



TÉCNICAS DE AMOSTRAGEM PARA ANÁLISES GENÉTICAS

Introdução

A meta das próximas páginas é delinear os procedimentos de amostragem para a coleta de material adequado para o uso em análises genéticas. Para um biólogo de campo ou veterinário existem inúmeras possibilidades de boas amostras para este tipo de análise. Tudo, desde pêlos a fezes, pode produzir DNA de boa qualidade, **desde que seja adequadamente coletado e preservado.**

Considerações Gerais sobre Amostragem

A grande dificuldade de se coletar material biológico para propósitos de análises genéticas é evitar que o DNA se degrade. Os maiores agentes degradantes de DNA na grande maioria das amostras são as enzimas com atividade DNase. Estas podem estar presentes na amostra ou ser produzidas por microorganismos em crescimento. Conseqüentemente, a meta principal é tornar estas enzimas inativas ou não deixar que elas ajam.

Existem diversas maneiras de tornar as enzimas inativas. Entretanto, elas são em geral caras ou requerem a utilização de reagentes que não estão normalmente disponíveis para a grande maioria de biólogos de campo e veterinários. Por outro lado, prevenir a atividade das enzimas é muito mais fácil e é em geral realizado através da desidratação da amostra. As maneiras mais comuns, eficientes e fáceis de se fazer isto são:

1. Desidratar a amostra através do uso de sílica-gel ou algum outro dessecante. Estes produtos estão em geral disponíveis em supermercados e lojas de artesanato e flores (usados para secar flores). Amostras secas são geralmente fáceis de se transportar, embora possam enfrentar algumas restrições da parte do país que estiver importando, pois podem ainda conter esporos viáveis, vírus ou bactérias que podem infectar pessoas e animais domésticos naquele país.
2. Desidratar a amostra através do uso de Etanol (70-100%). Quanto mais baixa a concentração mais fácil o transporte, pois se torna menos inflamável. Entretanto, quando mais baixa a concentração do Etanol, mais degradado o DNA se torna. Desta maneira, concentrações inferiores a 70% não são recomendadas. Adicionalmente, qualquer outro produto que não o Etanol (como por exemplo, o Metanol) não é recomendado também, pois pode interferir com a extração ou amplificação do DNA.

Conseqüentemente, é mais recomendável que as amostras coletadas sejam preservadas secas ou em Etanol. À parte disto, outros fatores que você precisa ter em mente são:

1. **Rotular:** Sempre rotule suas amostras e mantenha uma planilha de registros separadamente. O rótulo da amostra deve conter um número de referência, a data da coleta, o local, e a espécie. O número de referência deve ser o mesmo utilizado na planilha de registros, a qual deve conter a mesma informação escrita no rótulo e outras informações tais como o nome do coletor, coordenadas de GPS da localização exata do lugar onde a amostra foi coletada e quaisquer outras observações feitas necessárias. As coordenadas de GPS são informações essenciais para muitas análises genéticas e devem ser sempre tomadas. Finalmente, quando estiver rotulando suas amostras, use canetas apropriadas. Por exemplo,

quando estiver rotulando um tubo com Etanol use canetas de tinta permanente que não se apaguem com Etanol ou, você pode usar ainda papel alumínio marcado com caneta o qual deve ser colocado dentro do tubo. O ideal é usar ambas as maneiras de rotular.

