

# PADRONIZAÇÃO DE EXAME DE SEXAGEM MOLECULAR PARA AULAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

Fernanda Mendes Saviani<sup>1</sup>, Beatriz Leão Cavalaro<sup>2</sup>, Marcela Funaki dos Reis<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Acadêmica de Biomedicina, Campus Maringá/PR, Universidade Cesumar – UNICESUMAR. fernandam.saviani@gmail.com

<sup>2</sup> Acadêmica de Biomedicina, Campus Maringá/PR, Universidade Cesumar – UNICESUMAR. bialeaocavalaro@icloud.com

<sup>3</sup> Orientadora, Universidade Cesumar – UNICESUMAR. marcelafunaki@gmail.com

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi padronizar a técnica de sexagem molecular para utilização em aulas práticas de biologia molecular possibilitando aos acadêmicos terem acesso a um protocolo padrão ouro de análise. As amostras foram coletadas de voluntários maiores de 18 anos de ambos os sexos que aceitaram participar da pesquisa e assinaram o TCLE. A sexagem molecular foi realizada pela reação em cadeia da polimerase - PCR com os *primers* Y7/Y8 que identificam o gene DSY14 presente somente no cromossomo Y. Após a testagem de parâmetros de reação e ciclagem os resultados foram expressos de maneira qualitativa pela presença da banda que identifica do gene DSY14 no gel de eletroforese. Assim, os indivíduos de sexo masculino apresentam banda positiva e indivíduos do sexo feminino ausência desta banda quando observado o gel de eletroforese. A técnica de sexagem molecular proposta foi padronizada como esperado e posteriormente irá contemplar a rotina de aulas práticas da disciplina de Biologia Molecular.

**PALAVRAS-CHAVE:** Aulas práticas; Cromossomos Y; Reação em cadeia da polimerase.

## 1 INTRODUÇÃO

E a sexagem molecular foi desenvolvida inicialmente para identificação precoce de doenças genéticas e posteriormente para identificação do sexo de bebês durante a gestação. Assim, Lo *et al* (1997) confirmaram a presença de fragmentos de cromossomos do bebê no sangue materno e desenvolveram *primers* capazes de identificar de maneira exclusiva o sexo masculino pela presença do gene DSY14 presente no cromossomo Y.

Desta maneira, o exame de sexagem molecular baseado na identificação da presença do gene DSY-14 se tornou padrão ouro na identificação precoce do sexo de bebês durante a gestação e de fundamental aprendizagem para acadêmicos na área de Biologia Molecular. A biologia molecular vem sendo uma ferramenta importante na evolução da compreensão dos mecanismos relacionados à genética contribuindo de forma significativa no desenvolvimento de novos métodos diagnósticos (Eça 2004).

Para os acadêmicos dos cursos de graduação em áreas da saúde é relevante que vivenciem em aula a rotina e aplicação de exames padrão ouro para que desenvolva a habilidade técnica fundamental para o exercício profissional futuro. Como destaca Viviani e Costa (2010) que consideram as atividades práticas um recurso ou complemento as aulas teóricas que proporcionam ao estudante vivenciar a realidade da prática científica e da pesquisa bem como a reflexão e discussão de problemáticas ligada à aula prática. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi padronizar o exame molecular de sexagem para aplicação em aulas práticas de Biologia Molecular.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo foram analisadas amostras de voluntários do sexo masculino e feminino a fim de detectar a especificidade dos *primers* selecionados Y7 e Y8 para identificação do gene DSY14.

Todos os indivíduos foram orientados e concordaram em participar da pesquisa assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TLCE aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unicesumar pelo parecer número 4.764.033.

Os voluntários participantes do estudo foram conduzidos ao laboratório de Biologia Molecular da Universidade Cesumar – Unicesumar onde foram orientados quanto a metodologia de doação das amostras sanguíneas.

