

Universidade Presbiteriana Mackenzie
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Farmácia

Comparação de métodos de extração de DNA a partir de fontes escassas

Marjorye Cristina Dias Silva

São Paulo
2018

Marjorye Cristina Dias Silva

Comparação de métodos de extração de DNA a partir de fontes escassas

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Presbiteriana
Mackenzie como requisito parcial à obtenção
do grau Bacharel em Farmácia.

Orientador: Eder de Carvalho Pincinato

São Paulo

2018

Marjorye Cristina Dias Silva

Comparação de métodos de extração de DNA a partir de fontes escassas

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Presbiteriana
Mackenzie como requisito parcial à obtenção
do grau Bacharel em Farmácia.

Aprovada em

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eder de Carvalho Pincinato
Universidade Presbiteriana Mackenzie

Prof.^a Dra. Ana Paula Pimentel Costa
Universidade Presbiteriana Mackenzie

Prof.^a Dra. Patrícia Fiorino
Universidade Presbiteriana Mackenzie

RESUMO

A fim de avaliar a eficiência, nível de contaminação, toxicidade, qualidade e quantidade da extração de DNA a partir de amostras escassas, como fios de cabelo e raspado bucal, os métodos de extração com fenol-clorofórmio, extração com cloreto de lítio, Kit Wizard® Genomic DNA Purification e método de Lahiri & Nurnberger otimizado por Salazar, foram comparados. A utilização desse tipo de amostra tem aumentado, por não serem invasivas, mais facilmente obtidas e resultarem em boa quantidade e qualidade de ácido desoxirribonucleico. A análise quantitativa e a pureza do material genético extraído foi avaliada com espectrômetro NanoDrop® e fluorimetria (“QuantiFluor® dsDNA System”). Em seguida, a eficiência da extração foi avaliada a partir da reação em cadeia da polimerase (PCR), que amplificou o gene da β -globina humana, posteriormente visualizado através da análise eletroforética em gel de agarose a 2% e transiluminador de luz azul. Analisando os resultados, constatou-se que a extração pelo método de Lahiri & Nurnberger otimizado por Salazar apresentou melhor eficiência e vantagem frente aos demais métodos estudados, já que foi o único em que foi possível visualizar o gene ampliado, além de ser considerado o método mais prático, rápido e atóxico.

Palavras-chave: DNA; extração; amostra escassa.

ABSTRACT

In order to evaluate the efficiency, level of contamination, toxicity, quality and quantity of DNA extraction from scarce samples, such as hair samples and buccal scraping, phenol-chloroform extraction methods, lithium chloride extraction, Kit Wizard® Genomic DNA Purification and Lahiri & Nurnberger's method optimized by Salazar, were compared. The use of this type of sample has increased because they are not invasive, more easily obtained and result in good quantity and quality of deoxyribonucleic acid. Quantitative analysis and purity of the extracted genetic material was evaluated with NanoDrop® spectrometer and fluorimetry ("QuantiFluor® dsDNA System"). Then, the extraction efficiency was evaluated from the polymerase chain reaction (PCR), which amplified the human β -globin gene, later visualized through the electrophoretic analysis in 2% agarose gel and blue light transilluminator. Analyzing the results, it was found that the extraction by the method of Lahiri & Nurnberger optimized by Salazar presented better efficiency and advantage over the other methods studied, since it was the only one in which it was possible to visualize the enlarged gene, besides being considered the most practical method, fast and non-toxic.

Keywords: DNA; extraction; scarce samples.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Componentes do mix para PCR e seus respectivos volumes utilizados.....	17
Quadro 2	Resultados da extração com Cloreto de Lítio.....	20
Quadro 3	Resultados da extração com Fenol-clorofórmio.....	21
Quadro 4	Resultados da extração pelo método de Lahiri & Nurmberger....	21
Quadro 5	Resultados da extração com “Wizard® Genomic DNA Purification Kit”.....	22

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Resultados da extração com Cloreto de Lítio.....	20
Gráfico 2	Resultados da extração com Fenol-clorofórmio.....	21
Gráfico 3	Resultados da extração pelo método de Lahiri & Nurmberger	22
Gráfico 4	Resultados da extração com “Wizard® Genomic DNA Purification Kit”	22

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Amostras.....	13
Figura 2	Protocolo rápido do “Wizard® Genomic DNA Purification Kit”.....	15
Figura 3	Protocolo rápido do “QuantiFluor® dsDNA System”.....	19
Figura 3	Visualização dos fragmentos de β -globina humana como controle-positivo, seguido do gene de β -globina do DNA de raspado bucal.....	23

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	PROBLEMA DE PESQUISA.....	10
1.2	JUSTIFICATIVA.....	10
1.3	OBJETIVO.....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	10
3	METODOLOGIA	12
3.1	AMOSTRAGEM.....	12
3.2	TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO.....	13
3.2.1	Extração com fenol-clorofórmio	13
3.2.2	Extração com cloreto de lítio	14
3.2.3	“Wizard® Genomic DNA Purification Kit”	14
3.2.4	Método de Lahiri & Nurnberger	15
3.3	ANÁLISE QUANTITATIVA E PUREZA.....	16
3.3.1	NanoDrop®	16
3.3.2	Fluorimetria	16
3.4	AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO DO DNA.....	17
3.4.1	PCR	17
3.4.2	Análise eletroforética	18
4	ASPECTOS ÉTICOS	19
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	24
	REFERÊNCIAS	25
	ANEXOS	30

1. INTRODUÇÃO

1.1. PROBLEMA DE PESQUISA

Este projeto de pesquisa buscou esclarecer qual método de extração de DNA é mais eficiente e vantajoso para amostras com escassa quantidade de material genético, dentre eles foram estudados: extração com fenol-clorofórmio, extração com cloreto de lítio, kit comercial (Promega) e método de Lahiri & Nurnberger.

1.2. JUSTIFICATIVA

A comparação da eficiência dos métodos de extração de DNA e caracterização das vantagens e desvantagens de cada um dos métodos analisados fornece informações que levam a uma escolha mais coerente do método em relação a atividade a ser desenvolvida, otimizando a execução e os gastos do projeto.

