

Padronização da extração de DNA genômico a partir de diferentes fases do leite humano

Standardization of genomic DNA extraction from different phases of human milk

DOI:10.34117/bjdv7n7-504

Recebimento dos originais: 08/06/2021

Aceitação para publicação: 23/07/2021

Fernando Hideki Fuyama

Acadêmico do curso de medicina, Departamento de Medicina, Universidade Estadual de Maringá

Instituição de atuação atual: Departamento de Medicina, Universidade Estadual de Maringá

Endereço :Rua Mandaguari, 212, apto 1101 CEP:87020-230, Maringá, Paraná, Brasil
E-mail: ra107467@uem.br; ferfuyama@gmail.com

Giovana Paola Zaccarias Bemvides

Bacharela em Biomedicina. Mestranda no Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá

Instituição de atuação atual: Universidade Estadual de Maringá

Endereço :Av. Colombo, 5790 - Jd. Universitário. Bloco T20, sala 109. Maringá, Paraná
E-mail: giovanap.zaccarias@hotmail.com

Aleia Harumi Uchibaba Yamanaka

Mestrado em Biociências e Fisiopatologia. Acadêmica de Doutorado no Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá

Instituição de atuação atual: Universidade Estadual de Maringá

Endereço :Rua Tietê, 660. Ed. Grécia, apto 403, Maringá, Paraná.
E-mail: aleiayamanaka@hotmail.com

Christyna Beatriz Genovez Tavares

Mestre em enfermagem. Acadêmica de Doutorado no Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá

Instituição de atuação atual: Universidade Estadual de Maringá

Endereço: Hospital Universitário Regional de Maringá, Av. Mandacaru, 1590 - Parque das Laranjeiras, Maringá - PR, 87083-240
E-mail: cbgenovez@gmail.com

Jesui Vergilio Visentainer

Doutor. Docente – Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá.

Instituição de atuação atual: Universidade Estadual de Maringá

Endereço completo: Av. Colombo, 5790 - Zona 7, Maringá - PR, 87020-900
E-mail: jesuiv@gmail.com

Joana Maira Valentini Zacarias*

Doutora em Biociências e Fisiopatologia. Docente - Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá; Acadêmica Pós-Doutorado - Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá
Instituição de atuação atual: Universidade Estadual de Maringá
Endereço completo: Av. Colombo, 5790 - Zona 7, Maringá - PR, 87020-900
E-mail: jo_maira@hotmail.com ou jmvzsantim2@uem.br

Jeane Eliete Laguila Visentainer

Doutora. Docente - Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia; Departamento de Análise Clínicas e Biomedicina e Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá
Instituição de atuação atual: Universidade Estadual de Maringá
Endereço completo: Av. Colombo, 5790 - Zona 7, Maringá - PR, 87020-900
E-mail: jelvisentainer@uem.br

RESUMO

O leite humano (LH) é um fluido fisiológico composto por eletrólitos, glicídios, glicoproteínas e células nucleadas, como leucócitos e células epiteliais mamárias. Posto isso, o LH pode ser uma fonte viável e segura para a obtenção de DNA comparado à extração pelo sangue periférico, visto que não é necessário realizar o acesso venoso periférico nas puérperas, o que seria incômodo para elas. Dessa forma, devido à escassez de informações na literatura, este trabalho propõe a padronização de técnicas para extração de DNA do LH em suas diferentes fases (colostro, transição e maduro) pelas seguintes metodologias: *Salting out*, Qiagen QIAamp DNA Mini Kit™ e Biopur®. Os resultados das três técnicas de extração produziram um DNA de maior pureza, porém em concentrações mais baixas, ainda que suficientes para processos de amplificação, comparado ao DNA extraído pelo sangue periférico.

Palavras-chave: Leite humano, Pesquisa em Genética, Biologia molecular.

ABSTRACT

The human milk (HM) is a physiologic fluid comprised of electrolytes, glycodes, glycoproteins and nucleated cells, such as leukocytes and breast epithelial cells. Hence, the HM can be a viable and safer source for DNA collection than its extraction from peripheral blood, given the fact that it is not necessary to submit any puerperal subject to peripheral venous access that could cause discomfort to them. Thus, due to lack of papers regarding the issue, this present work proposes the DNA extraction standardization from HM in its distinct maturation phases (Colostrum, transitional milk and mature milk) via the following methodologies: *Salting out*, Qiagen QIAamp DNA Mini Kit™ and Biopur®. The results from the three extraction techniques yielded DNA in higher purity but at lower yet feasible concentrations for amplification procedures compared to the DNA extracted from peripheral blood.

