

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE LARVAS INDIVIDUAIS DE HELMINTOS

MELLO, S.S.D.; GAGLIARDI, T.R.; NICIURA, S.C.M. (Orientador)

Centro Universitário Central Paulista

A genotipagem de helmintos, parasitas do trato gastrointestinal de ruminantes, permite o conhecimento de polimorfismos moleculares relacionados a características adaptativas, dentre as quais se destaca a resistência a produtos anti-helmínticos. Uma vez que a determinação da frequência gênica e da frequência alélica para os polimorfismos de interesse requer a avaliação individual dos helmintos, dificuldades técnicas têm sido encontradas para a recuperação de quantidade suficiente de DNA a partir de larvas para a aplicação de técnicas moleculares. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes protocolos para a extração de DNA de larvas individuais de helmintos *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* no estágio L3. Após cultura de fezes de ovinos, por sete dias, as larvas de helmintos foram recuperadas e destinadas à extração de DNA. Oito protocolos foram testados: 1) tratamento com NaOH (200 mM), seguido por neutralização com HCl (200 mM); 2) incubação com proteinase K (1 mg/mL) em tampão de lise (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8, 15 mM MgCl₂, 10 mM DTT e 4,5% Tween 20); 3) incubação com proteinase K (5 mg/mL) em tampão de extração (1 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,1 mM EDTA pH 8 e 0,1% SDS); 4) kit Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega); 5) kit Invisorb Spin Tissue Mini (Invitex); 6) kit QIAamp DNA Stool (Qiagen); 7) extração com fenol e clorofórmio; e 8) precipitação protéica com sal (100 mM NaCl). Após a extração, o DNA foi avaliado quanto à quantidade (ng/μL) e à qualidade (razão absorvâncias A260/A280) em NanoDrop. Os resultados médios de concentração de DNA, de razão A260/A280 e de total de DNA recuperado por larva, respectivamente, nos tratamentos foram: 1) 3,47 ng/μL, 2,57 e 34,67 ng; 2) 74,97 ng/μL, 0,76 e 236,17 ng; 3) 107,50 ng/μL, 0,77 e 537,48 ng; 4) leituras negativas; 5) 5,11 ng/μL, 1,32 e 255,25 ng; 6) 0,62 ng/μL, 0,94 e 124 ng; 7) 170,54 ng/μL, 1,67 e 1.705,42 ng; e 8) 2,42 ng/μL, 0,64 e 24,17 ng. Quando os resultados foram comparados, pôde-se observar que para os tratamentos que não promovem purificação de proteínas (1, 2 e 3), foram observadas menores razões A260/A280, mas recuperação satisfatória de DNA nos tratamentos 2 e 3. Em relação à utilização de kits (4, 5 e 6), devido ao grande volume recomendado pelo fabricante para a eluição do DNA, os tratamentos resultaram em menor concentração, mas a recuperação de DNA foi satisfatória nos tratamentos 5 e 6, enquanto que o tratamento 4 não se mostrou adequado para a extração de DNA de larvas de helmintos. O tratamento 7 permitiu obtenção de razão A260/A280 satisfatória e elevada recuperação de DNA, enquanto o oposto foi observado para o protocolo 8. A partir desses resultados, pode-se concluir que o protocolo de extração de DNA com fenol e clorofórmio foi o mais eficaz quanto à recuperação de DNA com a remoção satisfatória de proteínas, a partir de larvas individuais de helmintos no estágio L3. Em testes moleculares preliminares, foi possível amplificar um fragmento de 772 -tubulina por nested-PCR a partir das amostras de DNA βp do gene da extraídas com o protocolo 7, o que confirma a qualidade do DNA obtido de larvas individuais de helmintos por extração com fenol e clorofórmio.

Orgão de financiamento: CNPq/PIBIC; Embrapa Macroprograma 3.