

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL EM ESCORPIÕES (ARACHNIDA: SCORPIONES)

Elen Azevedo da Costa¹; Ilka Biondi²; Dulcinéia Ferreira Andrade³; Judie Jesus de Souza⁴.

1. Bolsista estágio acadêmico, Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: eacbio@gmail.com.
2. Orientadora, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: ilkabiondi@gmail.com.
3. Pesquisadora do Laboratório de Animais Peçonhentos e Herpetologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, email: dulciiandrade@yahoo.com.br.
4. Bolsista I.C. Jr., Laboratório de Animais Peçonhentos e Herpetologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, email: judie_jesus@hotmail.com.

PALAVRAS-CHAVE: escorpiões, protocolos, extração de DNA.

INTRODUÇÃO

Os artrópodes são os invertebrados mais bem diversificados, possuindo a maior quantidade de espécies conhecidas sendo encontrados em todas as regiões do planeta. Entre os artrópodes estão os Quelicerados, cujo principal grupo é o Arachnida, representado pelas aranhas, carrapatos e escorpiões (Polis, 1990; Ruppert; Barnes, 1996).

Atualmente, os escorpiões são encontrados em quase todas as regiões do mundo, exceto na Antártida, e possuem aproximadamente 90 gêneros, 13 famílias dentre as quais a família Buthidae tem um maior destaque por apresentar uma ampla distribuição geográfica, nas regiões tropicais, subtropicais e em algumas extensões da região temperada e por possuir escorpiões causadores de acidentes graves (Polis, 1990; Lourenço, 2002; Marcussi; Arantes; Soares, 2011).

De acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação foram registrados no Brasil, entre os anos de 2001-2011, 376.517 casos de acidentes por escorpiões, sendo que a região Nordeste apresenta maior incidência de acidentes com 30,4 casos/100.000 hab. Neste mesmo período, o Estado da Bahia passou a ocupar o segundo lugar em ocorrência de acidentes no Brasil, com cerca de 62.000 casos registrados, onde 194 evoluíram para óbito (SINAN, 2011). A correta identificação dos agentes etiológicos é um dos principais desafios para que haja uma maior eficácia no tratamento, já que o uso do soro se faz necessário evitando dessa forma complicações por conta dos efeitos fisiopatológicos das toxinas presentes na peçonha dos escorpiões (Ismail, 1995).

Tendo em vista a necessidade de um método alternativo à identificação morfológica das espécies, a utilização de técnicas de biologia molecular pode auxiliar na identificação das espécies e a partir daí estudos de caráter filogenéticos e/ou filogeográficos também podem ser inferidos (Waldschmidt, 1997). Estas técnicas, no entanto, requerem qualidade e quantidade suficientes de DNA para a realização de estudos. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a eficácia de extração de DNA de escorpiões mantidos na coleção científica do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Feira de Santana/Divisão de Animais Peçonhentos e Herpetologia, verificando o efeito do período de armazenamento destes espécimes em álcool a 70% sobre a quantidade de DNA extraído.

METODOLOGIA

Foram selecionados para estudo espécies de escorpião da família: (i) Buthidae (C.L. Koch, 1837): 05 espécimes de *Tityus serrulatus*, depositados na coleção no período de 1989 a 2002; 05 espécimes de *T. stigmurus*, depositados na coleção no período de 1990 a 2010; e 04 espécimes de *T. neglectus*, depositados na coleção no ano de 1995 a 2008; e da família (ii)

Bothriuridae (Simon, 1880): 04 espécimes de *Bothriurus sp*, depositados na coleção no período de 1996 a 2010. A extração do material genético deu-se a partir da retirada do primeiro segmento da cauda após o telson, a partir de dois diferentes protocolos:

a) Protocolo de Extração a base de Acetato de Amônia.