Keywords: Human Milk, Genetic Research, Molecular Biology.

1 INTRODUÇÃO

O leite humano (LH) é um biofluido complexo de composição específica por lactante e variável com tempo de lactação, além de ser crucial para o desenvolvimento do lactente, seja no âmbito nutricional e metabólico como também imunológico e protetor. O leite humano é dividido em três fases de acordo com o tempo de lactação: colostro, transição e maduro.

A fase que consiste o colostro, a qual abrange os primeiros 5 dias de lactação, possui característica mais imunológica do que nutricional, por ser abundante em substâncias protetoras como IgA secretora, lactoferrina, leucócitos, oligossacarídeos do leite humano (HMOs) e fatores de crescimento. Porém, a presença de lactose, ácidos graxos, caseínas são escassos nessa fase, se comparada ao leite maduro (Mosca & Gianni, 2017).

Com o progresso da lactação, o LH atinge a fase de transição após os 5 dias até a segunda semana pós-parto (Ballard & Morrow, 2013), apresentando-se com composição similar ao colostro, porém de natureza mais nutritiva com o aumento progressivo de componentes calóricos como ácidos graxos e lactose (Andreas et al., 2015) e diminuição dos componentes imunológicos. Após a quarta semana pós-parto, o LH pode ser considerado maduro (Mosca & Gianni, 2017; Ballard & Morrow, 2013), o qual assume uma função mais nutritiva do que imunológica e tem a sua composição relativamente estável durante o restante da lactação (Ballard & Morrow, 2013).

Assim, considerando que o LH possui células nucleadas da mãe, como leucócitos, que perfazem 2% das células somáticas (variando de 146.000 leucócitos/mL no colostro até 23.650 leucócitos no leite maduro), lactócitos, células luminiais, mioepiteliais e células-tronco mesenquimais compoendo os 98% restantes (Witkowska-Zimny & Kaminska-El-Hassan, 2017), é possível que o LH seja uma fonte alternativa e não invasiva para a extração de DNA genômico. Como a literatura é escassa no que se refere ao assunto, este trabalho visou padronizar a extração de DNA por diferentes técnicas, a fim de verificar a viabilidade de utilizar esse material em técnicas de Biologia molecular, empregando kits comerciais, como Qiagen™ e Biopur® e a metodologia *in-house* por *salting-out* modificada.