2. **Evite contaminação:** É muito fácil contaminar as amostras com DNA humano. Para a maioria das análises este não é um problema, pois as análises usam métodos que são específicos para a espécie sendo considerada ou usam procedimentos que não detectam o DNA humano da amostra. De qualquer maneira, para algumas aplicações isto pode ser um problema, especialmente se estivermos tentando determinar o sexo dos indivíduos. Não é necessário usar luvas ou máscaras quando estiver no campo, mas você deve ser cuidadoso o suficiente para evitar manipular as amostras com suas mãos. Mais importante, é preciso evitar contaminação entre amostras. Sendo assim, sempre esterilize seu bisturi antes de coletar uma amostra de tecido, sempre use um novo galho para manipular uma nova amostra de fezes, e sempre utilize uma nova seringa para coletar uma nova amostra de sangue.
3. **Quanto mais nem sempre é melhor:** Às vezes é tentador coletar a maior quantidade possível de material. Entretanto, por exemplo, preencher um tubo inteiro com uma amostra de tecido ou fezes não é a melhor maneira de preservar o material genético. Quando você preenche todo o tubo com o material biológico você deixa muito pouco espaço para o agente de preservação. Se você estiver preservando as amostras de fezes com Etanol, você precisa se certificar de que você poderá colocar Etanol suficiente dentro do tubo para cobrir toda a amostra. Desta forma, você poderá ter certeza de que as amostras serão preservadas. De outra forma, você acabará com amostras que não terão utilidade para nada! Porém, se você encontrar um grande e fresco bolo fecal e quiser coletar o máximo que puder, você sempre pode separar a sua amostra em dois ou três tubos diferente.

Tipos de Amostras

Pêlo - Uma das melhores amostras.

Pêlos são provavelmente uma das melhores amostras para se coletar. Eles são fáceis de preservar e de transportar, e é muito fácil extrair deles DNA de boa qualidade. Se você estiver capturando animais no campo ou pode ter acesso a animais de origem conhecida em zoológicos, este é provavelmente o melhor método. Também, se você está no campo e pode encontrar pêlos com facilidade, como por exemplo, em troncos de árvores que animais utilizaram para se esfregar (coçar), esta é provavelmente a melhor amostra.

Se você estiver arrancando pêlos de um animal, procure por pêlos grossos, limpos e difíceis de remover. Esses pêlos geralmente produzem os folículos, bulbos ou raízes que contêm o tecido vivo do qual podemos extrair o DNA. Para obter uma quantidade suficiente de DNA é necessário coletar uma quantidade de 5 a 10 bulbos de cada indivíduo. Sempre se certifique de que os pêlos contêm os bulbos, pois de outra forma eles não têm utilidade para genética.

Amostra de pêlo são mais bem preservadas secas, em envelopes sem cera e selados. Você pode rotular a amostra escrevendo a informação no envelope. Você pode então manter vários envelopes em um recipiente separado ou saco plástico com sílica gel ou algum outro agente dessecante para ajudar a manter as amostras secas. Envelopes sem cera são porosos e permitem que as amostras respirem.

Fezes - Provavelmente o segundo melhor tipo de amostra.

Amostras de fezes são fáceis de coletar e produzem um DNA razoavelmente bom quando coletadas ainda frescas. Uma outra grande vantagem das fezes é que não são necessárias licenças CITES para transportá-las, e se elas estiverem preservadas em Etanol não é necessário obter permissão de importação para a grande maioria dos países. Entretanto, pode ainda ser preciso obter licenças de exportação para alguns países. Finalmente, outro ponto positivo dessas amostras é que elas não requerem nenhum tipo de

manipulação dos animais, evitando estressá-los, e em geral pode-se obter desta forma um grande número de amostras.

Duas coisas devem ser levadas em consideração quando coletando fezes. A primeira é que é necessário que o bolo fecal esteja o mais fresco possível. A segunda é que é preciso coletar o material da camada superficial. A camada superficial é a porção do bolo fecal que esteve em contato com o trato intestinal do animal por último, então esta é a camada que possui as células do animal. Se a camada superficial tiver quaisquer fungos, insetos, ou quaisquer outras possíveis contaminações, é bem provável que a extração do DNA não funcione. Por outro lado, se você estiver amostrando num ambiente bastante seco e a camada superficial estiver bem seca, pode ser que seja possível obter DNA da amostra, mesmo que esta tenha algumas semanas de idade. Outra coisa importante que se deve ter em mente é evitar manipular as fezes com as mãos nuas. Isto evita a contaminação das amostras e preserva sua própria saúde. A melhor coisa é quebrar um ramo ou galho de uma árvore próxima, e então quebrar novamente este ramo em dois, usando a porção mais recentemente quebrada para manipular as fezes.

