



PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DAS ESPÉCIES DE AVES *Oryzoborus angolensis* e *Oryzoborus maximiliani*

*Paulo Henrique Godoy Teles*¹; *Adriana dos Santos Maulais*²; *Alessandra Valéria de Oliveira*³

RESUMO: O Brasil, considerado um país de megadiversidade, ocupa o terceiro lugar em número de aves com 1.677 espécies, isto significa 55,3% do total de aves da América do Sul. As espécies de pássaros, curió, *Oryzoborus angolensis* (Linnaeus, 1766) e bicudo, *Oryzoborus maximiliani* (Cabanis, 1851), são as espécies mais ameaçadas de extinção por serem aves canórias por isso um grande interesse comercial. As técnicas que estão sendo implementadas são os testes de paternidade e *fingerprint* das aves, para que possa ser criado um banco de dados sobre cada indivíduo, garantindo assim a procedência dos animais tanto para o IBAMA quanto para os criadores legais. Isto também permite um maior controle dos animais de cativeiro, tanto no momento em que o criador irá comprar ou vender animais. Esses testes de paternidade e *fingerprint* genéticos são baseados em marcadores de microssatélites. No entanto, para a amplificação desses loci de microssatélites o material genético dos indivíduos deve ser de boa qualidade e o DNA não pode estar degradado. Diferentes protocolos de extração de DNA têm sido utilizados em espécies de aves e a identificação de um protocolo de extração de DNA ideal que possibilite um DNA de qualidade para realização de testes moleculares é fundamental. Neste trabalho foram utilizados dois protocolos de extração de DNA que se mostraram eficazes em relação à quantidade e qualidade do material genético obtido.

PALAVRAS-CHAVE: Extração de DNA; *Oryzoborus angolensis*; *Oryzoborus maximiliani*

1 INTRODUÇÃO

A perda da diversidade biológica reduz a capacidade de suportarem os impactos antrópicos ou naturais, e de realizarem com eficiência a ciclagem de energia e nutrientes, intensificando assim a destruição desses ecossistemas. Além de que muitas espécies de interesse biomédico e econômico são extintas (BAÍA JÚNIOR *et al.*, 2004).

Mesmo protegidas por lei, calcula-se que anualmente 12 milhões de espécies sejam retiradas de nossas florestas, suprimindo tanto tráfico interno e o tráfico externo que é mais lucrativo. O tráfico de animais silvestres constitui o 3º maior comércio ilícito do mundo, sendo superado pelo tráfico de narcóticos e armas. Estima-se que o capital movimentado pelo tráfico de animais silvestres seja em torno de US\$ 10 a 20 bilhões por

¹ Discente do curso de Biomedicina. Departamento de Biomedicina do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá, Paraná. Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica do CESUMAR (PROBIC). godoy.teles@hotmail.com

² Discente do curso de Ciências Biológicas. Departamento de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá, Paraná. maulais@hotmail.com

³ Coordenadora e orientadora do curso de Ciências Biológicas. Departamento de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá, Paraná. alessoli@cesumar.br

anos, sendo que a participação do Brasil seria de aproximadamente 5% a 15% do total (ROCHA, 1995, citado por BORGES *et al.*, 2006).

A Lei de Crimes Ambientais estabelece que as atividades de fiscalização sejam de responsabilidade municipal, estadual e federal, tendo como o principal dever proteger a fauna silvestre brasileira. O grande problema para os órgãos responsáveis por fiscalização de animais contrabandeados é a identificação da taxonomia e a dificuldade no processo de reintrodução dos animais (BORGES *et al.*, 2006).

