

EFICIÊNCIA E AVALIAÇÃO ECONÔMICA DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE SÊMEN, SANGUE E PELO EM OVINOS

EFFICIENCY AND ECONOMIC ASSESSMENT OF DNA EXTRACTION METHODS FROM OVINE SEMEN, BLOOD AND HAIR

Bartholazzi Junior A.^{1*}, González A.R.M.¹, David C.M.G.¹, Rua M.A.S.¹, Corrêa T.S.¹, Quirino C.R.¹

Universidade Estadual do Norte Fluminense. Av Alberto Lamego, 2000. CEP 28013-602. Rio de Janeiro, Brasil. *junior_barth@hotmail.com.

Keywords: Genetic improvement; Molecular marker; PCR; Spectrophotometer.

Palavras-chave: Melhoramento genético; Marcador molecular; PCR; Espectrofotômetro.

ABSTRACT

Currently, the use of molecular techniques stands out for the accuracy of assessment and for many applications, mainly identifying characteristics of economic interest. DNA extraction is an important step in genomic evaluations that use the technique of Polymerase Chain Reaction. The study aimed to evaluate the alkaline method in DNA extraction from sheep semen, blood and hair samples in order to use in molecular studies. Afterward the extraction, the DNA was evaluated in a spectrophotometer to determine the concentration and purity in A260/A280 nm and A260/A230 nm. The samples were subjected to DNA amplification by PCR. Analysis of variance was performed to verify differences in concentration and level of purity of semen, blood and hair samples. The amount of extracted DNA showed higher concentration in semen samples. In purity A260/A280 nm, DNA extractions of blood and hair showed higher results compared to semen. The DNA extraction from hair samples was certainly the most efficient method due to lower cost per sample, its easy collection (non-invasive) and the material storage at room temperature.

RESUMO

Atualmente o emprego das técnicas moleculares se destaca pela acurácia de avaliação e pelas inúmeras aplicações, principalmente na identificação de características de interesse econômico. A extração de DNA é uma importante etapa nas avaliações genômicas que utilizam a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase. Objetivou-se avaliar o método alcalino na extração de DNA a partir de amostras de sêmen, pelo e sangue de ovinos, para sua utilização em estudos moleculares. Após extração, o DNA foi avaliado usando espectrofotômetro para determinar sua concentração (A260), a pureza na razão A260/A280 nm e A260/A230 nm. As amostras foram submetidas à amplificação do DNA pela PCR. Foi realizada a análise de variância para verificar diferenças na concentração e no nível de pureza das amostras de sêmen, sangue e pelo. A quantidade de DNA extraído apresentou maior concentração nas amostras de sêmen. Na pureza A260/A280 nm as extrações de DNA do sangue e do pelo apresentaram mais limpas quando comparadas ao sêmen. A extração de DNA das amostras de pelo mostrou-se como o método mais eficiente devido ao menor custo por amostra, sua facilidade na coleta (não invasiva) e armazenamento do material em temperatura ambiente.

INTRODUÇÃO

O progresso observado na genética molecular nas últimas décadas gerou conhecimento e ferramentas interessantes para estudos genéticos e populacionais. Desta forma, aumentou a capacidade em identificar espécies e caracterizar a biodiversidade de diferentes ecossistemas brasileiros, assim como avaliar a variabilidade genética inter e intrapopulacional de animais de importância econômica (Rosa & Paiva, 2009), principalmente através da utilização de metodologias que envolve a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A PCR é aplicada na maior parte das técnicas moleculares podendo ser utilizada no estudo de populações, dos genes e como técnica para auxiliar a seleção animal. Para realização da PCR é necessário o DNA genômico dos indivíduos que são utilizados como fita molde para a amplificação do loco em estudo, sendo assim a técnica

de PCR totalmente dependente da extração do DNA dos tecidos. Oliveira *et al.* (2007) afirmaram que a extração e a purificação do DNA a partir de diversas amostras é uma etapa fundamental para se obter alta eficiência de amplificação nos protocolos que usam a PCR.

A utilização de métodos de extração do DNA simples e com baixo custo foi adotada no Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal - UENF, permitindo o emprego dos protocolos nas pesquisas e na rotina laboratorial como uma alternativa ao uso dos kits de extração comerciais. Entretanto, estes procedimentos dependem principalmente da habilidade de se extrair DNA em quantidade e qualidade suficiente, além dos fatores relacionados a armazenamento do tecido.

