue nas penas: cálamos contendo maior conteúdo sanguíneo disponibilizaram maior concentração de DNA total na extração. Assim como a quantidade de penas retiradas (peso total), a presença/ausência ou até mesmo a intensidade do aparecimento de sangue nessas amostras afetou diretamente, de forma positiva, na concentração e qualidade do DNA extraído;
- d) Condições e tempo de armazenamento: amostras acondicionadas em locais ideais e com pouco tempo entre coleta e extração de DNA apresentaram melhores valores e maior pureza no resultado final (ÇOBANOĞLU, *et al.*, 2023).

5.4 Sexagem molecular utilizando conjunto de *primers* P0/P2/P8 a partir de penas de novas espécies

A sexagem por PCR utilizando os *primers* P0/P2/P8 e material extraído de penas com kit de extração de DNA de COVID apresentou anelamento para ambos os sexos nas espécies de rosella, periquito, diamante-de-gould e agapornis, que correspondem a grupos distintos, separados majoritariamente em duas ordens: Psittaciformes e Passeriformes. Além disso, também foi

possível obter anelamento para uma fêmea de trinca-ferro, pertencente à ordem Passeriformes. Nenhuma dessas espécies citadas haviam sido sexadas anteriormente por esse método, segundo levantamento literário. Adicionalmente, destaca-se que as espécies diamante-de-gould e trinca-ferro pertencem a duas diferentes famílias dentro da ordem Passeriformes (Estrildidae e Thraupidae, respectivamente), para as quais não há relatos de sexagem pelo conjunto dos três iniciadores. As bandas resultantes para essas espécies apresentaram os mesmos comportamentos e características dos testes realizados com *G. gallus*, assim como para os controles positivos: ring neck e calopsita. Além disso, ainda que as espécies utilizadas como controles positivos sejam ambas da ordem de Psittaciformes (HAN, *et al.*, 2009; PASTIU, *et al.*, 2023), estas pertencem a famílias distintas: Psittaculidae e Cacatuidae.

Psittacopasserae é um clado de aves que inclui as ordens Passeriformes e Psittaciformes (SANGSTER, *et al.*, 2022). Os Passeriformes são os mais diversos, com uma grande variedade de espécies em diferentes habitats e distribuição global, sendo também a ordem com o maior número de espécies ameaçadas. Já os Psittaciformes ocupam o quarto lugar em diversidade e o segundo em número de espécies ameaçadas (MILLER & FOWLER, 2015; OLAH, *et al.*, 2016). A redução populacional de ambos os grupos é notável, causada por diversos fatores, como a perda de habitat decorrente da agricultura, exploração madeireira e desenvolvimento urbano, além da captura motivada por razões culturais, esportivas, comerciais e de subsistência, frequentemente associada a atividades ilegais devido às cores exuberantes, canto, inteligência e capacidade de imitar sons (OLAH, *et al.*, 2016; SOUTO, *et al.*, 2017). A maioria das espécies de Psittaciformes não apresenta características visuais distintas entre machos e fêmeas, e a determinação do sexo é essencial para auxiliar em programas científicos, de reprodução, conservação e reintrodução dessas espécies (KROCZAK, *et al.*, 2021).

Por fim, destaca-se a análise comparativa entre as sexagens por *primers* P0/P2/P8 e a sexagem apenas com os *primers* P2/P8 demonstrada no presente trabalho. Çakmak e colaboradores (2017) relatam que, comparando a sexagem molecular com a utilização de três distintos pares de *primers* (CHD1F/CHD1R, 2550F/2718R e P2/P8), o PCR com P2/P8 foi o que apresentou pior desempenho avaliando os resultados das 77 espécies estudadas, quando

comparado aos demais conjuntos de *primers*, com taxa de sucesso de apenas 50,9%, relacionando as dificuldades encontradas às mesmas discutidas acima. Porém, em nossos estudos, foi possível aumentar o sucesso de sexagem com a utilização do iniciador P0 em conjunto aos demais, confirmando a resolução para a sexagem com a utilização do PCR multiplex mesmo para espécies que apresentam íntrons com pouca diferença nos tamanhos entre os alelos W e Z. Ao relacionar as figuras 26, 27 e 29 do presente trabalho, observa-se uma grande melhoria e facilidade de distinção sexual para todas as espécies quando os três *primers* são usados, sugerindo este método como o mais indicado para a sexagem dessas espécies.

6 CONCLUSÃO

A utilização do *primer* P0 em associação aos *primers* P2/P8 facilita e auxilia, de forma visual, a caracterização do sexo molecular de aves de diferentes espécies e famílias de forma robusta e eficaz. Ressalta-se que a melhor temperatura de anelamento observada para as diferentes espécies estudadas foi de 48 °C, abrangendo a amplificação eficaz de diferentes grupos de aves. Os resultados observados sugerem sua aplicação como ferramenta de sexagem molecular das novas espécies ainda não sexadas pelo PCR multiplex: rosella (*P. eximius*), periquito (*M. undulatus*), diamante-de-gould (*E. gouldiae*), agaporne (*A. roseicollis*) e o trinca-ferro (*S. similis*). Destaca-se aqui as duas novas famílias incluídas nos testes de PCR multiplex: Estrildidae e Thraupidae. Ainda, buscando enfatizar a importância do bem-estar animal em estudos na ciência, ressalta-se a eficácia da extração de DNA com qualidade satisfatória a partir de amostras de penas de diferentes espécies, mesmo com amostragens menores, contendo menor peso e/ou volume. Quanto ao tipo de amostra utilizada, nota-se que apenas penas velhas e com maior quantidade de material queratinizado apresentaram valores insuficientes para o tipo de análise realizada. Adicionalmente, salienta-se que os kits para extração de DNA de vírus, excedentes dos tempos de COVID, podem ser aplicados para esse tipo de procedimento utilizando penas de aves. Apesar de inúmeros estudos anteriores descreverem a necessidade de alto processamento das amostras de cálamos de penas, o presente trabalho destaca a simplificação do tipo de extração realizada, buscando sempre a sustentabilidade e aproveitamento máximo de recursos na pesquisa.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEMOLA, O. J. *et al.* Karyotypic Analysis of Cockerel *Gallus Gallus Domesticus* (Linnaeus, 1758). **Equity J. Sci. Technol.**, v. 7, n. 01, p. 01-01, 2020. Disponível em: <<https://www.bibliomed.org/mnsfulltext/14/14-1570524902.pdf?1728907164>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

ALONSO, J. C. *et al.* Sexual size dimorphism in the Common Crane, a monogamous, plumage-monomorphic bird. **Ornis Fenn.**, v. 96, n. 04, p. 194-204, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.51812/of.133960>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

ANGGRAENI, D. V. **Molecular sexing pada burung bangsa passeriformes.** Orientadores: MURSYANTI, Exsyupransia. (orientador). Tese (Doutorado) – PPG-BIO (Programa de Pós-Graduação em Biologia), UAJY (Universidade Atma Jaya Yogyakarta), Yogyakarta, Indonésia, 2018. Disponível em: <<http://ejournal.uajy.ac.id/id/eprint/17176>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

ANTIN, P.B.; KONIECZKA, J. H. Genomic resources for chicken. **Dev. Dyn.**, v. 232, n. 04, p. 877-882, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/dvdy.20339>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

ANTONIO, E. S. *et al.* Sexagem molecular em araras vermelhas e Centros de Triagem de Animais Silvestres: revisão. **PubVet.**, v. 15, n. 11, p. 01-10, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.31533/pubvet.v15n11a961.1-10>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

ARRAIANO, C. M. *et al.* The critical role of RNA processing and degradation in the control of gene expression. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 34, n. 05, p. 883-923, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00242.x>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

ASLAM, M. *et al.* Direct PCR assays for DNA barcoding and sexing of plucked feathers. **Gene Rep.**, p. 101937, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.genrep.2024.101937>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

AVELAR, A. A. **Ontogenia e dimorfismo sexual nas espécies de guaribas vermelhos, gênero *Alouatta lacépède*, 1799 (Primates, Atelidae).** Orientadores: SOUSA E SILVA JÚNIOR, José de (orientador). 86 f.. Dissertação (Mestrado) – PPG-ZOOL (Programa de Pós-Graduação em Zoologia), UFPA (Universidade Federal do Pará), Belém, Pará, 2007. Disponível em: <https://www.repositorio.ufpa.br/bitstream/2011/4239/1/Dissertacao_Ontogenia_DimorfismoSexual.pdf>. Acesso em: 21 jul. 2024.