1.3. OBJETIVO

Comparar quatro métodos de extração de DNA e definir, dentre esses, qual o método mais eficiente e vantajoso para extração de DNA, a partir de amostras de fios de cabelo e raspado bucal.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Nos dias atuais, com o avanço das pesquisas genômicas, a necessidade de amostras de DNA de boa qualidade, aumenta. Esta amostra de DNA é mais comumente obtida através de células nucleadas do sangue periférico, considerado um método invasivo e que pode apresentar obstáculos para obtenção (LE MARCHAND *et al.*, 2001).

No entanto, existem métodos alternativos, que utilizam amostras biológicas de outras origens, que não a de sangue periférico. A obtenção de DNA genômico a partir de células da cavidade bucal e de fios de cabelo, por exemplo, são mais simples e rápidas de se obter, não-invasivas e, além de apresentarem um ótimo custo-efetivo, também resultam em uma quantidade razoável de DNA com ótima pureza (HANSEN *et al.*, 2007).

Além da fonte do material biológico, estas pesquisas genômicas também devem levar em consideração a qualidade do DNA extraído. Alguns métodos

utilizados para a extração do material genético podem prejudicar a sua amplificação *in vitro* por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), devido à baixa quantidade e/ou qualidade desse material (VILANOVA-COSTA *et al.*, 2008).

Dentre os fatores que podem prejudicar a obtenção de DNA de boa qualidade e quantidade, destacam-se: a utilização de fortes solventes e possibilidade de arraste para a fase de amplificação, excessivas etapas de manipulação, longos períodos de digestão com proteinase K e duração excessiva de desenvolvimento do método (VILANOVA-COSTA *et al.*, 2008).

Observa-se, na literatura, uma busca contínua na melhoria dos métodos de extração de DNA para que os interferentes acima citados sejam substituídos ou minimizados.

Um exemplo clássico da utilização de fortes solventes é a técnica de extração com fenol-clorofórmio:álcool isoamílico, que consiste na desnaturação das proteínas da amostra com fenol tamponado e clorofórmio, baseando-se na propriedade de hidrofobicidade das proteínas, ou seja, sua afinidade pelos solventes orgânicos aplicados. A utilização do álcool isoamílico previne a formação de espuma durante o processo de agitação da mistura, facilitando a separação da fase orgânica e da fase aquosa, onde o DNA se mantém (EMBRAPA, 2007).

Uma alternativa à utilização do fenol seria a aplicação da técnica de extração com cloreto de lítio. Esta técnica combina, simultaneamente, a lise das células e a extração do DNA da amostra em um único passo, utilizando cloreto de lítio (LiCl) em alta concentração molar (RAHA, MERANTE, PROTEAU, REED, 1990). O DNA extraído, assim como o obtido pela técnica fenol-clorofórmio é de alta qualidade, podendo ser utilizado para amplificação por PCR, com a vantagem de ser mais simples e rápida (HONG, COURY, POLNE-FULLER, GIBOR, 1992).

A fim de otimizar o tempo de extração, substituir o uso de solvente e diminuir as etapas neste processo, surgiram os kits comerciais, como o Kit Wizard® Genomic DNA Purification, da empresa Promega. Este kit é estruturado em quatro fases: uma primeira fase da purificação, onde ocorre a lise das células, seguida da remoção das proteínas celulares por salting-out, que precipita as proteínas, mas não age sobre o DNA; uma terceira fase, onde ocorre a digestão do RNA pela RNAase e, por fim, o DNA genômico é concentrado e precipitado com isopropanol (PROMEGA, 2017).

Utilizando-se da mesma ideia, a de substituir o solvente orgânico por um sal e otimizar o processo de extração, o pesquisador SALAZAR *et al.* (1997) propôs uma adaptação metodológica da técnica descrita por Lahiri Nurnberger (1991), com o objetivo de minimizar o volume de material utilizado (TAS, 1851) (EVERSON *et al.*, 1993) (GARG *et al.*, 1996) (ZEILLINGER *et al.*, 1993) (SIAFAKAS *et al.*, 1995). Este método, além de não utilizar enzimas para a digestão das proteínas, descreve um procedimento atóxico e eficiente para a extração de DNA de amostras biológicas diversas.

Como visto, as pesquisas por métodos alternativos de extração de DNA que possam ser rápidos e práticos, livres de contaminação e de baixa toxicidade surgem com uma grande velocidade e estudos comparativos devem ser desenvolvidos para avaliar se tais métodos resultam em um material genético de qualidade e quantidade suficientes para aplicação na prática diária do laboratório.

3. METODOLOGIA

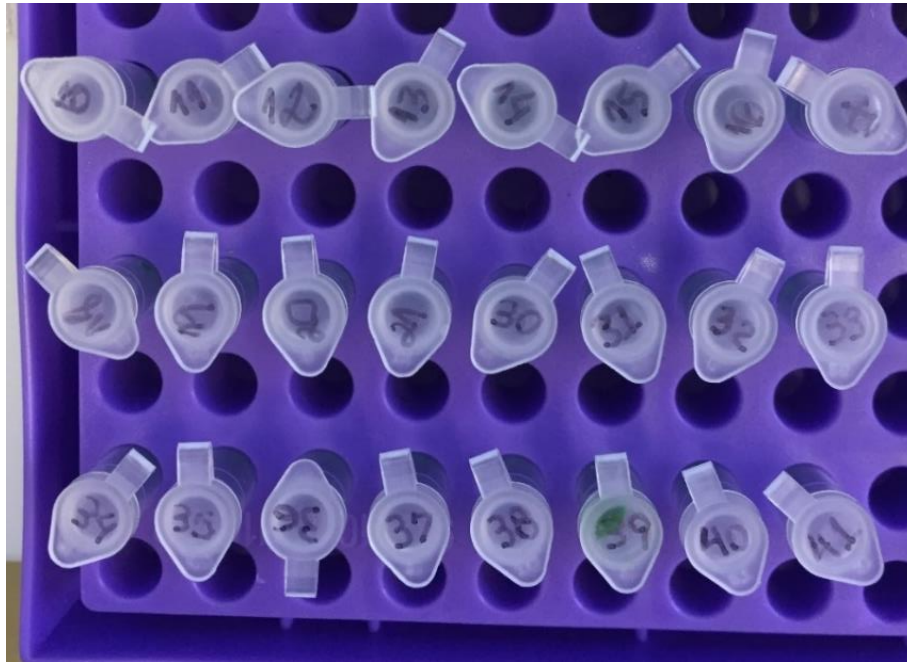
3.1. AMOSTRAGEM

O projeto obteve 24 amostras da análise em triplicata de cada método, totalizando 12 amostras de raspado bucal e 12 amostras de fios de cabelo.

