



EXTRAÇÃO NÃO-INVASIVA DE DNA DE “*Equus caballus*”: UMA AVALIAÇÃO DE MÉTODOS

GUSTAVO AUGUSTO LACORTE¹, ISABELA DE MACEDO GOMES DIAS², MARIA RAQUEL SANTOS CARVALHO³

¹ Laboratório de Genética Humana e Médica – ICB – UFMG, E-mail: lacorte@icb.ufmg.br

² Doutoranda em Genética – ICB - UFMG

³ Profa. Adjunto de Genética – ICB - UFMG

RESUMO - O avanço da genética molecular contribui muito para estudos de melhoramento animal, ao permitir a obtenção de importantes informações. A extração de DNA é um passo importante e pode ser realizada por diversos métodos inclusive não-invasivos que se mostram de custo e operacionalidade mais atrativos. Foram comparados cinco métodos de extração a partir de amostras de pêlo e células de mucosa oral (swab). Os métodos baseados em Chelex 100 apresentaram maior rendimento. Extrações a partir de swab apresentaram melhores resultados em relação às de pêlo, sendo mais viáveis, apesar de serem mais caras.

PALAVRAS-CHAVE: Extração de DNA, método não-invasivo, swab, amostras de pêlo

NONINVASIVE DNA EXTRACTION OF *Equus caballus*: AN EVALUATION OF METHODS

ABSTRACT - Molecular genetics has been a powerful aid in animal breeding. DNA extraction is an important step and can be done by several methods, including some noninvasive ones, more attractive in costs and easiness of execution. It was compared five DNA extraction methods applied to samples of hair shafts and oral mucosa cells (swab). Those methods based in Chelex 100 performed were better than others. Oral mucosa cell DNA extraction was somewhat more expensive but produced more DNA than the hair shafts.

KEYWORDS: DNA extraction, swab, hair shafts, noninvasive methods

INTRODUÇÃO

Até pouco tempo, o ganho genético em animais domésticos através da seleção para características quantitativas de interesse econômico, era feito utilizando-se apenas o fenótipo, pois, pouco se conhecia do genótipo dos indivíduos. O avanço da genética molecular tem contribuído muito para a área de melhoramento ao permitir o acesso direto ao genótipo dos organismos em estudo, permitindo averiguação mais precisa da estrutura genética populacional e da variabilidade genética. O grande ganho fornecido por estas metodologias foi sem dúvida a seleção assistida por marcadores (Dekkers, 2002).

Uma etapa importante do processo de identificação do genótipo dos indivíduos é a extração do DNA. Existem na literatura vários métodos de extração de DNA de mamíferos (Morin, 1996). Dentre eles, os métodos não-invasivos têm se mostrado atrativos por serem de custo e dispêndio de tempo reduzidos, de fácil coleta e estocagem das amostras (Valderrama, 1999). Entretanto, a quantidade de DNA obtida por tais métodos pode ser baixa (Taberlet, 1996; Vigilant, 1999), sendo a genotipagem possível apenas por meio de amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR).

Na literatura existem várias publicações sobre métodos de extração de DNA. Muitas são baseadas em kits comerciais, de custos relativamente elevados. Não foram encontrados estudos comparando métodos de extração de baixo custo, aplicáveis à amostras de material biológico obtidas por métodos não-invasivos de coleta.

No presente estudo foram descritos os resultados da comparação, em termos de rendimento e custos, de cinco métodos de extração de DNA de amostras de pêlo e mucosa oral.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados cinquenta pêlos (com o bulbo) da região da crina, células da mucosa oral (swab), além de amostras de sangue de dois indivíduos do Centro de Equitação do Xapuri em Belo Horizonte, MG.

As amostras de pêlo foram estocadas em envelopes individuais e conservadas em local seco à temperatura ambiente até o momento da extração. As amostras de sangue foram congeladas em

tubos do tipo *vacutainer* em presença de anticoagulante EDTA. As células da mucosa oral foram congeladas em 10 mM Tris e 1mM EDTA (TE). As extrações das amostras foram realizadas três dias após a coleta.

Para cada extração foram utilizados cinco pêlos cortados, deixando-se um comprimento de apenas 0,5 cm acima do bulbo. As células da mucosa oral foram ressuspensas por agitação leve e a solução foi dividida entre os tubos para a extração. Antes do início dos processos de extração centrifugou-se e descartou-se o TE. A extração de DNA a partir do sangue periférico foi feita conforme o protocolo de Miller et al (1988).

Cinco métodos foram escolhidos, em função do baixo custo e fácil operacionalidade, resumidamente descritos a seguir:

- (1) Fervura da amostra por 8 minutos em água bidestilada, deionizada, estéril;
- (2) Extração em TTE (1mM Tris pH 8,0; Triton X-100 1% ; 0,5 M EDTA pH 8,0) que consiste em colocar os bulbos em 50µL de solução de TTE seguido de fervura por 10 minutos, centrifugação e troca de tubo;
- (3) Extração com 0,2 M NaOH, 0,04 M Tris pH 7,5; Adição de 5µL de NaOH, agitação leve, segunda do tamponamento com 45 µL de Tris pH 7,5 ;
- (4) Chelex-100 5%: adição de 50 µL de Chelex 100 a 5% seguido de fervura por 8 minutos; sendo as amostras centrifugadas antes do uso;
- (5) digestão com proteinase K (20 mg/ml) seguida de extração com Chelex-100 5% e adição de 50 µL de Chelex 100, 1 µL de proteinase K, seguido de incubação a 56 °C por aproximadamente 16 horas. Fervura por 8 minutos, sendo as amostras centrifugadas antes do uso.