Não há referências nacionais e internacionais com relação ao custo de reagentes, armazenamento, tempo para coleta das amostras, tempo de extração e valores de concentração e pureza das amostras de DNA de diferentes tecidos. Os tecidos escolhidos, como o sangue e pelo se deve pela facilidade de coleta e por serem tecidos comumente utilizados em laboratórios comerciais e de pesquisa. A escolha do sêmen é devido a sua disponibilidade como o sêmen congelado, podendo ser oriundo de empresas comerciais de venda de sêmen de animais de alto potencial genético, que nem sempre estão disponíveis para coleta de outros tecidos, ou de animais que já morreram e ainda possuem seu sêmen congelado.

Diante dos diferentes tipos de amostras utilizadas para a extração de DNA, da necessidade de um método para obter amostras com qualidade e quantidades suficientes para serem empregadas na técnica de PCR e com um menor tempo de extração. O presente trabalho objetivou realizar uma avaliação econômica, qualitativa, quantitativa da extração de DNA de amostras de sêmen, pelo e sangue, utilizando o método alcalino, para serem posteriormente utilizadas na técnica de PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e animais

O trabalho foi conduzido na Unidade de Apoio a Pesquisa Animal da Universidade Estadual Fluminense de acordo com a Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) e registrado no Comitê de Ética de Uso Animal – UENF.

Foram utilizadas amostras de sêmen, sangue e pelo, todas coletadas a partir de 10 carneiros adultos da raça Santa Inês, pertencentes a fazendas da região norte do estado do Rio de Janeiro, mantidos em sistema intensivo e semi-intensivo de criação, durante o ano de 2014. A espécie utilizada neste estudo não limita a utilização dos protocolos para extração de DNA de outras espécies como bovinos e equinos.

Foram utilizadas 10 amostras para cada protocolo avaliado, sendo, dois protocolos para amostras de sêmen, dois protocolos para amostras de sangue e um protocolo para as amostras de pelo, totalizando 50 amostras (20 amostras de sêmen, 20 amostras de sangue e 10 amostras de pelo). Todas as amostras de diferentes tecidos foram provenientes dos mesmos animais.

Avaliação do custo

Foi avaliado o tempo de coleta das amostras de sêmen, sangue e pelo e o tempo de extração de cada protocolo, o tipo e o material para o armazenamento, o custo do material utilizado para coleta e os custos dos reagentes utilizados. Os valores foram convertidos em Dólar com cotação US\$1,00 equivalente a R\$3,90 (reais) (BCB, 2019).

Extração de DNA

Como mencionado anteriormente os protocolos podem ser utilizados para tecidos de outras espécies diferentes da espécie ovina avaliada neste trabalho. Entretanto, os valores relacionados a quantidade e pureza do DNA podem se alterar.

De forma geral, nos protocolos avaliados foram utilizadas uma solução de lise (192,5 mM de NaOH), com pH ácido e que junto com o aquecimento ocasiona o rompimento das membranas celulares e a exposição do DNA presente no núcleo celular. Utilizou-se uma solução B (200 mM de HCL e 100 mM de Tris HCL) ou a solução neutralizante (10 ml de Tris HCl 1M, 1,67 ml HCl (concentrado), qsp H₂O ultra pura 100ml), que ambas possuem uma ação tamponante da solução de lise, com o objetivo de parar a atividade de lise da primeira solução e diminuir o pH de toda a reação, tendendo para o pH neutro.

Extração de sêmen fresco:

Nas amostras de sêmen para a extração, as amostras foram coletadas utilizando a vagina artificial e a concentração espermática foi avaliada com auxílio de uma câmara de Neubauer de acordo com o Manual de Exame Andrológico, do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). A concentração espermática média das amostras coletadas foi de $3,04 \times 10^9$ espermatozoides/ml.

As extrações de DNA de amostras de sêmen foram realizadas no mesmo dia da coleta. Foi utilizado o método de extração alcalina simples pela técnica rápida (protocolo 1). Em seguida foi realizado uma alteração no protocolo 1, adicionando uma etapa extra de centrifugação (protocolo 2). O volume de sêmen utilizado foi o mesmo para todas as amostras independente de sua concentração espermática inicial.

