



**DEFINIÇÃO DE METODOLOGIA PARA FIXAÇÃO E PROTOCOLO DE
EXTRAÇÃO DE DNA PARA AVALIAR A PRESENÇA DO VIRUS WSSV EM
*Laeonereis culveri***

Vanessa C. Bitencourt¹, Juliana R. Moser², Karim H. Lüchmann³, Juliano M. Vilke⁴, Micheli C. Thomas⁵

¹ Acadêmica do Curso de Biologia- CERES – bolsista de iniciação científica PIVIC/UDESC

² Professora Colaboradora do Departamento de Engenharia de Pesca - CERES

³ Professora do Departamento de Pedagogia a Distância - CEAD

⁴ Acadêmico do Curso de Engenharia de Pesca- CERES

⁵ Orientadora, Departamento de Eng. de Pesca e Ciências Biológicas- CERES - michelict@gmail.com.

Palavras-chave: WSSV. Molecular. Poliqueta.

A "síndrome do vírus mancha branca" (WSSV) foi relatada pela primeira vez em Taiwan em 1992 e foi assim denominada após os sinais clínicos sob a forma de pequenas manchas brancas na carapaça de camarões infectados. O vírus não é apenas altamente infeccioso para o camarão, mas também para muitos outros crustáceos incluindo caranguejos e lagostins, além de copépodos, microalgas marinhas, rotíferos, plâncton, poliquetas e moluscos. Os poliquetas, que vivem nos sedimentos de viveiros de cultivos, são presas altamente nutritivas e preferidas pelos camarões e estão entre os muitos vetores biológicos com potencial para ser infectado pelo WSSV.

Para a identificação da presença do vírus no ambiente e em animais, é necessário fazer a extração de DNA do hospedeiro ou diretamente de amostras do sedimento. De modo geral, o DNA extraído de amostras frescas ou congeladas é o ideal para análises moleculares, pois as macromoléculas encontram-se bem preservadas. Porém, dependendo do material biológico, o álcool 70% e 100% acabam servindo melhor como fixador para análises de DNA. Para tanto, antes de iniciar as análises da presença de WSSV em poliquetas fez-se necessário definir o método de fixação das amostras coletadas e o protocolo de extração de DNA que melhor se aplicam à *Laeonereis culveri*.

Os poliquetas utilizados nos testes foram coletados e triados vivos do sedimento na lagoa Santo Antônio dos Anjos, Laguna - SC. Os espécimes selecionados foram mantidos vivos sem alimentação para esvaziar o tubo digestivo em aquários com água do mar, recirculação e aeração. Antes do início do protocolo de extração os organismos foram lavados com água destilada, cortados na secção da cabeça e da cauda, sendo utilizado apenas a secção mediana do corpo. Os poliquetas foram dispostos separadamente em micro tubos de 0,5 ml, em diferentes soluções: 3 exemplares em álcool 70%, 3 exemplares somente congelados e 3 exemplares frescos.

Após a preparação, foram utilizados dois protocolos de extração, o primeiro foi o protocolo SALT adaptado de Lopera - Barrero N, M (2008) para extração de DNA genômico que se baseia na desidratação e precipitação de proteínas; o segundo foi um protocolo de extração com proteinase K e CTAB combinados. Após a extração do DNA foram realizadas as eletroforeses das amostras de todos os testes para verificar a presença e integridade do DNA. Foram feitas em gel de agarose 1%, com dois intercalantes, gel read no teste 1 ao 3 e brometo no teste 4. Em seguida, para atestar a qualidade do DNA das amostras, foi feito a quantificação em espectrofotometria.

Tabela 1. Número de amostras com presença de bandas em gel de agarose em diferentes condições de fixação e extração.

Positivos			
	Álcool	Congelado	Vivo
Teste 1	1	0	0
Teste 2	3	2	2
Teste 3	0	0	0
Teste 4	5	5	5
TOTAL	9	7	7

De acordo com a Tabela 1, podemos perceber que as amostras que mostraram um melhor resultado perante a eletroforese foram as fixadas em álcool 70 e 100%. Nos valores de 260/280 da espectrofotometria, uma proporção de ~ 1,8 é aceita como puro para DNA. Assim, as amostras positivas do primeiro protocolo de extração, teste 1 ao teste 3, foram submetidas a análise de quantificação em Nanodrop, na qual verificamos que nenhuma amostra continha DNA puro. Nos resultados analisados do teste 4, que foi feito com o segundo protocolo de extração, tivemos a presença de DNA puro em duas amostras em álcool, três frescas e três congeladas. Nas amostras restantes a relação 260/280 foi menor, o que indica a presença de proteína, fenol ou outros contaminantes que absorvem fortemente em ou perto de 280 nm. Já os valores de 260/230 para DNA puro, são frequentemente mais altos do que na relação 260/280, geralmente na faixa de 2,0. Nas amostras do teste 4, todas as amostras mostraram a presença de leves contaminantes que absorvem a 230nm. Portanto, a partir dos resultados das análises de eletroforese e, principalmente, pela espectrofotometria, pôde-se constatar que dentre as opções testadas, foi obtido DNA de *L. culveri* de melhor qualidade a partir de amostras frescas e protocolo de extração com proteinase K e CTAB combinados. Os resultados não foram conclusivos pois a acadêmica, por questões pessoais, não deu continuidade ao trabalho.