2 DESENVOLVIMENTO

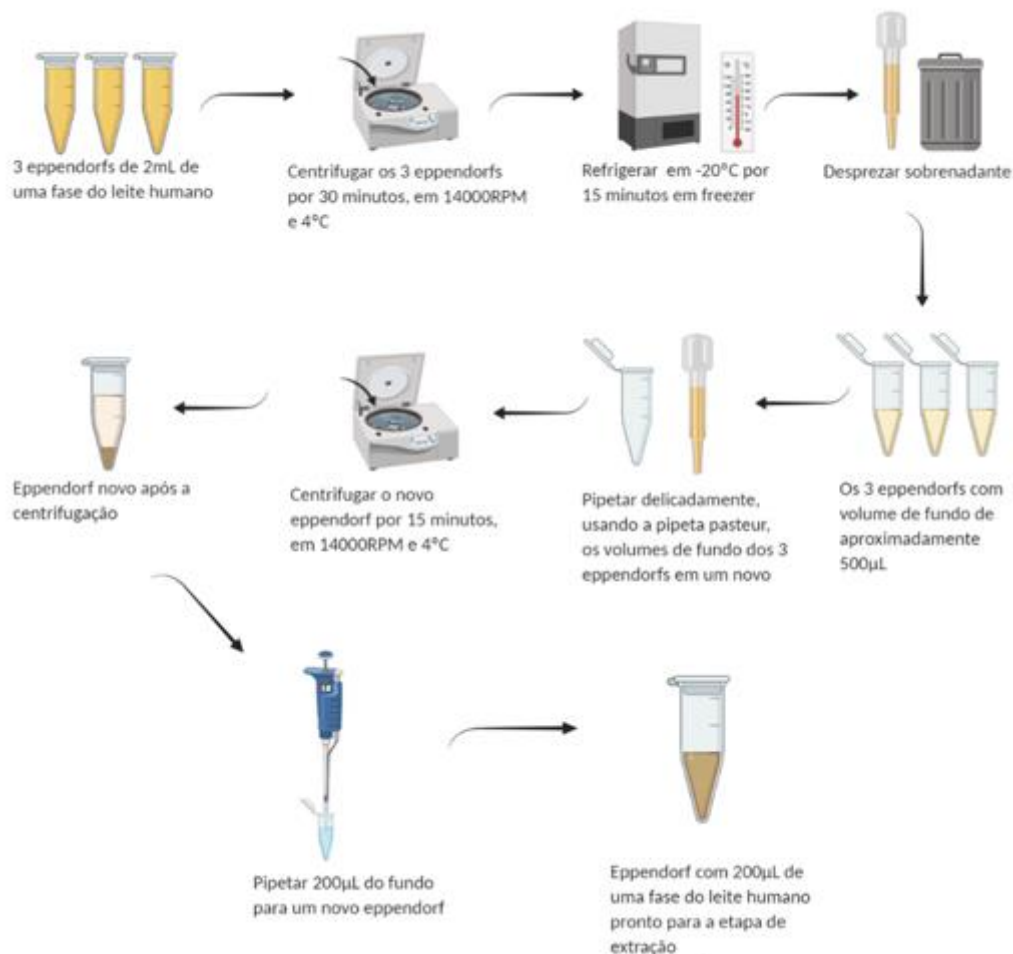
Este estudo foi aprovado pela Comissão de Regulamentação de Atividades Acadêmicas do Hospital Universitário Regional de Maringá (COREA/HUM) com o

parecer número 027/2018 e pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - (COPEP) da Universidade Estadual de Maringá, com o parecer número 2.797.476/2018.

O LH utilizado neste estudo foi obtido a partir do leite de descarte do Banco de Leite Humano (BLH) do HUM, visando a não intervir na rotina de gerenciamento desse recurso no HUM, já que o LH é escasso, devido à demanda para os recém-nascidos hospitalizados ser maior que a oferta disponível pelas doações. Conforme o Ministério da Saúde, o BLH deve assegurar o controle de qualidade do LH ordenhado cru (LHOC), o qual foi utilizado neste projeto, por manter acidez na escala Dornic menor ou igual a 8°D, *off-flavor*, sujidade e cor vermelho/marrom ausentes e possuir creatinina maior ou igual a 250Kcal/L (Ministério da Saúde, 2006).

Para as três metodologias de extração (Qiagen™, Biopur® e *salting-out*), foi necessário empregar 4 etapas: preparação, extração, amplificação e eletroforese. A etapa de preparação consistiu em centrifugar 6mL (3 *eppendorfs* de 2mL) de leite humano de cada fase (coloostro, transição e maduro) por 30 minutos, em 14000RPM e 4 °C, e refrigerar as 9 amostras em -20°C por 15 minutos em freezer, a fim de que a gordura do LH se solidificasse e fosse removida. Prosseguindo a preparação, desprezou-se o sobrenadante, restando o fundo centrifugado (aproximadamente 500µL de cada amostra individual) a ser aliquotado com a pipeta *Pasteur* dos 3 *eppendorfs* para um único *eppendorf* para cada fase do LH. Ao final da preparação, os recipientes individuais correspondentes de cada fase do leite foram centrifugados por 15 minutos, em 14000RPM e 4 °C, a fim de que 200µL do fundo de cada amostra fossem pipetados para novos *eppendorfs*, iniciando a etapa de extração. Um esquema das etapas de preparação está representado na Figura 1.

Figura 1. Esquemática da etapa de preparação do leite humano para a extração de DNA.



Para a etapa de extração, partindo do volume de 200µL da etapa de preparação, utilizou-se o protocolo de *swab* bucal para a metodologia do Qiagen™ e o de sangue total para o Biopur®, os quais produziram DNA viável para a amplificação. Em relação à metodologia de extração de DNA por *salting-out*, a qual foi desenvolvida em 1990 (John e col., 1991) e modificada em 2009 (Cardozo e col., 2009), o material extraído seguindo o protocolo original apresentou-se degradado ou com presença de inibidores da reação de cadeia da polimerase (PCR). A degradação do material foi observada por meio de visualização do material extraído em gel de agarose e a presença de inibidores de PCR pôde ser observada pela ausência de amplificação do material ou amplificação com formação de bandas inespecíficas, visualizados também em gel de agarose.