No protocolo 1 para sêmen, seguiram as seguintes etapas:

1. Adicionar 25 μ l de sêmen em microtubos de 1,5 ml.
2. Adicionar 50 μ l de solução de lise (192,5 mM de NaOH), homogeneizar e levar ao termociclador por 15 minutos a 96°C.
3. Adicionar 50 μ l de solução B (200 mM de HCL e 100 mM de Tris HCL) e homogeneizar.
4. Armazenar o DNA imerso na solução B a -4°C até o momento de realizar as amplificações.

Protocolo 2 para sêmen:

1. Adicionar 25 μ l de sêmen em microtubos de 1,5 ml.
2. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos, descartar o sobrenadante.
3. Adicionar 50 μ l de solução de lise (192,5 mM de NaOH), homogeneizar e levar ao termociclador por 15 minutos a 96°C.
4. Adicionar 50 μ l de solução B (200 mM de HCL e 100 mM de Tris HCL) e homogeneizar.
5. Armazenar o DNA imerso na solução B a -4°C até o momento de realizar as amplificações.

Nas amostras de sangue para a extração do DNA, foram coletados 5 ml de sangue por punção da veia jugular externa e armazenado em tubo de EDTA a 10% e mantidos resfriados a 4°C até o momento da extração.

O protocolo de extração alcalina rápida de DNA de sangue seguiu a metodologia descrita por (Coelho *et al.*, 2004) (protocolo 1); sendo que foi realizado uma alteração no protocolo inicial, acrescentando-se uma etapa extra de centrifugação (protocolo 2).

Protocolo 1 para sangue:

1. Adicionar 100 μ l de sangue total em microtubos de 1,5 ml.
2. Para lavagem, adicionar 400 μ l de tampão NE (0,58 g NaCl, 3,72 g EDTA, 1 L H₂O ultra pura), centrifugado por 5 minutos a 13000 rpm.
3. Retirar o sobrenadante deixando aproximadamente 100 μ l.
4. Esta lavagem (etapa 2 e 3) foi repetida por mais duas vezes, devendo na última descartar o sobrenadante deixando somente o pelete.
5. Adicionar 50 μ l de solução de lise (200 mM de NaOH), homogeneizar e levar ao termociclador por 15 minutos a 96°C.
6. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos.
7. Adicionar 50 μ l de solução neutralizante (10 ml de Tris HCl 1M, 1,67 ml HCl (concentrado), qsp H₂O ultra pura 100ml) e homogeneizar.
8. Armazenar o DNA imerso na solução neutralizante a -4°C até o momento de realizar as amplificações.

Protocolo 2 para sangue:

1. Adicionar 100 μ l de sangue total em microtubos de 1,5 ml.
2. Centrifugar a 13000 rpm por 6 minutos e descartar o sobrenadante.
3. Para lavagem, adicionar 400 μ l de tampão NE (0,58 g NaCl, 3,72 g EDTA, 1 L H₂O ultra pura), centrifugado por 5 minutos a 13000 rpm.
4. Retirar o sobrenadante deixando aproximadamente 100 μ l.
5. Esta lavagem (etapa 2 e 3) foi repetida por mais duas vezes, devendo na última descartar o sobrenadante deixando somente o pelete.
6. Adicionar 50 μ l de solução de lise (200 mM de NaOH), homogeneizar e levar ao termociclador por 15 minutos a 96°C.
7. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos.

8. Adicionar 50 µl de solução neutralizante (10 ml de Tris HCl 1M, 1,67 ml HCl (concentrado), qsp H₂O ultra pura 100ml) e homogeneizar.

9. Armazenar o DNA imerso na solução neutralizante a -4°C até o momento de realizar as amplificações.

Nas amostras de pelo para a extração do DNA, foram coletadas amostra de pelo da forma que os bulbos pilosos pudessem se manter na maior parcela dos pelos retirados e foram armazenados em sacos de papel pardo não encerado. A presença dos bulbos foi avaliada em microscópio ótico no aumento de 4x, onde foram selecionados e separados do pelo.

Extração de DNA das amostras de pelo:

1. Adicionar 10 bulbos pilosos em microtubo de 1,5 ml.

2. Adicionar 50 µl da solução de lise (200 mM de NaOH) e homogeneizar com pipeta certificando-se que todos os bulbos ficaram submersos.

3. Incubar a 96 °C por 15 minutos.

4. Centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto.

5. Adicionar 50 µl da solução B (200 mM de HCL e 100 mM de Tris HCL) e homogeneizar.

5. Armazenar o DNA a -4°C até o momento de realizar as amplificações.

Quantificação

A quantidade e a qualidade (pureza) do DNA genômico extraído em todos os métodos realizados foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop 2000c).