Para coletar uma amostra você abre um tubo de amostras (idealmente use tubos de 5 ml) e coloca a tampa em algum local com a boca para cima. Com o ramo em sua mão, coloque a boca do tubo próximo ao local onde você deseja amostrar. Use então o ramo para retirar cerca de 1cm² da superfície das fezes e empurrar a amostra para dentro do tubo. Repita o mesmo procedimento e retire outra amostra de 1cm² de outra porção das fezes. Você terá então cerca de 2 ml de fezes no tubo. Preencha o tubo com Etanol (entre 70-100%) de forma que você tenha uma proporção de 2:3 de fezes e Etanol. Feche o tubo, envolva a tampa com papel parafilme para evitar vazamentos, e descarte ramo usando um novo para cada tubo de amostragem. Isto é muito importante para evitar contaminação entre tubos. Lembre-se de rotular todas as suas amostras. Amostras de fezes preservadas desta maneira podem ser armazenadas a temperatura ambiente.

Para o caso de o seu animal de estudo defecar na água, existem alguns poucos estudos que foram bem sucedidos na extração de DNA de amostras de golfinhos e dugongs. Para o caso do golfinho, os pesquisadores estavam com os animais quando eles defecaram e foram capazes de coletar as amostras imediatamente. Conseqüentemente, as amostras estavam bem frescas. Para o caso do dugong, as amostras foram encontradas flutuando depois de um determinado período de tempo, foram colocadas em sacos plásticos individuais e congeladas até que a extração do DNA fosse possível. Se você encontrar fezes de anta submersas ou flutuando na água e esta parecer intacta, sugerimos que você remova a porção contendo a superfície usando um saco plástico (um por amostra), e então use os procedimentos descritos acima. Testes adicionais serão requeridos para avaliar se este protocolo é adequado, mas ele deveria produzir algum DNA se a amostra estiver relativamente fresca.

Como um comentário final, a amostragem deve ser feita no campo. É tentador coletar a maior quantidade possível de fezes no campo e então retirar as amostras no laboratório. Isto deve ser evitado o quanto possível, realizando todo o processo no campo de forma a evitar contaminação e ajudando a que você faça tudo de uma só vez.

Amostras de Tecido - Bom DNA, difíceis de transportar.

Amostras de tecido produzem um DNA muito bom, mas são difíceis de transportar pelo fato de precisarem de licença CITES e terem outros regulamentos. De qualquer maneira, se você estiver capturando animais no campo, ou trabalha em uma área que tenha problemas de animais sendo mortos em estradas ou mesmo caça, você poderá ter oportunidades de coletar este tipo de amostra e seria uma pena se você perdesse essas oportunidades. Quando estiver coletando amostras de tecidos, tenha em mente de que a quantidade necessária é pequena, e que você deve sempre esterilizar seu bisturi antes de coletar uma nova amostra.

Se você encontrar um animal morto numa estrada, ou se você estiver capturando animais, a melhor parte para se amostrar é a orelha. Um pequeno fragmento de 1cm² ou menos fornece excelente DNA tanto em qualidade quanto em quantidade. Uma pequena parte da orelha é muito melhor do que uma porção de

músculo, por exemplo, porque não apodrece tão facilmente. De qualquer maneira, se você encontrar carne fresca (por exemplo, com um caçador) cheire a carne. Se estiver cheirando mal, a extração de DNA provavelmente não vai funcionar. Se não estiver cheirando mal, você pode coletar alguns mm² do tecido.

