

PROTOCOLO DE COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO PARA ESTUDOS DE GENÉTICA MOLECULAR EM CARNÍVOROS E OUTROS MAMÍFEROS

1. Havendo o devido licenciamento por parte do Ibama e/ou autoridades estaduais, coletar amostras de material biológico de todos os indivíduos capturados e, se possível, também de quaisquer animais encontrados mortos (p. ex. em estradas), peles apreendidas e qualquer outro material disponível. Apesar de a ênfase atual de nossas pesquisas em genética ser em carnívoros neotropicais, pesquisas similares com outros grupos (p.ex. Xenarthra) estão sendo também iniciadas. Instruções específicas são dadas a seguir:
2. Coletar amostra de sangue de todos os indivíduos capturados (ou disponíveis em cativeiro, com origem geográfica conhecida). Procura-se coletar cerca de 5-10 ml de cada um, mas caso isto seja inviável 2-5 ml tendem a ser suficientes; é preferível coletar qualquer quantidade (mesmo menos de 1 ml) a deixar de coletar, pois mesmo de um pequeno volume ainda pode ser possível obter informações importantes.

As amostras podem ser coletadas em tubos (p. ex. Vacutainer) com anti-coagulante (EDTA ou ACD) e colocadas o mais rápido possível sob refrigeração; neste caso é preferível enviá-las ao laboratório onde o DNA será extraído em um prazo de no máximo 1-3 semanas para minimizar a degradação do material. Caso um laboratório local esteja disponível para a estocagem do material, o sangue deverá ser processado assim que possível, através de centrifugação e separação da ‘papa de leucócitos’ (incluindo também a parte superior [alguns mm] da fase de hemáceas, localizada logo abaixo) em um novo tubo, a qual pode ser então mantida congelada a longo prazo, e de onde o DNA poderá ser extraído futuramente. Neste caso, uma amostra de cerca de 1 ml de plasma pode também ser estocada para possíveis estudos futuros (p.ex. epidemiológicos).

Outra possibilidade, geralmente mais eficiente em campo, é misturar a amostra recém-coletada (já contendo o anti-coagulante EDTA ou ACD) **a um volume igual** do tampão TES (“Easy Blood”, composto de 100mM Tris, 100 mM EDTA, 2% SDS); neste caso a amostra pode ser mantida refrigerada, congelada ou a temperatura ambiente, e estocada por um período maior de tempo antes do envio. Estoques deste tampão podem ser enviados deste laboratório ou de outros centros no Brasil.
3. Coletar amostras de tecidos de animais encontrados mortos (atropelados, carcaças apreendidas, etc.). Qualquer tecido pode ser utilizado, mas os preferíveis seriam músculo esquelético, fígado, coração ou rim. O tecido pode ser colocado diretamente em álcool (álcool etílico 70 % ou mais concentrado, inclusive etanol absoluto), e mantido a temperatura ambiente ou refrigerado. A conservação em formol não deve ser realizada pois dificulta muito a obtenção de DNA da amostra. Procura-se coletar cerca de 2-3 tubos (p.ex. eppendorf) independentes contendo pequenos pedaços (cerca de 1 cm³) de cada indivíduo. Pedaços maiores em qualquer outro tipo de recipiente também podem ser utilizados; neste caso o ideal é cortar sulcos no tecido para facilitar a absorção do álcool. Caso seja preferível, o tecido pode ser mantido congelado por longo período antes de ser colocado em álcool.

Quando a coleta destes tecidos não for a viável, uma alternativa (particularmente para animais atropelados) é apenas cortar a(s) orelha(s) do animal, que pode(m) ser mantida(s) em álcool ou desidratada(s) (p. ex. em um envelope de papel). Apesar de não prover uma quantidade tão grande de DNA quanto os tecidos mencionados acima, este material seria suficiente para incluir a amostra em estudos genéticos.

4. Coletar amostras de peles (apreendidas, obtidas na região, etc.). Pequenos fragmentos podem ser raspados da parte interna de peles secas ou preparadas; geralmente existe mais material disponível na parte interna de orelhas, nariz e patas. Além disso, um pequeno pedaço (cerca de 1-2 cm²) pode ser cortado de qualquer parte da pele, geralmente de um dos lados. Este tipo de material pode ser mantido seco (p. ex. em tubos ou sacos plásticos, se possível com sílica-gel para mantê-lo desidratado) ou em álcool etílico (70% ou absoluto).
5. Tanto no caso dos tecidos quanto no das peles, deve-se tentar minimizar a contaminação com material de indivíduos diferentes. Para isto pode-se utilizar lâminas diferentes para coletar material de cada indivíduo, ou limpar a lâmina da melhor maneira possível com álcool antes de iniciar-se a coleta de um novo animal.
6. É fundamental que as amostras estejam bem identificadas; informações importantes que devem ser enviadas juntamente com as amostras incluem: espécie, procedência geográfica (o mais precisa possível), número do indivíduo no projeto (outros números de identificação, se existirem), e observações que sejam consideradas relevantes sobre o animal (especialmente coloração da pelagem, p. ex. melanismo). Mesmo que poucas informações estejam disponíveis (como no caso de peles apreendidas), ainda assim a amostra pode ser de valor para certos estudos. Sugerimos utilização da Ficha de Coleta em anexo, que poderá ser enviada junto com as amostras.
7. As amostras coletadas podem ser estocadas localmente até um contato futuro, e/ou enviadas a repositórios onde sejam estocadas ou utilizadas para estudos genéticos em andamento. No caso de carnívoros, as amostras podem ser enviadas ao repositório do Centro Nacional de Pesquisas para a Conservação dos Predadores Naturais – CENAP/IBAMA, ou diretamente para este laboratório caso possam ser utilizadas em projetos já em andamento. Para verificar esta possibilidade, ou em caso de dúvida, entre em contato utilizando o endereço abaixo.

Contato:

Prof. Eduardo Eizirik

Faculdade de Biociências-PUCRS, e Instituto Pró-Carnívoros.

Endereço:

Centro de Biologia Genômica e Molecular, Faculdade de Biociências, PUCRS

Av. Ipiranga, 6681, prédio 12. Porto Alegre, RS 90619-900.

Fax: (51) 3320-3612

Email: eduardo.eizirik@pucrs.br

**ESTUDOS DE GENÉTICA MOLECULAR EM CARNÍVOROS E OUTROS
MAMÍFEROS**

FICHA DE COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Data:

Identificação do indivíduo (números, tatuagens, stubook, microchips, etc.):

.....
.....

Espécie (especificar dúvidas na identificação se for o caso):

.....
.....

Sexo: Idade:

Procedência Geográfica (o mais precisa possível):

.....
.....
.....

Observações (características individuais, coloração, etc.):

.....
.....

Amostras coletadas e conservantes:

.....
.....

Pesquisadores responsáveis:

.....
.....

Comentários:

.....
.....