As amostras de raspado bucal foram obtidas com auxílio de “Swab” umedecido em solução de cloreto de sódio a 0,9% “LBS®”. Após a coleta, o “Swab” foi mergulhado por 10 segundos nas respectivas soluções de lise de cada método de extração, contidas em um tubo do tipo “Eppendorf” devidamente identificado.

Foram coletados 5 fios de cabelos para cada amostra por extração manual com auxílio de pinça e somente foram utilizados os fios retirados com os respectivos bulbos capilares. Estes bulbos foram imediatamente transferidos para um tubo do tipo “Eppendorf” devidamente identificado.

Figura 1: Amostras.



Fonte: elaborado pelo autor.

3.2. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO

3.2.1. Extração com fenol-clorofórmio

Foram adicionados 500µL de tampão de lise Tris-base, 50µL de SDS 10% e 10µL de proteinase K ao um tubo do tipo “Eppendorf”, seguido de incubação por três horas a 56°C no equipamento de banho sorológico microprocessado (Quimis®). Posteriormente, adicionou-se 560µL de solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), seguido de agitação por inversão por três minutos, centrifugação a 10.00rpm por 10 minutos a 4°C, na centrífuga refrigerada (Quimis®) e separação do sobrenadante resultante para um novo tubo com auxílio de uma micropipeta, para que o volume exato fosse detectado. Ao novo tubo, adicionou-se 10µL de RNase, seguido de incubação a 37°C por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se volume igual de uma solução de clorofórmio-álcool isoamílico ao volume obtido de sobrenadante somado com o volume de RNase adicionado, seguido de centrifugação por 10 minutos, a 4°C e 10.000rpm e transferência do sobrenadante com auxílio de micropipeta, detectando-se o volume exato. Sabendo-se o volume exato de sobrenadante, adiciona-se o dobro de volume de isopropanol ao tubo e 1/3 do volume de sobrenadante de acetato de sódio 3M, seguido de

resfriamento a -20°C por uma hora, centrifugação por 10 minutos, a 4°C e 10.000rpm e descarte do sobrenadante por inversão. Aguardou-se a secagem com o tubo invertido sobre papel de filtro a temperatura ambiente com posterior adição com 50 μL de água MiliQ. O material foi conservado a -20°C (ISOLA *et al.*, 1994).

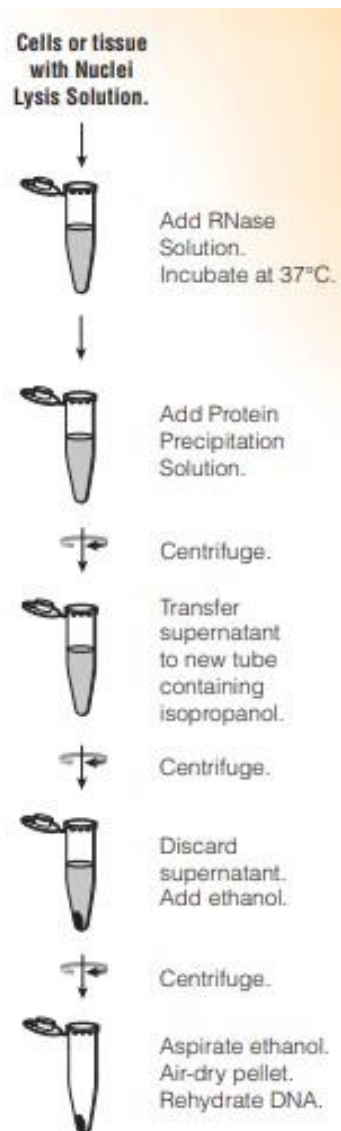
3.2.2. Extração com cloreto de lítio

Foram acrescentados ao Eppendorf 790 μL de tampão de lise Tris base e 10 μL de proteinase K, seguido de encubação em banho-maria a 55°C por 12 horas. Centrifugou-se a 12.000rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo com 400 μL de cloreto de lítio 7,5M. O novo tubo foi submetido a resfriamento no congelador por 30 minutos e, em seguida, centrifugado a 14.000rpm por 15 minutos. Um novo tubo do tipo Falcon com 2mL de etanol absoluto recebeu o sobrenadante e foi resfriado a -20°C por 24 horas. Após um dia, centrifugou-se a 2.000rpm por 15 minutos e 200 μL do sobrenadante foi transferido para um tubo Eppendorf com 1mL de etanol 70%, seguido de centrifugação a 10.000rpm por 5 minutos. A secagem foi realizada a temperatura ambiente e, em seguida, adicionou-se 100 μL de água MiliQ.

3.2.3. “Wizard® Genomic DNA Purification Kit”

Em tubo do tipo “Eppendorf”, foi adicionado 600 μL de solução de lise nuclear à frio e 17,5 μL de proteinase K. Em seguida, a amostra foi encubada por uma noite a 55°C com agitação suave. No dia seguinte, foi adicionado 3 μL de solução de RNase e homogeneizou-se. A amostra foi novamente encubada por 30 minutos a 37°C . Adicionou-se 300 μL de solução de precipitação de proteína com posterior agitação no vórtex e resfriamento no gelo por 5 minutos. Centrifugou-se a 16.000rpm por 4 minutos e o sobrenadante obtido foi transferido para um novo Eppendorf, que continha 600 μL de isopropanol a temperatura ambiente. O novo tubo foi agitado por inversão e submetido a centrifugação a 16.000rpm por um minuto. O sobrenadante foi removido, adicionou-se 600 μL de etanol 70% a temperatura ambiente e homogeneizou-se. A amostra foi centrifugada a 16.000rpm por um minuto e em seguida, o tubo foi invertido para completa eliminação do sobrenadante por 15 minutos. Decorrido este tempo, reidratou-se a amostra com 100 μL de solução de reidratação de DNA por uma hora a 65°C . A amostra foi conservada em freezer (PROMEGA, 2010).

