

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL EM ARANHAS (ARACHNIDA: ARANEAE) DE COLEÇÕES

Samara Alves Sá Teles¹; Ilka Biondi²; Eddy José Francisco de Oliveira³; Nayara Santos da Silva⁴.

1. Bolsista de Estágio Acadêmico do Laboratório de Animais Peçonhentos e Herpetologia, Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: samara_sateles@hotmail.com
2. Orientadora, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Animais Peçonhentos e Herpetologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: ilkabiondi@gmail.com
3. Co-orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Entomologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: eddyfo@gmail.com
4. Bolsista IC/Jr, Laboratório de Animais Peçonhentos e Herpetologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: nay.ag@hotmail.com

PALAVRAS CHAVE: Aranha, Extração de DNA, coleções.

INTRODUÇÃO

Os aracnídeos são considerados a mais importante classe de quelicerados, pois nesta classe estão incluídos os escorpiões, aranhas, carrapatos e ácaros. Estes animais são objeto de repulsa e/ou de medo para a maior parte da população humana, devido às reações causadas pelo empoçonhamento principalmente de escorpiões e aranhas (FREITAS, 2006).

Atualmente são reconhecidas para a ordem Araneae 43.244 espécies, alocadas em 3.970 gêneros (PLATNICK, 2012). Exceto as famílias Uloboridae e Holoarchaeidae, todas as aranhas possuem peçonha (LUCAS, 2009). Contudo, somente são considerados pela Organização Mundial da Saúde quatro gêneros de aranhas capazes de causar empoçonhamento grave no ser humano: *Atrax* (Hexathelidae), *Latrodectus* (Theridiidae), *Loxocles* (Sicariidae), *Phoneutria* (Ctenidae), sendo as três últimas de ocorrência no Brasil (LUCAS, 2009).

Dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação, entre os anos de 2001 a 2011 registram para o Brasil 6.647 casos de acidentes por aranha, sendo que a região Nordeste apresenta uma incidência de 12,8 casos/100.000 hab. Durante os dois últimos anos, no entanto, o estado da Bahia foi responsável por praticamente metade das ocorrências registradas em toda região nordeste, com 929 dos 2023 casos registrados, onde 03 evoluíram para óbito (SINAN, 2011).

Para que o tratamento dos acidentes com aranhas seja mais rápido e eficiente, é essencial fazer uma identificação precisa do animal para que o tratamento seja específico, porém estes grupos possuem problemas com sua sistemática devido a dificuldades em encontrar características morfológicas que permitam uma melhor distinção entre as espécies (GARB, 2004; MARQUES-DA-SILVA, 2005).

Marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados em estudos de diversidade genética em espécies animais, solucionando, entre outros problemas, a taxonomia de grupos complexos. Para o êxito de um estudo envolvendo marcadores moleculares, o emprego de protocolos eficientes para a extração de DNA, dos quais se obtenham DNA puro e de boa qualidade é de fundamental importância. E, sempre que possível, agrega-se a estes, métodos de extração rápidos, de baixa toxicidade e de menor dispêndio econômico.

Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar a eficácia de dois métodos de extração de DNA a partir de espécimes de *Latrodectus* e *Loxocles*, dois gêneros de aranha de interesse médico devido à gravidade de seus acidentes, conservados em álcool 70% na coleção do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Feira de Santana.

METODOLOGIA

Foram selecionados ao todo 07 espécimes do gênero *Loxosceles* depositados na coleção entre os anos de 1989 a 2005 e 07 espécimes do gênero *Latrodectus*, sendo estas: 04 espécimes de *Latrodectus curacaviensis* depositados na coleção entre os anos de 1989 a 1997; 02 espécimes de *Latrodectus geometricus* depositados na coleção nos anos de 1996 e 2011 e um espécime de *Latrodectus sp.* depositado na coleção no ano de 1991.

A obtenção do material genético deu-se a partir da retiradas das patas dianteiras, com as quais foram realizadas as extrações de DNA total utilizando dois protocolos específicos:

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

b) Protocolo de extração a base de NaCl: Os tecidos foram macerados em 1mL de tampão de lise celular (10nM Tris-HCL, 2mM Na₂EDTA, Ph.8.2) aquecido a temperatura de 60°C. Após aquecer, acrescentou-se 0,2mL de SDS a 10% e 0,4mL de solução de proteinase K (1mg de proteinase K, SDS a 1% e 2mM Na₂EDTA), em seguida a solução foi posta em banho-maria a 60°C, com posterior acréscimo de 0,25mL 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 vorteadas 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. Adicionou-se a amostra o mesmo volume de isopropanol, novamente centrifugando a temperatura ambiente (2500 rpm). O sobrenadante foi descartado e utilizado álcool 70% para lavar o pellet. As amostras de DNA obtidas foram ressuspensas em 50 uL 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 etídio (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 também foi realizada através da análise no espectrofotômetro UV-VIS (NOVA - TU - 1880 - Doble Beam), utilizando leituras de absorbância em 260 nm (Concentração do DNA em ng/uL = Absx100x50).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os espécimes selecionados para a extração de DNA total utilizando o protocolo a base de acetato de amônia como o protocolo a base de NaCl não evidenciaram presença de DNA total quando submetidos a eletroforese em gel de agarose 2%. Repetições com pequenas alterações nos protocolos de extração foram realizadas, no entanto, nenhuma das amostras, independente do tempo de conservação na coleção, foram sensíveis a fotodocumentação ao gel de agarose.

