

Padronização da Técnica de Extração de DNA de Células de Mucosa Oral Com NaCl: Aplicação no Estudo do Gene PROP1

***Milena Garcia Abrão
Ana Elisa C. Billerbeck
Mirian Yumie Nishi
Suemi Marui
Berenice B. de Mendonça***

Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular — LIM/42, Disciplina de Endocrinologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), SP.

*Recebido em 01/03/05
Revisado em 29/07/05
Aceito em 09/08/05*

RESUMO

A extração de DNA de leucócitos periféricos é o meio de obtenção de DNA mais amplamente utilizado. Entretanto, a coleta de células a partir de swab oral, geralmente utilizada em medicina forense, é útil para obtenção de amostras de DNA de recém-nascidos, crianças e de pacientes que vivem em locais onde a coleta e o envio da amostra de sangue não é factível. Nosso objetivo foi padronizar a técnica de extração de DNA a partir de swab de células de mucosa oral utilizando NaCl, comparando-a com a extração pelo kit comercial. Para testar a qualidade do DNA, amplificamos os 3 éxons do gene *PROP1* de 12 pacientes com hipopituitarismo hipofisário em DNA extraído simultaneamente de células da mucosa oral e de sangue periférico. A amplificação de fragmentos maiores foi testada em DNA de mucosa oral de indivíduos normais utilizando-se *primers* do éxon 10 do gene do *FSHR* (1000pb) e do gene *CYP21A2* (1200pb). Ambos os métodos resultaram em DNA de boa qualidade, permitindo o estudo molecular. O método por NaCl mostrou-se mais rápido e barato, resultando em maior quantidade de DNA quando comparado ao kit comercial. Nos pacientes com hipopituitarismo, identificamos a mutação delAG301-302 em 6 pacientes, 4 em homozigose (33%) e 2 em heterozigose (16%), e a mutação G51A em heterozigose em uma paciente. Em conclusão, padronizamos a técnica de extração de DNA de células de swab oral com NaCl que, quando comparada à extração com kit comercial, apresentou menor custo e maior rapidez, indicando ser esta uma forma confiável de obtenção de DNA para estudos genéticos. (Arq Bras Endocrinol Metab 2005;49/6:978-982)

Keywords: Extração DNA; Swab oral; *PROP1*

ABSTRACT

Standardization of DNA Extraction With NaCl From Oral Mucosa Cells: Application in *PROP1* Gene Study.

DNA extraction of peripheral leukocytes is the most broadly used technique to obtain DNA. However, cell collection from an oral swab, frequently used in forensics, is useful to obtain DNA samples, mainly in newborns, children and patients who live far from the collection sites, where blood sample collection and sending is not feasible. Our objective was to standardize DNA extraction from an oral swab, using the NaCl method, comparing it with a commercial kit. To test DNA quality, we amplified the 3 exons of *PROP1* gene of 12 patients with hypopituitarism in DNA obtained from oral cells and peripheral blood cells. Amplification of larger fragments was tested in oral DNA of normal subjects using primers of exon 10 of *FSHR* gene (1000bp) and of *CYP21A2* gene (1200bp). Both methods yielded good quality DNA, allowing the amplification of 3 exons of *PROP1* gene. The NaCl method showed to be faster and less expensive, resulting in a larger amount of DNA when compared to the commercial kit. We identified the delAG301-302 mutation in 6 patients, 4 in homozygous (33%) and 2 in heterozygous (16%) state and G51A mutation in heterozygous state in a single patient. In conclusion,

we standardized the DNA extraction of oral cells with NaCl, which presented lower costs and faster results, when compared with the extraction by a commercial kit indicating that DNA from oral swabs are a reliable source for genetic studies. (**Arq Bras Endocrinol Metab** 2005;49/6:978-982)