As amostras foram descongeladas e centrifugadas a 13000 rpm por 1 minuto. Foi pipetado 2 µL da parte superior do produto da extração e depositados no leitor do espectrofotômetro (NanoDrop 2000c).

A concentração do DNA foi aferida pela leitura de absorbância A₂₆₀ nm e o nível de pureza foi determinado pela razão A₂₆₀/A₂₈₀ nm e A₂₆₀/A₂₃₀ nm. A leitura do espectrofotômetro na absorbância A₂₈₀ está relacionada ao comprimento de onda absorvida pelas proteínas e reflete a pureza do DNA por proteínas. A pureza avaliada na razão A₂₆₀/A₂₃₀ nm é devido a presença de sais e reagentes presentes na amostra. Na razão A₂₆₀/A₂₈₀ nm e A₂₆₀/A₂₃₀ nm valores iguais ou superiores a 1,8 determinam uma amostra de DNA pura.

Teste de amplificação pela PCR

Realizou-se à amplificação com o loco microssatélite OarFCB020 (92-118 pb), utilizado para teste de diversidade genética em ovinos. Com o objetivo de validar os resultados obtidos, o loco escolhido foi testado pela técnica de PCR. Estes protocolos são utilizados rotineiramente em nosso laboratório com diferentes locos microssatélites e locos gênicos, entretanto, para fins de análise para o estudo foi exemplificado apenas este loco (OarFCB020).

As amostras das extrações foram diluídas de acordo com a concentração de DNA aferida no espectrofotômetro objetivando-se atingir a concentração final de 20 ng para o uso na reação de PCR. A detecção dos produtos da amplificação foi realizada em géis de poliacrilamida (8 %) de 20 cm, corados com nitrato de prata. Juntamente com as amostras, foram aplicados padrões de peso molecular (100 pb) para a comparação do tamanho dos fragmentos obtidos.

Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância utilizando o programa estatístico GENES (Cruz, 2006), As médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade devido ao efeito das amostras utilizadas (sêmen, sangue e pelo).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação do custo

O custo do material utilizado para coleta dos tecidos apresentou grande variação. O menor custo observado ocorreu nas amostras de pelo por necessitarem apenas de sacos de papel não encerados para o seu armazenamento. Quando os pelos são armazenados em sacos de papel encerados ocorre a fixação dos bulbos ao saco de papel, no momento de sua retirada para seleção e corte dos bulbos, estes ficam aderidos na parede dos sacos e se desprende do restante do pelo, perdendo os bulbos que possuem o DNA genômico.

1
2

Tabela I. Material de coleta e armazenamento, tempo de coleta das amostras, reagentes utilizados, tempo de extração, tipo de estoque das amostras e custos (US\$) da extração de DNA das amostras de sêmen, sangue e pelo (*Collection and storage material, sample collection time, reagents used, extraction time, sample stock type and costs (US\$) for DNA extraction from semen, blood, and hair samples*).

Variáveis	Sêmen		Sangue		Pelo
	Protocolo I	Protocolo II	Protocolo I	Protocolo II	
Material coleta e estoque	tubo 50ml, tubo 2ml	tubo 50ml, tubo 2ml	tubo EDTA 4 ml, agulha	tubo EDTA 4ml, agulha	saco papel
Custo/100 amostra (US\$)	65,00	65,00	33,00	33,00	0,04
Tempo coleta (min)	15	15	3	3	3
Estoque	freezer	freezer	Freezer	freezer	t ⁰ ambiente
Reagentes/ 100 amostra					
NaCl (1 Kg= US\$62,82)			7x10 ⁻⁴ g NaCl	7x10 ⁻⁴ g NaCl	
EDTA (1 Kg= US\$166,15)			4,5x10 ⁻³ g EDTA	4,5x10 ⁻³ g EDTA	
NaOH (1 Kg= US\$201,80)	2x10 ⁻⁴ g NaOH	4x10 ⁻⁴ g NaOH			
Tris HCl (1 Kg= S\$2016,41)	6,1x10 ⁻⁴ g Tris HCl	6,1x10 ⁻⁴ g Tris HCl	2,4x10 ⁻⁴ g Tris HCl	2,4x10 ⁻⁴ g Tris HCl	6,1x10 ⁻⁴ g Tris HCl
HCl (1 L= US\$616,92)	8,4x10 ⁻⁴ ml HCl	8,4x10 ⁻⁴ ml HCl	3x10 ⁻⁴ ml HCl	3x10 ⁻⁴ ml HCl	8,4x10 ⁻⁴ ml HCl
Custo (US\$)	0,17	0,17	0,15	0,15	0,18
Tempo extração (min)	25,2	30	45	50,4	25,2
Custo Total (US\$)	65,42	65,42	33,75	33,84	0,46

Cotação do Dólar= R\$ 3,90, em 04/06/2019 (BCB⁸).

