

Uso de solução salina (NaCl) na extração de DNA a partir de bulbo capilar

WEBER, Giovana Regina^{*}; DISNER, Geonildo Rodrigo^{**}; NICOLAU, Leandro Sidinei^{***}; GIOVANAZ, Gustavo^{****}; TROTT, Alexis^{*****}; MIRANDA, Gustavo Borba de^{*****}

Resumo

A extração de DNA total a partir de bulbos capilares possibilita uma ampla diversidade de pesquisas e aplicações, além de permitir o envio de amostras a distância e ser utilizado na Medicina Forense, sendo um método amostral não invasivo. É necessária a busca por métodos de extração de DNA que sejam rápidos, de baixo custo, livres de contaminantes e toxicidade. Nesta pesquisa foi avaliada a qualidade do DNA extraído de bulbos capilares, a partir de dois métodos de extração, utilizando fenol/clorofórmio ou solução salina. Para testar a eficiência das extrações foram utilizadas 30 amostras de bulbos capilares, e os produtos das extrações foram amplificados por PCR para o gene da β -actina. Todas as 30 amostras obtiveram resultado positivo em relação à extração utilizando solução de NaCl. Estes resultados, quando comparados a extrações com fenol/clorofórmio, não apresentaram diferenças observáveis. Palavras-chave: Folículo piloso. Extração DNA. Cloreto de sódio. Fenol.

Use of saline solution (NaCl) in the DNA extraction from hair bulbs

Abstract

The extraction of total DNA from hair bulbs enables a wide range of research and applications, and allow the sending of samples to away and be used in Forensic Medicine, being a non-invasive sampling method. It is necessary

* Acadêmica do Curso de Biomedicina; bolsista de Iniciação Científica pela Universidade do Oeste de Santa Catarina, *Campus* São Miguel do Oeste;

** Acadêmico do Curso de Ciências Biológicas; bolsista de Iniciação Científica pela Universidade do Oeste de Santa Catarina, *Campus* São Miguel do Oeste;

*** Acadêmico do Curso de Ciências Biológicas; bolsista de Iniciação Científica pela Universidade do Oeste de Santa Catarina, *Campus* São Miguel do Oeste;

**** Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade do Oeste de Santa Catarina, *Campus* São Miguel do Oeste;

***** Doutor em Bioquímica; Professor da Área das Ciências Biológicas e da Saúde, Laboratório de Biologia Molecular da Universidade do Oeste de Santa Catarina *Campus* de São Miguel do Oeste; alexistrott@hotmail.com

***** Doutor em Genética e Biologia Molecular; Professor da Área das Ciências Biológicas e da Saúde, Laboratório de Biologia Molecular da Universidade do Oeste de Santa Catarina; Rua Oiapoc 211, 89900-000, São Miguel do Oeste, SC; gustavo.miranda@unoesc.edu.br

the search for methods of DNA extraction that are fast, inexpensive, free of contaminants and toxicity. The purpose of this study was to evaluate the quantity and quality of DNA extracted from hair bulbs from two extraction methods, one using phenol/chloroform, and another, a saline solution. To test the efficiency of extraction were used 30 samples of hair bulbs, and the products of the extractions were amplified using β -actin gene. All 30 samples obtained positive results with respect to extraction using NaCl solution. These results, when compared to extractions with phenol/chloroform, showed no observable differences.

Keywords: Hair follicle. DNA extraction. Sodium Chloride. Phenol.

1 INTRODUÇÃO

As pesquisas em biologia molecular dependem de um bom e qualificado material genético. Porém, para que estes estudos atinjam um grau máximo de eficiência, é importante que a extração do DNA (ácido desoxirribonucleico) seja de alta qualidade e que este esteja o menos degradado possível. Existem várias técnicas para extração dos ácidos nucleicos, que utilizam diferentes metodologias e espécimes biológicos, baseadas no uso de proteinase K, seguidas, ou não, por fenol e clorofórmio, além de diversos *kits* comerciais. Mesmo com diferenças entre os protocolos, todos seguem as seguintes etapas: lise das células, desproteinização e concentração do DNA (BUENO, 2004).