Keywords: DNA extraction; Oral swab; *PROPI*

O DNA DE BOA QUALIDADE É FUNDAMENTAL para identificar os portadores de mutações para tratamento e aconselhamento genético. A identificação destas mutações em DNA obtido de sangue periférico é um procedimento habitual, entretanto há dificuldades na coleta de sangue em crianças e no encaminhamento das amostras de pacientes e familiares que vivem em locais distantes e de difícil acesso. A coleta de material utilizando células de mucosa oral, rotineiramente empregada em medicina forense, pode ser então uma boa alternativa para obtenção de DNA (1-3). No presente estudo, padronizamos a técnica de extração de DNA em células de mucosa oral com NaCl, técnica essa já utilizada na extração de DNA de sangue periférico (4), e comparamos com um kit comercial. Para avaliar a qualidade do DNA obtido, utilizamos como modelo o estudo do gene *PROPI* em pacientes com hipopituitarismo.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Para padronização do método com NaCl, foram colhidos *swabs* orais de 20 voluntários, funcionários do Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 e de 12 pacientes portadores de hipopituitarismo.

Obtenção do swab Oral: Os voluntários e os pacientes foram orientados a bochechar previamente com 100ml de água destilada e a coleta foi realizada raspando a face interna das bochechas com pequenas escovas citológicas estéreis, fazendo movimentos circulares aproximadamente 30 vezes; as escovas tiveram a porção externa das hastes cortadas e colocadas em microtubos de 2ml. As amostras colhidas foram armazenadas em geladeira por período de 2 a 30 dias antes da extração.

Foram testados e comparados dois diferentes métodos de extração de DNA:

Extração com NaCl: Aos tubos contendo o *swab* foram adicionados 200µl de TES (Tris HCl 10mM pH 7,6; EDTA 1mM; SDS 0,6%) e 5µl de proteinase K (10mg/ml) e incubados por 2h a 42°C. Após a incubação, retirou-se a escova e obteve-se o volume de

250µl aproximadamente, aos quais adicionou-se 42µl de NaCl saturado (6 M), agitando manualmente com vigor. Centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 2 vezes o volume de etanol absoluto. Os tubos foram agitados e centrifugados por 1 minuto a 15.000 x g. O etanol absoluto foi descartado e foi adicionado 1ml de etanol 70%, invertendo-se os tubos diversas vezes para lavar o *pellet*. Os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 15.000 x g e o sobrenadante desprezado. Repetiu-se a lavagem com etanol 70% mais uma vez e, após desprezar o sobrenadante, os tubos permaneceram abertos por 30min para evaporação do etanol residual. O DNA foi dissolvido em 60µl de TE 10:0,1 (Tris HCl 10mM; EDTA 0,1mM). Este volume foi estabelecido após a utilização de volumes progressivos de 20–60µl por ser adequado para obtenção de concentração de DNA em torno de 80ng/µl.

Extração com o Kit comercial DNA isolation kit (Puregene, Genra Systems, Minneapolis, MN, EUA): Em cada tubo contendo os *swabs* foram adicionados 300µl de solução de lise. A seguir, foi adicionado 1,5µl de proteinase K (20mg/ml). As escovas foram retiradas e adicionou-se 100µl de solução de precipitação de proteína. Foram adicionados 300µl de isopropanol 100% e 0,5µl de glicogênio (20mg/ml) e os tubos foram centrifugados a 15.000 x g por 3 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o tubo invertido sobre papel absorvente. Foram adicionados 300µl de etanol 70% para lavar o DNA. Os tubos permaneceram abertos por 15min para evaporação do etanol residual e, a seguir, o DNA foi dissolvido em 20µl de solução de hidratação do DNA. A concentração final de DNA nas amostras foi em torno de 50ng/µl.

As amostras de DNA extraídas pelos dois métodos foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% em TAE (Tris-acetato 0,004 M; EDTA 0,001 M, pH 8,0) contendo brometo de etídio na concentração de 0,5µg/ml de gel e observadas em transiluminador para verificar sua integridade. A concentração das amostras de DNA obtidas pelas duas técnicas foram medidas em espectrofotômetro (Ultrospec III, Pharmacia LKB Biochrom Ltd, Cambridge, Inglaterra) no comprimento de onda de 260nm. A relação 260/280 igual a 1,8 foi utilizada para caracterizar a pureza do material. As amostras ficaram armazenadas a 4°C até sua utilização.

