

445 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA CELULAR A PARTIR DE ADULTOS DE *Haematobia irritans* (LINNAEUS, 1758) (DIPTERA MUSCIDAE)¹

VALUATION OF DIFFERENT PROTOCOLS OF EXTRACTION OF CELLULAR DNA FROM ADULTS OF *Haematobia irritans* (LINNAEUS, 1758) (DIPTERA: MUSCIDAE)

Luciana Gatto Brito²
Maribel Elizabeth Funes Huacca³
Luciana C. de A. Reginato⁴
Gonzalo Efrain Moya Borja⁵

RESUMO - As técnicas de análise de DNA são importantes ferramentas para a identificação de genes que promovem o comportamento fenotípico inerente à espécie, e também na análise genética das populações. Objetivando a obtenção de DNA celular a partir de adultos de *Haematobia irritans*, foram testados diferentes protocolos de extração, onde avaliou-se a eficiência destes em fornecer material a ser utilizado em futuros estudos envolvendo a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Obteve-se a extração de DNA em apenas dois protocolos, sendo que, um deles apresentou melhor rendimento após análise por espectrofotometria. Tal resultado demonstra que, no caso da espécie *H. irritans*, a extração do DNA genômico através de acetato de potássio, sal utilizado para propiciar a precipitação protéica, em detrimento do uso de clorofórmio (álcool isoamílico (24:1)), mostrou-se a opção mais adequada.

ABSTRACT - Techniques for DNA analysis, are important tools for the identification of genes that promote the behavior phenotype inherent to the species, and also for the genetic analysis of the populations. With the objective of the obtaining cellular DNA from adults of *Haematobia irritans*, three different extraction protocols were evaluated with respect to efficiency in supplying DNA to be used in future studies involving the technique of Polymerase Chain Reaction. From the tested protocols, only two resulted in cellular DNA, and one of them presents better quality, after analysis by spectrophotometry. These results show that, in the case of *H. irritans*, the extraction of cellular DNA through potassium acetate, salt used to promote the precipitation of protein, in detriment of the use chloroform (isoamyl alcohol (24:1)), was the most appropriate option.

PALAVRAS-CHAVE: *Haematobia irritans*, DNA celular, extração.

KEY WORDS: *Haematobia irritans*, cellular DNA, extraction.

INTRODUÇÃO

A espécie *Haematobia irritans*, vulgarmente conhecida como "mosca do chifre", é um parasito hematófago obrigatório de bovinos com distribuição cosmopolita. A mosca do chifre é originária da Europa, e foi introduzida nos Estados Unidos em 1884, de onde se espalhou para os outros países da América. Sua presença no Brasil foi ob-

servada por volta de 1976, inicialmente, no Estado de Roraima (Valério & Guimarães, 1983). A disseminação está relacionada com a movimentação de bovinos e veículos de transporte provenientes de regiões infestadas (Araújo, 1991).

Quando em altas infestações, estes dípteros causam elevadas perdas econômicas devido à diminuição da produção de leite e carne e pela neces-

sidade de procedimentos onerosos para o seu controle (Campbell, 1976; Kunz *et al.*, 1984). A "mosca do chifre", além de ser apontada como transmissora de patógenos, é considerada nos Estados Unidos da América, uma das maiores pragas para os bovinos (Scholl & Petersen, 1985), sendo responsável por perdas de até 730 milhões de dólares anuais (Byford *et al.*, 1992). Um dos efeitos prejudiciais da "mosca

¹ - Trabalho realizado sob os auspícios da CAPES e EMBRAPA.

² - CPGCV-PV, Bolsista CAPES - UFRRJ. Km 7 Br 465, Seropédica, RJ, 23851-970 e-mail: brito@cnpse.embrapa.br

³ - Curso de Pós-graduação em Química Analítica, Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo (IQSC/USP), Bolsista CNPq.

⁴ - Pesquisadora CPPSE-EMBRAPA.

⁵ - Departamento de Parasitologia Animal - UFRRJ.

do chifre" sobre o gado, é a predisposição à infestação pela mosca da bi-cheira, *Cochliomyia hominivorax*, causada pelas lesões deixadas por suas picadas, além da perda de sangue e a irritação dos animais. Esta irritação pode reduzir o pastoreio, interferindo na ingestão e na assimilação de nutrientes, devido a perda de energia despendida na tentativa de defesa contra o ataque das moscas o que geralmente, acarreta a redução no ganho de peso (Campbell & Thomas, 1992).