3

As amostras de sêmen e sangue, no entanto, precisam ser armazenadas a baixas temperaturas com o objetivo de prevenir a degradação das células e a perda do material genético, necessitando de mais equipamentos nos trabalhos com essas amostras (Tabela I) e consequentemente os custos advindos da utilização destes.

O tempo para coleta das amostras foi semelhante entre as amostras de sangue e pelo, e logo, a menor mão de obra. Para coleta do sêmen, apesar de ser um processo simples, é necessário um maior tempo para preparo do material e de fatores relacionados ao animal como a libido e treinamento prévio do reprodutor, além de exigir um profissional capacitado.

O protocolo II das amostras de sangue apresentou o maior tempo para extração (50,4 min) pela necessidade de lavagem inicial do sangue antes da extração. Enquanto a extração pelo protocolo I do sêmen e da extração de DNA do pelo apresentaram o menor tempo (25,2 min).

Os reagentes utilizados para extração do DNA das amostras de sangue apresentaram os menores custos. A técnica de extração alcalina foi aplicada a todos os protocolos, entretanto, o volume das soluções e as concentrações destas variaram de acordo com o tipo de tecido. Entretanto, a diferença nos custos dos reagentes foi muito próxima, com custo para 100 amostras variando de US\$0,15 (para os protocolos para sangue) a US\$0,18 (para o protocolo para pelo). O custo total apresentou maior variação, com menor valor para o protocolo de extração de DNA de pelo (US\$0,46) e maior valor para os protocolos I e II de extração de DNA das amostras de sêmen. Dentre todos os tecidos, a extração de DNA das amostras de pelo apresentou o menor custo total por amostra, determinado principalmente pelo baixo custo do material utilizado para coleta (Tabela I). Além disso, o menor tempo para coleta e para extração diminuiria também o custo de mão de obra.

Quantificação

São apresentadas na Tabela II as médias de concentração e pureza do DNA extraído das amostras de sêmen, sangue e pelo. Para a concentração de DNA extraído das amostras de sêmen não foram observadas diferenças ($P < 0,05$) segundo o protocolo utilizado. A etapa de centrifugação prévia, adicionada ao protocolo II, não alterou a quantidade de DNA extraído.

Tabela II. Médias e respectivos desvios padrão para concentração e pureza (A260/A280 nm e A260/A230 nm) do DNA extraído das amostras de sêmen, sangue e pelo (*Means and standard deviations for concentration and purity (A260/A280 nm and A260/A230 nm) of DNA extracted from semen, blood and hair samples*).

Amostra	Concentração (ng/ μ L)	A260/A280 nm	A260/A230 nm
Sêmen	916,43 \pm 281,51 ^a	1,14 \pm 0,12 ^b	0,30 \pm 0,07 ^{ab}
Sangue	167,06 \pm 81,24 ^b	1,35 \pm 0,21 ^a	0,37 \pm 0,15 ^a
Pelo	147,61 \pm 52,47 ^b	1,39 \pm 0,10 ^a	0,24 \pm 0,05 ^b

Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Na razão A260/A280 nm relacionado à pureza proteica da amostra, houve diferenças ($P > 0,05$) entre os protocolos. Observou-se que no protocolo II o valor obtido (A260/A280= 1,38) foi superior ao protocolo I (A260/A280= 1,14). Com a centrifugação da amostra há uma diminuição dos contaminantes proteicos, principalmente pela retirada de grande parte do plasma seminal. Estes resultados foram inferiores ao recomendado pelo Manual do Nanodrop (A260/A280= 1,80) (NanoDrop, 2010).

Não foram encontrados na literatura nacional e internacional trabalhos sobre metodologias e material biológico para extração de DNA de amostras de ovinos. Desta forma, foram utilizados trabalhos de extração de DNA de outras espécies para comparar os resultados.

