

## Extração do DNA genômico a partir de células espermáticas ovinas<sup>1</sup>

### *Genomic DNA Extraction from Sheep spermatozoa cells*

**André Luiz da Conceição Santos**

Faculdade Pio Décimo, 0000-0002-5251-9598, andreconceicao.mv@gmail.com

**Wilson Romão Toledo da Silva**

Universidade Federal de Sergipe, 0000-0002-3821-2610, wilsonufs@gmail.com

**Antonio Matos Fraga Junior**

Faculdade Pio Décimo, 0000-0003-2790-7924, fragaam@gmail.com

**Marcus Vinicius de Aragão Batista**

Universidade Federal de Sergipe, 0000-0003-4745-8919, mvabatista@hotmail.com

**Jonatan Mikhail Del Solar Velarde**

Universidade Federal de Sergipe, 0000-0003-1626-5700, delsolarvelarde@gmail.com

#### Resumo

O presente estudo objetivou desenvolver um protocolo rápido para a extração de DNA a partir de espermatozoides da espécie ovina. Para isso, ejaculados coletados de um carneiro raça Santa Inês adulto e saudável foram acondicionados e transportados a 5°C durante 2 horas para serem armazenados a -20°C e analisados posteriormente. Executaram-se testes de extração de DNA em alíquotas de sêmen contendo 100, 200, 300 e 400 x 10<sup>6</sup> espermatozoides / mL. Em seguida, a concentração (ng/μL) e pureza (A260/A280) do DNA isolado foram avaliadas em nanoespectrofotômetro. A concentração e pureza de DNA extraído foi superior (P < 0,05) quando a maior concentração espermática (400 x 10<sup>6</sup>) foi utilizada. O protocolo desenvolvido neste estudo foi eficaz para a extração de DNA de espermatozoides ovinos.

Palavras-chaves: Extração de DNA; DNA; Espermatozoide; Ovino; Carneiro.

#### Abstract

The present study aimed to develop a rapid protocol for DNA extraction from sheep spermatozoa. For this purpose, ejaculates collected from a healthy adult Santa Inês ram were packaged and transported at 5°C for 2 hours to be stored at -20°C and analyzed later. DNA extraction tests were performed on semen aliquots containing 100, 200, 300 and 400 x 10<sup>6</sup> spermatozoa/mL. Then, the concentration (ng/μL) and purity (A260/A280) of the isolated DNA were evaluated in a nanospectrophotometer. The concentration and purity of extracted DNA was higher (P < 0.05) when the highest sperm concentration (400 x 10<sup>6</sup>) was used. The protocol developed in this study was effective for extracting DNA from ovine spermatozoa.

Keywords: Keywords: DNA extraction; DNA; Spermatozoa; Sheep; Ram.

## 1 Introdução

---

<sup>1</sup> Este trabalho foi financiado pela XXX (Opcional).

O DNA genômico presente no interior das células que compõem os tecidos orgânicos pode ser extraído através de métodos enzimáticos manuais ou automatizados (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Para este processo se faz necessário o uso de detergentes, sais e solventes orgânicos que promovem a lise e a precipitação dos componentes celulares, isolando o DNA (SILVA *et al.*, 2014).

Apesar da grande variedade de protocolos de extração de DNA disponíveis (ALMEIDA *et al.*, 2011; DARBANDI *et al.*, 2017; WARTON *et al.*, 2018), muitos deles demandam tempo excessivo e alto custo. Além disso, cada célula pode apresentar peculiaridades que dificultam o processo. Espermatozoides, por exemplo, apresentam protaminas, proteínas ligadoras do DNA responsáveis pela compactação e maior rigidez do núcleo dessas células (WU *et al.*, 2015). Essa organização exclusiva dificulta a ação dos detergentes e sais utilizados para a obtenção de amostras de DNA (SILVA *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2015). Dessa forma, o estudo de novos protocolos de extração do DNA rápidos e de custo reduzido, são uma estratégia para o incremento das tecnologias, afim de superar tais barreiras (ARAÚJO; RAMOS; LUÍZ, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Até o momento, estudos prévios realizaram a extração de DNA de espermatozoides a partir de volumes específicos do ejaculado obtido (DARBANDI *et al.*, 2017; MANUJA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2014). A contribuição científica deste estudo consiste em padronizar e propor um novo protocolo de extração de DNA baseado no uso de concentrações espermáticas previamente estabelecidas. Dessa forma, um único ejaculado poderá ser aproveitado para utilização em diferentes abordagens no campo. Além disso, este estudo propõe a utilização de um protocolo descrito para células somáticas, para uso em células não somáticas.