Os tecidos foram macerados em 300 µL de solução de lise, no qual foi acrescentado 5 µL de Proteinase-K. As amostras foram agitadas por 10 a 20 minutos e incubadas a 55°C por 36 horas. Após a incubação as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e acrescentou-se 300 µL de acetato de amônia, que foram então centrifugadas por 10 minutos (13.000 rpm). O sobrenadante foi transferido para novos tubos com acréscimo de 500 µL de isopropanol absoluto e foi submetido a outra centrifugação por 10 minutos (13000 rpm). O sobrenadante foi descartado em seguida. Foi utilizado álcool 70% para lavar o pellet e por fim as amostras de DNA total obtidas foram ressuspensas em 50 µL de tampão (TE) e mantidas em geladeira.

b) Protocolo de extração a base de cloreto de sódio (NaCl)

A maceração dos tecidos foi feita em 1mL de tampão de lise celular (10mM Tris-HCL, 2mM Na₂EDTA, pH.8.2) que foi aquecido a temperatura de 60°C. Após aquecer, acrescentou-se 0,2 mL de SDS a 10% e 0,4 mL de solução de Proteinase-K (1mg de proteinase K SDS a 1% e 2mM Na₂EDTA), logo após a solução foi posta em banho-maria a 60°C, com posterior acréscimo de 0,25 mL de solução saturada de NaCl 6M e centrifugados por 15 minutos a 2500 rpm. O sobrenadante foi transferido para novos tubos onde foi adicionado o mesmo volume (~0,8 mL) de clorofórmio-álcool-isoamílico (2:4:1) em cada, sendo vortezizadas por 10 minutos e novamente centrifugados a temperatura ambiente (2500rpm) por 15 minutos até obter uma fase aquosa superior contendo DNA que foi transferida para novos tubos. Foi adicionado às amostras o mesmo volume de isopropanol, que foi novamente centrifugado à temperatura ambiente (2500 rpm). O sobrenadante foi descartado e utilizou-se álcool 70% para lavar o pellet. As amostras de DNA obtidas foram ressuspensas em 50 µL de tampão (TE) e mantidas em geladeira.

As amostras de DNA extraídas foram analisadas através da eletroforese em gel de agarose 2 %, em tampão TBE, e coradas com brometo de etídeo (0,3%). A quantificação do DNA foi realizada por meio da comparação entre a intensidade das bandas visualizadas nas amostras extraídas, com aquela observada nos padrões de DNA lambda, que apresentam as concentrações de 2 ng/mL.

A quantificação do DNA total das amostras também foram submetidos a análise do espectrofotômetro UV-VIS (NOVA - TU - 1880 - Doble Beam), utilizando leituras de absorbância em 260 nm (Concentração do DNA em ng/µL Absx100x50).

RESULTADOS

Todos os espécimes de escorpião selecionados para a extração de DNA total utilizando o protocolo de extração tendo como base acetato de amônia e o protocolo a base NaCl, não tornaram evidente a presença de DNA total quando submetidos a eletroforese em gel de agarose. Repetições com pequenas alterações nos protocolos foram realizadas, mas em nenhuma das amostras, independente do tempo de conservação na coleção, o DNA foi evidenciado.

As amostras utilizadas foram submetidas a análise quantitativa utilizando espectrometria UV-VIS e independente do protocolo utilizado para a extração de DNA dos espécimes, foram observadas concentrações de DNA total. (Tabela 1).

Extração de DNA total com protocolo de Acetato de Amônia				
Ano	Absorbância (260 nm)	Concentração de DNA total em ng	Espécie	RG
2010	0.063	6.3	<i>Bothriurus sp.</i>	7465
1989	0.019	1.9	<i>T. serrulatus</i>	0205
2006	0.069	6.9	<i>T. serrulatus</i>	3145
2008	0.130	13.0	<i>T. neglectus</i>	3618
1990	0.027	2.7	<i>T. stigmurus</i>	016
2010	0.108	10.8	<i>T. stigmurus</i>	1575

Tabela 1-a). Grau de absorbância de DNA das amostras de espécimes de escorpiões submetidas ao protocolo de extração de DNA a base de acetato de amônia. RG: Registro na coleção científica MZUEFS.