AVIBASE. Bulbul-de-bigodes-amarelos: *Eurillas latirostris* (Strickland, HE 1844). **Specimen information.**, Avibase: the world bird database, s.d. Disponível em: <<https://avibase.bsc-eoc.org/species.jsp?avibaseid=728B225E752DB2FD>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

AYERS, K. L. *et al.* *The molecular genetics of ovarian differentiation in the avian model.* **Sex. Dev.**, v. 07, n. 01-03, p. 80-94, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1159/000342358>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

AYERS, K. L., *et al.* *RNA sequencing reveals sexually dimorphic gene expression before gonadal differentiation in chicken and allows comprehensive annotation of the W-chromosome.* **Genome Biol.**, v. 14, p. 01-17, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-3-r26>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

BABA, T *et al.* *Ad4BP/SF-1 regulates cholesterol synthesis to boost the production of steroids.* **Commun. Biol.**, v. 01, n. 01, p. 18, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s42003-018-0020-z>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

BECKER J. B. *Sex differences in addiction.* **Dialogues Clin. Neurosci.**, v. 18, n. 04, p. 395-402, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.31887%2FDCNS.2016.18.4%2Fjbecker>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

BELLAIRS, R.; OSMOND, M. *The atlas of chick development.* 3 ed.. Oxford: Academic Press, Elsevier, 2014. 692 p.. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/book/9780123849519/atlas-of-chick-development>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

BELLOTT, D. W. *et al.* *Avian W and mammalian Y chromosomes convergently retained dosage-sensitive regulators.* **Nat. Genet.**, v. 49, n. 03, p. 387-394, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/ng.3778>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

BELLOTT, D. W.; PAGE, D. C. *Dosage-sensitive functions in embryonic development drove the survival of genes on sex-specific chromosomes in snakes, birds, and mammals.* **Genome Res.**, v. 31, n. 02, p. 198-210, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/gr.268516.120>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

BGENET. Tangará (*Chiroxiphia caudata*), **Naturalist**, 2022. Disponível em: <<https://www.inaturalist.org/observations/145064604>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

BILAL, A. *et al.* *Urbanization causing habitat destruction and loss of birds diversity in district sargodha.* **Op. Acc. J. Bio. Sci. & Res.**, v. 10, n. 01, p. 01-04, 2021. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.46718/JBGSR.2021.10.000237>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

BIRCHLER, J. A. *Dosage compensation for the birds.* **Heredity**, v. 102, n. 05, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/hdy.2008.134>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

BIRDLIFE INTERNATIONAL. *State of the world's birds: taking the pulse of the planet.* Cambridge, UK: BirdLife International, 2018. 79 p.. Disponível em: <<https://www.birdlife.org/papers-reports/state-of-the-worlds-birds/>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

BOBATO, J. **Reprodução e cuidado uniparental em uma espécie com poliginia de lek, *Chiroxiphia caudata* (Shaw & Nodder, 1793)**. Orientadores: ROPER, James Joseph (orientador). 09 f. Projeto de Dissertação (Mestrado) – PPG-ECO (Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação), UFPR (Universidade Federal do Paraná), Curitiba, Paraná, 2014. Disponível em: <https://www.iat.pr.gov.br/sites/agua-terra/arquivos_restritos/files/documento/2020-12/projeto_08_2015.pdf>. Acesso em: 21 jul. 2024.

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Portaria nº. 169, de 20 de fevereiro de 2008. Institui e normatiza as categorias de uso e manejo da fauna silvestre em cativeiro em território brasileiro, visando atender às finalidades socioculturais, de pesquisa científica, de conservação, de exposição, de manutenção, de criação, de reprodução, de comercialização, de abate e de beneficiamento de produtos e subprodutos, constantes do Cadastro Técnico Federal (CTF) de atividades potencialmente poluidoras ou utilizadoras de recursos naturais. **DOU (Diário Oficial da União)**: seção 1, Brasília, DF, n. 84, p. 55, 06 maio 2015. Disponível em: <<https://www.ibama.gov.br/component/legislacao/?view=legislacao&legislacao=135756>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

BRITO, B. F. *et al.* Nova biotécnica de imunosexagem de espermatozoides de ruminantes. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 42, n. 03, p. 99-95, 2018. Disponível em: <[http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v42/n3-4/p090-95%20\(RB734\).pdf](http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v42/n3-4/p090-95%20(RB734).pdf)>. Acesso em: 21 jul. 2024.

BRITO, B. F. *et al.* Ram and goat semen immunosexed and diluted in powdered coconut water-based preservation medium. **Acta Sci. Vet.**, v. 49, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.22456/1679-9216.114066>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

BRUGGEMAN, V. *et al.* Developmental endocrinology of the reproductive axis in the chicken embryo. **Comp. Biochem. Physiol. a Mol. Integr. Physiol.**, v. 131, n. 04, p. 839-846, 2002. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(02\)00022-3](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(02)00022-3)>. Acesso em: 21 jul. 2024.

ÇAKMAK, E. *et al.* Comparison of three different primer sets for sexing birds. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 29, n. 01, p. 59-63, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/1040638716675197>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

MOURA, C. Tangará (*Chiroxiphia caudata*). **Naturalist**, 2018. Disponível em: <<https://www.inaturalist.org/observations/94335882>>. Acesso em: 29 ago. 2024.

CERIT, H. *et al.* Sex determination by CHDW and CHDZ genes of avian sex chromosomes in *Nymphicus hollandicus*. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.**, v. 31, n. 06, p. 371-374, 2007. Disponível em: <<https://journals.tubitak.gov.tr/veterinary/vol31/iss6/1/>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

CHEN, J. *et al.* The evolution of sex chromosome dosage compensation in animals. **J. Genet. Genomics**, v. 47, n. 11, p. 681-693, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jgg.2020.10.005>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

CHENG, Y.; BURT, D. W. Chicken genomics. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 62, p. 265-271, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1387/ijdb.170276yc>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

CLINTON, M.; HAINES, L. C. An overview of factors influencing sex determination and gonadal development in birds. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 55, p. 876-886, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7781-7_6>. Acesso em: 21 jul. 2024.

CLINTON, M.; ZHAO, D. Avian sex determination: a chicken and egg conundrum. **Sex. Dev.**, v. 17, n. 02-03, p. 120-133, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1159/000529754>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

ÇOBANOĞLU, Ö. *et al.* Efficiency of DNA extractions methods from pigeons and cockatiels feathers. **BSJ Agri.**, v. 06, n. 06, p. 636-642, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.47115/bsagriculture.1364218>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

COOKE, H. J.; SAUNDERS, P. T. K. Mouse models of male infertility. **Nature Reviews Genetics**, v. 03, p. 790-801, 2002. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrg911>>. Acesso em: 16/08/2024.

CREWS, D. Sex determination: where environment and genetics meet. **Ev. Dev.**, v. 05, n. 01, p. 50-55, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1046/j.1525-142x.2003.03008.x>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

CRIAÇÃO DE ANIMAIS. Criação de periquito-de-colar (*Psittacula krameri*). **Criação de animais**: criar animais, uma arte, 2018. Disponível em: <<https://criacaodeanimais.blogspot.com/2018/03/criacao-do-ringneck-psittacula-krameri.html>>. Acesso em: 30 jul. 2024.

CUTHILL, I. C. *et al.* Plumage reflectance and the objective assessment of avian sexual dichromatism. **Am. Nat.**, v. 153, n. 02, p. 183-200, 1999. Disponível em: <<https://doi.org/10.1086/303160>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

DAMIANI, D. *et al.* O enigma da determinação gonadal: o que existe além do cromossomo Y?. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 44, n. 3, p. 381-389, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0004-27302000000300010>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

RUIZ, D. S. Foto 61919353. **Naturalist**, 2020. Disponível em: <<https://www.biodiversity4all.org/photos/61919353>>. Acesso em: 30 jul. 2024.