## **2 Material e métodos**

Este estudo é uma adaptação do protocolo de Araújo *et al.* (2009). Todos os procedimentos seguiram as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), cujo desenvolvimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária da Faculdade Pio Décimo, com número de registro 32/18.

## 2.1 Coleta e processamento de amostras

As amostras de sêmen foram coletadas usando eletroejaculador (AUTOJAC V3) via retal com o animal em estação e consciente. Antes da introdução da sonda, as sîbalas foram removidas da ampola retal para introdução da mesma. O prepúcio foi lavado com água corrente e sabão neutro, e foi realizada a lubrificação da sonda e do reto com óleo mineral. O ejaculado foi transferido para um tubo Falcon de 50 mL, acondicionado em recipiente isotérmico a aproximadamente 5°C e transportado até o laboratório.

A concentração espermática (CE) foi mensurada com uma proporção de diluição de 1: 400 (SILVA; NOGUEIRA; SILVA, 2017). Após a avaliação da CE, o sêmen foi diluído em solução fisiológica a 0,9% em alíquotas a  $100 \times 10^6$  espermatozoides / mL e as alíquotas foram armazenadas a - 20 °C até a extração do DNA.

## 2.2 Extração do DNA genômico

A extração do DNA foi realizada em capela de fluxo laminar, limpa com álcool 70% e exposta à radiação ultravioleta por 15 minutos antes do procedimento. As amostras de sêmen diluídas nas concentrações de  $100 \times 10^6$  espermatozoides x mL foram descongeladas em temperatura ambiente. Para a obtenção das diferentes concentrações ( $100, 200, 300$  e  $400 \times 10^6$ ), o volume de 1 mL dos tubos foi adicionado em um único e centrifugado a  $10.000 \times g$  por 5 minutos em centrífuga não resfriada, removendo-se o sobrenadante para obtenção do *pellet* contendo os espermatozoides. Posteriormente, os *pellets* em cada tubo foram lavados e centrifugados três vezes a  $5.000 \times g$  por 5 minutos em 1 mL de solução tampão fosfato salino (PBS) estéril 1x (DARBANDI *et al.*, 2017). Após a última lavagem removeu-se o sobrenadante e 100 µL de água ultrapura foi adicionada.

Para a extração de DNA seguiu-se as etapas descritas por Araújo *et al.* (2009) com o tempo de homogeneização em vórtex modificado para 3 minutos em todas as etapas do processo; o tempo de banho seco modificado à 60°C após adição de SDS foi modificado para 3 horas e, finalmente, o volume da solução de precipitação proteica modificado para 500 µL.

## 2.3 Análise da concentração e pureza do DNA

Alíquotas contendo DNA extraído foram avaliadas quanto à concentração e grau de pureza em nanoespectrofotômetro (Thermo Scientific® NanoDrop Lite). Para isso, foi utilizado 2  $\mu$ L da suspensão contendo DNA de cada tubo. Todas as alíquotas de DNA extraídas foram medidas em dez repetições.

## 2.4 Análise estatística

Para estimar as diferenças entre concentração e pureza do DNA, teste ANOVA foi utilizado seguido de um modelo aditivo linear misto. Comparações de médias foram aplicadas quando observou-se diferença significativa ( $P < 0,05$ ) utilizando teste de Tukey. As análises foram realizadas utilizando software estatístico R e os resultados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média.

## 3 Resultados e Discussão

Ao comparar a qualidade do DNA de diferentes concentrações de espermatozoides, observou-se que a concentração de DNA foi maior ( $P < 0,05$ ) quando utilizada a maior concentração de espermatozoides ( $400 \times 10^6$ ). Por meio da espectrofotometria não foi possível detectar DNA isolado quando foram utilizados 100 milhões de espermatozoides, e menor concentração foi obtida ( $P < 0,05$ ) quando foram utilizados 200 milhões de espermatozoides. A pureza do DNA não diferiu ( $P > 0,05$ ) quando 300 ou 400 milhões/mL de espermatozoides foram usados (Tabela 1).