Os *kits* comerciais para extração do DNA são extensamente empregados na rotina laboratorial, principalmente por sua maior praticidade, rapidez e alta afinidade por íons metálicos que são inibidores da Taq DNA Polimerase (POLSKI et al., 1998; GONZÁLEZ et al., 2004). Alguns exemplos são Chelex 100® e InstaGene Matrix®, ambos disponibilizados pela BioRab (BAREA; PARDINI; GUSHIKEN, 2004), além de EZ-DNA® e o *kit* de extração por coluna NeoScience® (CARDOZO et al., 2009). Porém, nem sempre apresentam completa eficiência e precisão, além de seu maior custo. A metodologia tradicional com proteinase K e fenol/clorofórmio é amplamente utilizada e costuma conceder bons resultados, entretanto, apresenta desvantagens pela sua toxicidade ao ambiente e perigo ao manuseio (BAREA; PARDINI; GUSHIKEN, 2004). Como método alternativo, pode-se substituir fenol e clorofórmio por uma solução salina (MEDRANO; AASEN; SHARROW, 1990).

Métodos amostrais não invasivos têm sido amplamente utilizados e incentivados. Pesquisas nas áreas biológicas, principalmente com foco no meio ambiente e conservação, estão cada vez mais utilizando esse tipo de amostragem em estudos de populações silvestres das mais variadas espécies animais, bem como em investigações com seres humanos (BAREA; PARDINI; GUSHIKEN, 2004; ANDERSON et al., 2006; CAUDRON et al., 2007; WEBER et al., 2009). A maioria das amostras não invasivas são fontes escassas de DNA. Estas podem ser provenientes de fios de cabelo, restos celulares em dentes arrancados ou sob unhas, ossos, tecidos de cadáveres decompostos e diversos fluidos corpóreos (BAREA; PARDINI; GUSHIKEN, 2004). O uso destas fontes escassas de DNA possuem diversas aplicações, como em diagnósticos retrospectivos,

identificação de indivíduos e paternidade, estudos populacionais, envios de amostras a distância e aplicações na Medicina Forense (BUENO, 2004).

Na atualidade, são pesquisados métodos de extração de ácidos nucleicos que sejam rápidos, de baixo custo, com produtos livres de contaminação e toxicidade, além de eficientes, mesmo com pequena quantidade ou escassez da amostra. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade do DNA extraído de bulbos capilares, a partir de dois métodos de extração, um por fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e outro por solução salina (NaCl).

2 MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de bulbos capilares foram provenientes de 30 indivíduos adultos, os quais foram informados do conteúdo e objetivo da pesquisa, consentindo com o uso de seu material genético. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética na Pesquisa da Universidade do Oeste de Santa Catarina, sob o número de protocolo 131/2010. A extração do DNA baseou-se no uso de proteinase K com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico ou sua substituição por solução salina, tendo o protocolo de Medrano, Aasen e Sharrow (1990) como base, mas com modificações.

Os bulbos, aproximadamente cinco por amostra, foram coletados com auxílio de uma pinça e acondicionados em microtubos. Os fios de cabelo foram lavados com álcool 70% e água estéril, em seguida fracionados de forma a incluir todo o bulbo e acrescidos de tampão SEB (Tris HCl 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM e SDS 2%), Dithiothreitol (DTT) e proteinase K (20 mg/ml), incubados em banho-maria a 56 °C por 12h. Para isolamento do DNA, foi utilizada uma solução salina (NaCl 4M) ou fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), sendo o DNA, posteriormente, precipitado com auxílio de etanol absoluto gelado, concentrado em água ultrapura (mili-Q) e armazenado a -20 °C.