A melhor maneira de preservar amostras de tecido é imergi-las em Etanol. Você tem de ter bom senso e colocar suficiente Etanol no tubo de amostragem para cobrir toda a amostra. Se você estiver amostrando apenas alguns mm² de tecido, você pode usar tubos de 2 ml, e então enchê-los com Etanol. Uma vez mais, envolva a tampa do tubo com papel parafilme para evitar vazamentos e rotule o tubo apropriadamente. Amostras de tecido preservadas desta maneira podem ser mantidas a temperatura ambiente.

Amostras de Sangue - Excelente DNA, mas muito caro.

Amostras de sangue provavelmente produzem o DNA de melhor qualidade, embora tanto a coleta da amostra quanto a extração do DNA sejam muito caros. Adicionalmente, na grande maioria dos casos a coleta da amostra envolve a captura e anestesia do animal, o que não é uma situação ideal se você quiser coletar uma grande quantidade de amostras.

As melhores maneiras de preservar sangue são através do uso de vacuntainers (com EDTA - tampa roxa) ou Solução Tampão Easy Blood (EBB). Se você estiver usando vacuntainer, certifique-se de agitar bem para que o EDTA entre na solução, e mantenha refrigerado. Se estiver usando EBB você deve misturar um volume de sangue para um volume de EBB, e do mesmo modo manter refrigerado. Normalmente somente é necessária uma pequena quantidade de sangue, e conseqüentemente, cerca de 1 ml de sangue deve ser mais do que suficiente para estudos de genética.

Outros Tipos de Amostra de Tecido

Ossos e dentes podem produzir algum DNA, mas é bastante difícil e estas não são fontes muito confiáveis. Adicionalmente, ossos podem ser difíceis de serem transportados. Conseqüentemente, não se recomenda a utilização destes materiais para análises genéticas.

Considerações a Respeito de Transporte e Envio de Amostras

Quando enviando suas amostras para outro país, recomendamos que você use algum serviço de courier, tais como FedEx ou UPS. Isto significa que os custos de envio serão um pouco mais altos, mas também significa que as amostras vão viajar rapidamente. Também, declare um valor nominal de 1 dólar nos formulários de alfândega e especifique "Valor para propósitos de alfândega". Agentes alfandegários vão interpretar valores mais altos como se a pessoa ou instituição no destino final estivessem comprando as amostras de você e isto resultará em tarifas de importação e outras taxas a serem estabelecidas. Também se lembre de incluir cópias das suas licenças de exportação/importação e CITES com a documentação do envio.

Leituras Suplementares

Fernando, P., and D. J. Melnick. 2001. Molecular sexing eutherian mammals. *Mol Ecol Notes* **1**:350-353.

Frantzen, M. A. J., J. B. Silk, J. W. H. Ferguson, R. K. Wayne, and M. H. Kohn. 1998. Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Mol Ecol* **7**:1423-1428.

Kohn, M. H., and R. K. Wayne. 1997. Facts from feces revisited. *Trends in Ecology & Evolution* **12**:223-227.

Parsons, K. M. 2001. Reliable microsatellite genotyping of dolphin DNA from faeces. *Mol Ecol Notes* **1**:341-344.

Parsons, K. M., J. F. Dallas, D. E. Claridge, J. W. Durban, K. C. Balcomb Iii, P. M. Thompson, and L. R. Noble. 1999. Amplifying dolphin mitochondrial DNA from faecal plumes. *Mol Ecol* **8**:1766-1768.

Reed, J. Z., D. J. Tollit, P. M. Thompson, and W. Amos. 1997. Molecular scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal faeces. *Mol Ecol* **6**:225-234.

Taberlet, P., and L. P. Waits. 1998. Non-invasive genetic sampling. *Trends in Ecology & Evolution* **13**:26-27.

Wasser, S. K., C. S. Houston, G. M. Koehler, G. G. Cadd, and S. R. Fain. 1997. Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. *Mol Ecol* **6**:1091-1097.

Fontes de Informação na Internet

Field Vet Program (WCS) - www.fieldvet.org

Wildlife Genetics, Inc - www.wildlifegenetics.ca/pages/samples