Embora pequena, aproximadamente metade do tamanho de uma *Musca domestica*, o dano que ela causa deve-se ao grande número de indivíduos que freqüentemente parasitam o mesmo animal. A observação de "nuvens" de até 5 mil moscas por animal tem sido descrita por diversos autores. O sangue, seu único alimento, é obtido através de inúmeras picadas diárias, e a alimentação estende-se durante as 24 horas do dia, não havendo, aparentemente, influência da incidência de luz sobre o repasto. Isto explica o epíteto específico da mosca em latim, "*irritans*", uma vez que seu efeito principal é a irritação causada ao animal infestado, deixando-o extremamente agitado, prejudicando o seu desempenho normal, além da espoliação sangüínea propriamente (McIntock & Depner, 1954 e Harris *et al.*, 1974).

Estudos relacionados à ocorrência, sazonalidade e controle da "mosca do chifre" veem sendo realizados ao longo dos anos dentro da parasitologia veterinária (Palmer *et al.*, 1981; Williams, 1991; Macedo *et al.*, 2001; Barros, 2002). Entretanto, são incipientes os trabalhos relacionados à genética das populações e à variação gênica deste parasito, tanto no Brasil quanto nos demais países latino-americanos.

Com o advento das técnicas de biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismos de DNA, os quais permitem a obtenção de um grande número de marcadores cobrindo o genoma do organismo. Tais

marcadores, denominados "marcadores moleculares" podem ser utilizados em diversas aplicações e são importantes ferramentas para a identificação de genes que promovem o comportamento fenotípico inerente à espécie, e também na análise genética das populações, estudos evolutivos, ecológicos, filogenéticos e taxonômicos (Gasser, 1999; Lynch & Milligan, 1994; Reineke & Zeibitz, 1999).

Vários procedimentos de extração de DNA de tecido têm sido descritos na literatura porém o que se observa é que protocolos padrões são utilizados com algumas modificações, visando resolver problemas referentes à espécie em estudo. Objetivando a obtenção de DNA celular através de espécimes de *H. irritans*, foram testados diferentes protocolos de extração, onde avaliou-se a eficiência destes em fornecer material a ser utilizado em futuros estudos envolvendo a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Dellaporta *et al.*, 1983; Taylor *et al.*, 1996; Guerrero *et al.*, 1997; Lessinger & Azeredo-Espin, 2000).

A quantificação do DNA genômico baseia-se na propriedade das bases aromáticas dos ácidos nucléicos em absorver radiação ultra-violeta ao comprimento de onda de 260 nm. A medida da absorvância de 260 nm (A_{260}) é utilizada para a determinação da concentração de ácidos nucléicos. A pureza do DNA pode ser avaliada pela relação A_{260}/A_{280} , pois as proteínas absorvem radiação ultra-violeta ao comprimento de onda de 280 nm: para o DNA puro, o valor desta relação; e de 1,8, sendo que valores abaixo sugerem contaminação protéica, e acima contaminação por RNA ou fenol (Zaha, 1996).

MATERIALE MÉTODOS

No presente estudo utilizou-se indivíduos adultos de *H. irritans*, conservados em álcool 70% e mantidos à temperatura de congelamento. Para a obtenção de DNA genômico, os espé-

cimes foram divididos em 15 amostras, cada qual contendo cinco moscas. Os protocolos testados foram obtidos a partir de literatura pertinente, seguindo técnicas descritas por Dellaporta *et al.*, 1983; Lessinger & Azeredo-Espin, 2000 e Taylor *et al.*, 1996, aqui denominados protocolos I, II e III, respectivamente.

Protocolo I: os espécimes foram colocados em tubos de polipropileno para centrífuga, com capacidade de 1,5 ml, e macerados com auxílio de bastão de vidro em 160 µl de solução contendo TRIS 100 mM, NaCl 60 mM, sacarose 5% e EDTA 10 mM. Após este procedimento, foram adicionados 450 µl de uma segunda solução contendo TRIS 300mM, SDS 1,25%, sacarose 5% e EDTA 10 mM, por tubo. Os tubos foram agitados por inversão e mantidos em banho-Maria a 65° C por 30 minutos. Após a incubação, adicionou-se 150 µl de acetato de potássio (3M, pH 5,0) e as amostras foram novamente agitadas por inversão e colocadas por 20 minutos a -20° C. Após esse período, foram centrifugadas a 13.000 rpm por 15 minutos, e o sobrenadante transferido para novo tubo de centrífuga, quando adicionou-se igual volume de isopropanol. Os tubos foram agitados por inversão e mantidos por 5 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante descartado. O DNA precipitado (*pellet*) foi lavado com 500 µl de etanol 70% por tubo e novamente centrifugado a 13.000 rpm por 5 minutos, sendo sobrenadante descartado. Após a extração, os *pellets* foram desidratados em capela de fluxo laminar e, após completamente secos, foram hidratados em 100 µl de tampão TE (TRIS HCl 10mM, EDTA 1 mM) e armazenados a -20° C.

