



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXVII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS **SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2023**

Amplificação de marcadores mitocondriais de espécimes de *Crotalus durissus* que habitam no Estado da Bahia.

Karen Cruz Dos Santos E Santos¹; Dulcineia Ferreira de Andrade²; Rogério Mercês Ferreira Santos² ; Ilka Biondi³;

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: karensants001@gmail.com
2. Co-orientadores, DCBIO, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: dfandrade@uefs.br; rmfsantos@uefs.br
3. Orientador, DCBIO, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: ibiondi@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: *Crotalus*; biologia molecular; marcadores mitocondriais.

INTRODUÇÃO

As relações filogenéticas do gênero *Crotalus* vêm sendo investigadas por vários autores desde a década de 40. Em 2005, Wuster et al., sinonizaram as cascavéis do Nordeste do Brasil com as demais cascavéis do Sul, Sudeste e Centro Oeste do país. Entretanto, no Estado da Bahia, os estudos com gênero *Crotalus* demonstram que os acidentes crotálicos apresentavam sintomas e efeitos clínicos atípicos dos preconizados na literatura para este gênero no Brasil (Biondi-de-Queiroz *et al.*, 1994; Biondi et al, 2016).

Além disso, a existência da variabilidade encontrada na peçonha de *Crotalus* provenientes de ecossistemas diferentes no Estado da Bahia (Soares, 2004; Biondi, 2009), juntamente com as diferenças da morfometria craniana (Andrade, 2009), associado com os estudos proteômicos recentes (*in press*), contrapõe a existência de uma única subespécie para estas regiões.

Os avanços no uso de marcadores moleculares tornou-se comum para delimitar e definir espécies, utilizando o DNA mitocondrial (mtDNA). Deste modo, utilizamos neste trabalho esta ferramenta amplificando regiões mitocondriais de espécimes de *Crotalus*. Assim, agregar aos estudos já realizados, a identificação gênica de animais fornecedores de peçonha (antígenos) para a produção de soros regionalizados é um passo importante da rastreabilidade da matéria prima.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA

O DNA total dos espécimes de cascavéis foi extraído de amostras biológicas (sangue e tecido) com o kit EC-MXPA da Nova Biotecnologia utilizando o equipamento de extração de ácidos nucleicos automatizado Extracta 32 (Loccus). Os marcadores moleculares selecionados foram amplificados por PCR em reações com volume total de 20 µl que continha 2µl tampão, 0,8 MgCl₂, 1,6 µl dNTP, 2 µl tampão, 0,5 µl Taq DNA polymerase e 10,1 µl de água ultra pura e 1µl de DNA. Todas as amplificações foram realizadas num termociclador Techne® prime elite com os seguintes perfis térmicos: 94 ° C durante 5 min; 35 ciclos de 95°C por 1m, 48–54°C por 45-90s, 72°C por 1m; 72°C por 5 minutos.

Os fragmentos amplificados foram então submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com Gelred, utilizando marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb) Ladder, a 500Ma e 100V a 50 min, imersos em solução tampão TBE 10x e imagens captadas para análise dos resultados em no fotodocumentador L-Pix Touch - Loccus. A purificação dos fragmentos da PCR foi realizada com a utilização de uma solução de Polietileno-glicol (PEG 8000) e estocados em -80°C para posterior sequenciamento.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

De forma geral, as *rattlesnakes* (cascavéis) é um grupo complexo sem uma clara definição de espécies/subespécies na América do Sul. Este cenário impacta diretamente na produção de soro no Brasil, haja vista que a produção dos imunobiológicos utilizando a peçonha de uma única subespécie de *Crotalus* como fornecedora de matéria prima como ocorre no Brasil, impacta na baixa neutralização dos acidentes por *Crotalus* em várias regiões do País, o que contribui para o óbito. Neste trabalho, foi possível avançarmos para mudarmos esta realidade com a realização dos passos iniciais, extração e amplificação do DNA mitocondrial e nuclear extraído, mas fundamentais para a identificação gênica.

Houve a extração de DNA total com alta qualidade das 85 amostras biológicas utilizando amostras de tecido e sangue das cascavéis de 31 municípios do Estado da Bahia, (Figura 01A) com excelente amplificação das amostras dos DNA para todos os seis (06) genes mitocondriais utilizados (CYT-B1, ND43, CYT-B2, 16S1, 12S e COI-1) e para o gene nuclear C-MOS1 pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (Figura 01B; Tabela 01). A aplicação de diversos marcadores mitocondriais pode contribuir