**Tabela 1. Média  $\pm$  erro padrão de concentração (ng /  $\mu$ L) e pureza (A260 / A280) do DNA extraído sob diferentes concentrações espermáticas (CE)**

CE x 10 <sup>6</sup>	Concentração (ng/ $\mu$ L)	Pureza (A260/A280)
100	/	/
200	0.970 $\pm$ 0.021 <sup>c</sup>	1.485 $\pm$ 0.045 <sup>b</sup>
300	2.480 $\pm$ 0.110 <sup>b</sup>	1.651 $\pm$ 0.035 <sup>ab</sup>
400	4.570 $\pm$ 0.037 <sup>a</sup>	1.659 $\pm$ 0.014 <sup>a</sup>

ng/ $\mu$ L: nanogramas por microlitro; A260/A280: razão de absorbância do DNA isolado. Médias  $\pm$  erro padrão seguido por letras diferentes na mesma coluna diferem.

Este estudo avaliou pela primeira vez a eficácia de um protocolo descrito para extração de DNA de sangue total bovino, adaptado com eficácia para a extração de DNA de espermatozoides. Apresentando uma nova perspectiva à ideia de que protocolos para

células somáticas não funcionam com células não somáticas (DARBANDI *et al.*, 2017). Nossos resultados de concentração diferem do que foi obtido em alguns estudos (MANUJA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2014) estes, entretanto, avaliaram a eficácia de kits comerciais ou usaram reagentes de alto custo, como proteinase K. Nosso objetivo foi avaliar um protocolo não comercial e com reagentes de uso em rotinas de laboratório de biologia. Apesar disso, a pureza do DNA obtida em nosso estudo é semelhante a pureza obtida após o uso do reagente comercial TRIzol (MANUJA *et al.*, 2010), Kit DNeasy Blood and Tissue<sup>®</sup>, e superior a um método utilizando Kit resina Chelex-100<sup>®</sup> (SILVA *et al.*, 2014).

#### 4 Considerações Finais

A utilização de maiores concentrações de espermatozoides podem, por conseguinte, aumentar a concentração de DNA extraído usando o presente protocolo. Nossos resultados são satisfatórios, trazendo uma nova perspectiva para a eleição de concentrações espermáticas adequadas para esta finalidade. Protocolos para extração de DNA de células somáticas podem ser usados em células não somáticas.

#### Referências

- ALMEIDA, M. et al. Efficient DNA extraction from hair shafts. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 3, n. 1, p. 319–320, 2011.
- ARAÚJO, F. R.; RAMOS, C. A. DO N.; LUÍZ, H. L. Avaliação de um Protocolo de DNA Genômico a Partir de Sangue Total. **Comunicado técnico 120, Embrapa**, p. 1–5, 2009.
- DARBANDI, M. et al. A simple, rapid and economic manual method for human sperm DNA extraction in genetic and epigenetic studies. **Middle East Fertility Society Journal**, p. 10–13, 2017.
- MANUJA, A. et al. Evaluation of different methods of DNA extraction from semen of buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls. **Buffalo Bulletin**, v. 29, n. 2, p. 109–114, 2010.
- OLIVEIRA, M. C. D. S. et al. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de dna por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. **Embrapa Pecuária Sudeste**, p. 43, 2007. .

SILVA, E. C. B. et al. Comparative study of DNA extraction methodologies from goat sperm and its effects on polymerase chain reaction analysis. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 3, p. 6070–6078, 2014.

SILVA, J. C. B.; NOGUEIRA, E.; SILVA, M. R. Processamento de Sêmen Bovino Refrigerado. **Comunicado Técnico 108, Embrapa**, p. 1–6, 2017.

WARTON, K. et al. Comparison of 4 commercial kits for the extraction of circulating DNA from plasma. **Cancer Genetics**, v. 228–229, p. 143–150, 2018.

WU, H. et al. Rapid method for the isolation of mammalian sperm DNA. **BioTechniques**, v. 58, n. 6, p. 293–300, 2015.