As espécies de pássaros curió, *Oryzoborus angolensis* (Linnaeus, 1766) e bicudo, *Oryzoborus maximiliani* (Cabanis, 1851), são espécies ameaçadas de extinção por serem aves de grande valor comercial. Muito provavelmente o bicudo é o pássaro que possui maior número de notas em um mesmo canto e com a maior diversidade de cantos catalogados. Cada bicudo impõe sua própria personalidade, no andamento, na voz e melodia e sempre acrescenta ou diminui notas em sua melodia. Dificilmente existirá dois bicudos com o mesmo canto, por mais semelhantes que sejam, mesmo executando as mesmas notas, cada um irá impor suas características ao executar o canto. (FEBRAPS, 2007, citado por PEDERIVA, 2008). O bicudo toma postura ereta ao cantar, com o peito empinado e a cauda abaixada, destacando sua valentia e disposição para disputas territoriais. O macho desta espécie também, após algum tempo de vida, tem suas penas escurecidas tornando-o preto, com uma mancha na parte externa da asa (OLSON, 1851).

O curió, que na língua tupi guarani significa “amigo do homem”, pela característica de aproximar-se das aldeias e afeiçoando-se a presença dos humanos, foi classificado de forma equivocada por Linnaeus em 1766, recebendo o nome científico *Oryzoborus angolensis*. *Oryzoborus* é alusão ao fato de se alimentar de sementes de arroz, e *angolensis* por ter atribuído sua origem a África. O curió macho, assim como os outros do mesmo gênero, no início da sua vida tem as penas na coloração marrom, após completar em média 420 dias, inicia a troca de cor das penas, passando a ser pretas, existe uma pequena mancha branca em suas asas, no peito carrega uma faixa de cor vinho, as fêmeas como tendo uma cor mais marrom em seu dorso, e um tom mais claro no peito, mesmo quando já estão com maior tempo de vida. Quando estão em seu habitat natural, se alimentam basicamente de insetos e de vários tipos de sementes, seu tempo de vida varia de seis a dez anos, já em cativeiro há relatos de aves que viveram cerca de trinta anos (OLSON, 1851).

Devido às características das espécies citadas, o IBAMA tem intensificado o controle e fiscalização nas que ainda estão em seu habitat natural. Uma das formas mais comumente adotadas é a captura destes animais, sua identificação com uma anilha de metal, onde é especificado os dados biológicos e morfométricos do animal (IBDF 1981, IBAMA 1994). Outras técnicas que estão sendo implementadas são os testes de paternidade e *fingerprint* das aves, para que possa ser criado um banco de dados sobre cada indivíduo, garantindo assim a procedência dos animais tanto para o IBAMA quanto para os criadores legais. Isto também permite um maior controle dos animais de cativeiro, tanto no momento em que o criador irá comprar ou vender animais.

Esses testes de paternidade e *fingerprint* genéticos são baseados em marcadores microssatélites. Os microssatélites são pequenas seqüências repetidas do genoma, compostas de um a seis nucleotídeos. Os locos de microssatélites apresentam uma elevada taxa de mutação, o que os tornam potencialmente polimórficos. Tem grande utilidade nas áreas de genética da conservação e genética de populações, também na investigação forense, nos diagnósticos de doenças, estudos ecológicos e na análise de parentesco (CORRÊA, 2009).

Marcadores de microssatélites têm sido um dos mais aplicados nos estudos genéticos com possibilidade de uso em diversos campos da genética, incluindo genética da conservação, genética de populações e genética forense. Microssatélites fornecem informações importantes na identificação de unidades de conservação e para investigar

os processos genéticos que ocorrem em populações, como padrões de fluxo gênico e incidência da deriva genética (HEYWOOD et al., 2003. Citado por CORRÊA, 2009).

No entanto, para a amplificação desses loci de microssatélites o material genético dos indivíduos deve ser de boa qualidade e o DNA não pode estar degradado. Diferentes protocolos de extração de DNA têm sido utilizados em espécies de aves e a identificação de um protocolo de extração de DNA ideal que possibilite um DNA de qualidade para realização de testes moleculares é fundamental.