Protocolo II: Os espécimes foram colocados em tubos de polipropileno, com capacidade de 1,5 ml, e macerados com auxílio de bastão de vidro em 100 µl de NaCl, 100 mM, EDTA 100 mM, TRIS mM e SDS 0,5%. As amostras foram

então incubadas em banho-Maria a 55° C por 3 horas, e após este período adicionou-se 2 µg de RNase por tubo e estes permaneceram a 55° C por 10 minutos. Foram adicionados 100 µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e as amostras centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo de centrífuga contendo 200 µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e novamente centrifugou-se as amostras por 5 minutos, sendo este procedimento repetido duas vezes. Os sobrenadantes obtidos após as centrifugações foram transferidos para novos tubos de centrífuga, onde adicionou-se 400 µl de etanol 100%, sendo as amostras centrifugadas por 20 minutos a 13.000 rpm. Os *pellets* de DNA obtidos foram lavados em 500 µl de etanol 70%, e centrifugados a 13.000 rpm por 7 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Após a extração, os *pellets* foram secos em capela de fluxo laminar, e após completamente desidratado, o DNA foi ressuspenso em 100 µl de água estéril auto-clavada e armazenado a -20° C.

Protocolo III: Os espécimes foram colocados em tubos de polipropileno para centrífuga, com capacidade de 1,5 ml, e macerados com auxílio de bastão de vidro em 200 µl de NaCl, 100 mM de EDTA 100 mM, TRIS 100 mM e SDS 0,5%, sendo também adicionado 4 µg de proteinase K por tubo. As amostras foram incubadas em banho-Maria a 55° C por 3 horas. Após esse período adicionou-se 2 µg de RNase por tubo, e estes permaneceram a 37° C por 20 minutos. Foram adicionados às amostras 100 µl de acetato de potássio, e elas permaneceram por 10 minutos a 55° C. Após este período, adicionou-se 100 µl de clorofórmio, álcool isoamílico (24:1), sendo as amostras centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante obtido foi transferido para novo tubo de centrífuga contendo 200 µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), seguindo nova centrifugação em igual velocidade por 5 minutos. O sobrenadante obtido foi

transferido para novo tubo de centrífuga e adicionou-se etanol 100%, em volume correspondente a duas vezes o volume do sobrenadante obtido. As amostras foram novamente centrifugadas por 20 minutos a 13.000 rpm, para que se obtivesse a decantação do etanol. Os *pellets* de DNA obtidos foram lavados em 500 µl de etanol 70%, e centrifugados a 13.000 rpm por 7 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Após a extração, os *pellets* foram secos em capela de fluxo laminar. Após completa desidratação, o DNA foi ressuspenso em 100 µl de água estéril autoclavada e armazenada a -20° C.

A quantificação do DNA genômico obtido nas amostras foi feita utilizando-se espectrofotômetro, com base na propriedade da molécula de DNA em absorver a radiação ultravioleta ao comprimento de onda (λ) de 260 nm. Para a leitura, foram retirados 10 µl de cada amostra de DNA e diluídos em 490 µl de água estéril autoclavada e, a partir da absorbância obtida, foi possível determinar a concentração de DNA em solução (ng/µl), utilizando-se a seguinte fórmula: [DNA] = OD 260 x 2500.

Com a finalidade de verificar a qualidade do DNA obtido a partir dos protocolos testados, foi feita uma corrida eletroforética, sendo que as amostras fossem diluídas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esse partir dos protocolos testados, obteve-se a extração de DNA genômico apenas nos protocolos I e II, sendo que os melhores rendimentos, após a espectrofotometria, foram observados no protocolo I (Figura 1).