DARWIN, C. **A origem das espécies**. 1. ed.. São Paulo: Edipro, 2018. 480 p. Disponível em: <<https://edipro.com.br/livro/a-origem-das-especies/>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

DE BOEVER, S. *et al.* Identification and validation of housekeeping genes as internal control for gene expression in an intravenous LPS inflammation model in chickens. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 122, n. 03-04, p. 312-317, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.12.002>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

DEVELEY, P. F. *Bird conservation in Brazil: challenges and practical solutions for a key megadiverse country.* *Perspect. Ecol. Conserv.*, v. 19, n. 02, p. 171-178, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pecon.2021.02.005>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

DIAS, E. A. *et al.* Psittacine sex determination by radioimmunoassay (RIA) of sex steroids using fecal samples. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 43, supl., p. 05-11, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2006.26529>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

DANIELS, D. *Drewmonkman*, 2014. Disponível em: <https://www.drewmonkman.com/wp-content/uploads/2014/08/Northern_Shoveler_pair-Dick-Daniels.jpg>. Acesso em: 24 jun. 2024.

DOMÍNGUEZ, E. *et al.* Sperm sexing mediated by magnetic nanoparticles in donkeys, a preliminary in vitro study. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 65, p. 123-127, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.04.005>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

DONGMO, A. E. *et al.* Determination of sex in reptiles and birds using molecular techniques. *J. Ev. Biol.*, v. 28, n. 02, p. 318-328, 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/journal/14209101>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

DU, L.; GUO, P. *Computation and folding predictions.* In: GUO, P.; AFONIN, K. A. *RNA Nanotechnology and Therapeutics.* Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 2022. Disponível em: <<https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/9781003001560-5/computation-folding-predictions-lili-du-peixuan-guo>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

DUNN, P. O. *et al.* Mating systems, sperm competition, and the evolution of sexual dimorphism in birds. *Ev.*, v. 55, n. 01, p. 161-175, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb01281.x>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

DURANT, S. *Incubation temperature causes skewed sex ratios in a precocial bird.* *J. Exp. Biol.*, v. 219, n. 13, p. 1961-1964, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1242/jeb.138263>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

DURANT, S. E. *The role of incubation temperature in determining avian phenotype: implications for avian ecology, life history evolution, and conservation.* Orientadores: HOPKINS, William A. (orientador). 158 f.. Tese (Doutorado) – PPG-RD-FR (Programa de Pós-Graduação em Philosophy In Fisheries and Wildlife), Virginia Tech (Virginia Polytechnic Institute and State

University), Blacksburg, Virgínia, 2011. Disponível em: <<https://dspace7-pprd-fr.cloud.lib.vt.edu/500>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

EKBLOM, R.; WOLF, J. B. W. *A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation*. **Ev. Appl.**, v. 07, n. 09, p. 1026-1042, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/eva.12178>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

ELLEGREN, H. *Hens, cocks and avian sex determination: a quest for genes on Z or W?*. **EMBO Rep.**, v. 02, n. 03, p. 192-196, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve050>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

ENSEMBL. *Chicken (bGalGal1.mat.broiler.GRCg7b): Whole genome, 2024*. Disponível em: <https://www.ensembl.org/Gallus_gallus/Location/Genome>. Acesso em: 01 ago. 2024.

ESTERMANN, M. A. *et al. Insights into gonadal sex differentiation provided by single-cell transcriptomics in the chicken embryo*. **Cell Rep.**, v. 31, n. 01, p. 107491, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.03.055>>. Acesso em: 16/08/2024.

FABICHAKI, S. T. **Análise de proteína sexo-específica de membrana de células do sangue, provenientes do cromossomo “W” de *Gallus gallus***. Orientadores: GRADE, Carla Vermeulen Carvalho (orientadora). 89 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – CG-BIOTEC (Bacharelado em Biotecnologia), UNILA (Universidade Federal da Integração Latino-Americana), Foz do Iguaçu, Paraná, 2021. Disponível em: <<https://dspace.unila.edu.br/handle/123456789/6353>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

FATTORINI, P. *et al. Highly degraded RNA can still provide molecular information: an in vitro approach*. **Electrophoresis**, v. 41, n. 5-6, p. 386-393, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/elps.201900200>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

FENG, S. *et al. Dense sampling of bird diversity increases power of comparative genomics*. **Nature**, v. 587, n. 7833, p. 252-257, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2873-9>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

FLORES-SANTIN, J.; BURGLEN, W. W. *Beyond the chicken: alternative avian models for developmental physiological research*. **Front. Physiol.**, v. 12, p. 712633, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.712633>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

FOTH, C.; RAUHUT, O. W. M. **The evolution of feathers: from their origin to the present**. 1. ed. Cham, Suíça: Springer, 2020. 529 p. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/978-3-030-27223-4>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

FREITAS, E. B. *et al. Estudo anatomo-fisiológico do sistema reprodutivo feminino das aves na formação dos ovos: revisão de literatura*. **Rev. Cient. Eletrônica Med. Vet.**, ano IX, n. 17, p. 01-12, 2011. Disponível em:

<http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/TaIWTcM4jI8XNbm_2013-6-27-15-30-45.pdf>. Acesso em: 21 jul. 2024.

GERALDES, H. População de grou-comum atinge níveis recorde no Reino Unido. **Wilder**, 22 abr., 2020. Disponível em: <<https://wilder.pt/historias/populacao-de-grou-comum-atinge-niveis-recorde-no-reino-unido>>. Acesso em: 07 jul. 2024.

GILBERT, S. F. **Biologia do desenvolvimento**. 5. ed. Ribeirão Preto: Funpec, 2003. Disponível em: <https://tga.blv.ifmt.edu.br/media/filer_public/6b/f9/6bf9b452-c40d-452e-a5c4-de848d8a3eae/biologia_do_desenvolvimento_5a_edicao_scott_fgilbert.pdf>. Acesso em: 16/08/2024.

GONZÁLEZ-MARÍN, C. *et al.* *In vitro sperm quality and DNA integrity of SexedULTRATM sex-sorted sperm compared to non-sorted bovine sperm.* **Theriogenology**, v. 114, p. 40-45, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.09.039>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

GORMAN, K. B. *et al.* *Ecological sexual dimorphism and environmental variability within a community of Antarctic penguins (genus Pygoscelis).* **PloS One**, v. 09, n. 03, p. e90081, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090081>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

GOVOROUN, M. S. *et al.* *Isolation of chicken homolog of the FOXL2 gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development.* **Dev. Dynam.**, v. 231, n. 04, p. 859-870, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/dvdy.20189>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

GRANDO, A. P. **Utilização de tomografia por ressonância magnética nuclear para sexagem de aves silvestres sem dimorfismo sexual**. Orientadores: BERNARDES FILHO, Rubens (orientador). 89 f. Dissertação (Mestrado) – PPG-BIOENG (Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia), USP (Universidade de São Paulo), São Carlos, São Paulo, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.11606/D.82.2002.tde-07012003-092830>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. *Removing DNA contamination from RNA samples by treatment with RNase-free DNase I.* **Cold Spring Harb. Protoc.**, v. 2019, n. 10, p. pdb. prot101725, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/pdb.prot101725>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

GRIFFITHS, R. *et al.* *A DNA test to sex most birds.* **Mol. Ecol.**, v. 07, p. 1071-1075, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00389.x>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

GROLEAU, R. **How is sex determined?**. Boston: WGBH Educational Foundation, 2001. Disponível em:

<https://www.pbs.org/wgbh/nova/miracle/dete_nf05.html>. Acesso em: 16 ago. 2024.