Extração de DNA total com protocolo de NaCl				
Ano	Absorbância	Concentração de DNA total em ng	Espécie	RG
2010	0.050	5.0	<i>Bothriurus sp.</i>	7465
1989	0.032	3.2	<i>T. serrulatus</i>	0205
2006	0.026	2.6	<i>T. serrulatus</i>	3145
2008	0.043	4.3	<i>T. neglectus</i>	3618
1990	0.032	3.2	<i>T. stigmurus</i>	016
2010	0.041	4.1	<i>T. stigmurus</i>	1575

Tabela 1-b). Grau de absorbância de DNA das amostras de espécimes de escorpiões submetidas ao protocolo de extração de DNA a base de NaCl. RG: Registro na coleção científica MZUEFS.

Podemos inferir inicialmente que o protocolo utilizado para a extração de DNA total a base de Acetato de amônia foi mais eficaz quando comparado ao protocolo a base de NaCl. Comparando ambos, o primeiro conseguiu obter uma concentração média de 6,4 ng de DNA total, enquanto que o segundo obteve uma concentração média de 3,7 ng de DNA total.

Todas as amostras submetidas à leitura espectral apresentaram concentrações de DNA, mesmo que em algumas delas, em pequenas quantidades. As menores concentrações de DNA foram apresentadas pelos espécimes mantidos a mais tempo na coleção científica, como ilustrado pelas espécies de *T. serrulatus* e *T. stigmurus* (Tabela 01 a). Comparando o tempo de permanência de ambas as espécies na coleção científica, pode-se inferir que a espécie *T. stigmurus* possui uma redução do material extraído em relação a *T. serrulatus*. Transcorridos 10 anos de permanência na coleção científica, *Tityus stigmurus*, apresentou um decréscimo na concentração do seu material genético de até 0,8 ng. A espécie *T. neglectus* apresentou uma concentração de DNA total muito superior às demais, possivelmente em virtude de seu maior tamanho e qualidade de conservação, que conseqüentemente forneceu uma maior quantidade de tecido biológico para a extração de DNA.

CONCLUSÕES

A não visualização do DNA em eletroforese de agarose deu-se muito provavelmente em virtude da sua pequena concentração de DNA total nas amostras selecionadas.

A submissão das amostras na espectrometria UV-VIS foi de extrema relevância para se detectar a presença de DNA nas amostras selecionadas. A sua não aplicabilidade poderia ter nos dado um falso resultado a respeito da degradação do DNA em espécimes conservados ao longo do tempo.

A presença de DNA, mesmo em pequena concentração, em espécimes antigos, mantidas em coleções científicas, é um excelente resultado, pois possibilitará inúmeros outros estudos envolvendo diversas linhas de pesquisa, que vão desde a identificação precisa destes agentes etiológicos, como estudos de impacto ambiental ao suporte para estudos de desenvolvimento de soroterapias regionalizadas.

REFERÊNCIAS

- ISMAIL, M. 1995. The scorpion envenoming syndrome. *Toxicon*, Arábia Saudita, vol. 33, n. 7.
- LOURENÇO, W. R. 2002. *Scorpions of Brazil*. Paris: Les Éditions de l'If, 307p.
- MARCUSSI, S.; ARANTES, E. C.; SOARES, A. M. 2011. *Escorpiões: biologia, envenenamento e mecanismos de ação de suas toxinas*. 1ª ed. São Paulo: Funpec-Editora, 140p.
- RUPPERT, E.; BARNES, R. D. 1996. *Zoologia dos Invertebrados*. 6 ed. São Paulo: Ed. Roca, 1028p.
- POLIS, G. A. *The Biology of Scorpions*. California: Stanford University Press, 1990.
- SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. 2011. Homepage: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>.
- WALDSCHMIDT, A. N. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). 1997. *Braz. J. Genet.* vol. 20, nº 3. Ribeirão Preto. Homepage: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84551997000300011>.