A quantidade de DNA extraído a partir do sêmen fresco de ovinos do presente estudo (916,43 ng/ μ L) foi superior a relatada por Coelho *et al.* (2004) e Sverzut (2011), que avaliaram sêmen bovino, obtendo médias de 160 ng/ μ L e 170 ng/ μ L, respectivamente.

Essa diferença, possivelmente se deve a dois fatores principais: primeiro pela diferença na concentração espermática entre as espécies e segundo pela utilização de sêmen fresco no presente trabalho em contraste com o congelado, como utilizado por Coelho *et al.* (2004) e Sverzut (2011), que pela adição de diluidores e protetores celulares apresentam menor concentração espermática.

Siqueira *et al.* (2007) encontraram uma concentração espermática média de $0,1 \times 10^9$ espermatozoides/ml em paletas de sêmen congelado de bovinos, enquanto a concentração média encontrada neste trabalho foi de $3,04 \times 10^9$ espermatozoides/ml em ovinos. A maior concentração de DNA não representa uma maior eficiência no protocolo utilizado neste estudo, possivelmente o maior número de células no sêmen fresco consequentemente forneceu um número maior de moléculas de DNA.

Segundo Hyttel *et al.* (2012), no ejaculado do bovino a concentração de espermatozoide é de 500 a 3000×10^6 espermatozoides/ml enquanto que no carneiro é de 3000 a 6000×10^6 espermatozoides/ml. Como mencionado anteriormente esta diferença na concentração de espermatozoides possa ter refletido na concentração de DNA obtida.

Apesar do fato do espermatozoide ser uma célula haploide o número de espermatozoides presentes nas amostras de sêmen utilizado na extração é suficiente para apresentar o genoma completo do animal, não interferindo nos resultados da metodologia a ser empregada.

A média da pureza A260/A280 nm da extração foi superior ao encontrado por Coelho *et al.* (2004), que obtiveram média de 0,90. O sêmen fresco apresentou vantagens para extração de DNA por não apresentar diluidores e criopreservantes como gema de ovo, entre outros adicionados ao congelamento que diminuem a qualidade da amostra. Não foram observadas diferenças ($P < 0,05$) na pureza A260/A230 nm relacionada a reagentes e sais.

Nas amostras de sangue a concentração de DNA extraído não apresentou diferenças ($P > 0,05$) entre os protocolos. As médias de concentração observadas nos dois protocolos (167,06 ng/ μ l e 158,97 ng/ μ l) foram superiores às encontradas por Araújo *et al.* (2009), que partiram de uma amostra de 350 μ l de sangue e obtiveram uma concentração média de DNA extraído de sangue de 83,75 ng/ μ l de bovinos, de 24,36 ng/ μ l de búfalos e 73,72 ng/ μ l de veado-campeiro. Estes autores utilizaram protocolo de extração com etapa de purificação que pode propiciar a diminuição da concentração do DNA.

Coelho *et al.* (2004) obtiveram média superior na concentração de DNA extraído de sangue de bovinos (363,33 ng/ μ l). A maior concentração observada por estes autores, provavelmente foi devido a não realização da etapa de purificação e a um maior volume inicial de amostra para a extração, a qual não é especificada em seu trabalho.

Para a pureza A260/A280 nm das amostras do DNA de sangue, o protocolo II mostrou-se mais eficiente (1,57), apresentando um aumento significativo ($P < 0,05$) no nível de pureza da amostra em relação ao protocolo I (1,35). A centrifugação permitiu a coleta da amostra sem o plasma sanguíneo, diminuindo assim a concentração de proteínas na amostra.

Araújo *et al.* (2009) ao avaliarem a pureza A260/A280 nm obtiveram médias superiores para as amostras de bovinos (1,89), de búfalos (1,66) e de veado-campeiro (1,94). Este resultado está relacionado à etapa de purificação utilizada, que elimina as proteínas das amostras. Coelho *et al.* (2004) obtiveram em amostras do DNA extraído pela técnica rápida de sangue de bovinos, pureza na razão A260/A280 nm de 1,23, valor inferior ao encontrado neste trabalho.

Ao avaliar a pureza A260/A230 nm dos dois protocolos, verificou-se médias semelhantes, não apresentando diferença significativa entre os protocolos ($P > 0,05$). Os volumes dos reagentes utilizados não diferem entre o protocolo I e II refletindo na igualdade das contaminações relacionadas aos reagentes (A260/A230 nm). Não foram observadas diferenças ($P < 0,05$) na pureza A260/A230 nm da extração de sangue.