GUO, P. *et al.* Uniqueness, advantages, challenges, solutions, and perspectives in therapeutics applying RNA nanotechnology. In: GUO, P.; HAQUE, F. **RNA Nanotechnology and Therapeutics**. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 2022. p. 43-70. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089%2Fnat.2012.0350>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

HAN, J., *et al.* A simple and improved DNA test for avian sex determination. **The Auk**, v. 126, n. 04, p. 779-783, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1525/auk.2009.08203>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

HANDLEY, L. J. *et al.* Evolutionary strata on the chicken Z chromosome: implications for sex chromosome evolution. **Genetics**, v. 167, n. 01, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1534/genetics.167.1.367>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

HAUPT, L. L. **The pilgrim on the great bird continent: the importance of everything and other lessons from Darwin's lost notebooks**. 1. ed.. Nova Iorque: Little, Brown and Company, 2006. 288 p.. Disponível em: <<https://www.hachettebookgroup.com/titles/lyanda-lynn-haupt/pilgrim-on-the-great-bird-continent/9780316082969/?lens=little-brown>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

HIDAYAT, R. F. K. *et al.* Molecular bird sexing of Tanimbar Cockatoos (*Cacatua goffiniana*) by using polymerase chain reaction method. **J. Trop. Biodivers. Biotechnol.**, v. 06, n. 02, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.22146/jtbb.59997>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

HIRST, C. E. *et al.* Sex determination and gonadal sex differentiation in the chicken model. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 62, n. 01-02-03, p. 153-166, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1387/ijdb.170319cs>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

HIRST, C. E., *et al.* Sex reversal and comparative data undermine the W chromosome and support Z-linked DMRT1 as the regulator of gonadal sex differentiation in birds. **Endocrinology**, v. 158, n. 09, p. 2970-2987, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1210/en.2017-00316>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

HUANG, Z., *et al.* Evolutionary analysis of a complete chicken genome. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 120, n. 08, p. e2216641120, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.2216641120>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

HUDSON, Q. *et al.* Aromatase inhibition reduces expression of FOXL2 in the embryonic chicken ovary. **Dev. Dynam.**, v. 233, n. 03, p. 1052-1055, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/dvdy.2038>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

ICHIKAWA, K. *et al.* *Genome editing in chickens*. **Gene and Genome Editing**, v. 03-04, 2022a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ggedit.2022.100015>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

ICHIKAWA, K. *et al.* *Prediction of sex-determination mechanisms in avian primordial germ cells using RNA-seq analysis*. **Sci. Rep.**, v. 12, p. 13528, 2022b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-022-17726-7>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

ICMBIO, 2024. **SALVE**: Sistema de Avaliação do Risco de Extinção da Biodiversidade. Brasília: ICMBIO, 2024. Disponível em: <<https://salve.icmbio.gov.br/>>. Acesso em: 23 jul. 2024.

IGIC, B. *et al.* *Size dimorphism and avian-perceived sexual dichromatism in a New Zealand endemic bird, the whitehead Mohoua albicilla*. **J. Morphol.**, v. 271, n. 06, p. 697-704, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jmor.10827>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

IMAIMATSU, K. *et al.* *Gonadal sex differentiation and ovarian organogenesis along the cortical–medullary axis in mammals*. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 23, n. 21, p. 13373, 2022.

TAYLAR, I. **American Cootville**: *Fulica americana*. Seattle: Flickr, 2013. Disponível em: <<https://www.flickr.com/photos/taylar/8533881376/in/photolist-2mbtMVZ-KpUcKL-e17nBN-22xN3Mt>>. Acesso em: 24 jul. 2024.

HILLIER, L. W. *et al.* *Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution*. **Nature**, v. 432, n. 7018, p. 695-716, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nature03154>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

JENNINGS, R.; PREMANANDAN, C. *Female reproductive system: avian female reproductive tract*. In: JENNINGS, R.; PREMANANDAN, C.. **Veterinary Histology**. Montreal, Canadá: *The Ohio State University Pressbooks*, 2017. Disponível em: <<https://ohiostate.pressbooks.pub/vethisto/chapter/13-avian-female-reproductive-tract/>>. Acesso em: 17 jul. 2024.

JERÔNIMO, B. C. **Caracterização da região MHM em aves**: padrões diferenciais de metilação em machos e fêmeas. Orientadores: WASKO, Adriane Pinto (orientadora). 75 f. Dissertação (Mestrado) – PPG-Genética (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas), UNESP (Universidade Estadual Paulista), Botucatu, São Paulo, 2016. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/144240>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

JETZ, W. *et al.* *The global diversity of birds in space and time*. **Nature**, v. 491, p. 444-448, BirdTree: exploring the avian world, 2012. Disponível em: <<https://birdtree.org/>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

JIANG, Y., *et al.* *H3K27ac chromatin acetylation and gene expression analysis reveal sex-and situs-related differences in developing chicken gonads*. **Biol. Sex**

Differ., v. 13, n. 01, p. 06, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13293-022-00415-5>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

JIMÉNEZ, R., *et al.* Sex maintenance in mammals. **Genes**, v. 12, n. 07, p. 999, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/genes12070999>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

JIN, K., *et al.* CYP19A1 (aromatase) dominates female gonadal differentiation in chicken (*Gallus gallus*) embryos sexual differentiation. **Biosci. Rep.**, v. 40, n. 10, p. BSR20201576, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1042%2FBSR20201576>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

JULIEN, P. *et al.* Mechanisms and evolutionary patterns of mammalian and avian dosage compensation. **PLoS Biol.**, v. 10, n. 05, p. e1001328, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001328>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

JÚNIOR, E. A.; YAMASHITA, H. Aspectos básicos de tomografia computadorizada e ressonância computadorizada e ressonância magnética. **Braz. J. Psychiatry**, v. 23, supl. I, p. 02-03, 2001. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbp/>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

KAISER, V. B., BACHTROG, D. Evolution of sex chromosomes in insects. **Ann. Rev. Genet.**, v. 44, n. 01, p. 91-112, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146%2Fannurev-genet-102209-163600>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

KANCHANAPHUM, P. Identification of human DNA by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique combined with white ring precipitation of Cu(OH)₂. **Songklanakarin J. Sci. Technol.**, v. 40, n. 04, p. 738-742, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.14456/sjst-psu.2018.108>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

KIM, H. *et al.* Blood transcriptome comparison between sexes and their function in 4-week Rhode Island Red chickens. **Anim. Cells Syst.**, v. 26, n. 06, p. 358-368, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/19768354.2022.2146187>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

KIM, Y. M.; HAN, J. Y. The early development of germ cells in chicken. **Int J Dev Biol.** v. 62, n. 01-02-03, p. 145-152, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1387/ijdb.170283jh>>. Acesso em: 16 ago. 2024.

KING, A. S. Sistema urogenital de las aves. In: GROSSMAN, J. D.; SISSON, S. **Anatomia de los animales domésticos**. 5. De. Barcelona: Masson, SA, 2002. 1416 p. Disponível em: <http://biblio.unvm.edu.ar/opac_css/index.php?lvl=notice_display&id=12914>. Acesso em: 21 jul. 2024.

KOHLRAUSCH, A. B. *et al.* **Biologia reprodutiva, comportamento e ecologia de atobás (*Sulidae*): implicações para a evolução do dimorfismo sexual no tamanho.** Orientadores: MATIOLI, Sergio Russo (orientador). 150 f.. Tese

(Doutorado) – PPG-Genética (Programa de Pós-Graduação em Biologia Genética), USP (Universidade São Paulo), Botucatu, São Paulo, 2003. Disponível em: <<https://repositorio.usp.br/item/001352024>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

KOMINI, C.; BOUNAS, A. *Recovery of RNA from avian nucleated whole blood stored under field conditions: an evaluation of commercial methods*. **Br. Poult. Sci.**, v. 63, n. 05, p. 730-734, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00071668.2022.2061838>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

KÖNIG, H. E. *et al. Male genital organs (organa genitalia masculine)*. In: KÖNIG, H. E. *et al. Avian anatomy: textbook and colour atlas*. 2. ed. Reino Unido: 5m Publishing, 2016. p. 139-146. Disponível em: <<https://ebookcentral.proquest.com/lib/unigent-ebooks/detail.action?docID=4841530>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

KROCZAK, A. *et al. In silico analysis of seven PCR markers developed from the CHD1, NIPBL and SPIN genes followed by laboratory testing shows how to reliably determine the sex of Musophagiformes species*. **Genes**, v. 13, p. 932, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/genes13050932>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

KROCZAK, A. *et al. New bird sexing strategy developed in the order Psittaciformes involves multiple markers to avoid sex misidentification: debunked myth of the universal DNA marker*. **Genes**, v. 12, n. 06, p. 878, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/genes12060878>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

KUROIWA, A. *Sex-determining mechanism in avians*. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 1001, p. 19-31, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-981-10-3975-1_2>. Acesso em: 21 jul. 2024.