Logo, o protocolo de *salting-out* modificado em 2009 foi alterado, de modo que a modificação do procedimento de lavagem via RCLB (*red cell lysis buffer*) e a inclusão de substâncias tamponantes e quelantes, como o TRIS-HCl e EDTA (em quantias modestas), respectivamente, pudessem eliminar nucleases e inibidores de PCR, sendo o excesso de cálcio um exemplo (Funes-Huacca et al., 2011), e conservar a estrutura do

DNA por manter o pH do material estável e em condições desfavoráveis para nucleases.

Assim, seguem as 27 etapas do protocolo modificado de *salting-out*:

1. Adicionar 1mL de RCLB (1X)* gelado na amostra de 200 μ L obtidas na etapa de preparação
2. Homogeneizar em vórtex por 10 segundos.
3. Incubar no *thermoshaker*TM em 55 °C por 5 minutos sem agitação.
4. Incubar novamente no *thermoshaker*TM com agitação em 1400 e temperatura ambiente por 10 minutos.
5. Centrifugar em 13000 rpm, 20 °C por 3 minutos.
6. Desprezar o sobrenadante e manter o *pellet* intacto no fundo do *eppendorf*.
7. Repetir as etapas anteriores, porém deve-se quebrar o *pellet* dessa vez.
8. Adicionar à solução 20 μ L de *Sodium Dodecil Sulfate* (20%)
9. Adicionar à solução 40 μ L de solução de proteinase K**
10. Adicionar à solução 5 μ L de TRIS-HCl (2M; PH~7,6)
11. Adicionar à solução 40 μ L de EDTA (125mM; PH=8)
12. Adicionar à solução 195 μ L de água destilada
13. Incubar no *Thermoshaker*TM em 55 °C com agitação em 1400 por 40 minutos.
14. Adicionar 100 μ L de NaCl (6M) em temperatura ambiente e homogeneizar em vórtex por 30 segundos.
15. Centrifugar em 20 °C, 13000 rpm por 5 minutos
16. Transferir o sobrenadante para um novo *eppendorf* de 1,5mL contendo 100 μ L de NaCl (6M).
17. Homogeneizar em vórtex por 30 segundos e centrifugar em 20 °C, 13000 rpm por 5 minutos.
18. Transferir o sobrenadante para um novo *eppendorf* vazio de 1,5mL.
19. Adicionar 800 μ L de etanol absoluto gelado, fechar e verter os *eppendorfs* delicadamente por 10 vezes, visando a precipitação do DNA.
20. Centrifugar a 20 °C, 13000 rpm por 2 minutos.
21. Desprezar o sobrenadante.
22. Adicionar 1mL de etanol 70° gelado ao precipitado.
23. Centrifugar a 20 °C, 13000 rpm por 2 minutos.
24. Desprezar o sobrenadante.
25. Deixar secar a temperatura ambiente por 24 horas.

26. Hidratar com 30 μ L de água destilada e homogeneizar no vórtex por 10 segundos.
27. Incubar em banho maria em 37 °C por 1 hora.

Notas:

*: A solução de RCLB (5X) contem: 274g de sacarose, 25mL de Triton X100, 12,5mL de MgCl₂.6H₂O (1M), 15mL TRIS-Hcl (2M; PH~7,6) e 500mL de água destilada. A solução RCLB (1X) é composta pela diluição de 1 parte de RCLB (5X) em 4 partes de água destilada).

** : A solução de proteinase K contem: Proteinase K liofilizada Ambion™, 50 μ L de TRIS-Hcl (2M; PH~7,6), 100 μ L de CaCl₂.2H₂O (20mM), 2,5mL de glicerol e água destilada com quantidade suficiente para 5mL.

Ao término da fase de extração, o material obtido foi submetido a análise por espectrometria mediante o dispositivo Nanodrop 2000™ (Tabela 1), com objetivo de identificar as concentrações e a qualidade do DNA extraído, a fim de verificar a viabilidade do material e calibrar o volume ideal de amostra para a etapa de amplificação. No entanto, não foi possível realizar essa avaliação do material extraído por Biopur® por conta de interferência dos reagentes utilizados na leitura espectrofotométrica. Analisou-se também se havia quantidades excessivas e fragmentações de DNA que acarretam em *smears* na análise do gel de agarose na etapa de eletroforese.

