

12

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 BRITO¹, GUSTAVO GASPARIN², MARIBEL ELIZABETH FUNES HUACCA³,
LUCIANA C. DE A. REGITANO⁴ & GONZALO EFRAIN MOYA BORJA⁵**

INTRODUÇÃO

A espécie *Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758), vulgarmente conhecida como "mosca do chifre" é originária da Europa, e foi introduzida na América do Sul através da Venezuela e Colômbia em 1937. No Brasil, constatou-se sua presença inicialmente no estado de Roraima entre 1977 e 1978¹. Estudos relacionados a ocorrência, sazonalidade e controle da mosca do chifre vêm sendo realizados ao longo dos anos dentro da parasitologia veterinária. Entretanto, são incipientes os trabalhos relacionados à genética das populações e a variação gênica deste parasito, tanto no Brasil quanto nos demais países latino-americanos. O uso de técnicas utilizando DNA, são importantes ferramentas para a identificação de genes que promovem o comportamento fenotípico inerente à espécie, e também na análise genética das populações². Vários procedimentos de extração de DNA têm sido descritos na literatura. O que se observa no entanto, 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 espécimens de *H. irritans*, foram testados diferentes protocolos de extração, onde avaliou-se a eficiência destes em nos fornecer material a ser utilizado em futuros estudos envolvendo a técnica de Reação em Cadeia de Polimerase.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se no presente estudo adultos de *H. irritans*, conservados em potes de vidro contendo álcool 70% e mantidos a temperatura de congelamento. Para a obtenção de DNA genômico, os espécimens foram divididos em 15 amostras, cada qual contendo cinco moscas. Os protocolos testados foram obtidos a partir de literatura pertinente, seguindo técnicas descritas na literatura^{3,4,5}, aqui denominados por protocolos I, II e III.

Protocolo I: Os espécimens foram colocados em tubos de polipropileno para centrifuga, com capacidade de 1,5 ml, e macerados com auxílio de bastão de vidro em 160µl solução contendo TRIS 100 mM, NaCl 60 mM, Sacarose 5% e EDTA 10 mM. Após este procedimento, foi adicionado 450µl de uma segunda solução contendo TRIS 300 mM, SDS 1,25%, Sacarose 5%, EDTA 10mM, por tubo. Os tubos foram agitados por inversão e mantidos em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Após a incubação, adicionou-se 150µl de acetato de potássio (3M, Ph 5,0) e as amostras novamente agitadas por inversão e colocadas por 20 minutos a -20°C, após este período, estas foram centrifugadas a 13000 rpm por 15 minutos, e o sobrenadante transferido para novo tubo de centrifuga e onde adicionou-se igual volume de isopropanol. Os tubos foram então agitados por inversão e mantidos por 5 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante descartado. O *pellet* de DNA foi lavado com 500µl de etanol 70% por tubo, e estes novamente centrifugados a 13000 rpm por 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Após a extração, os *pellets* foram desidratados em capela de fluxo de contínuo de oxigênio, a após completamente secos, os *pellets* foram hidratados em 100µl de tampão TE (TRIS HCl 10 mM, EDTA 1 mM) e armazenado a -20°C.

Protocolo II: Os espécimens foram colocados em tubos de polipropileno para centrifuga, com capacidade de 1,5 ml, e macerados com auxílio de bastão de vidro em 100µl de NaCl 100 mM, EDTA 100 mM, TRIS 100 mM e SDS 0,5%. As amostras foram então incubadas em banho-maria a 55°C por 3 horas, onde após este período adicionou-se 2µg de RNAase por tubo e estes permaneceram a 55°C por 10 minutos. Foi então adicionado 100µl de clorofórmio:

álcool isoamílico (24:1), e as amostras centrifugadas a 13000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi então transferido para novo tubo de centrifuga contendo 200µl 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 centrifuga, onde adicionou-se 400µl de etanol 100% e as amostras centrifugadas por 20 minutos a 13000 rpm. Os *pellets* de DNA obtidos foram lavados em 500µl de etanol 70%, e centrifugados a 13000 rpm por 7 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Após a extração, os *pellets* foram secados em capela de fluxo de contínuo de oxigênio, e após completamente seco, o DNA foi ressuspensionado em 100µl de água estéril auto-clavada e armazenado a -20°C.