Esse resultado demonstra que, no caso da espécie *H. irritans*, a extração do DNA genômico através de acetato de potássio, sal utilizado para propiciar a precipitação protéica, assim como o uso de álcool isopropílico, mostrou-se uma boa opção que, para esta espécie, o DNA na presença do sal e do isopropanol formou um precipitado,

freqüentemente visível, que pôde sedimentado por centrifugação, a hidratado em tampão TE, foi quantificado ao comprimento de onda de 260 nm e, baseando-se na absorbância obtida, calculou-se a concentração de DNA nas amostras em ng/µl (Figura 2). A pureza das preparações contendo DNA foi analisada através da relação entre leituras realizadas ao comprimento de onda de 260 nm e 280 nm (Figura 3), pois, enquanto os ácidos nucleicos absorvem luz ao comprimento de onda de 260 nm, as proteínas absorvem luz ao comprimento de onda de 280 nm; assim a relação A_{260}/A_{280} nos dá um parâmetro para a avaliação da qualidade das preparações de DNA já que valores menores que 1,8 revelam contaminação de DNA por proteína. Com o protocolo utilizado, obteve-se o DNA em solução com baixa contaminação protéica.

A precipitação de ácidos nucleicos através do uso de etanol é utilizada para concentrar soluções de DNA por meio da presença de concentrações relativamente altas de cátions monovalentes e o etanol induz a transição estrutural da molécula do ácido nucleico, promovendo a precipitação da solução (Eickbush & Moudrianakis, 1978). O uso de etanol absoluto baseia-se na propriedade de o álcool em modificar estruturalmente a molécula dos ácidos nucleicos a fim de promover sua precipitação, sendo que as posteriores lavagens do DNA precipitado com etanol 70% visam a dessalinização do DNA, pois a maioria dos sais e pequenas moléculas orgânicas são solúveis em etanol 70%. Outros sais como o cloreto de sódio, acetato de potássio e acetato de amônia também são capazes de induzir a precipitação de ácidos nucleicos, porém são mais difíceis de serem removidos do precipitado contendo o DNA devido à sua baixa solubilidade em etanol 70% (Ausubel *et al.*, 1998).

A maior eficiência do protocolo de extração de DNA genômico em fornecer maiores quantidades de DNA assim como um precipitado menos co-

taminado tanto por proteínas como por RNA, talvez seja uma conseqüência do uso da sacarose no processo de maceração dos espécimes, que por aumen-

tar a osmolaridade da solução, conseguiu promover uma melhor desidratação celular, sendo que, a adição de acetato de potássio com posterior in-

cubação das amostras a -20°C também propiciou a eficiente precipitação das proteínas, diminuindo a contaminação protéica. A precipitação do DNA extraído, mesmo que em baixa concentração na solução, foi favorecido pela incubação a -20°C , pois baixas temperaturas favorecem a precipitação dos ácidos nucleicos, e proporcionam uma boa recuperação do DNA (Ausubel *et al.*, 1998).

Após a extração das amostras de DNA genômico das diferentes populações de *H. irritans*, o mesmo foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1%, onde se observou a qualidade do DNA (Figura 4).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, A. M. D. Relatório interno da seção de doenças parasitárias e carenciais. SEPAC/SNAD/MARA. Brasília, DF, Brasil, 1988, 1989, 1990, 1991.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A. & STRUHL, K. 1998. Current protocols in molecular biology. New York: John Wiley & Sons, v. 01, p. 205-245.

BARROS, A. T. M. Desenvolvimento de

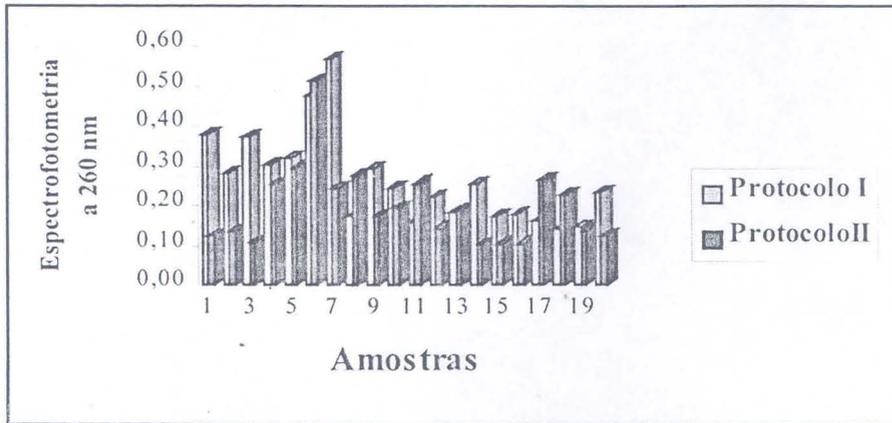


Figura 1: Quantificação do DNA genômico de *H. irritans* obtido pelos diferentes protocolos utilizando-se espectrofotômetro ao comprimento de onda de 260 nm.