A etapa de centrifugação adicionada no protocolo de extração de DNA de sêmen e de sangue mostrou-se eficiente para eliminar parte do plasma dos tecidos e suas proteínas aumentando a pureza na razão A260/A280 nm das amostras extraídas sem afetar a concentração de DNA.

A extração do DNA de pelo (Tabela II) apresentou concentração média inferior aos resultados de Coelho *et al.* (2004), com média de 582,42 ng/ μ L de DNA de amostras de pelo de bovinos. Essa diferença pode estar relacionada à diferença nos tamanhos dos bulbos entre as espécies observadas. Essa diferença de tamanho possivelmente afeta o número de células presentes e consequentemente a quantidade de DNA.

A pureza do DNA na razão A260/A280 nm das amostras de pelo apresentou valor similar ao encontrado por Coelho *et al.* (2004), que foi de 1,30. A pureza A260/A230 nm na amostra apresentou média de 0,24, pela alta concentração de sais nas amostras dos reagentes utilizados.

Os resultados da pureza A260/A280 nm e A260/A230 nm apresentaram-se abaixo do valor recomendado de 1,8 em todas as extrações e de todos os tecidos. Este resultado sugere que as amostras não seriam puras com relação a proteínas e sais, por não apresentar etapas de purificação, porém, o que não determina a inviabilidade das amostras.

Comparando-se os resultados encontrados nos três diferentes tecidos utilizados observa-se que a concentração de DNA foi superior nas amostras de sêmen do que nos outros tecidos, e entre as amostras de sangue e pelo não houve diferenças ($P>0,05$) (Tabela II).

A alta concentração de DNA extraído das amostras de sêmen provavelmente está relacionada à alta concentração de células na amostra de sêmen (76×10^6 espermatozoides/25 μ l). No sangue total, Santana *et al.* (2009) relataram uma concentração média de leucócitos (células nucleadas) de $0,7 \times 10^6$ leucócitos/100 μ l em ovinos adultos. Não existem trabalhos avaliando a mensuração do número de células nucleadas presente nos bulbos. É importante frisar que na rotina laboratorial observam-se bulbos capilares visualmente de tamanhos diferentes em cada espécie animal, e consequentemente quantidade de células diferentes.

Houve diferença ($P<0,05$) no nível de pureza na razão A260/A280 nm, onde as extrações de DNA das amostras de sangue e pelo foram as mais puras, pela elevada presença de proteínas no ejaculado nas amostras de sêmen. Na pureza A260/A230 nm houve diferença ($P<0,05$) entre os tecidos. A extração do DNA das amostras de sangue apresentou-se mais pura (maior valor na razão A260/A230) em relação às amostras de DNA extraído do sêmen.

Teste de amplificação pela PCR

Todas as amostras de DNA extraídas a partir das amostras de sêmen, sangue e pelo, mostraram amplificações consistentes com bandas definidas e dentro do tamanho esperado para o loco microssatélite OarFCB020 (92-118 pb) (Figura 1). Estes resultados indicam que as contaminações encontradas na avaliação qualitativa (A260/A280 nm e A260/A230 nm), não foram suficientes para inibir a atividade da enzima DNA polimerase e assim a PCR.

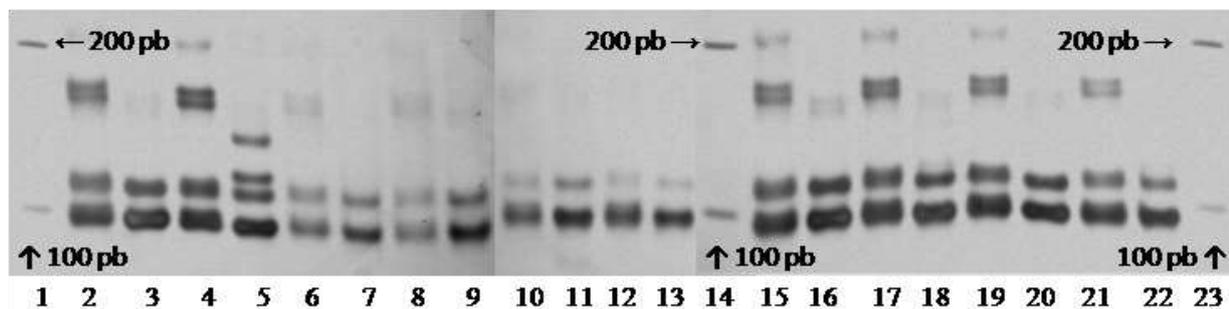


Figura 1. Eletroforese em gel de poliacrilamida da amplificação do loco OarFCB020 (92-118 pb) (*Polyacrylamide gel electrophoresis of amplification OarFCB020 locus (bp 92-118)*).