Reação de Polimerização em Cadeia (PCR): Para testar a capacidade de amplificação de diferentes fragmentos, amplificamos os 3 éxons do gene *PROPI* (301pb, 365pb e 512pb), o éxon 10 do gene do receptor de FSH (1.000pb) e um fragmento do gene *CYP21A2* (1.200pb) com primers específicos (tabela 1).

Tabela 1. Primers utilizados para as reações de PCR.

(Éxons)/Gene	Primer Sense	Primer Anti-sense	TH°C	Tamanho Amplicon (pb)
(1) PROP1	GGAAGCAGAGAAATCTCAAGTC	CCAAGGGGTGCTCCAGTC	54	301
(2) PROP1	TGGTCCAGCACCGAGGAG	GCCCAACATTCTATGATAGC	55	365
(3) PROP1	CTATGTCAAGTGTGGGCTCT	TTCTAATCGGTGAGCTGAC	57	512
(8) CYP21A2	TTCAGGCGATTGAGGAAGGC	CAGAGCAGGGAGTAGTCTC	56	1200
(10) FSHR	CTGGATCTGAGATGTTGATTCTA	CCTCTAAGTCATTAGCCAAATA	60	1000

TH: temperatura de hibridação.

RESULTADOS

Amostras extraídas com NaCl: O DNA obtido apresentou padrão de degradação em gel de agarose 1%, porém com formação de bandas > 12.000pb. Estas amostras obtiveram excelente eficiência na amplificação de fragmentos de até 1.200pb utilizando primers do gene *CYP21A2* em apenas 1µl de DNA (figuras 1, 2 e 3; tabela 2).

Amostras extraídas com o Kit comercial: O DNA obtido por este método apresentou menor padrão de degradação em gel de agarose 1% com banda presente > 12.000pb. Fragmentos de 1.000pb do éxon 10 do gene do receptor do FSH foram amplificados demonstrando boa qualidade quando utilizado o volume de 5µl. Mesmo sendo um DNA de melhor qualidade, foi necessário um volume maior nas reações de PCR por apresentar menor concentração. Como o volume final da extração é de 20µl, não é um método econômico quando se trata de amostras importantes e de difícil obtenção (figuras 1, 2 e 3; tabela 2).

Análise molecular: O seqüenciamento direto dos produtos de PCR dos éxons 1, 2 e 3 do gene *PROP1* revelou que a alteração mais freqüente é a deleção de um dinucleotídeo AG: 301–302delAG. Essa deleção cria um *stop codon* na posição 149/150 da proteína e leva à formação de uma proteína truncada. Dos 12 pacientes estudados, 6 apresentaram essa mutação, sendo 2 em heterozigose e 4 em homozigose. Uma paciente apresentou a mutação em heterozigose 152G>C no éxon 2 que leva a uma troca de glicina por alanina na posição 51 (G51A). Em 12 pacientes, amplificamos e seqüenciamos amostras de DNA extraídas de sangue periférico e de *swab* oral extraídas com NaCl, com igual resultado, mostrando a boa qualidade do DNA obtido por este método.

DISCUSSÃO

A extração de DNA de leucócitos periféricos é o meio de obtenção de DNA mais largamente utilizado e tem sido realizada por várias técnicas, sendo que a técnica de extração com fenol-clorofórmio permite obtenção

de DNA de melhor qualidade. Devido à toxicidade deste reagente, atualmente buscam-se alternativas para a extração de DNA de leucócitos periféricos, tendo sido utilizado o NaCl saturado neste estudo (4).

A coleta de células a partir de *swab* oral facilita a obtenção e encaminhamento da amostra, principalmente de recém-nascidos, crianças e pacientes que vivem em locais onde a coleta e o envio da amostra de sangue não é factível.