O DNA presente no bulbo capilar está disponível em pequenas quantidades, quando o fio de cabelo é arrancado apresenta de 1-750 ng/fio e quando desprendido de 1-12 ng/fio, sendo necessária sua amplificação para uma possível visualização em gel de agarose. Para controle de presença de DNA nas amostras, além de sua qualidade, todas as amostras foram submetidas à PCR utilizando-se *primers* específicos para o gene *housekeeping* β -actina (Tabela 1), o qual amplificou um fragmento de 88pb (SESARINI et al., 2009). Algumas amostras foram submetidas à Nested PCR, para o qual foi utilizado o mesmo conjunto de iniciadores. O programa de amplificação apresentou uma desnaturação inicial a 94 °C por 10 min, seguida por 35 ciclos (desnaturação por 1 min a 94 °C, anelamento por 1 min a 52 °C e extensão por 1 min a 72 °C) e uma extensão final a 72 °C por 5 min.

Tabela 1 – Sequências de *primers* para amplificação do gene β -actina

<i>Primer</i>	Sequência
B-ACT F	5' CCCTTGCCATCCTAAAAGCC 3'
B-ACT R	5' TGCTATCACCTCCCCTGTGT 3'

Fonte: os autores.

A visualização dos resultados da PCR para o gene da β -actina foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídio.

3 RESULTADOS

Foram analisadas 30 amostras de bulbo capilar. Após o processo de extração, os produtos dos dois métodos foram submetidos a uma amplificação com o marcador molecular β -actina para a comprovação da eficiência do método utilizado.

Todas as 30 amostras testadas foram submetidas ao processo de extração de DNA a partir de solução salina (NaCl 4M). Os resultados apresentados por esse método, após a amplificação com gene da β -actina, mostraram-se positivos para as 30 amostras. Porém, 12 das 30 amostras tiveram que ser submetidas à Nested PCR para aumentar o produto amplificado, em virtude da pequena quantidade de DNA presente.

Em cinco amostras das 30 utilizadas neste trabalho, também foi utilizado o protocolo com solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico para isolamento de DNA, sendo este submetido à amplificação do gene da β -actina. O produto desta PCR foi comparado às amplificações do gene da β -actina com DNA extraído por solução salina. Os dois protocolos mostraram resultados semelhantes e satisfatórios, apresentando DNA íntegro e em boa qualidade.

4 DISCUSSÃO

A extração de DNA total a partir de bulbos capilares, apesar de ser uma fonte escassa, possibilita ampla diversidade de pesquisas e aplicações, tais diagnósticos retrospectivos, identificação de indivíduos e paternidade.

Atualmente, a grande maioria dos protocolos de extração de DNA utiliza fenol/clorofórmio para a sua obtenção. Apesar de esses reagentes possibilitarem uma boa qualidade do material extraído, algumas pesquisas têm buscado métodos alternativos para a extração de DNA em razão da grande toxicidade destes, tanto para quem os manipula quanto para o meio ambiente (BAREA; PARDINI; GUSHIKEN, 2004; ABRÃO et al., 2005).

Com o intuito de encontrar novas alternativas de protocolos de extração de DNA de células do bulbo capilar, foi testada uma técnica que utiliza solução de NaCl em substituição ao fenol/clorofórmio. Esta técnica foi aplicada a 30 amostras de bulbos capilares e se mostrou eficiente, pois se comprovou a extração de material em todas as amostras a partir da amplificação deste

material. Técnica semelhante foi utilizada por Miller, Dykes e Polesky (1988) na extração de DNA de sangue periférico e também por Abrão et al. (2005), porém na extração de DNA de células de mucosa oral. Estes últimos autores, além de usarem a técnica com solução de NaCl na extração de DNA, compararam esse método com a extração realizada com um *kit* comercial e concluíram que não houve diferença na qualidade das amplificações e sequenciamentos a partir de tais materiais. Além disso, a técnica de extração de DNA de células de mucosa oral com NaCl apresentou menor custo, maior rapidez e maior quantidade, indicando ser esta uma forma confiável de obtenção de DNA para estudos genéticos.