Figura 2: Protocolo rápido do “Wizard® Genomic DNA Purification Kit”.



Fonte: PROMEGA (2010).

3.2.4. Método de Lahiri &Nurnberger

Foi adicionado 300µL de solução aquosa de iodeto de sódio 6M ao Eppendorf e agitado por 20 segundos no vórtex. Adicionou-se 600µL de solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), agitou-se no vórtex por 20 segundos e centrifugou-se a 12.000rpm por 5 minutos. Em um novo tubo, adicionou-se 400µL de isopropanol e 300µL do sobrenadante. Encubou-se por 3 minutos a temperatura ambiente e centrifugou-se a 12.000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi eliminado por inversão completa do tubo e o sedimento foi lavado com 500µL de isopropanol 37%. A amostra foi centrifugada a 12.000rpm por 5 minutos e em seguida, o tubo foi

invertido para completa eliminação do sobrenadante. Aguardou-se 20 minutos a temperatura ambiente para a secagem do sedimento, adicionou-se 100µL de tampão Tris base para ressuspensão do DNA e encubou-se por 10 minutos a 56°C. A amostra obtida foi conservada a -20°C (LAHIRI, NURNBERGER, 1991).

3.3. ANÁLISE QUANTITATIVA E PUREZA

3.3.1. NanoDrop®

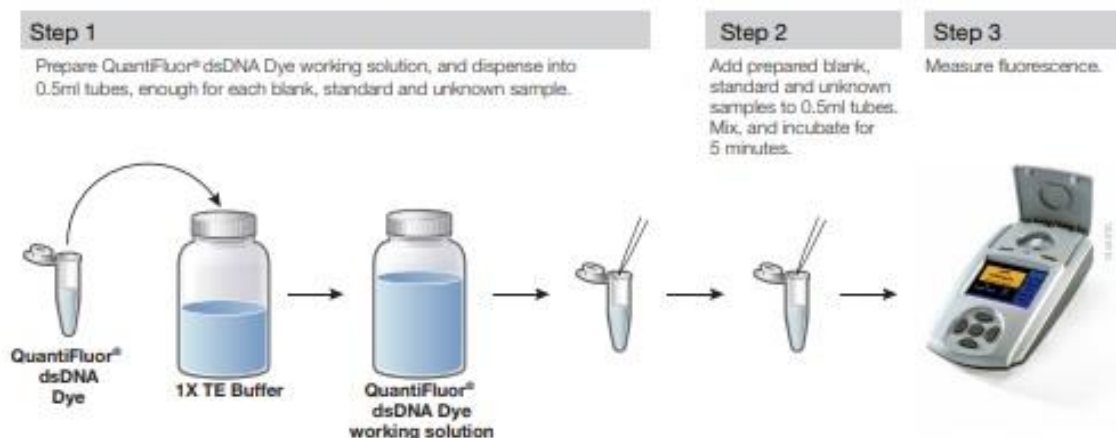
A quantidade e qualidade do DNA foi determinada por espectrômetro NanoDrop®, utilizando-se 1µL do material extraído (UFSM, 2014). A razão considerada para análise da pureza das amostras foi a 260/280nm, que deve apresentar-se entre 1,8 e 2,0. Valores menores de 1,8 demonstram possível contaminação da amostra com proteínas e solventes, capazes de absorver luz em 280nm (LEHNINGER *et al.*, 2004).

3.3.2. Fluorimetria

O kit utilizado foi o “QuantiFluor® dsDNA System” (Promega) e as amostras quantificadas no “Quantus fluorometer” (Promega)

Figura 3: Protocolo rápido do “QuantiFluor® dsDNA System”.

Single-Tube Format Protocol



Fonte: PROMEGA (2017).

De início, o tampão TE foi diluído 20 vezes, ao homogeneizar 300µL do tampão com 5.700µL de água MiliQ, resultando em 6.000µL de tampão TE 1x. Em seguida, 3.000µL de “solução de trabalho” foram preparados a partir da diluição de 15µL da solução QuantiFluor® dsDNA Dye com 2.985µL de tampão TE 1x. Posteriormente, em microtubos de 500µL, foram preparados os “controle-negativo”, com a adição de 200µL da “solução de trabalho”, e “controle-positivo”, com a adição de 2µL do DNA padrão do kit e 200µL da “solução de trabalho”. E, por fim, as amostras analisadas foram preparadas a partir de 1µL do material, 99µL de tampão TE 1x e 100µL da “solução de trabalho”.

As amostras foram submetidas à leitura no fluorímetro “Quantus fluorometer” e as concentrações foram dadas em ng/µL.

3.4. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO DO DNA

3.4.1. PCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada com o intuito de amplificar o segmento de 480 pares de bases do gene da β-globina humana para posterior visualização por meio de eletroforese em gel de agarose com a utilização do mix GoTaq®Flexi Buffer Green e a GoTaq® Hot Start Polymerase descritos na Tabela 1.

Quadro 1: Componentes do mix para PCR e seus respectivos volumes utilizados.

Composição do mix	Volume utilizado	Concentração
5x green GoTaq®Flexi Buffer	10 µL	1x
Primer β sense	1 µL	1uM
Primer β antisense	1 µL	1uM
GoTaq® Hot Start Polymerase (5u/µL)	0,25 µL	1,25u
DNA	1µL (FC)/ 5µL (RB)	15-40ng
MgCl ₂ – 25 mM	4 µL	2mM
dNTTP's	1 µL	0,2mM de cada
H ₂ O	31,75µL (FC)/ 27,75µL (RB)	
Volume final em cada tubo	50 µL	

Fonte: elaborado pelo autor.