Para extração de DNA foi utilizado o método de *salting-out* proposto por Gaaib, Nassief e Al-Assi (2011). A quantificação do DNA extraído foi realizada de maneira indireta em eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo seguindo o protocolo adaptado de Kanbe *et al.* (2002). A amplificação do gene DSY14 utilizou a metodologia proposta por Lo *et al.* (1998), com modificações, onde foi realizada pela reação em cadeia da polimerase – PCR com o *primers* Y7 (CATCCAGAGCGTCCCTGGCTT) e Y8 (CTTTCCACAGCCACATTTGTC). As condições de ciclagem também foram padronizadas seguindo os protocolos de Semercilo *et al.* (2007) e Mustafa *et al.* (1995). Após a amplificação foi realizada nova eletroforese em gel de 2,5% de agarose para confirmação do sexo masculino pela presença do *amplicon* de 198 pb.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A padronização de exames moleculares é necessária devido às condições de equipamentos e reagentes que variam de laboratório para laboratório. Nesse sentido, a partir de um protocolo definido é importante testar diferentes condições para padronizar o protocolo completo. Na sexagem molecular é identificada a presença do gene DYS14 no sangue materno e por isso se torna um exame menos invasivo e considerado de baixo risco ao bebe. Neste exame a gestante a partir da 8ª semana de gestação apresenta fragmentos de cromossomos do bebe na corrente sanguínea e com isso é possível realizar a identificação molecular do sexo.

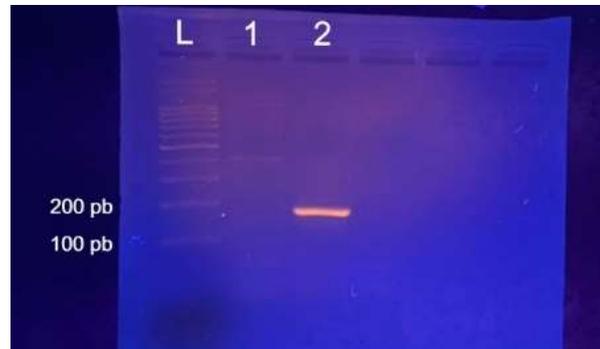
Neste estudo, após a extração de DNA ocorreu a quantificação para avaliação da quantidade, pureza e integridade para garantir a qualidade da PCR. Estes parâmetros relacionados a extração de DNA são fundamentais, pois a qualidade do produto da extração, ou seja, o DNA garante o sucesso da amplificação e evita a geração de resultados falso-positivos e negativos (ARAÚJO *et al.*, 2021).

Seguindo o protocolo adaptado de Lo *et al.* (1998) houve amplificação do gene para o sexo esperado (FIGURA 1), sem presença de inibidores de reação mostrando qualidade tanto do processo de extração de DNA quanto da reação de PCR (DIAS *et al.*, 2012). No entanto, houve presença amplificação inespecífica indicando problemas na ciclagem durante a amplificação no termociclador (HAAS, TORRES; 2016). A amplificação inespecífica é caracterizada pela amplificação de regiões que não são alvos determinados pelos *primers* e ocorrem devido ao ajuste de temperaturas não ideais ao anelamento destes *primers*.



**Figura 1:** Amplificação inespecífica. L: *ladder* 100 pb , 1: amostra de DNA genômico XY, 2: amostra de DNA genômico XX com amplificações inespecíficas, 3: controle negativo

Nesse sentido, uma nova condição de ciclagem com 42 ciclos foi testada, porém também resultando em amplificação inespecífica. Assim, foram conduzidos mais dois testes com 30 e 35 ciclos de reação de PCR com temperaturas diferentes, sendo que em 35 ciclos houve a amplificação do alvo de DNA esperado e sem as amplificações inespecíficas como mostra a Figura 2.



**Figura 2:** Amplificação esperada do gene DSY14. L: ladder de 100 pb, 1: amostra de DNA genômico XX, 2: amostra DNA genômico XY.