LEE, H. J. *et al. DMRT1 gene disruption alone induces incomplete gonad feminization in chicken*. **FASEB J.**, v. 35, n. 09, e21876, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1096/fj.202100902r>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

LEITE, A. A. *et al. Laparoscopic sexing technique in the canindé macaw (Ara ararauna)*. **Braz. J. Anim. Environ. Res.**, v. 05, n. 04, p. 3641-3643, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.34188/bjaerv5n4-016>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

LI, Z. *et al. RNA regulation and function in nature*. In: GUO, P.; AFONIN, K. A. **RNA Nanotechnology and Therapeutics**. Boca Raton, USA: CRC Press, 2022a. Disponível em: <<https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/9781003001560-3/rna-regulation-function-nature-zhefeng-li-daniel-binz-el-peixuan-guo>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

LI, J. *et al. The m6A methylation regulates gonadal sex differentiation in chicken embryo*. **J. Anim. Sci. Biotechnol.**, v. 13, n. 01, p. 52, 2022b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40104-022-00710-6>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

LI, X.; GUO, P. *RNA structure and folding*. In: GUO, P.; AFONIN, K. A. **RNA Nanotechnology and Therapeutics**. Boca Raton, USA: CRC Press, 2022. Disponível em: <https://www.sfu.ca/~eemberly/phys847/lectures/RNA_folding.pdf>. Acesso em: 21 jul. 2024.

LIN, X. *et al.* Preliminary study on expression and function of the chicken W chromosome gene *MIER3* in embryonic gonads. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 24, n. 10, p. 8891, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms24108891>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

LIU, X. *et al.* Comparison of six different pretreatment methods for blood RNA extraction. **Biopreserv Biobank**, v. 13, n. 01, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/bio.2014.0090>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

LOPES, T. da S. **Sexagem em tartaruga-da-Amazônia (*Podocnemis expansa* Schweigger 1812) baseado na fisiologia hormonal, anatomia e histologia das gônadas**. Manaus: UFAM, 2015. 26 p. Disponível em: <<http://riu.ufam.edu.br/handle/prefix/4428>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

LOVICH, J. E.; GIBBONS, J. Age at maturity influences adult sex ratio in the turtle *Malaclemys terrapin*. **Oikos**, v. 59, p. 126-134, 1990. Disponível em: <<https://doi.org/10.2307/3545132>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

LUCK, G. W. *et al.* Relations between urban bird and plant communities and human well-being and connection to nature. **Conserv. Biol.**, v. 25, n. 04, p. 816-826, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2011.01685.x>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

MALLMANN, L. Sanhaço-Papa-Laranja: *Rauenia bonariensis*. **Naturalist**, 2020. Disponível em: <<https://www.inaturalist.org/observations/60843785>>. Acesso em: 15 ago. 2024.

MAGGI, B. S. **Coloração e seleção sexual em *Tropidurus hispidus***. Orientadores: COSTA, Gabriel Côrrea (orientador). 83 f.. Tese (Doutorado) – PPG-ECO (Programa de Pós-Graduação em Ecologia), UFRN (Universidade Federal do Rio Grande do Norte), Natal, Rio Grande do Norte, 2017. Disponível em: <<https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/24372>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

MAJOR, A. T. *et al.* *FOXL2* antagonises the male developmental pathway in embryonic chicken gonads. **J. Endocrinol.**, v. 243, n. 03, p. 211-228, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1530/joe-19-0277>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

MAJOR, A. T.; SMITH, C. A. Sex Reversal in Birds. **Sex Dev.**, v. 10, n. 05-06, p. 288-300, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1159/000448365>>. Acesso em: 18 ago. 2024.

MALTEMPI, P. P. P. Mais cromossomos sexuais do que autossomos: um caso observado em anfíbios. **Semin., Ciênc. Biol. Saúde**, v. 38, n. 01, supl. 01, p. 41, 2017. Disponível em: <<https://ojs.uel.br/revistas/uel/index.php/seminabio/article/viewFile/29206/22399>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

MANK, J. E. *et al.* Ontogenetic complexity of sexual dimorphism and sex-specific selection. **Mol. Biol. Ev.**, v. 27, n. 07, p. 1570-1578, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/molbev/msq042>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

MARIYAPPAN, M. *et al.* Ecological role and ecosystem services of birds: a review. **Int. J. Environ. Clim. Chang.**, v. 13, n. 06, p. 76-87, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.9734/ijeccl/2023/v13i61800>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

MAROCHI, M. Z. *et al.* Dimorfismo sexual em *Hepatus pudibundus* (Crustacea, Decapoda, Brachyura). **Iheringia Ser. Zool.**, v. 106, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1678-4766e2016003>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

MARRIADASSOU, M. *et al.* Unraveling the history of the genus *Gallus* through whole genome sequencing. **Mol. Phyl. Ev.**, v. 158, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.107044>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

MATTA, C. G. F. **Desenvolvimento de uma metodologia para sexagem de espermatozoides de bovinos utilizando anticorpos monoclonais e complemento.** 71 f. Tese (Doutorado) – PPG-PA (Programa de Pós-Graduação em Produção Animal), UFF (Universidade Estadual do Norte Fluminense), Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2003. Disponível em: <<https://www.uff.br/servico/repositorio-institucional-riuff/>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

MEDVEDEV, O. *et al.* The restorative potential of soundscapes: a physiological investigation. **Appl. Acoust.**, v. 96, p. 20-26, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apacoust.2015.03.004>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

MESQUITA, P. C. M. D. *et al.* Dimorfismo sexual na “cobra-cipó” *Oxybelis aeneus* (Serpentes, Colubridae) no estado do Ceará, Brasil. **Biotemas**, v. 23, n. 04, p. 65-69, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.5007/2175-7925.2010v23n4p65>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

METHORST, J. *et al.* The importance of species diversity for human well-being in Europe. **Ecol. Econ.**, v. 181, p. 106917, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2020.106917>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

MIGNEROT, L.; COELHO, S. The origin and evolution of the sexes: novel insights from a distant eukaryotic lineage. **C. R. Biol.**, v. 339, n. 07-08, p. 252-257, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.crvl.2016.04.012>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

MILLER, R. E.; FOWLER, M. E. (Ed.). **Fowler's zoo and wild animal medicine**. 1. ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences, v. 08, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/C2009-0-63976-3>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

MOREIRA, F. M. A. **Sexagem de mamíferos a partir da cromatina sexual em células do bulbo piloso**. Orientadores: SILVA E LUNA, Hélder Ferreira (orientadora); MARTINHO, Maria Angélica Maciel (coorientadora). Dissertação (Mestrado) – PPG-BA (Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal), UFMS (Universidade Federal do Mato Grosso do Sul), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 2015. Disponível em: <<https://repositorio.ufms.br/handle/123456789/2687>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

MULLER, U. *H-Y antigens*. **Hum. Genet.**, v. 97, n. 06, p. 701-704, 1996. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/bf02346175>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

MURASHIMA, A. *et al.* *Understanding normal and abnormal development of the Wolffian/epididymal duct by using transgenic mice*. **Asian J. Androl.**, v. 17, n. 05, p. 749-755, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.4103/1008-682x.155540>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

NAKATA, T. *et al.* *Chicken hemogen homolog is involved in the chicken-specific sex-determining mechanism*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 110, n. 09, p. 3417-3422, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1218714110>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

NAM, D. K. *et al.* *Oligo (dT) primer generates a high frequency of truncated cDNAs through internal poly (A) priming during reverse transcription*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 99, n. 09, p. 6152-6156, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.092140899>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

NARDON, E. *et al.* *Higher random oligo concentration improves reverse transcription yield of cDNA from bioptic tissues and quantitative RT-PCR reliability*. **Exp. Mol. Pathol.**, 2009, v. 87, n. 02, p. 146-151. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2009.07.005>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

NATALLIA, C. E. **Molecular sexing pada accipitridae menggunakan metode loop mediated isothermal amplification (LAMP) dan polymerase chain reaction (PCR)**. Orientadores: MURSYANTI, Exsyupransia. (orientador). Tese (Doutorado) – PPG-BIO (Programa de Pós-Graduação em Biologia), UAJY (Universitas Atma Jaya Yogyakarta), Yogyakarta, Indonésia, 2018. Disponível em: <<http://e-journal.uajy.ac.id/17170/>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

NCBI. **Genome assembly GRCg6a**. Bethesda, Maryland, EUA: NCBI, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_000002315.6/>. Acesso em: 27 jul. 2024.

