

PO005 - OTIMIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE DNA E PCR PARA OBTENÇÃO DOS GÊNES 18S rDNA, 28S rDNA E ESPAÇADORES INTERGÊNICOS DE DACTILOGIRÍDEOS (PLATYHELMINTHES, MONOGENOIDEA)

Julio C. Aguiar¹; Antônio A. M. Maia²; Marcia R. M. Silva³ & Edson A. Adriano⁴

1 UNICAMP – Departamento de Biologia Animal. E-mail: julio_aguiar@msn.com

2 USP – Departamento de Medicina Veterinária. E-mail: marciamg@usp.br

3 USP – Departamento de Medicina Veterinária. E-mail: antomaia@usp.br

4 UNIFESP – Departamento de Ciências Biológicas. E-mail: edapadriano@gmail.com

O advento de técnicas moleculares tem permitido avançar na diagnose de espécies de Dactylogyridae e compreender as relações evolutivas entre estes organismos. Contudo, as diferentes linhagens recém descobertas podem dificultar o uso dos marcadores moleculares disponíveis. Além disso, a diagnose realizada pela análise das estruturas esclerotizadas (complexo copulatório, vagina, além de âncoras e barras haptorais), que exige que o helminto seja seccionado, consome tempo e pode comprometer a reação em cadeia da polimerase (PCR), por usar uma parte do helminto. Visando evitar a secção do parasita, avaliamos três métodos para identificação do helminto em lâminas provisórias e um método com helminto seccionado em lâmina permanente: I etanol 70%; II glicerina-amônio-picrato (GAP); III proteinase K (20mg/mL) diluída em tampão de lise (pH 8, 10 mM Tris-Cl, 25 mM EDTA, 100 mM NaCl e 0,5% SDS) e; IV helminto seccionado montado em Grey & Wess. Também avaliamos a eficiência de secar o helminto utilizando um concentrador, após as etapas acima e antes da extração e, os métodos Fenol-Clorofórmio e o Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) para extração de DNA. Utilizamos como modelo, espécimes de *Vancleaveus cicinnus* parasita de *Phractocephalus hemioliopterus*. Para otimizar a PCR, desenvolvemos *primers* para os genes 18S, 28S rDNA, ITS1 e ITS2. Alinhamos sequências de Dactylogyridae no SeaView Version 4 e analisamos o múltiplo alinhamento no Prisma para seleção de *primers*. Alguns desses *primers* foram editados para garantir maior especificidade na região 5' para dactilogirídeos. Todas as etapas foram aferidas após a PCR em gel de agarose 1,5% observado sobre um transiluminador e, após o sequenciamento, pela qualidade dos cromatogramas observada nos programas BioEdit 7.1.3.0 e Asparagin e, pelo alinhamento básico no BLASTn. A extração de DNA também foi aferida em um espectrofotômetro NanoDrop 260/280 nM. O método I não permite observar as estruturas de diagnose. Os métodos II + secagem e IV + secagem foram os que possibilitaram a extração de maior quantidade de DNA com melhor qualidade. No entanto, a qualidade do cromatograma, sugere que o uso do GAP pode interferir no processo de amplificação. O procedimento de seccionar o helminto evita a ação de reagentes que possam desnaturar o DNA e, permite uma identificação precisa do parasita. Contudo a secção do helminto exige muita habilidade, demanda tempo, potencializa as chances de contaminação e a observação dos caracteres de diagnose só é possível após horas. A extração de DNA por meio da pK (III) + secagem não garantiu quantidades maiores e nem melhorou a qualidade do DNA extraído. Porém, é um procedimento que não exige tanta habilidade, permite diagnosticar mais rapidamente e possibilita melhorias na amplificação e sequenciamento. Os *primers* desenvolvidos no presente estudo contribuíram para a qualidade da amplificação e sequenciamento e para diminuição das ocorrências de contaminação. Alguns deles, como DAC18F1, DAC18R1 e DAC18R2 podem ser usados tanto para PCR como para Nested PCR do gene 18S rDNA. Os *primers* desenvolvidos para os genes ITS1-ITS2 e para o 28S rDNA parcial são potenciais, contudo carecem de mais testes.