Com o intuito de padronizar uma metodologia para extração de DNA de *swab* oral para ser aplicada como rotina em nosso laboratório, testamos duas técnicas, sendo uma delas caseira, com NaCl, e a outra comercial (Puregene, Gentra Systems, Minneapolis, MN, EUA), utilizando como modelos de amplificação o gene *PROP1* e o gene *FSHR* em DNA de indivíduos normais e pacientes com hipopituitarismo. O NaCl foi utilizado para extrair o DNA de *swab* de células de mucosa oral por apresentar propriedades químicas de precipitação relativamente semelhantes às do fenol (5). O método caseiro utilizando o NaCl mostrou-se rápido, fácil e barato e resultou num DNA de qualidade, sendo possível a amplificação dos 3 éxons do gene *PROP1*, além de fragmentos de até 1.200pb do *CYP21A2* e 1.000pb do *FSHR*.

Os kits comerciais para extração de DNA são previamente testados e aprovados, geralmente apresentando maior credibilidade em relação aos métodos caseiros, mas muitas vezes são inviáveis devido ao custo elevado. A extração com kit comercial (Puregene, Gentra Systems, Minneapolis, MN, EUA) comparada a extração com NaCl apresentou menor rendimento, maior tempo de execução e custo 2 vezes maior.

Nos pacientes com hipopituitarismo, identificamos a mutação delAG301-302 em 6 pacientes, 4 em homozigose (33%) e 2 em heterozigose (16%), e a mutação G51A em heterozigose em uma paciente.

Em conclusão, padronizamos a técnica de extração de DNA de células de *swab* oral com NaCl que, quando comparada à extração com kit comercial, apresentou menor custo e maior rapidez, indicando ser esta uma forma confiável de obtenção de DNA para estudos genéticos.

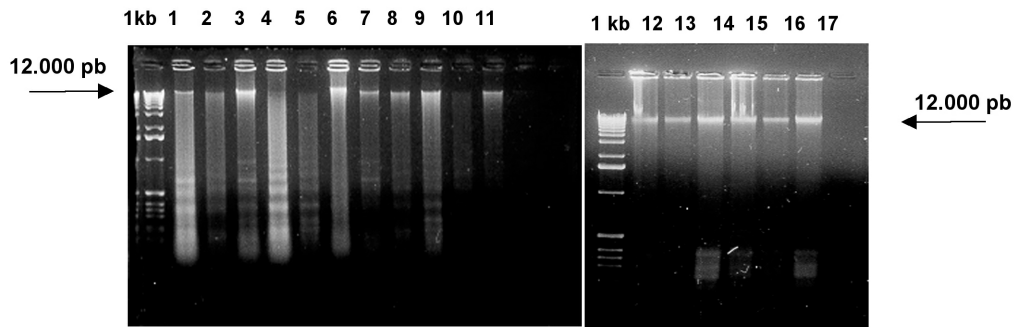


Figura 1. Amostras de DNA dos controles extraídas de swab oral utilizando NaCl (colunas 1-11) ou kit comercial (12-17) em gel de agarose 1%. Observar presença de maior concentração de massa em torno de 12.000pb em ambos os métodos.