Este trabalho objetivou padronizar um protocolo de extração de DNA das espécies de aves *Oryzoborus angolensis* e *Oryzoborus maximiliani*, que permitisse obter um DNA de boa qualidade para amplificação de microssatélites. Foram testados dois protocolos diferentes de extração de DNA e identificado os resultados em relação à quantidade e qualidade de material obtido.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Processamento das amostras:

Foram utilizadas amostras de sangue, cartucho e bulbo de penas das espécies de aves *Oryzoborus angolensis* e *Oryzoborus maximiliani*. As amostras foram mantidas congeladas até o processamento.

Protocolos de extração de DNA:

Para a extração de DNA das amostras foram testados dois protocolos diferentes e foram analisados os seguintes fatores: quantidade de material genético extraído no final do processo e qualidade do DNA (degradado ou não degradado).

O primeiro protocolo a ser testado foi baseado em Fenol/Clorofórmio descrito por Sambrook *et al.* (1989). Amostras de sangue ou bulbo da pena foram cortadas e homogeneizadas em tampão PS (Tris-HCl 0,2 M, EDTA 30 mM, SDS 2% e Sacarose 5%), tampão TH (Tris-HCl 10 mM, NaCl 60 mM, EDTA 10 mM, Sacarose 5%, Espermina 0,15 mM e Spermidina 0,15 mM) pH 8,0 e proteinase K (20 µg/µL) por 90 minutos em banho-maria a 37 °C. Posteriormente, o DNA foi purificado por extração com fenol/clorofórmio (1:1) e clorofórmio, respectivamente, e precipitado com solução salina (NaCl 5 M) e etanol absoluto gelado. O *pellet* foi ressuscitado em tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) com RNase.

O segundo protocolo a ser testado foi baseado em extração alcalina descrita por Rudbeck *et al.* (1998), que é variável dependendo do tipo de amostra a ser extraído o DNA. Amostras de sangue foram misturadas com NaOH (0,05 M) ficando 10 minutos em banho-seco a 74°C. Depois para a neutralização foi adicionado TrisHCl pH 8,0 e posteriormente para a precipitação foi adicionado NaCl (0,2 M) e etanol absoluto. As amostras foram congeladas instantaneamente com nitrogênio líquido e centrifugadas a 4° C por 20 minutos. Para ressuspender a amostra será utilizado tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) com pH 8,0.

Os bulbos de penas, foram triturados e homogeneizados com NaCl (0,2 M) e levados a banho-seco por 20 minutos a 74°C, depois para neutralização será adicionado TrisHCl com pH 8,0 e posteriormente para a precipitação foi adicionado NaCl (0,2 M) e etanol absoluto. As amostras foram congeladas instantaneamente com nitrogênio líquido e centrifugadas a 4°C por 20 minutos, e para depois ressuspender a amostra foi utilizado tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) com pH 8,0.

Após a extração as amostras foram quantificadas em gel de agarose 1% em comparação com DNA padrão de concentração conhecida e amplificadas pela técnica de PCR, para verificação da qualidade do material.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sucesso de um exame usando DNA depende basicamente da quantidade e da qualidade de DNA extraído de diversas fontes. Em exames de paternidade o DNA é extraído em condições ideais, sem contaminação e o material tem que ser íntegro, então nesses casos a extração de DNA para análise talvez seja a etapa mais importante de todo o processo (DOLINSKY, 2007).

Este trabalho utilizou 49 amostras de DNA de aves, sendo que 21 amostras foram de *Oryzoborus angolensis*, 4 de sangue e 17 de bulbo de pena e 28 amostras foram de *Oryzoborus maximiliani*, sendo 5 amostras de sangue e 23 amostras de bulbo de pena. Todas as amostras de DNA extraídas não foram visualizadas nos géis de agarose utilizados, provavelmente pela baixa concentração de DNA obtido (Figura 1). No entanto, todas as amostras foram amplificadas utilizando a técnica de PCR, gerando marcadores estáveis, que apresentaram reprodutibilidade (Figura 2). Dessa forma evidenciou-se a presença de material genético nas amostras, provavelmente em uma concentração de 5 a 10ng.