A amplificação do alvo esperada está relacionada a revelação de uma banda de 198 pb que identifica o sexo masculino, pois os *primers* Y7 e Y8 anelam no gene DYS14 localizado no cromossomo Y que é exclusivo do sexo masculino. Desta maneira o exame de sexagem molecular é facilmente interpretado, pois quando ocorre a presença da banda no gel de eletroforese ela corresponde ao sexo masculino e ausência de banda ao sexo feminino.

A padronização do exame de sexagem molecular realizada neste estudo foi concluída em todas as suas etapas desde a extração de DNA a emissão do resultado de maneira confiável. Com isso espera-se futuramente incluir este exame padrão ouro nas rotinas de aulas práticas de Biologia Molecular oferecendo aos acadêmicos da Unicesumar a oportunidade de aliar o conhecimento teórico a prática do futuro exercício profissional.

#### 4 CONCLUSÃO

Neste estudo foi realizada a padronização do exame de sexagem molecular proposta por meio da identificação do gene DSY14 presente no cromossomo Y exclusivo para indivíduos do sexo masculino. A padronização realizada conseguiu seguir corretamente todos os parâmetros fundamentais para exames moleculares com qualidade desde a extração de DNA, PCR e resultados seguros quanto a não geração de falsos-positivos ou negativos. Assim, é esperado futuramente incluir este exame como prática em aulas de biologia molecular.

#### REFERÊNCIAS

- HAAS, D. J.; TORRES, A. C. D. Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, n. 26, p. 1-15, 2016.
- DIAS, N. L.; JÚNIOR-FONSECA, A. A.; RODRIGUES, D.S.; CAMARGOS, M. F. *et al.* PCR em tempo real para diagnóstico da leucose enzoótica bovina. **Ciência Rural**, v. 42, n. 8, p. 1434-1439, 2012.
- ARAÚJO, M. C.; VALENTE, A. D.; SOUZA, G. A. F.; AVELAR, A. C. S.; TORRESAN, C.; MORAES, A. M. S. M.; REIS, M. F. Adaptação de um método de extração de DNA a partir

de células da mucosa bucal baseado em parâmetros de qualidade. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 34697-34708, 2021.

EÇA, Lilian Piñero. **Biologia molecular**: guia prático e didático. Rio de Janeiro: Revinter, 2004.

JAWDAT, N.; GAAIB, Adnan F. Nassief; Akeel H. Al-Assi Simple salting – out method for genomic DNA extraction from whole blood. 16. **Tikrit Journal of Pure Science** 16 (2) 2011.

KANBE, T.; HORII, T.; ARISHIMA, T.; OZEKI, M.; KIKUCHI, A. PCR-based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes. **Yeast**, v. 29, 973-989, 2002.

LEVI, José Eduardo; WENDEL, Silvano; TAKAOKA, Deise Tihe. Determinação pré-natal do sexo fetal por meio da análise de DNA no plasma materno. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 9, p. 687-690, 2003.

Lo YM, Corbetta N, Chamberlain P. F, *et al.* Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. **Lancet**. 1997; 350:485-7.

Lo YM, Tein M. S, Lau T. K, *et al.* Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. **Am J Hum Genet**. 1998; 62(4):768-775.

MUSTAFA, A. S.; AHMED, A.; ABAL, A. T.; CHUGH, T. D. Establishment and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction for detection of mycobacteria and specific identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Tuber Lung Dis**. 1995;76(4):336–343.

PERUZZI, Sarah Luchese; FOFONKA, Luciana. A importância da aula prática para a construção significativa do conhecimento: a visão dos professores das ciências da natureza. Disponível em <http://www.revistaea.org/pf.php?idartigo=1754>. Acesso em: 14 maio 2020.

VIVIANI, Daniela; COSTA, Arlindo. **Práticas de ensino de ciências biológicas**. Centro Universitário Leonardo da Vinci – Indaial, Grupo UNIASSELVI, 2010.

WATSON, J. D.; BAKER, T. A.; BELL, S. P.; LOSICK, G. R.; LEVINE, M. **Biologia molecular do gene**. 5. ed. Rio de Janeiro: Artmed, 2006. 728 p.