NCBI. **Prokaryotic RefSeq Genome Re-annotation Project**. Bethesda, Maryland, EUA: NCBI, 2024. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/about/prokaryotes/reannotation/>>. Acesso em: 14 ago. 2024.

NUNES, G. T. *et al.* Sex determination and sexual size dimorphism in the Red-billed Tropicbird (*Phaethon aethereus*) and White-tailed Tropicbird (*P. lepturus*). **Waterbirds**, v. 36, n. 03, p. 348-352, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1675/063.036.0312>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

OHASHI, A. *et al.* The expression and localization of RNase and RNase inhibitor in blood cells and vascular endothelial cells in homeostasis of the vascular system. **PLoS ONE**, v. 12, n. 03, e0174237, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174237>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

OKASHITA, N.; TACHIBANA, M. Transcriptional regulation of the Y-linked mammalian testis-determining gene SRY. **Sex. Dev.**, v. 15, n. 05-06, p. 351-359, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1159/000519217>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

OLAH, G. *et al.* Ecological and socio-economic factors affecting extinction risk in parrots. **Biodivers. Conserv.**, v. 25, p. 205-223, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10531-015-1036-z>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

OLIAS, P. *et al.* Reference genes for quantitative gene expression studies in multiple avian species. **PLoS ONE**, v. 09, n. 06, e99678, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099678>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

OLIVEIRA, C. M. *et al.* Análise comparativa da estabilidade do DNA de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) sob diferentes métodos de preservação para uso em RAPD-PCR. **Neotrop. Entomol.**, v. 31, p. 225-231, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1519-566X2002000200008>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

OLIVEIRA, R. A. *et al.* Sexagem fetal em equinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 38, n. 01, p. 37-42, 2014. Disponível em: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vti-29094>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

OLIVEIRA, T. H. G. *et al.* O DNA: uma sinopse histórica. **Rev. Ensino Bioquím.**, v. 02, n. 01, p. 01-16, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.16923/reb.v2i1.13>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

PACHECO, J. F. *et al.* Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee: second edition. **Ornithol. Res.**, v. 29, p. 94-105, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s43388-021-00058-x>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

PAMULANG, Y. V.; HARYANTO, A. Short communication: molecular bird sexing on kutilang (*Pycnonotus sp.*) based on amplification of CHD-Z and CHD-W genes by using polymerase chain reaction method. **Biodiversitas**, v. 22, n. 01, p. 449-

452, 2021. Disponível em: <<https://smujo.id/biodiv/article/view/6955>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

PAȘTIU, A. I. *et al.* PCR protocols for molecular sexing in monomorphic birds. **Sci. Works, Ser. C Vet. Med.**, v. 69, n. 01, 2023. Disponível em: <<https://veterinarymedicinejournal.usamv.ro/index.php/scientific-papers/past-issues?id=1823>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

NICOLOSO, P., Sanhaço-Papa-Laranja: *Rauenia bonariensis*. **Naturalist**, 2022. Disponível em: <<https://www.inaturalist.org/observations/144266470>>. Acesso em: 15 ago. 2024.

PEREIRA, D. C. *et al.* Molecular sexing in the formation of pairs of blue-and-yellow macaw (*Ara ararauna*) in reintroduction programs. **Res., Soc. Dev.**, v. 10, n. 10, p. 570101019330-570101019330, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.33448/rsd-v10i10.19330>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

PEREIRA, E. M. **Padrões de vocalização de frangos de corte para sexagem e estimativa de bem-estar**. Orientadores: NÄÄS, Irenilza de Alencar (orientador). 79 f. Tese (Doutorado) – PPG-EA (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola), UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas), Campinas, São Paulo, 2012. Disponível em: <<https://bv.fapesp.br/pt/dissertacoes-teses/76646/padroes-de-vocalizacao-de-frangos-de-corte-para-sexagem-e-es>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

PIACENTINI, V. Q. *et al.* Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee. **Rev. Bras. Ornitol.**, v. 23, n. 02, p. 91-298, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s43388-021-00058-x>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

PIÉGU, B. *et al.* Variations in genome size between wild and domesticated lineages of fowls belonging to the *Gallus gallus* species. **Genomics**, v. 112, n. 02, p. 1660-1673, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.10.004>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

POLITO, M. J. *et al.* A simplified method of determining the sex of *Pygoscelis penguins* using bill measurements. **Mar. Ornithol.**, v. 40, p. 89-94, 2012. Disponível em: <<http://www.marineornithology.org/article?rn=974>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

PRUM, R. O. *et al.* A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. **Nature**, v. 526, n. 7574, p. 569-573, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nature15697>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

BONI, R. Araponga: *Procnias nudicollis*. **Naturalist**, 2022. Disponível em: <<https://www.inaturalist.org/observations/139523882>>. Acesso em: 15 ago. 2024.

RALLABANDI, H. R. *et al.* Identification of female specific genes in the W chromosome that are expressed during gonadal differentiation in the chicken.

Korean J. Poult. Sci., v. 46, n. 04, p. 287-296, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.5536/KJPS.2019.46.4.287>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

RAMOS, C. N. *et al.* Sexing as a tool for reinsertion of *Amazona aestiva* parrots to nature: use of less invasive technique. **Res., Soc. Dev.**, v. 10, n. 12, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.33448/rsd-v10i12.20601>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

RASO, T. F.; WERTHER, K. Sexagem cirúrgica em aves silvestres. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 56, n. 02, p. 188-192, 2004. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/abmvz/a/9DnftFLqwwnfZXLsc8tcFb/?lang=pt&format=pdf>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

REZENDE-PINTO, F. M. **Ciclo reprodutivo e dimorfismo sexual em *Cnemidophorus vacariensis* Feltrim & Lema, 2000 (*Sauria, Teiidae*) nos campos do Planalto das Araucárias do Rio Grande do Sul, Brasil.** Orientadores: VIÑAS, Laura Verrastro (orientador). Dissertação (Mestrado) – PPG-BA (Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal), UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Porto Alegre, 2007. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/10947>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

RIBEIRO, S. A. *et al.* Loop Mediated Isothermal Amplification Assay (LAMP): uma revisão detalhada sobre a técnica. **Revista EVS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde**, v. 48, n. 01, p. 8809-8809, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.18224/evs.v48i1.8809>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

ROCHA, A. O. *et al.* Coleta de sangue e extração do DNA de aves: uma revisão. In: CARVALHO, D. A. *et al.*. **Conservação, uso e melhoramento de galinhas caipiras.** Ponta Grossa: Atena, 2020. p. 61-71. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1129541>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

ROCHA JUNIOR, J. M. da. **Litíase epididimária em *Gallus gallus domesticus* em diferentes regiões do Brasil.** Orientadores: MARTINS, Nelson Rodrigo da Silva (orientador). 47 f. Tese (Doutorado) – PPG-VET (Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária), UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais), Belo Horizonte, Minas Gerais, 2007. Disponível em: <<https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/BUOS-8FVNXH>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

CONTE, R. Irerê: *Dendrocygna viduata*. **Biodiversity4all**, 2013. Disponível em: <<https://www.biodiversity4all.org/observations/44670415>>. Acesso em: 25 abr. 2024.

RODRIGUES, D. L. N. Desafios na padronização da anotação genômica. **BIOINFO**, v. 3, p. 05, 2023. Disponível em: <<https://bioinfo.com.br/desafios-na-padronizacao-da-anotacao-genomica/>>. Acesso em: 25 abr. 2024.

