

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE COLETA MINIMAMENTE INVASIVOS PARA OBTENÇÃO DE DNA GENÔMICO EM ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS

ANGELITA MILECH¹; CLARICE BRINCK BRUM²; DEISE FARIAS FREITAS²;
FRANCINE MAAGH²; ISABEL OLIVEIRA DE OLIVEIRA³

¹ Universidade Federal de Pelotas – angelitamilech@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – claricebbrum@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – ise.freitas07@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – franbmaagh@hotmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – isabel.ufpel@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O Centro de Pesquisas Epidemiológicos (CPE) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) desenvolve projetos de grande porte, envolvendo o banco de DNA das coortes de nascimentos ocorridos em Pelotas nos anos de 1982, de 1993, de 2004 e de 2015. A partir da coleta deste material, vários estudos são planejados buscando identificar polimorfismos genéticos associados com doenças crônicas, além de investigar marcadores bioquímicos, hormonais, pró-inflamatórios e genéticos e sua interação com fatores ambientais, especialmente hábitos de vida, nas diferentes fases da vida dos participantes.

Estudos em larga escala, como os epidemiológicos, requerem métodos eficientes e convenientes para obtenção de DNA genômico dos sujeitos investigados. A pureza, a integridade, e a concentração de DNA isolados afetam diretamente as taxas de sucesso da genotipagem. Embora o sangue atenda a esses pré-requisitos e seja a fonte tradicional de DNA genômico, este é com freqüência substituído por DNA obtido a partir de células presentes na cavidade bucal. A principal vantagem da obtenção de DNA bucal pela simplicidade do método de coleta, que é minimamente invasivo, eliminando o desconforto associado à coleta de sangue. Além disso, é aplicável em crianças, idosos e pessoas com deficiência, garantindo altas taxas de participação nos estudos (STRECKFUS, 2002).

A cavidade bucal fornece várias fontes potenciais de isolamento de DNA. O DNA isolado da saliva é uma mistura de DNA genômico do doador, DNA mitocondrial e DNA da microflora oral. O DNA microbiano reduz a qualidade e utilidade do DNA salivar como modelo para análises do DNA humano. Apesar das preocupações com baixa produtividade e variabilidade entre as amostras, estudos recentes relataram que a coleta de saliva ainda fornece DNA suficiente para a genotipagem (ABRAHAM et al., 2012; SUN et al., 2014; DURDIAKOVA et al., 2012; BAHLO et al., 2010).

Com isso diferentes protocolos foram desenvolvidos para a obtenção de DNA de origem bucal a fim de aperfeiçoar esse procedimento. Nossa objetivo nesta análise foi comparar o rendimento e qualidade do DNA de dois métodos minimamente invasivos de obtenção de DNA: saliva total e swab bucal.

2. METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado no laboratório do Centro de Pesquisas Epidemiológicas (CPE) da Universidade Federal de Pelotas – UFPel. A população alvo deste estudo faz parte da segunda geração dos participantes da coorte de 1993 de Pelotas RS, ou seja, descendentes dos integrantes da coorte. No período de coleta das amostras as crianças acompanhadas de seus pais ou responsáveis foram convidadas a comparecer à clínica do CPE, onde foram informados do propósito do estudo e convidados a assinar um termo de

consentimento livre e esclarecido. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas.

Nesse estudo foi utilizada uma sub-amostra de 351 crianças do total de 1162 que compareceram à clínica do CPE. A amostra incluiu 173 amostras de saliva total e 18 % ($n=178$) das amostras nas quais foi utilizado um swab bucal, sorteadas aleatoriamente pelo programa estatístico. No primeiro grupo de amostras foi utilizado o kit comercial Oragene • DNA (OG-500) de autocoleta indicado para crianças acima de 4 anos e adultos. No segundo grupo, a coleta foi realizada com o auxílio de um swab bucal fornecido pelo kit comercial Oragene • DNA (OGR-575) de coleta assistida recomendado para crianças menores de 4 anos de idade.