Tanto amostras de bulbo de pena quanto de sangue foram úteis como fonte de DNA, evidenciando a eficiência dos protocolos testados.



Figura 1. Quantificação de DNA, obtido por extração alcalina, em gel de agarose 1%. (1,2 e 3) DNA padrão de concentração conhecida. (4, 5, 6, 7, 8 e 9) *Oryzoborus angolensis*, (10, 11, 12 e 13) *Oryzoborus maximiliani*.

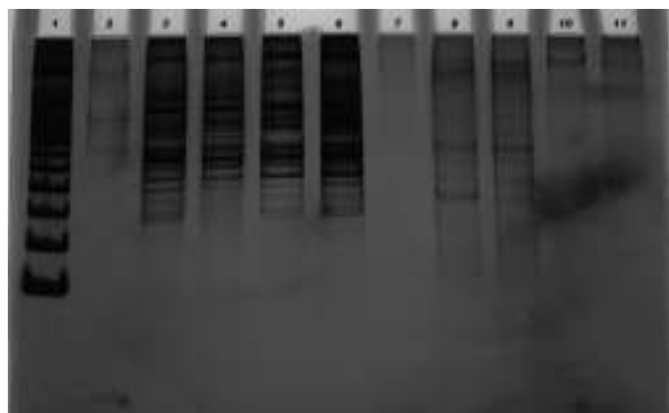


Figura 2. Fragmentos de DNA amplificados a partir de amostras de DNA obtidas por extração alcalina. (1) Marcador de peso molecular Ladder 100pb. (2 e 7) Controle negativo da reação. (3, 4, 5 e 6) *Oryzoborus angolensis*, (8, 9, 10 e 11) *Oryzoborus maximiliani*.

4 CONCLUSÃO

Ambos os protocolos de extração de DNA das aves *Oryzoborus angolensis* e *Oryzoborus maximiliani* apresentaram resultados satisfatórios em relação à qualidade do material genético obtido, que pode ser utilizado com êxito nas reações de amplificação. No entanto a quantidade de material genético obtido foi pequena, mas suficiente para as análises genéticas.

REFERÊNCIAS

BAÍA JÚNIOR, P. C.; GUIMARÃES, D. A. A. *Parque ambiental de Belém: um estudo da conservação da fauna silvestre local e a interação desta atividade com a comunidade do entorno*. Revista Científica da UFPA. v. 4. Abril, 2004.

BORGES, R. C.; OLIVEIRA, A.; BERNARDO, N.; COSTA, R. M. M. C. *Diagnóstico da fauna silvestre apreendida e recolhida pela Polícia Militar de meio ambiente de Juiz de Fora*. Revista Brasileira de Zootecias 8 (1): p.23-33. 2006.

CORRÊA, C. L. *Isolamento e caracterização de locos de microssatélite para Neothraupis fasciata (Emberizidae, Passeriformes, Aves)*. 2009. Tese (Mestrado) – Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2009.

DOLINSKY, L. C.; PAREIRA, L. C. V. *DNA forense*. Saúde & Ambiente em Revista, v.2, n.2, p.11-22, jul-dez, 2007.

IBAMA. 2004. Manual de anilhamento de aves silvestres. Brasília, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 146p.

LINNAEUS, C. A. *Species Plantarum*. ed. 4. Reichardianam Quinta, 1800.

OLSON, S. L.; A revision of the subspecies of *Sporophila* (“*Oryzoborus*”) *angolensis* (Aves: Emberizinae). Proceedings of the Biological Society of Washington, v. 94, n. 1, p. 43-51, 1981

PEDERIVA, P.; TUNES, E. *Musicalidade, fala expressão das emoções*. IV Simpósio de Cognição e Artes Musicais. Maio, 2008.

RUDBECK, L.; DISSING, J. *Rapid, simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR*. Biotechniques. Outubro, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989.