Resultados semelhantes foram observados por Cardozo et al. (2009) que utilizaram solução de NaCl na extração de DNA a partir de sangue humano coagulado. Essa técnica mostrou os melhores resultados quando comparada às extrações realizadas pelo *kit* comercial EZ-DNA® (Biological Industries, Beit Haemek, Israel) e pelo *kit* de coluna Neoscience® (One Lambda Inc., San Diego, CA).

Na presente pesquisa, observou-se a eficiência da extração de DNA total a partir de bulbos capilares, utilizando-se solução de NaCl, sendo comprovada por meio de amplificações do gene da β -actina em todas as amostras. Além disso, em cinco das 30 amostras, comparou-se esse método com o tradicionalmente utilizado, fenol/clorofórmio como precipitante do DNA. Como já evidenciado em outros trabalhos publicados (ABRÃO et al., 2005; CARDOZO et al., 2009), a metodologia que utiliza solução de NaCl como precipitante, não mostrou diferenças aparentes quando comparada com outros métodos tradicionais.

5 CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que a eficiência do uso de solução de NaCl na extração de DNA total de material considerado como fonte escassa de DNA proporciona a substituição de reagentes tóxicos, como os solventes orgânicos fenol e clorofórmio em procedimentos laboratoriais, tornando os custos e o tempo laboral mais compatíveis com a realidade atual.

REFERÊNCIAS

ABRÃO, M. G. et al. Padronização da Técnica de Extração de DNA de Células de Mucosa Oral Com NaCl: Aplicação no Estudo do Gene PROP1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, n. 6, p. 978-982, 2005.

ANDERSON, H. M. et al. Non-invasive genetic sampling of the Eurasian Otter (*Lutra lutra*) using hairs. **Hystrix, Italian Journal of Mammalogy**, v. 17, n. 1, p. 65-77, 2006.

BAREA, J. A.; PARDINI, M. I. M. C.; GUSHIKEN, T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 4, p. 274-281, 2004.

BUENO, V. DNA e aperfeiçoamento das técnicas de extração. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 4, p. 233-234, 2004.

CARDOZO, D. M. et al. Extração de DNA a partir de sangue humano coagulado para aplicação nas técnicas de genotipagem de antígenos leucocitários humanos e de receptores semelhantes à imunoglobulina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p. 651-656, 2009.

CAUDRON, A. K. et al. Hair sampling and genotyping from hair follicles: a minimally-invasive alternative for genetics studies in small, mobile pinnipeds and other mammals. **Marine Mammal Science**, v. 23, p. 184-192, 2007.

GONZÁLEZ, L. A. G. et al. DNA extraction using chelex resin for the oncogenic amplification analysis in head and neck tumours. **Acta Otorrinolaringológica Española**, v. 55, p. 139-144, 2004.

MEDRANO, J. F.; AASEN, E.; SHARROW, L. DNA extraction from nucleated red blood cells. **Bio Techniques**, v. 8, n. 1, p. 43, 1990.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. A. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

POLSKI, J. M. et al. Rapid and effective processing of blood specimens for diagnostic PCR using filter paper and Chelex-100. **Mol. Path.**, v. 51, p. 215-217, 1998.

SEARINI, C. et al. Diagnóstico genético prenatal no invasivo de factor Rh y sexo fetal a través del análisis de ADN fetal libre en plasma materno. **Arch. Argent. Pediatr.**, v. 107, n. 5, p. 405-409, 2009.

WEBER, L. I. et al. Microsatellite genotyping from faeces of *Lontra longicaudis* from southern Brazil. **Iheringia**, v. 99, n. 1, p. 5-11, 2009.

Recebido em 08 de fevereiro de 2012
Aceito em 22 de fevereiro de 2012