Todos os métodos foram padronizados de modo a gerarem um volume final de solução de 60 µL.

Cada processo de extração foi repetido três vezes. As amostras foram testadas pela amplificação por PCR do *locus* LEX31, um microssatélite de *Equus caballus*. Amplificações de amostras extraídas de sangue foram usadas como controle positivo. Os produtos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida, corados por prata.

Cada método foi avaliado em termos de dispêndio de tempo e material, rendimento da reação e presença de amplificação inespecífica, comparados entre si e com o controle (amostras de DNA dos mesmos indivíduos, extraídas a partir de células sanguíneas pelo método de precipitação salina).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta uma síntese dos resultados. A melhor amplificação foi sempre obtida com o sangue periférico. Dentre os métodos não-invasivos, o maior rendimento foi com o DNA extraído a partir das células da mucosa oral, para todos os protocolos de extração testados, com exceção do protocolo 3, observando-se maior rendimento no protocolo 5. Para pêlo, o protocolo 4 se mostrou mais eficiente. Não houve amplificação, para ambos os métodos de coleta no protocolo 3.

O custo de extração de amostras de células da mucosa oral foi superior às amostras de pêlo devido a um maior gasto de material com a coleta das amostras. Em relação aos protocolos, o de número 5 além de ter sido o mais eficiente, não foi o mais caro, sendo que, o maior custo foi atribuído ao número 2, devido a utilização de um número maior de microtubos de centrifuga e ponteiras.

O tempo gasto (1 hora) foi semelhante para os protocolos de 1 a 4, diferindo muito do protocolo 5 (17 horas). A diferença se deve ao tempo necessário para digestão com a Proteinase K.

Devido ao baixo rendimento em DNA obtido por estes métodos, a quantificação das amostras torna-se inviável, o que dificulta a padronização das PCR, pois geralmente há bastante variação de rendimento entre as amostras. Outro problema associado à baixa quantidade de DNA é o risco de não-amplificação dos dois alelos presentes nos indivíduos, de tal forma que os heterozigotos acabam sendo classificados como homozigotos (*allele drop out*; Taberlet, 1996).

Os métodos baseados em Chelex 100 requerem grande atenção na concentração desta resina na solução de extração, pois o excesso deste reagente pode inibir a reação da PCR. Além disto, é necessário centrifugar as amostras antes de retirar o DNA para a PCR.

A praticidade da coleta no campo torna-se um grande ponto positivo nos métodos de coleta aqui testados, principalmente quando se trabalha com animais silvestres onde o acesso se torna mais difícil. A extração de DNA a partir de pêlo tem a vantagem de não precisar de refrigeração, facilitando o trabalho de campo. Entretanto, o rendimento é muito mais baixo. Os dados aqui obtidos (Tabela 1) fornecem uma base de orientação para escolha de métodos de extração não-invasiva.

TABELA 1. Comparação dos métodos de extração não-invasiva de DNA

Protocolo	Eficácia - pêlo (%)	Eficácia - swab (%)	Tempo médio (h)	Custo relativo*
1	0	33,3	1	1
2	0	66,7	1	1,95
3	0	0	1	1,53
4	33,3	83,3	1	1,01
5	16,7	100	17	1,54

* Nota: Para fins comparativos, estabeleceu-se o valor 1 para o custo do protocolo 1

CONCLUSÕES

A quantidade de DNA obtida a partir de amostras de células da mucosa oral (*swab*) foi maior do que a obtida de bulbo capilar. Os protocolos baseados na utilização de Chelex 100 se mostraram mais eficientes, mostrando valores intermediários aos demais. Os custos das amostragens de *swab* foram mais elevados, mas em compensação o rendimento foi maior.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DEKKERS, J.C.M.; HOSPITAL F. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, p. 22-32, 2002.
- MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res.** v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.
- MORIN, P.A.; WOODRUFF, D.S. Noninvasive genotyping for vertebrate conservation. In **Molecular Approaches in Conservation Biology**, Oxford University Press, pp. 298-313, 1996.
- TABERLET, P.; GRIFFIN, S.; GOOSENS, B.; QUESTIAU, S.; MANCEAU, V.; ESCARAVAGE, N., WAITS; L.P.; BOUVET, J. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 24, p. 3189-3194, 1996.
- VIGILANT, L. An Evaluation of Techniques for the Extraction and Amplification of DNA from Naturally Shed Hairs, **Biol. Chem.**, v. 380, p. 1329-133, 1999.
- VALDERRAMA, X.; KARESH, W.B.; WILDMAN, D.E.; MELNICK, D.J. Noninvasive methods for collecting fresh hair tissue, **Mol. Ecol. Technical Notes**, v. 8, p. 1749-1752, 1999.