As amostras submetidas à análise quantitativa utilizando espectrometria UV-VIS demonstraram concentração de DNA independente do protocolo utilizado para a extração de DNA dos espécimes (Tabela 01).

Extração de DNA total com protocolo de Acetato de Amônia				
Ano	Absorbância (260 nm)	Concentração de DNA total em ng	Espécie	RG
1989	0.058	5.8	<i>Loxosceles sp.</i>	1183
2005	0.062	6.2	<i>Loxosceles sp.</i>	6656
1991	0.081	8.1	<i>L. curacaviensis</i>	872
2011	0.082	8.2	<i>L. geometricus</i>	1549

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

Extração de DNA total com protocolo de NaCl				
Ano	Absorbância	Concentração de DNA total em ng	Espécie	RG
1989	0.034	3.4	<i>Loxosceles sp.</i>	1183
2005	0.031	3.1	<i>Loxosceles sp.</i>	6656
1991	0.051	5.1	<i>L. curacaviensis</i>	872
2011	0.060	6.0	<i>L. geometricus</i>	1549

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

Embora presente em pequena concentração, amplitude 0,082-0,031 ng/uL todas as amostras dos espécimes selecionados apresentaram DNA total, independente do tempo de conservação dos espécimes mantidos na coleção científica. Os espécimes do gênero *Loxosceles*, apresentaram em ambos os protocolos, uma concentração de DNA total menor quando comparado com os espécimes de gênero *Latrodectus*. Como a quantidade de material biológico utilizada para extração de DNA foi idêntica em ambos os gêneros, podemos concluir que a degradação de DNA ao longo do tempo ocorreu de forma mais acentuada nos espécimes do gênero *Loxosceles* em relação ao gênero *Latrodectus*. Esta última suposição pode ser aceita se analisarmos que em dezesseis anos (1989-2005) a redução de DNA sofrida pelos espécimes de *Loxosceles* foi de até 0.4ng.

O protocolo de extração de DNA total a base de acetato de amônia também se mostrou mais eficiente que o protocolo de extração baseado em NaCl. Este dado é interessante, pois nos permite o emprego direto de tal protocolo em posteriores extrações sem a necessidade de testes prévios a cerca da sua eficácia. Fazendo uma estimativa, o primeiro conseguiu obter uma concentração média de 7,1 ng/uL de DNA total, enquanto o segundo só obteve uma concentração média de 4,4 ng/uL de DNA.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de nenhum dos protocolos utilizados ter possibilitado a visualização do DNA total através da eletroforese em gel de agarose, provavelmente em virtude da baixa concentração de DNA presente nas amostras, ambos foram eficientes na extração de DNA total. Quando comparados, o protocolo a base de acetato de amônia obteve maior quantidade de DNA que o protocolo a base de NaCl. Este estudo demonstra que protocolos de extração

mais sofisticados devem ser utilizados para extração de DNA em materiais biológicos conservados.

Além disso, a presença de DNA, mesmo em pequenas concentrações, em espécimes mantidos em coleções científicas, mesmo por um longo período de tempo é um resultado bastante satisfatório, que possibilitará inúmeros outros estudos, desde os envolvendo pesquisa básica, estudos sistemáticos, identificação precisa destes agentes etiológicos, estudos envolvendo diversidade genética, impacto ambiental e suporte para estudos envolvendo a soroterapia.

REFERÊNCIAS

- FREITAS, M.A; SILVA, T.F.S. 2006. Guia ilustrado: Animais venenosos e peçonhentos no Brasil. Pelotas. RS: USEB, 131 p.
- LUCAS, S.M. 2009. Aranhas de interesse médico no Brasil. In: CARDOSO, J.L.C.; et al. *Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clinica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Sarvier, p. 157-165.
- MARQUES-DA-SILVA, E; FISCHER, M.L. 2005. Distribuição das espécies do gênero *Loxocles* Heineken & Lowe 1835 (Araneae; Sicariidae) no estado do Paraná. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v 38, p. 331-335.
- PLATNICK, N.I. The world spider catalog version 13.0. 2012. Homepage: <http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog/>.
- SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. 2011. Homepage: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>.