ROLBAND, L. A. *et al.* *The natural versatility of RNA.* In: GUO, P.; AFONIN, K. A. **RNA nanotechnology and therapeutics.** Boca Raton, USA: CRC Press,

2022. Disponível em:
<https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/9781003001560-13/natural-versatility-rna-lewis-rolband-oleg-shevchenko-caroline-west-ciara-conway-caryn-striplin-kirill-afonin>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

ROLY, Z. Y., et al. *Transcriptional landscape of the embryonic chicken Müllerian duct*. **BMC Genomics**, v. 21, p. 01-22, 2020. Disponível em:
<https://doi.org/10.1186/s12864-020-07106-8>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

ROMÃO, R. **Esplancnologia nas aves**. Évora: Universidade de Évora, 2011. 19 p.

ROSSETTI, V. Os sistemas “ZW”/“XY” e fatores que interferem na determinação do sexo em aves e mamíferos. **NetNature**, 2016. Disponível em:
<https://www.netnature.com.br/artigo/5360>>. Acesso em: 25 jun. 2024.

RUDAYA, S. V. et al. *Sex identification of different species of wild birds using a single universal protocol to the bird sexing method based on gene polymorphism*. **Regul. Mech. Biosyst.**, v. 11, n. 03, 2020. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.15421/022061>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

RUTZ, F. et al. Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 31, n. 03, p. 307-317, 2007. Disponível em:
<http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/307.pdf>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

SABAT, D. et al. *Elemental analysis of various feathers of Indian Rose Ringed Parakeet *Psittacula krameri**. **3rd International Multidisciplinary Microscopy and Microanalysis Congress (InterM)**, p. 33-40, 2016. Disponível em:
https://doi.org/10.1007/978-3-319-46601-9_5>. Acesso em: 21 jul. 2024.

SANGSTER, G. et al. *Phylogenetic definitions for 25 higher-level clade names of birds*. **Avian Res.**, v. 13, p. 100027, 2022. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.avrs.2022.100027>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

SANTOS, M. H. B. et al. Sexagem fetal em ovelhas Santa Inês por ultrasonografia. **Cienc. Rural**, v. 36, p. 573-578, 2006. Disponível em:
<https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000200033>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

SCHARTL, M. *Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates*. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 14, n. 06, p. 634-641, 2004. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.gde.2004.09.005>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

SCHOENWOLF, G. C. et al. **Larsen's human embryology**. 1. ed. Amesterdã, Países Baixos: Elsevier, 2014. 618 p.. Disponível em:
<https://shop.elsevier.com/books/larsens-human-embryology/schoenwolf/978-0-323-69604-3>>. Acesso em: 16 ago. 2024.

SCOTT, C. **Efeitos da sexagem por citometria de fluxo sobre a composição protéica da membrana de espermatozóides bovinos**. Orientadores: DELL'AQUA JUNIOR, José Antônio (orientador). Dissertação (Mestrado) – PPG-BA (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal), UNESP (Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"), Botucatu, São Paulo, 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/108796>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

SHARPE, J. C.; EVANS, K. M. *Advances in flow cytometry for sperm sexing*. **Theriogenology**, v. 71, n. 01, p. 04-10, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.021>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

SIGEMAN, H. *et al. Insights into avian incomplete dosage compensation: sex-biased gene expression coevolves with sex chromosome degeneration in the common whitethroat*. **Genes**, v. 09, n. 08, p. 373, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390%2Fgenes9080373>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

SILVA, E. I. C. **Avicultura: anatomia da galinha**. Belo Jardim/PE: IFPE, 2020. Disponível em: <<https://philarchive.org/rec/DASAEF>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

SILVA, K. V. K. A. *et al. Sex determination in Turdus amaurochalinus (Passeriformes: Muscicapidae): morphometrical analysis supported by CHD gene*. **Rev. Biol. Trop.**, v. 59, n. 02, p. 789-794, 2011. Disponível em: <<https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/3140/3047>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

SILVA, M. R. da. Maurice Wilkins e a polêmica acerca da participação de Rosalind Franklin na construção do modelo da dupla hélice do DNA. **Filosofia e história da biologia**, v. 05, n. 02, p. 369-384, 2010. Disponível em: <<https://www.abfhib.org/FHB/FHB-05-2/FHB-5-2-19-Marcos-Rodrigues-da-Silva.pdf>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

SILVA, N. S. R. *et al. Determination of seminal plasma protein range with molecular chromatography exclusion in young bulls*. **Braz. J. Anim. Environ. Res.**, v. 04, n. 02, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.34188/bjaerv4n2-024>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

SILVA JÚNIOR, M. S. F. S. *da et al. Eficiência de protocolos para extração de DNA com bulbos e sangue de galinhas caipiras*. In: IV Jornada Científica da Embrapa Meio-Norte. Anais da IV Jornada Científica da Embrapa Meio-Norte, v. 04, 2018, Teresina, PI. **Anais da IV Jornada Científica da Embrapa Meio-Norte**. Brasília, DF: Embrapa, 2018. p. 36. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1121031/1/QuartaJornadaCientifica2018300034.pdf>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

SIMPSON, R. K. *et al. Migration and the evolution of sexual dichromatism: evolutionary loss of female coloration with migration among wood-warblers*. **Proc. Roy. Soc. B, Biol. Sci.**, v. 282, n. 1809, p. 20150375, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0375>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

SLAWINSKA, A. *et al.* TLR-mediated cytokine gene expression in chicken peripheral blood mononuclear cells as a measure to characterize immunobiotics. **Genes (Basel)**, v. 12, n. 02, p. 195, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/genes12020195>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

SMITH, J. *et al.* Fourth report on chicken genes and chromosomes 2022. **Cytogenet. Genome Res.**, v. 162, n. 08-09, p. 405-528, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1159/000529376>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

SOCIETAT ORNITOLÒGICA AMICS DEL VENDRELL. **Sistema reproductor de las aves**. El Vendrell, Tarragona, Espanha: Soavelvendrell, 2014. Disponível em: <<https://soavelvendrell.wordpress.com/articulos/anatomia-de-las-aves/sistema-reproductor-de-las-aves/>>. Acesso em: 30 jul. 2024.

SOUTO, W. M. S. *et al.* Singing for cages: the use and trade of Passeriformes as wild pets in an economic center of the Amazon—NE Brazil route. **Trop. Conserv. Sci.**, v. 10, p. 1940082917689898, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1177/1940082917689898>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

SOUZA, G. V. **Produção de anticorpos monoclonais contra proteínas sexo-específicas de membrana de espermatozoides de equino**. In: 8º Encontro de Iniciação Científica, 1ª Mostra de Extensão, 3ª Mostra de Pós-Graduação, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2003.

STEINER, G. *et al.* Label free molecular sexing of monomorphic birds using infrared spectroscopic imaging. **Talanta**, v. 150, p. 155-161, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.12.008>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

STILLER, J. *et al.* Complexity of avian evolution revealed by family-level genomes. **Nature**, v. 629, p. 851-860, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41586-024-07323-1>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

SUN, C. *et al.* Role and function of the Hintw in early sex differentiation in chicken (*Gallus gallus*) embryo. **Anim. Biotechnol.**, v. 34, n. 01, p. 56-66, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10495398.2021.1935981>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

SUN, D. *et al.* Regional epigenetic differentiation of the Z Chromosome between sexes in a female heterogametic system. **Genome Res.**, v. 29, n. 10, p. 1673-1684, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/gr.248641.119>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

SUN, D. *et al.* The role of human ribonuclease A family in health and diseases: a systematic review. **IScience**, v. 25, n. 11, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105284>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

TAKAGI, N.; MAKINO, S. A revised study on the chromosomes of three species of birds. **Caryologia**, v. 19, n. 04, p. 443-455, 1966. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00087114.1966.10796235>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

TAN, *et al.* Mini review: Asymmetric Müllerian duct development in the chicken embryo. **Front. Cell Dev. Biol.**, v. 12, p. 1347711, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1347711>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