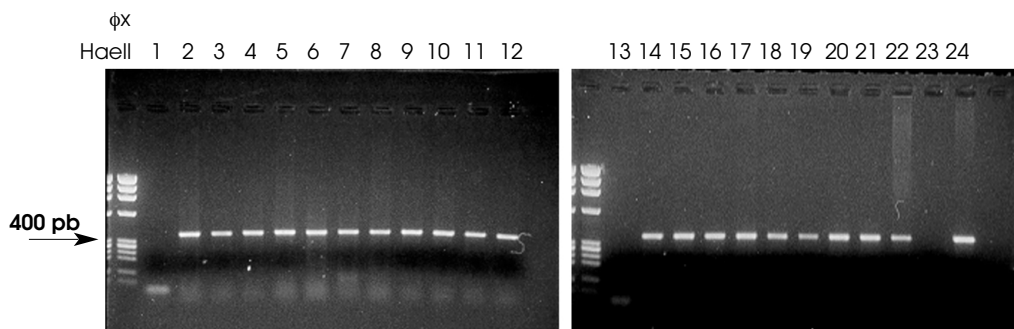


Figura 2. Amplificação do éxon 2 do PROP1 em amostras de DNA de controles extraídas de swab oral com NaCl (colunas 2-12), ou kit comercial (colunas 14-22) e de sangue periférico (coluna 24). Controles negativos da reação (colunas 1, 13 e 23)

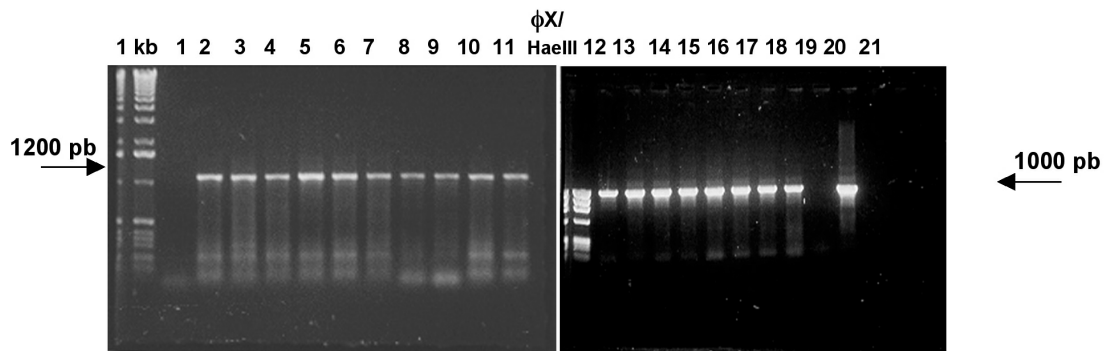


Figura 3. Amplificação de 1.200pb do gene *CYP21A2* em amostras de DNA de controles extraídas de swab oral com NaCl (colunas 2-11), e de 1.000pb do éxon 10 do *FSHR* em amostras de DNA de controles extraídas com kit comercial (colunas 12-19) e sangue (coluna 21). Controles negativos da reação (colunas 1 e 20)

Tabela 2. Comparação dos dois métodos de obtenção de DNA de swab oral.

Método utilizado	Volume final (µl)	Conc. de DNA (ng/µl)	Volume necessário para amplificação (µl)	Tempo de extração do DNA (min)	Custo aprox. para 50 extrações (R\$)
NaCl	60	80	1	160	200
Kit Puregene	20	50	5	240	500

REFERÊNCIAS

1. Lijnen I, Willems G. DNA research in forensic dentistry. **Methods Find Exp Clin Pharmacol** 2001;23(9):511-7.
2. Singer D, Lorente M, Valenzuela A, Lorente J, Alvarez J. Increasing DNA extraction yield from saliva stains with a modified Chelex method. **Forens Sci International** 1996;83:167-77.
3. Sweet D, Lorente M, Lorente J, Valenzuela A, Villanueva E. An improved method to recover saliva from human skin: the double swab technique. **J Forensic Sci** 1997;42:320-2.
4. Miller SA, Dykes DD, Polesky HA. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res** 1988;16(3):1215.
5. Heath EM, Morken NW, Campbell KA, Tkach D, Boyd EA, Strom DA. Use of buccal cells collected in mouthwash as a source of DNA for clinical testing. **Arch Pathol Lab Med** 2001;125:127-33.

Endereço para correspondência:

Berenice B. de Mendonça
Hospital das Clínicas
Laboratório de Hormônios
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 155,
PAMB, 2º andar, Bloco 6
05403-900 São Paulo, SP
Fax: (11) 3069-7519
E-mail: milenaabrao@bol.com.br / beremen@usp.br