Após a finalização do mix, as amostras foram submetidas à amplificação no termociclador T100® (Bio-Rad) sob as seguintes condições:

1. 95°C por dois minutos para ativação da Taq polimerase;
2. 30 ciclos a 95°C por 30 segundos para desnaturação;
3. 60°C por 50 segundos para anelamento;
4. 72°C por cinco minutos para extensão final.

Seguido deste ciclo programado, as amostras foram submetidas à análise eletroforética.

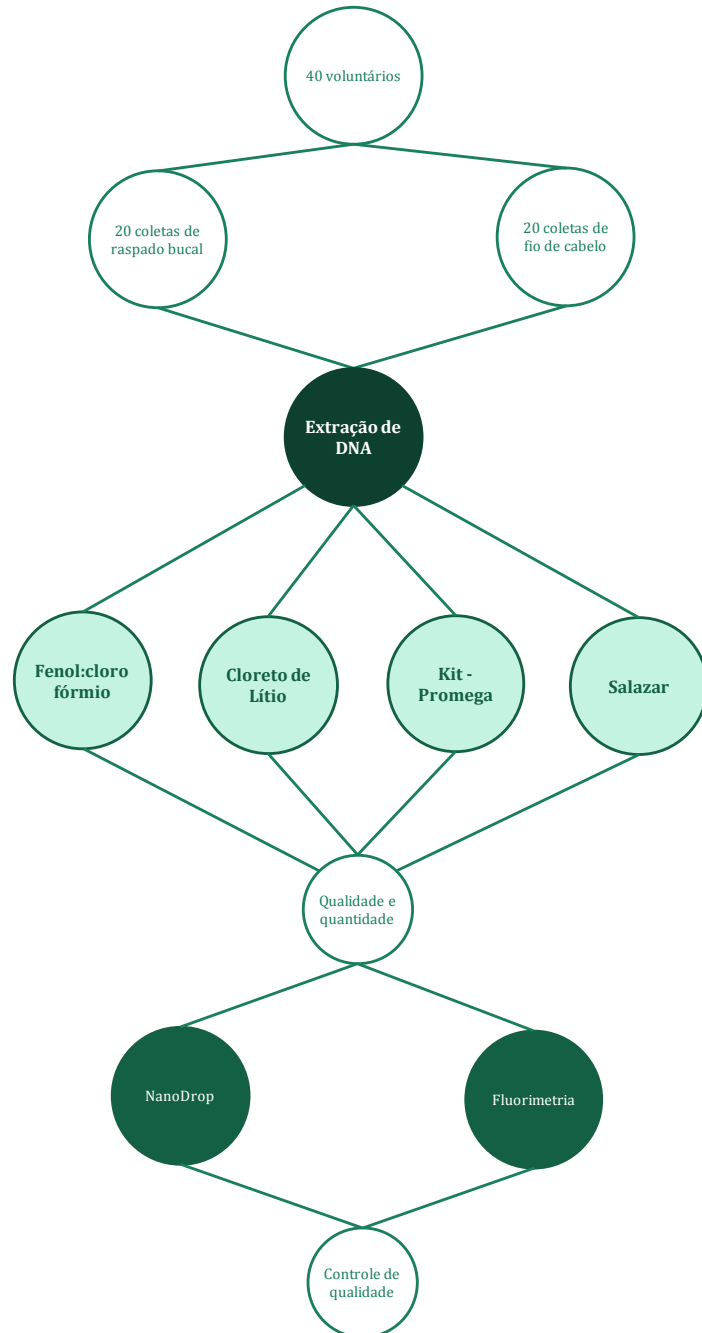
3.4.2. Análise eletroforética

A eletroforese, utilizada com objetivo de separar os fragmentos de DNA a partir de seus tamanhos e carga, utilizou gel de agarose a 2%, feito a partir da diluição de 3g de agarose em 150mL de tampão TBE 0,5x, seguido de aquecimento no forno microondas até que a solução ficasse homogênea e transparente. Ao atingir aproximadamente 50°C, a solução foi vertida no molde específico e, em seguida, um pente com 10 dentes foi colocado no gel, produzindo poços no gel. Após o resfriamento do gel, observado a partir da turvação e resistência da agarose, o molde foi transferido para a cuba de eletroforese horizontal LCH 7x8 (Loccus) e adicionou-se volume de tampão TBE 0,5x suficiente até a total imersão do gel, atingindo nível de pelo menos 1mm acima, seguido da retirada do pente.

O controle positivo utilizado foi feito com 1µL de β-globina, 2µL de corante SYBR Safe e 2µL de tampão. E as amostras foram preparadas com 10µL de corante SYBR Safe e 40µL do material extraído. Em seguida, foi feita a aplicação do controle e das amostras no gel com auxílio de uma micropipeta.

A corrida eletroforética foi feita a 130W por 30 minutos com o “Eletrophoresis power supply” (Loccus) e visualização, no transiluminador de luz azul.

Figura 4: Descrição esquemática resumida da metodologia proposta.



Fonte: elaborado pelo autor.

4. ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade sob o código CAAE nº 0048.0.272.000-10.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as metodologias avaliadas, a extração otimizada por Salazar obteve as maiores concentrações de DNA extraído, apesar de apresentar menor pureza, fato esperado, pois não há etapas para digestão proteica dos componentes celulares (Quadro 4 e Gráfico 3).