Protocolo III: Os espécimens foram colocados em tubos de polipropileno para centrifuga, com capacidade de 1,5 ml, e macerados com auxílio de bastão de vidro em 200µl de NaCl 100 mM, EDTA 100 mM, TRIS 100 mM e SDS 0,5%, sendo também adicionado 4µg de proteinase K por tubo. As amostras foram incubadas em banho-maria a 55°C por 3 horas, após este período adicionou-se 2µg de RNAase por tubo, e estes permaneceram a 37°C por 20 minutos. Foi adicionado as amostras 100µl de acetato de potássio, e estas permaneceram por 10 minutos a 55°C. Após este período, adicionou-se 100µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), sendo as amostras centrifugadas a 13000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante obtido foi então transferido para novo tubo de centrifuga contendo 200µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) seguindo-se nova centrifugação em igual velocidade por 5 minutos. O sobrenadante obtido foi transferido para novo tubo de centrifuga, 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 13000 rpm, para que se obtivesse a decantação do etanol. Os *pellets* de DNA obtidos foram lavados em 500µl de etanol 70%, e centrifugados a 13000 rpm por 7 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Após a extração, os *pellets* foram secados em capela de fluxo de contínuo de oxigênio, após completamente seco, o DNA foi ressuspensionado em 100 µl de água estéril auto-clavada e armazenado a -20°C. A quantificação do DNA genômico obtido pelos diferentes protocolos foi feita utilizando-se espectrofotômetro de massa, que baseia-se na propriedade da molécula de DNA em absorver radiação Ultra-violeta ao comprimento de onda de 260 nm, e baseando-se nesta absorção é possível determinar a concentração de DNA em uma solução.

RESULTADOS

A 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). 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), se mostrou a opção mais adequada, já que nessas condições a proteína na presença do sal formou um precipitado visível, que pôde ser sedimentado por centrifugação. A adição de isopropanol permitiu a precipitação do DNA, que posteriormente foi hidratado em tampão TE, e quantificado ao comprimento de onda de 260 nm. Baseando-se na absorbância obtida, calculou-se a concentração das amostras em ng/µl.

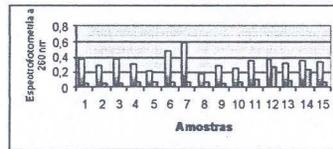


FIGURA 1: Quantificação do DNA genômico de *H. irritans* obtido pelos diferentes protocolos utilizando-se espectrofotômetro ao comprimento de onda de 260nm.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. VALÉRIO, J.R. & GUIMARÃES, J.H. *Rev. Bras. Zool.*,1: 417- 418. 1983.
2. GASSER, R.B. *Vet. Parasitol.*, **84**: 229-258. 1999.
3. DELLAPORTA, S.L., WOOD, J. & HICKS, J.B. *Plant Mol. Biol. Rep.*,1:19-21.1983
4. LESSINGER, A.C., AZEREDO-ESPIN, M.L. *Med. Vet. Entomol.*,14: 71-80. 2000.
5. TAYLOR, D.B., SZALANSKY, A.L. & PETERSON, R.D. *Med. Vet. Entomol.*,10: 63-70. 1996.

¹ Trabalho realizado sob os auspícios da CAPES e EMBRAPA.

² Aluna de Doutorado do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Dep^o de Parasitologia Animal, Bolsista CAPES.

³ Aluno de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de São Carlos.

⁴ Aluna de Mestrado do Curso de Pós-graduação em Química Analítica, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. Bolsista CNPq.

⁵ Pesquisadora EMBRAPA- CPPSE, Fazenda Canchim.

⁶ Professor Adjunto, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Dep^o de Parasitologia Animal.