THOMÉ, M. T. C. *et al.* Dimorfismo sexual, uso do ambiente e abundância sazonal de *Elachistocleis cf. ovalis* (Anura: Microhylidae) em um remanescente de Cerrado no estado de São Paulo, sudeste do Brasil. **Biota Neotrop.**, v. 07, n. 01, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1676-06032007000100003>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

TREE OF LIFE WEB PROJECT. **Aves: birds. version 01, 1999 (temporary)**. Disponível em: <<http://tolweb.org/Aves/15721/1999.01.01>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

TURCU, M. C *et al.* A comparison of feathers and oral swab samples as DNA sources for molecular sexing in companion birds. **Anim.**, v. 13, n. 03, p. 525, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ani13030525>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

VAILLANT, S. *et al.* Sex reversal and aromatase in chicken. **J. Exp. Zool.**, v. 290, n. 07, p. 727-740, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jez.1123>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

VALCU, M. *et al.* Extra-pair paternity and sexual dimorphism in birds. **J. Ev. Biol.**, v. 36, n. 05, p. 764-779, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/jeb.14172>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

VALENZUELA, N. Co-evolution of genomic structure and selective forces underlying sexual development and reproduction. **Cytogenet. Genome Res.**, v. 127, p. 232-241, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1159/000295809>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

VAN DAMME, R. *et al.* Causes of sexual dimorphism in performance traits: a comparative approach. **Ev. Ecol. Res.**, v. 10, p. 229-250, 2008. Disponível em: <<http://evolutionary-ecology.com/abstracts/v10/2265.html>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

VAN TILBURG, M. F. *et al.* Identificação de antígeno macho-específico de ovino. **Rev. Port. Cienc. Vet.**, v. 101, n. 559-560, p. 231-233, 2006. Disponível em: <<https://spcv.pt/wp-content/uploads/2023/06/Vol101-n559-560.pdf>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

VERTEBRATE GENOMES PROJECT. *Gallus gallus: chicken*. **Genomeark**, 2021. Disponível em: <https://www.genomeark.org/genomeark-all/Gallus_gallus>. Acesso em: 02 jun. 2024.

VIEIRA, J. N. *et al.* Sexagem molecular em aves silvestres. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 33, n. 2, p. 66-70, 2009. Disponível em:

<<http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/pag66-70.pdf>>.

Acesso em: 21 jul. 2024.

VOLODIN, I. A. *et al.* Gender identification using acoustic analysis in birds without external sexual dimorphism. **Avian Res.**, v. 06, p. 01-17, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40657-015-0033-y>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

VONK, J.; SHACKELFORD, T. K. **Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior**. Cham, Suíça: Springer, 2022. Disponível em: <<https://link.springer.com/referencework/10.1007/978-3-319-55065-7>>. Acesso em: 17 jul. 2024.

VUCICEVIC, M. *et al.* Sex determination in 58 bird species and evaluation of CHD gene as a universal molecular marker in bird sexing. **Zoo Biol.**, v. 32, n. 03, p. 269-276, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/zoo.21010>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

WALDRIGUES, A. Citogenética de aves III. Cromossomos sexuais e digametia em aves. **Semina**, v. 03, n. 10, p. 111-115, 1982. Disponível em: <<https://doi.org/10.5433/1679-0367.1982v3n10p111>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

WEISSENSTEINER, M. H.; SUH, A. Repetitive DNA: the dark matter of avian genomics. In: KRAUS, R. H. S. **Avian genomics in ecology and evolution: from the lab into the wild**. Suíça: Springer International Publishing, p. 93-150, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/978-3-030-16477-5>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

WHELAN, C. J. *et al.* Why birds matter: from economic ornithology to ecosystem services. **J. Ornithol.**, v. 156, p. 227-238, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10336-015-1229-y>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

WILLERSLEV, E. *et al.* Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. **Science**, v. 300, n. 5620, p. 791-795, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1126/science.1084114>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

WILLHELM, B. R. **Sexagem de sêmen por citometria de fluxo e sua aplicabilidade em animais selvagens**. Orientadores: OBERST, Ender Rosana (orientadora). 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – CG-VET (Bacharelado em Medicina Veterinária), UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Porto Alegre, 2014. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/183554>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

WINK, M. DNA analyses have revolutionized studies on the taxonomy and evolution in birds. In: MIKKOLA, H. **Birds challenges and opportunities for business, conservation and research**. Londres: IntechOpen, 2021. p. 03-21. Disponível em: <<https://doi.org/10.5772/intechopen.97013>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

XU, L.; ZHOU, Q. *Female-specific and dosage selections restore genes through transpositions onto the degenerated songbird W chromosomes.* **BioRxiv**, p. 692194, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/692194>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

XU, L.; ZHOU, Q. *The female-specific W chromosomes of birds have conserved gene contents but are not feminized.* **Genes**, v. 11, p. 1126, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390%2Fgenes11101126>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

YAMAMOTO, Y. *et al. Dynamic analysis of the developmental fate of cells in the center of the area pellucida of the blastoderm in chicken.* **Poult. Sci. J.**, v. 44, n. 01, p. 85-91, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.2141/jpsa.44.85>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

YILMAZ, A. *et al. The effects of incubation temperature on the sex of Japanese quail chicks.* **Poult. Sci.**, v. 90, n. 10, p. 2402-2406, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.3382/ps.2011-01471>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

YIMTRAGOOL, N.; CHANGTOR, P. *Some parts of the feather can be a non-invasive genetic sample for sexing in avian?.* **Iran. J. Appl. Anim. Sci.**, v. 12, n. 01, p. 161-166, 2022. Disponível em: <<https://sanad.iau.ir/Journal/ijas/Article/1023438>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

ZHANG, L.; GUO, P. *Principles and fundamentals of RNA nanotechnology.* In: GUO, P.; AFONIN, K. A. **RNA nanotechnology and therapeutics.** Boca Raton, USA: CRC Press, 2022. Disponível em: <<https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/9781003001560-4/principles-fundamentals-rna-nanotechnology-long-zhang-peixuan-guo>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

ZHAO, D. *et al. Effect of estrogen on chick primordial follicle development and activation.* **Cell Biol. Int.**, v. 41, n. 06, p. 630-638, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/cbin.10766>>. Acesso em: 21 jul. 2024.

8 ANEXOS

Anexo A – Certificado Comissão de Ética no Uso de Animais

19/04/2023, 15:06

https://sig.unila.edu.br/sipac/protocolo/documento/documento_visualizacao.jsf?imprimir=true&idDoc=753339

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA INTEGRAÇÃO LATINO-AMERICANA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO Nº 2 / 2023 / CEUA (10.01.05.19.05)

Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO

Foz Do Iguaçu-PR, 13 de abril de 2023.

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - UNILA

Certificamos que a proposta intitulada "ANÁLISE DA PRESENÇA DO mRNA DE PROTEÍNA SEXO ESPECÍFICA FEMININA, EM CÉLULAS SANGUÍNEAS DE AVES"- protocolado sob o processo nº **23422.001086/2023-27**, sob a responsabilidade do docente **Carla Vermeulen Carvalho Grade** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino Mui- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Integração Latinoamericana (UNILA), na reunião do dia 26 de janeiro de 2023.

Vigência do projeto	Abril/2023 a março de 2025
Espécie/Linhagem	Aves
Número de animais	10
Peso/Idade	Variáveis
Sexo	Ambos
Origem	Tutores/responsáveis

(Assinado digitalmente em 13/04/2023 13:38)
FLAVIO LUIZ TAVARES
PROFESSOR DO MAGISTÉRIO SUPERIOR
ILACVN (10.01.06.03.04)
Matrícula: 1655845

Processo Associado: 23422.001086/2023-27

Visualize o documento original em <https://sig.unila.edu.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **2**, ano: **2023**, tipo: **CERTIFICADO**, data de emissão: **13/04/2023** e o código de verificação: **bfeaa7e5f3**

https://sig.unila.edu.br/sipac/protocolo/documento/documento_visualizacao.jsf?imprimir=true&idDoc=753339

1/1

Fonte: a autora.

Legenda: Para o desenvolvimento do presente projeto, houve a aprovação para uso de amostra animal, expedida pela comissão de ética no uso de animais da UNILA.