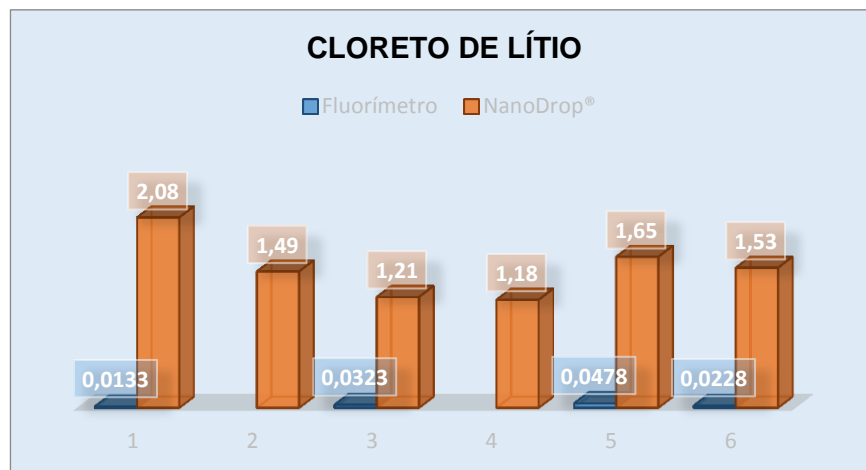
As demais metodologias, apesar de apresentarem boa pureza do material extraído, apresentam concentrações baixíssimas ou nulas de DNA.

Quadro 2: Resultados da extração com Cloreto de Lítio.

CLORETO DE LÍTIO	Fluorímetro (ng/ μ L)	NanoDrop (260/280)
C I	0,0133	2,08
C II	-	1,49
C II	0,0323	1,21
R I	-	1,18
R II	0,0478	1,65
R III	0,0228	1,53

Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 1: Resultados da extração com Cloreto de Lítio.



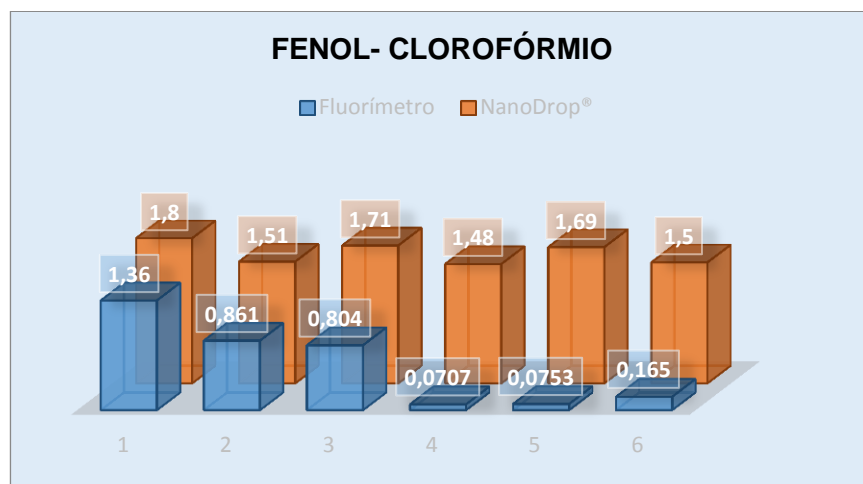
Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro 3: Resultados da extração com Fenol-clorofórmio.

FENOL-CLOROFÓRMIO	Fluorímetro (ng/μL)	NanoDrop (260/280)
C I	1,36	1,8
C II	0,861	1,51
C II	0,804	1,71
R I	0,0707	1,48
R II	0,0753	1,69
R III	0,165	1,5

Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 2: Resultados da extração com Fenol-clorofórmio.



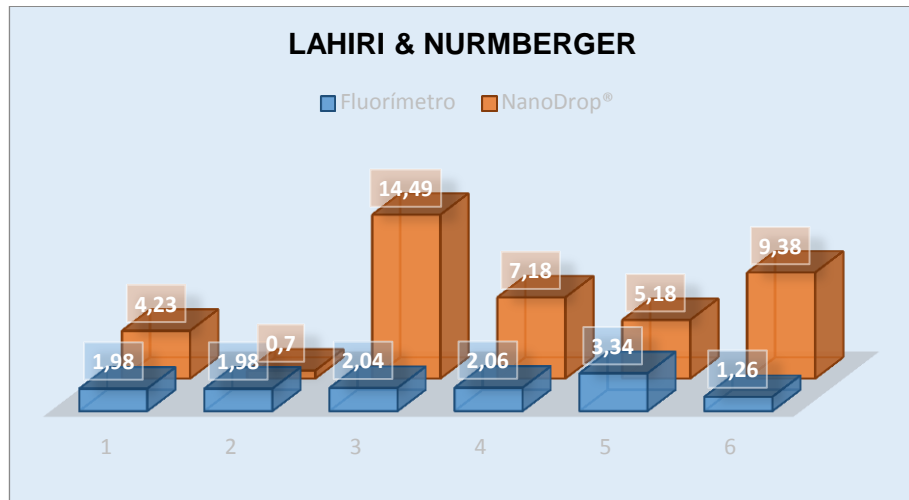
Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro 4: Resultados da extração pelo método de Lahiri & Nurmberger.

LAHIRI & NURMBERGER	Fluorímetro (ng/μL)	NanoDrop (260/280)
C I	1,98	4,23
C II	1,98	0,7
C II	2,04	14,49
R I	2,06	7,18
R II	3,34	5,18
R III	1,26	9,38

Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 3: Resultados da extração pelo método de Lahiri & Nurmberger.



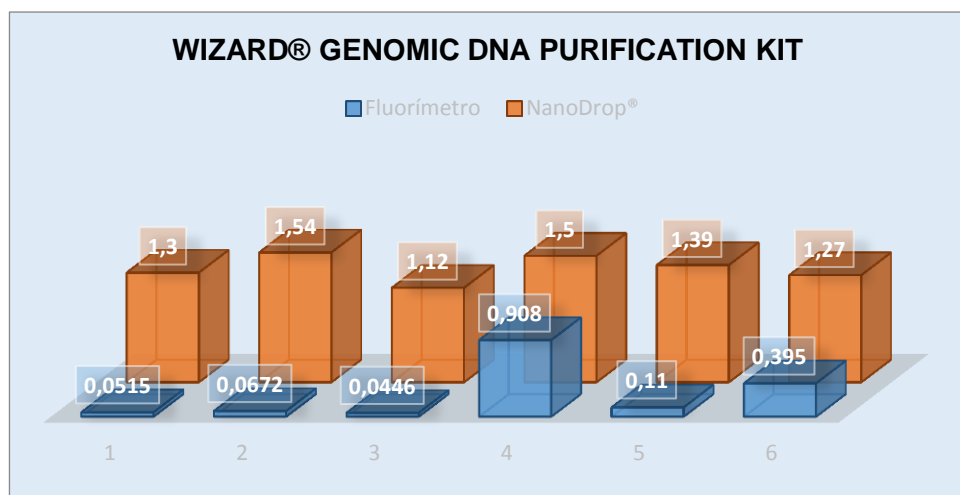
Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro 5: Resultados da extração com “Wizard® Genomic DNA Purification Kit”.