A obtenção do DNA foi realizada pelo método de extração orgânica, o qual consiste em três etapas principais. Primeiramente as amostras são incubadas em banho-maria por 1h e 30 min à 50°C, adiciona-se purificador (PT-L2P) fornecido pelo kit para que ocorra a lise celular e remoção de lipídeos. Em seguida, com o auxílio da proteinase K é promovida a degradação de proteínas, removendo-as do extrato celular. Após, é adicionado álcool absoluto gelado para purificação da amostra. Como o DNA não é solúvel em álcool, há o agrupamento dos filamentos tornando-os visíveis, precipitando-os. É realizada uma centrifugação na velocidade de 12.500 rpm. O sobrenadante é descartado, sendo posteriormente realizadas lavagens com álcool 70%. Por fim, é adicionado solução de tris-EDTA (TE) para eluição do DNA extraído.

A quantificação das concentrações de DNA foi realizada em espectrofotômetro (Nanovue™) com leituras de absorbâncias individuais de 230 nm, 260nm e 280nm, além de correção de *background* com leitura em 320nm. Foram obtidas também as leituras das relações 260/280nm e 260/230 nm. Por fim, foi realizado teste estatístico não paramétrico Wilcoxon (Mann-Whitney) em software STATA 12.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 173 crianças que fizeram a coleta de saliva total tinham idade média de 6 anos e 2 meses, já as crianças que realizaram a coleta através de swab bucal tinham idade média de 2 anos e 4 meses. Na tabela 1 abaixo, é apresentada a análise comparativa referente à quantidade e à qualidade de DNA obtido pelos distintos métodos.

Tabela 1: Análise comparativa sobre a obtenção de DNA a partir de swab bucal e de saliva total de crianças pertencentes a 2ª geração da coorte de 93, Pelotas RS.

Conc DNA	N	Média ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Erro padrão	IC95%	Valor de p
saliva	173	0,31	0,02	(0,27; 0,34)	< 0,001
swab	178	0,19	0,01	(0,16; 0,22)	
RAT260/280					
saliva	173	1,77	0,01	(1,75; 1,79)	= 0,001
swab	178	2,24	0,12	(2,01; 2,48)	
RAT260/230					
saliva	173	1,05	0,04	(0,96; 1,14)	= 0,881
swab	178	1,07	0,14	(0,79; 1,35)	

Conc DNA= concentração de DNA, N= número de amostras,
IC95% = intervalo de confiança 95%

A coleta de DNA da saliva total representa uma das melhores alternativas para uso em estudos genéticos em grande escala (ABRAHAM et al., 2012; HANSEN et al., 2007; KONI et al., 2011; ROGERS et al., 2007) por que a amostra de saliva é obtida por autocoleta usando um procedimento não invasivo e indolor que é ideal para uso em crianças. Isto explica as taxas de participação mais altas em comparação com a coleta de métodos que utilizam sangue venoso (HANSEN et al., 2007; PEPLIES et al., 2010). Um estudo recente de amostras de saliva de crianças, no entanto, sugeriu possíveis diferenças no rendimento de DNA da saliva coletada em diferentes idades (KONI et al., 2011). Os resultados apresentados na Tabela 1 demonstram que o rendimento de DNA diferiu estatisticamente ($p= 0,001$) entre os dois métodos de coleta, confirmando também as observações de estudos anteriores de menor rendimento de DNA obtidos de swabs bucais comparados à saliva total de crianças (KONI et al., 2011; ZHENG et al., 2001). Uma justificativa seria o fato da descamação epitelial da mucosa oral aumentar com a idade isso pode significar que amostras de saliva de indivíduos mais jovens contêm menos células (GASSO et al., 2014).

Além da idade dos indivíduos a extração, incluindo os reagentes utilizados, podem ter afetado as taxas de concentração e pureza das amostras de DNA. No entanto, o fato de termos usado kits de coleta do mesmo fabricante Oragene™ contendo solução estabilizadora e o mesmo protocolo de extração de DNA para isolar amostras de cada um dos dois métodos de coleta, nos permitem sugerir que o próprio método de coleta da saliva total, e não as soluções de isolamento associadas, foi o principal responsável pelo rendimento superior de DNA.

