

RESUMO - CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - GENÉTICA

APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DE PCR-RFLP NA OTIMIZAÇÃO DA SEXAGEM MOLECULAR DE CINCO ESPÉCIES DE CORUJAS BRASILEIRAS (AVES: STRIGIFORMES)

Gustavo Azevedo Quintanilha (quintanilhagusth@gmail.com)

Juliana De Moura Medeiros (jumour@ufrj.br)

Diogo Pignatara Coimbra (coimbradp@gmail.com)

Marina Mortati Dias Barbero (barbero.mmd@gmail.com)

Denise Monnerat Nogueira (denisemn@ufrj.br)

As corujas são aves predadoras que apresentam pouco ou nenhum dimorfismo sexual externo. No Brasil, ocorrem 26 espécies, sendo 4 endêmicas. São também residentes em centros urbanos, onde é comum sofrerem acidentes por colisões, o que determina a sua manutenção em centros de recuperação da fauna silvestre. A identificação do sexo é fundamental para conduzir estudos com animais de vida livre, e também é uma demanda urgente em centros de triagem, onde, além da importância para a formação de casais em cativeiro, implica diretamente nas decisões de manejo. Devido à dificuldade de captura e coleta de amostras biológicas, existe uma carência de estudos genéticos sobre as corujas brasileiras. As técnicas de sexagem baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que possuem como alvo o gene chromo-helicase-DNA-binding (CHD) localizado nos cromossomos sexuais Z e W, são as ferramentas mais precisas, rápidas e menos invasivas disponíveis. Contudo, utilizando o conjunto de primers P2/P8, considerados universais para aves não-

ratitas, a identificação do sexo em Strigiformes nem sempre é possível, pois a diferença de tamanho entre os amplicons CHD-Z/CHD-W é pequena, o que dificulta a resolução em matriz de agarose. Através da clivagem do amplicon CHD-Z pela enzima HaeIII em seu sítio de restrição 5'-GGCC-3', a diferença de tamanho entre este e o fragmento CHD-W torna-se maior, possibilitando a separação efetiva em agarose a 2%. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência da técnica de PCR-RFLP na otimização da sexagem molecular de cinco espécies de corujas brasileiras – *Tyto furcata*, *Asio clamator*, *Pulsatrix perspicillata*, *Megascops atricapilla* e *Athene cunicularia* – visando fornecer uma ferramenta alternativa para a sexagem molecular nessas espécies. A região do gene CHD foi amplificada por PCR utilizando os primers P2/P8. Os produtos obtidos foram submetidos à digestão com a enzima de restrição HaeIII por 2 horas a 37 °C, seguida de inativação a 80 °C por 20 minutos. Os produtos foram analisados em gel de agarose a 2% sob eletroforese a 100 V por 1 hora e 45 minutos. Para todas as espécies analisadas, o amplicon CHD-Z foi clivado, gerando padrões que possibilitaram a identificação do sexo em agarose a 2%. O tamanho dos fragmentos obtidos foi em torno de 300 pb (CHD-Z) e 400 pb (CHD-W) e, em todas as espécies, o fragmento CHD-W (exclusivo das fêmeas) foi maior e não sofreu clivagem. Uma banda menor, em torno de 70 pb, foi gerada pela clivagem do CHD-Z; entretanto, sua visualização não foi possível em agarose, somente em matriz de poliacrilamida. A PCR-RFLP foi eficaz para o diagnóstico do sexo nessas espécies, com clivagem consistente do fragmento CHD-Z utilizando a enzima HaeIII, corroborando dados existentes para Strigiformes e outros grupos. Dentre essas espécies, as quatro primeiras foram analisadas previamente por PCR convencional em agarose a 2%, e somente para *T. furcata* a separação dos amplicons foi efetiva. Portanto, a sexagem molecular dessas espécies foi otimizada com a aplicação conjunta da análise PCR-RFLP, possibilitando uma resolução segura dos fragmentos em agarose. A eletroforese em agarose requer menos experiência técnica e utiliza menos insumos tóxicos, oferecendo menor risco em comparação com a poliacrilamida. Além disso, é mais rápida, permitindo o diagnóstico em menor tempo, o que é particularmente importante na rotina laboratorial. Cadastro no SisGen AA5390C. Registro CEUA-ICBS n° 23083.033629/2023-63.

Palavras-chave: gene chd; p2/p8; haeiii.