WIZARD®	Fluorímetro (ng/μL)	NanoDrop (260/280)
C I	0,0515	1,3
C II	0,0672	1,54
C II	0,0446	1,12
R I	0,908	1,5
R II	0,11	1,39
R III	0,395	1,27

Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 4: Resultados da extração com “Wizard® Genomic DNA Purification Kit”.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Durante a análise eletroforética, apenas foi possível visualizar os fragmentos do gene da β -globina, posteriormente ampliados por PCR, da extração otimizada por Salazar de apenas uma das amostras de raspado bucal (Figura 5). A ausência de fragmentos das demais amostras durante a amplificação por PCR pode ser justificada pela baixa concentração de material extraído, baixa quantidade e/ou qualidade de amostra utilizada, utilização de fortes solventes, possibilidade de arraste para a fase de amplificação, excessivas etapas de manipulação, longos períodos e digestão com proteinase K e longa duração da metodologia.

Figura 5: Visualização dos fragmentos de β -globina humana como controle-positivo, seguido do gene de β -globina do DNA de raspado bucal extraído pelo método de Lahiri & NurMBERGER.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Além de bom desempenho analítico, o método de Lahiri & Nurnberger otimizado por Salazar, demandou de menor tempo para execução, entre uma hora e uma hora e meia, enquanto o Kit da Promega demanda de dois dias, extração com cloreto de lítio, três dias e extração com fenol-clorofórmio, de um dia. Além disso, não apresenta alto custo, como o Kit utilizado.

Em conjunto com o Kit da Promega, a extração otimizada por Salazar aparentou ser mais facilmente executada e ambas apresentam menor toxicidade, por não utilizarem fortes solventes, como fenol e clorofórmio.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se, por fim, que apesar dos métodos de extração com fenol-clorofórmio, extração com cloreto de lítio e Kit Wizard® Genomic DNA Purification serem mais comumente utilizados, demonstraram ser de menor eficiência e vantagem frente a extração pelo método de Lahiri & Nurnberger otimizado por Salazar para amostras escassas.

Apesar da quantidade de amostra ser considerada parâmetro principal para escolha do método de extração, a pureza também é parâmetro imprescindível a ser considerado, por este motivo o método de Lahiri & Nurnberger deve ser continuamente analisado, adaptado e comparados para que, além de boas concentrações obtidas, a amostra apresente alta pureza e possa ser largamente utilizada nas áreas médica, biotecnológica e forense.

REFERÊNCIAS

ANSARI, A; TALAT, N; JAMIL, B; HASAN, Z; RAZZAKI, T; DAWOOD, G, *et al.* *Cytokine gene polymorphisms across tuberculosis clinical spectrum in Pakistani patients.* **PLoS ONE.** 2009;4:e4778.

BAREA, Jaqueline A.; PARDINI, Maria Inês M. C.; GUSHIKEN, Tsieko. *Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR).* **Rev. bras. hematol. hemoter.** 2004;26(4):274-281.

BECK, H; SEMISCH, M; CULMSEE, C; PLESNILA, N; HATZOPOULOS, A. *Egr-1 regulates expression of the glial scar component phosphacan in astrocytes after experimental stroke.* **Am J Pathol.** 2008;173:77-92.

BJORKLUND, P; LINDBERG, D; AKERSTROM, G; WESTIN, G. *Stabilizing mutation of CTNNB1/beta-catenin and protein accumulation analyzed in a large series of parathyroid tumors of Swedish patients.* **Mol Cancer.** 2008;7:53.

BROBERG, K; HUYNH, E; SCHLAWICKE ENGSTROM, K; BJORK, J; ALBIN, M; INGVAR, C; *et al.* *Association between polymorphisms in RMI1, TOP3A, and BLM and risk of cancer, a case-control study.* **BMC Cancer.** 2009;9:140.

CK-12. **Gene Cloning - Advanced.** 2017. Disponível em: <<http://www.ck12.org/book/CK-12-Biology-Advanced-Concepts/section/9.2/>>. Acesso em: 14 mar. 2017.

CK-12. **The Polymerase Chain Reaction - Advanced.** 2017. Disponível em: <<http://www.ck12.org/book/CK-12-Biology-Advanced-Concepts/section/9.3/>>. Acesso em: 14 mar. 2017.

DHALIWAL, Anandika. **Extração e purificação de DNA.** 2013. Tradutor Antonielle Vieira Monclaro. Disponível em: <<http://www.labome.com.br/method/DNA-Extraction-and-Purification.html>>. Acesso em: 15 mar. 2017.

EVERSON, RB; MASS, MJ; GALLAGHER, JE; MUSSER, C; DALZELL, J. *Extraction of DNA from cryopreserved clotted human blood.* **Biotechniques** 1993;15:18–20.

FERNANDES, José Veríssimo et al. **Comparação de três protocolos de extração de DNA a partir de tecido fixado em formol e incluído em parafina.** 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442004000300003>. Acesso em: 14 mar. 2017.

GARG, U.; HANSON, N.; TSAI, M; ECKFELDT, J. *Simple and rapid method for extraction of DNA from fresh and cryopreserved clotted human blood.* **Clin. Chem.** 42 (4):64647-648,1996.

GHATAK, Analysis S.; MUTHUKUMARAN, Rajendra B.; NACHIMUTHU, Senthil K. *A simple method of genomic DNA extraction from human samples for PCR-RFLP.* **Journal of Biomolecular Techniques.** 2013;24:224–231.