Números 1, 14 e 23= ladder; 2 a 5= amostras de sêmen com protocolo 1; 6 a 9= amostras de sêmen com protocolo 2; 10 a 13= amostras de pelo; 15 a 18= amostras de sangue com protocolo 1; 19 a 22= amostras de sangue com protocolo 2.

A avaliação da amplificação do DNA extraído por estes protocolos foi exemplificado apenas com o loco OarFCB020, entretanto, os protocolos são utilizados rotineiramente no laboratório com diferentes locos microssatélites e locos gênicos, incluindo diferentes espécies como equinos e bovinos.

A diluição da amostra de DNA antes da utilização na PCR, para diminuir a alta concentração a níveis adequados para a amplificação (20 ng), possivelmente, levou a diluição das impurezas proteicas e de sais a níveis mínimos a ponto de não afetar a atividade da enzima DNA polimerase.

CONCLUSÃO

Todos os protocolos alcalinos rápidos avaliados podem ser utilizados para a obtenção do DNA em quantidade e qualidade satisfatória para a utilização na técnica de PCR. A extração de DNA de amostras de sêmen de ovinos pelo método proposto permite a obtenção de uma maior concentração de DNA. Contudo as amostras

de pelo se destacam por permitir uma coleta rápida, não invasiva, de menor custo de extração e por permitir o armazenamento em temperatura ambiente.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

BIBLIOGRAFIA

- Araújo F.R., Ramos C.A.N., Luíz H.L., Péres I.A.H.F.S., Oliveira R.H.M., Souza I.I.F. & Russi L.S. 2009. Avaliação de um protocolo de extração de DNA genômico a partir de sangue total. . In: *Embrapa Gado de Corte. Comunicado técnico, 120* (ed. by Corte EGd), p. 5, Campo Grande, MS.
- BCB. 2019. Banco Central do Brasil. URL <http://www4.bcb.gov.br/pec/taxas/batch/taxas.asp?id=txdolar>.
- CBRA (COLÉGIO BRASILEIRO REPRODUÇÃO ANIMAL). *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 3a ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.
- Coelho E.G.A., Oliveira D.A.A., Teixeira C.S., Sampaio I.B.M., Rodrigues S.G. & Alves C. 2004. Comparação entre métodos de estocagem de DNA extraído de amostras de sangue, sêmen e pêlos e entre técnicas de extração. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56, 111-5.
- Cruz C.D. 2006. *Programa Genes: Biometria*, Viçosa, MG.
- Hyttel P., Sinowatz F. & Vejlsted M. 2012. *Essentials of domestic animal embryology*, Edinburgh.
- NanoDrop. 2010. *Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers Nucleic Acid*.
- Oliveira M.C.S., Regitano L.C.A., Roese A.D., Anthonisen D.G., Patrocínio E., Parma M.M., Scagliusi S.S.M., Timóteo W.H.B. & Jardim S.N. 2007. *Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase*, São Carlos.
- Rosa A.J.M. & Paiva S.R. 2009. *Marcadores moleculares e suas aplicações em estudos populacionais de espécies de interesse zootécnico*, Planaltina, DF.
- Santana A.M., Silva D.G., Bernardes P.A., Pizauro L.J.L., Maluta R.P., Aquino G.V., Garcia K.O., Ávila F.A. & Fagliari J.J. 2009. Hemograma e perfil bioquímico sérico de ovinos em idade de abate. *Ciência Animal Brasileira. Ciência Animal Brasileira* 1, 286 - 9.
- Siqueira J.B., Guimarães J.D., Costa E.P., Henry M., Torres C.A.A., Silva M.V.G.B. & Silveira T.S. 2007. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática in vitro. *Revista Brasileira de Zootecnia* 36, 387-95.
- Sverzut V.G. 2011. Determinação da porcentagem de espermatozoides portadores de cromossomos X e Y no sêmen sexado mediante PCR em tempo real. p. 65. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.