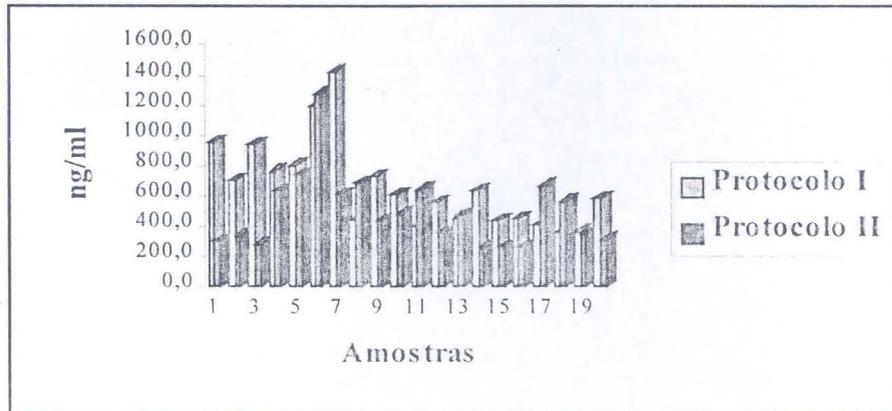


Figura 2: Concentrações de DNA genômico de *H. irritans*, obtidas pelos diferentes protocolos, expressas em ng/ μl .

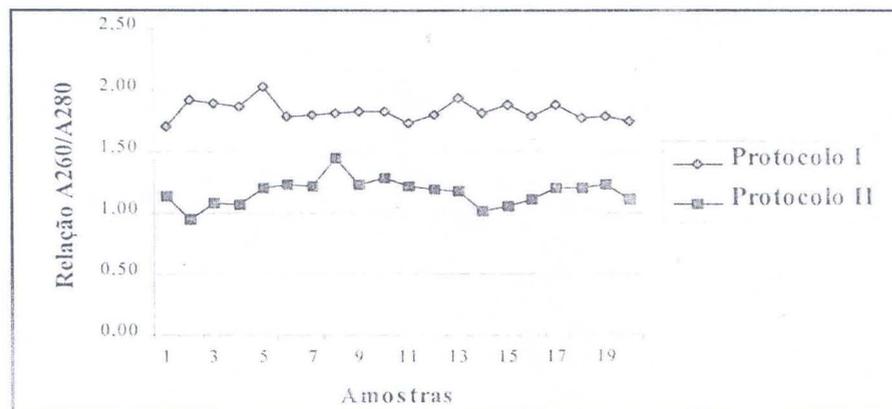


Figura 3: Relação entre as leituras utilizando-se espectrofotômetro ao comprimento de onda de 260 nm e 280 nm para avaliação da qualidade das preparações de DNA, obtidas pelos diferentes protocolos.

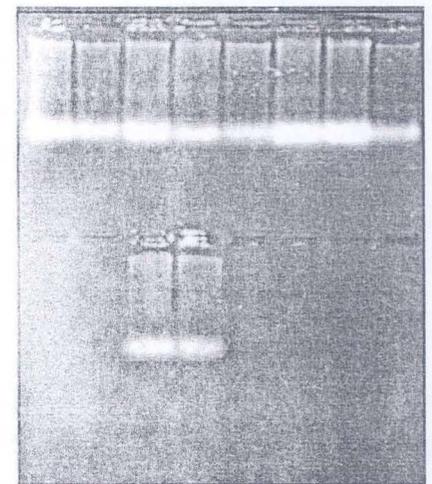


Figura 4: Gel de agarose a 1% contendo amostras de DNA genômico extraído das diferentes populações de *H. irritans* analisadas.

Haematobia irritans em massas fecais de bovinos mantidas em laboratório. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 37, n. 2, p. 217-221, 2002.

BYFORD, R. L.; CRAIG, M. E. & CROSBY, B. L. Review of ectoparasites and their effect on cattle production. *J. Anim. Sci.*, v. 70, p. 597-602, 1992.

CAMPBELL, J. B. 1976. Effect of horn fly on cows as expressed by increased weaning weights of calves. *J. Econ. Entomol.* 69(6): 711-712.