HANSEN, TV; SIMONSEN, MK; NIELSEN, FC; HUNDRUP, YA. *Collection of blood, saliva, and buccal cell samples in a pilot study on the Danish nurse cohort: comparison of the response rate and quality of genomic DNA.* **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2007;16:2072–2076.

HONG, Yong-Ki; COURY, Daniel A.; POLNE-FULLER, Miriam; GIBOR, Aharon. *Lithium chloride extraction of DNA from the seaweed *Porphyra perforata* (Rhodophyta).* **Journal of Phycology.** 1992;28(5): 717–720.

ISOLA, J.; DE VRIES, S.; CHU, L. et al. *Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples.* **Am J Pathol**, v. 145, n. 6, p. 1301-1308, Dec. 1994.

Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal. Universidade Federal de Santa Maria. **Nanodrop.** 2014. Disponível em: <<http://w3.ufsm.br/biorep/index.php/normas-de-uso/nanodrop>>. Acesso em: 14 mar. 2017.

LAHIRI, D; NURNBERGER, J. *A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies.* **Nucleic Acids Res.** 19 (19): 5444, 1991.

Le MARCHAND, L; LUM-JONES, A; SALTZMAN, B; VISAYA, V; NOMURA, AM; KOLONEL, LN. *Feasibility of collecting buccal cell DNA by mail in a cohort study.* **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2001; 10:701–703.

LEE, S; KIM, J; JANG, S; KIM, D; DO, Y; SUH, G, *et al.* *Clinical features and mutations in the ENG, ACVRL1, and SMAD4 genes in Korean patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia.* **J Korean Med Sci.** 2009;24:69-76.

LEHNINGER, L. *Lehninger Principles of Biochemistry.* W. H. Freeman & Co, 4 ed., pp. 1100, 2004.

LENZ, Guido. **Métodos Fotométricos.** 1997. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/biofisica/Bio10003/Metfoto.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2017.

PROMEGA. **QuantiFluor® dsDNA System Technical Manual.** 2017. Disponível em: <<https://www.promega.com.br/resources/protocols/technical-manuals/101/quantifluor-dsdna-system-protocol/>>. Acesso em: 15 mar. 2017.

PROMEGA. **Wizard® Genomic DNA Purification Kit: Instructions for use of products A1120, A1123, A1125 AND A1620..** 2010. Disponível em: <<https://www.promega.com.br/-/media/files/resources/protcards/wizard-genomic-dna-purification-kit-quick-protocol.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2017.

RAHA, Sandeep; MERANTE, Frank; PROTEAU, Gerald; REED, Jutta K. *Simultaneous isolation of total cellular RNA and DNA from tissue culture cells using phenol and lithium chloride.* **Gene Analysis Techniques.** 1990;7(7):173-177.

SAIKI, R. K. et al. *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.* **Science**, v. 230, p. 1350-4, 1985.

SALAZAR, Luis A.; HIRATA, Mario H; MACHADO, Marcos O.; CAVALLI, Selma A.; GUZMÁN, Elizabeth C. R.; NGUYNEN, Nga Y.; HIRATA, Rosario D. C. *DNA extraction from clotted human blood as an alternative method for genotyping studies.* **RBAC.** 1997;29(3):151-154.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANNIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. ed. **New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1992.

SANGUINETTI, C. J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A. J. *Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels*. **BioTechniques**, v. 17, n. 5, p. 914-21, 1994.

SENA OLIVEIRA, Maria Cristina de. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/48295/1/LivroProtMolecular.pdf>>. Acesso em: 14 mar. 2017.

SIAFAKAS, N; BURNETT, L; BENNETTS, B; PROOS, A. *Nonenzymatic extraction of DNA from blood collected into serum separator tubes [Technical Brief]*. **Clin Chem** 1995;1045-6.

SIMMONS, G; GLYNN, S; KOMAROFF, A; MIKOVITS, J; TOBLER, L; HACKET, J, *et al. Failure to confirm XMRV/MLVs in the blood of patients with chronic fatigue syndrome: a multi-laboratory study*. **Science**. 2011;334:814-7.

TAS, S. *Purification of DNA from clotted blood [Technical Brief]*. **Clin Chem** 1990;36:1851.

TERMINE, N; GIOVANNELLI, L; RODOLICO, V; MATRANGA, D; PANNONE, G; CAMPISI, G. *Biopsy vs. Brushing: comparison of two sampling methods for the detection of HPV-DNA in squamous cell carcinoma of the oral cavity*. **Oral Oncology**. 2012. 870-875.


VILANOVA-COSTA CAST, NOBREGA, JB; CRUZ, RSAD. *Extração e purificação de DNA em material biológico parafinado*. **Estudos** 2008; 35 (1/2):143-152.

YOON, H; CHIN, H; NA, K; CHAE, D; KIM S; JEOUN, U, *et al. Association of angiotensin II type 2 receptor gene A1818T polymorphism with progression of*


immunoglobulin A nephropathy in Korean patients. J Korean Med Sci. 2009;24:S38-43.

ZEILLINGER, R; SCHNEEBERGER, C; SPEISER, P. *A simple method for isolation of DNA from blood clot suited for use in PCR. Biotechniques* 1993;15:202–3.

ANEXO



UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
ANEXO 7



DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DE CONTEÚDO

Declaro ter atualizado do conteúdo do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado e que cumprimos as determinações da banca examinadora na versão final entregue do Trabalho de Conclusão de Curso. Esta cópia preenchida e assinada deverá ser entregue no prazo determinado pelo professor da disciplina de TCC anexada à cópia digitalizada da versão final do trabalho, no Moodle da disciplina.

Nome do Orientador: Eden de C. Pimcinato DRT: 1134997
 Assinatura: Eden de C. P. Data: 12/12/18
 Nome do Aluno: Marysny C. Dias Silva - Matrícula: 31533687
 Assinatura: Marysny C. D. Data: 12/12/18
 Título final do trabalho Comparação de métodos de extração de DNA a partir de fontes escaras.