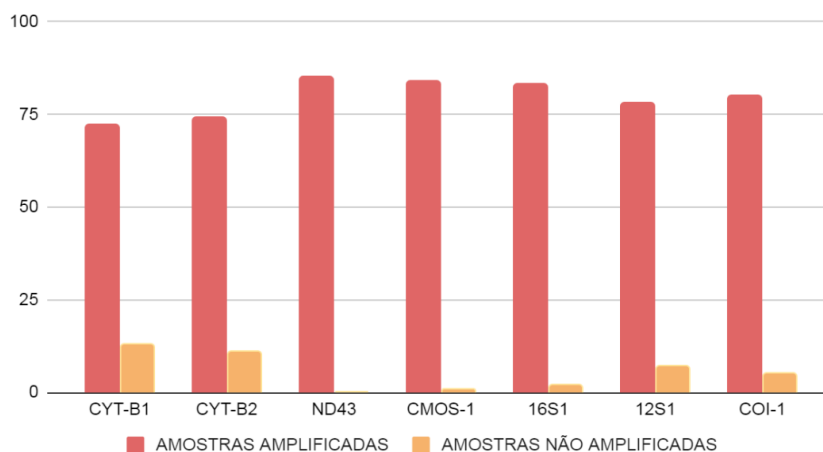
significativamente para solucionar o desafiador problema da identificação de espécies/subespécies coexistentes em um mesmo ecossistema.

Vários estudos têm comprovado a eficácia dos genes codificados pelo DNA mitocondrial para a identificação de serpentes (Pook e McEwing, 2005; Arteaga et al., 2023; Blair et al., 2016). Em um destes estudos, foi examinado a diversificação e os padrões biogeográficos de um grupo de cascavéis nas terras altas mexicanas durante o Neógeno, utilizando os genes C-mos, 12S, 16S, ND4 e CYT-b (Blair et al., 2016). Também, foi possível identificar simultaneamente três víboras peruanas, *Bothrops atrox*, *Lachesis muta* e *Crotalus durissus*, através da amplificação de genes mitocondriais *Cytb* e *COI*, extraídos dessas cobras (Arteaga et al., 2023).



Figura 01. Amostras de DNA extraídos no estudo. Gel de agarose a 1% corados com GelRed (A). Realização da etapa de purificação dos amplicons obtidos (B) e amostras de DNA extraídos no estudo. Gel de agarose a 1% corado com GelRed (C, D e E).

Gráfico 1. Relação das ampliações das amostras de *Crotalus durissus* do Estado da Bahia.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho é a primeira etapa dos estudos de identificação gênica que juntamente às análises filogenômicas (RAD-Seq) que estão sendo realizadas por pesquisadores do nosso grupo, permitirá esclarecer a existência de uma ou mais espécie e/ou subespécie de *Crotalus* no Estado da Bahia, e que atrelado a análise proteômica destas peçonhas possibilitará a fabricação de um soro com maior viabilidade na neutralização.

REFERÊNCIAS

Andrade, Dulcinea Ferreira. Estudo do complexo *Crotalus durissus cascavella* no Estado da Bahia utilizando variabilidade na peçonha e morfometria craniana. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós graduação em Biotecnologia, UEFS, Feira de Santana-Bahia 2009.

Andres Agurto-Arteaga, Dan E. Vivas-Ruiz, Fanny Lazo, Álex Proleón, Daniel Torrejón, Jorge Electo, Carmen Cayo, Felix A. Urrea, Carlos Chávez-Olórtegui, Eladio F. Sánchez, Armando Yarlequé, Simultaneous identification of three clinically relevant peruvian pit vipers by multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP), *Toxicon*, Volume 223, 2023, 107022, ISSN 0041-0101, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2023.107022>.

BIONDI, I. Caracterização biológica, bioquímica e imunológica das peçonhas de *Crotalus durissus* no estado da Bahia. Aryon de Almeida Barbosa Junior. 200 pgs. Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia. 2009.

Blair C, Sánchez-Ramírez S. Diversity-dependent cladogenesis throughout western Mexico: Evolutionary biogeography of rattlesnakes (Viperidae: Crotalinae: *Crotalus* and *Sistrurus*). *Mol Phylogenet Evol.* 2016 Apr;97:145-154. doi: 10.1016/j.ympev.2015.12.020. Epub 2016 Jan 21. PMID: 26802208.

Pook CE, McEwing R. Mitochondrial DNA sequences from dried snake venom: a DNA barcoding approach to the identification of venom samples. *Toxicon.* 2005 Dec 1;46(7):711-5. doi: 10.1016/j.toxicon.2005.07.005. Epub 2005 Sep 12. PMID: 16157361.

Rubinoff, D. and Holland, B.S. Between Two Extremes: Mitochondrial DNA Is Neither the Panacea Nor the Nemesis of Phylogenetic and Taxonomic Inference. *Systematic Biology*, 54, 952-961, 2005.

SOARES, W. R. A. Estudo comparativo da variabilidade das peçonhas de *Crotalus durissus* em diferentes regiões do estado da Bahia. 2004. 66 f. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Feira de Santana. Orientador: Ilka Biondi.2004.