A pureza do DNA, principalmente avaliada pela contaminação protéica, e a integridade são afetadas pelo método de coleta. Já a integridade, contaminação orgânica e com álcool, são influenciadas pelo método de purificação empregado na obtenção do DNA. Amostras com RAT A 260/280nm de 1,80 - 2,00 são referenciadas como relativamente livre de contaminantes e valores mais elevados para a RAT A260/230nm indicam menor contaminação por álcool (HANSEN et al., 2007). Observando os valores de quantidade e qualidade de DNA na tabela 1, para ambos os métodos, fica claro que as amostras com baixa concentração média de DNA tendem a ter níveis elevados de RAT A260/280nm e foram coletadas com swab, provavelmente refletindo baixas concentrações de material celular humano e altos níveis de contaminação no material coletado. Em contraste, amostras de saliva total tiveram índice próximo ao aceitável para a RAT A260/280 nm e maior concentração de DNA. Em relação a RAT A 260/230 nm os métodos não diferem estatisticamente ($p= 0,881$) porém, os valores são inferiores ao recomendado, indicando possível contaminação com resíduos de álcool. Estes resultados estão de acordo com o estudo de ROGERS et al. (2007) que compararam rendimento e a qualidade de saliva total usando os diferentes kits de coleta Oragene, cytobrush e swab bucal.

4. CONCLUSÕES

Tendo em vista os aspectos observados, podemos inferir que a saliva total é o melhor método de obtenção de DNA de origem bucal, devendo sempre ser o primeiro a ser oferecido para obtenção de amostras em crianças. Entretanto, a idade da criança é um fator limitante, pois muitas vezes o uso do swab bucal é o único método aplicável.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM J.E, MARANIAN M.J, SPITERI I, RUSSELL R, INGLE S, LUCCARINI C, EARL H.M, PHAROAH P.P, DUNNING A.M, CALDAS C. Saliva samples are a viable alternative to blood samples as a source of DNA for high throughput genotyping. **BMC Med Genomics** 5:19, 2012.

BAHLO M, STANKOVICH J, DANOVY P, et al. Saliva-derived DNA performs well in large-scale, high-density single-nucleotide polymorphism microarray studies. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**.19(3):794–8, 2010.

DURDIAKOVA J, KAMODYOVA N, OSTATNIKOVA D, VLKOVA B, CELEC P. Comparison of different collection procedures and two methods for DNA isolation from saliva. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**.50(4):643–7, 2012.

GASSO P, PAGEROLS M, FLAMARIQUE I, et al. The effect of age on DNA concentration from whole saliva: Implications for the standard isolation method. **American Journal of Human Biology**.26(6):859–62, 2014.

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**;16:2072–2076, 2007.

KONI AC, SCOTT RA, WANG G, BAILEY ME, PEPLIES J, BAMMANN K, PITSLADIS YP. DNA yield and quality of saliva samples and suitability for large-scale epidemiological studies in children. **International Journal of Obesity** 35: S113–S118, 2011.

PEPLIES J, FRATERMAN A, SCOTT R, RUSSO P, BAMMANN K. Quality management for the collection of biological samples in multicentre studies. **European Journal of Epidemiology**. 25(9):607–17, 2010.

ROGERS NL, COLE SA, LAN HC, CROSSA A, DEMERATH EW. New saliva DNA collection method compared to buccal cell collection techniques for epidemiological studies. **American Journal of Human Biology**, 19:319–326, 2007.

SUN F, REICHENBERGER EJ. Saliva as a source of genomic DNA for genetic studies: Review of current methods and applications. **Oral Health Dent Manag**.13(2):217–22, 2014.

STRECKFUS CF, BIGLER LR. Saliva as a diagnostic fluid. **Oral Diseases** 8: 69–76, 2002.

ZHENG S, MA X, BUFFLER PA, SMITH MT, WIENCKE JK. Whole genome amplification increases the efficiency and validity of buccal cell genotyping in pediatric populations. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 10:697–700, 2001.