CAMPBELL, J. B. & THOMAS, G. D. The history, biology, economics, and control of the Horn Fly, *Haematobia irritans*. *Agri-practice*, v. 13, n. 4, p. 31-36, 1992.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19-21.

EICKBUSH, T. H. & MOUDRIANAKIS, E. N. 1978. The compaction of DNA helices into either continuous supercolis or folded-fiber roas and toroids. *Cell* 13: 295-306.

GASSER, R. B. 1999. PCR-based technology in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology*, 84: 229-258.

GUERRERO, F. D.; JAMROZ, R. C.; KAMMLAH, D. & KUNZ, S. E. Toxocological and molecular characterization of pyrethroid-resistant horn-flies, *Haematobia irritans*: identification of *kdr* super-*kdr* point mutations. *Insect Bioch. Molec. Biol.*, v. 27, p. 745-755, 1997.

HARRIS, R. L. MILLER, J. A. & FRAZAR, E. D. 1974. Horn flies and stable flies: feeding activity. *Ann Entomol. Soc. Am.* 67(6): 891-894.

KUNZ, S. E.; MILLER, J. A.; SIMS, P. 1984. Economies of controlling horn flies (Diptera: Muscidae) in rage cattle management. *J. Econ. Entomol.* 77(3): 657-660.

LESSINGER, A. C.; AZEREDO-ESPIN, M. L. 2000. Evolution and structural organisation of mitochondrial DNA control region of myiasis-causing flies. *Med. Vet. Entomol.* 14:71-80.

LYNCH, M. & MILLIGAN, B. G. 1994. Analysis of population genetic struture with RAPD markers. *Mol. Ecology* 3: 91-99.

MACEDO, D. M.; BRITO, L. G. & MOYA BORJA, G. E. Emergência de *Haematobia irritans* em fezes bovinas no município de Seropédica, Rio de Janeiro. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 21, n. 2, p. 77-80, 2001.

MCLINTOCK, J. & DEPNER, K. R. 1954. Areview of the life-history and habits of the horn fly, *Siphona irritans* (L.) (Diptera: Muscidae. *Can. Entomol.* 86:20-33.

PALMER, W. A.; BAY, D. E. & SHARPE, P. J. H. Influence of temperature on the development and survival of the immature stages of horn fly, *Haematobia irritans irritans* (L.). *Protection Ecology*, v. 3, n. 4, p. 299-309, 1981.

REINEKE, A. & ZEBITZ, C. P. 1999. Suitability of polymerase chain reaction - based approaches for identification of different gypsy moth genotypes in Central Europe. *Ann Entomol. Soc. Am.* 92(5): 737-741.

SCHOLL, P. J. & PETERSEN, R. D. 1985. Biting flies. In: *Livestock Entomology*. Wiley, New York. pp:49-63.

TAYLOR, D. B. SZALANSKY, A. L. & PETERSEN, R. D. 1996. Identification of screwworm species by polymerase chain reaction-restriction fragment lenght polymorphism. *Med. Vet Entomol.* 10:63-70.

VALÉRIO, J. R.; GUIMARÃES, J. H. 1983. Sobre a ocorrência de uma nova praga, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) no Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 1 (4): 417-418.

WILLIAMS, R. E. Controle químico, prejuízos econômicos e estratégias de controle. In Anais do 1º Simpósio Internacional sobre a "mosca dos chifres" *Haematobia irritans*. USP, São Paulo, Brasil, 1991.

ZAHA, A. 1996. *Biologia molecular básica*. Porto Alegre: Mercado Aberto, p. 56.

AOS COLABORADORES

A Revista Brasileira de Medicina Veterinária vem contribuindo, nos seus 26 anos de existência, para divulgar conhecimentos atualizados de ciência e tecnologia, através de centenas de artigos originais, na maior parte resultantes de exaustiva experimentação.

Para cumprimento integral dos objetivos propostos, necessita contudo oferecer aos leitores os dados que possibilitem o desejado intercâmbio entre pesquisadores e entidades interessadas, no Brasil e no exterior.

A redação solicita, por isso mesmo, que os colaboradores sigam à risca as normas para publicação de trabalhos, com ênfase quanto aos seguintes detalhes:

- nome completo dos autores, sem abreviaturas;
- qualificação de cada autor, informando titulação e endereço (postal e eletrônico), para correspondência;
- que os autores assinem a revista ou sejam sócios da SOMVERJ.

Agradecemos, desde já, o atendimento aos quesitos supracitados.

A Direção Científica