Tabela 1. Relação das concentrações e as purezas dos DNAs (razão de absorvância 260/280) obtidos das 3 fases do leite humano pelas metodologias de Qiagen™ (QIAamp DNA Mini Kit™) e Salting-out Modificado.

Fases do leite humano:	Qiagen™ (QIAamp DNA Mini Kit™)	Salting-out modificado
Colostro	33,9ng/ μ L 260/280 = 2,04	7,4ng/ μ L 260/280 = 1,83
Transição	14,9ng/ μ L 260/280 = 1,94	13,2ng/ μ L 260/280 = 1,80
Maduro	55,6ng/ μ L 260/280 = 2,16	12,0ng/ μ L 260/280 = 1,91

Com relação à etapa de amplificação, utilizou-se a concentração dos seguintes reagentes na reação de PCR com iniciadores do hormônio do crescimento (HGH) para as 3 metodologias de extração, de modo que a quantidade de DNA para cada reação não ultrapassasse 100ng, com o objetivo de evitar a ocorrência de *smears*. A relação dos reagentes utilizados para as amplificações de cada metodologia de extração está descrita nas Tabelas 2, 3 e 4.

Tabela 2. Relação dos reagentes e suas respectivas concentrações para a reação de PCR das amostras extraídas por Qiagen™

Qiagen™ (QIAamp DNA Mini Kit™)	
Reagentes	Concentração
Água de injeção	q.s.p 10µL
Tampão 10X	1X
dNTP (10mM)	0,2mM
MgCl ₂ (50mM)	1,5mM
HGH Forward(10mM)	0,2mM
HGH Reverse(10mM)	0,2mM
Taq® DNA Polimerase (5U/µL)	0,5U/µL
DNA	Concentração em 1µL de cada fase

*q.s.p = quantidade suficiente para. HGH = *Primer* para o gene do hormônio de crescimento humano (HGH)

Tabela 3. Relação dos reagentes e suas respectivas concentrações para a reação de PCR das amostras extraídas por Biopur®

Biopur®	
Reagentes	Concentração
Água de injeção	q.s.p* 10µL
Tampão 10X	1X
dNTP (10mM)	0,2mM
MgCl ₂ (50mM)	1,5mM
HGH Forward(10mM)	0,2mM
HGH Reverse(10mM)	0,2mM
Taq® DNA Polimerase (5U/µL)	0,5U/µL
DNA	Concentração em 6µL de cada fase

*q.s.p = quantidade suficiente para. HGH = *Primer* para o gene do hormônio de crescimento humano (HGH)

Tabela 4. Relação dos reagentes e suas respectivas concentrações para a reação de PCR das amostras extraídas por *salting-out* modificado

Salting-out modificado	
Reagentes	Concentração
Água de injeção	q.s.p* 10µL
Tampão 10X	1X
dNTP (10mM)	0,2mM
MgCl ₂ (50mM)	1,5mM
HGH Forward(10mM)	0,2mM
HGH Reverse(10mM)	0,2mM
Taq® DNA Polimerase (5U/µL)	0,5U/µL
DNA	Concentração em 6µL de cada fase

*q.s.p = quantidade suficiente para. HGH = *Primer* para o gene do hormônio de crescimento humano (HGH)

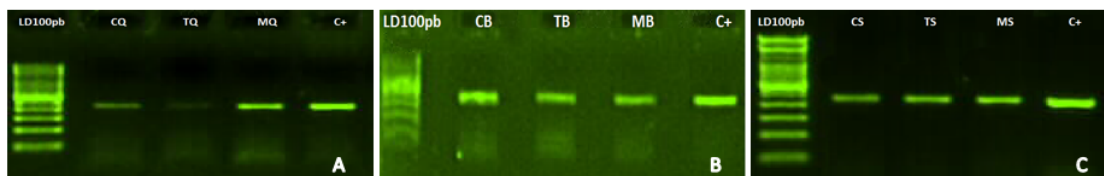
As condições da termociclagem foram: 1 ciclo de 15 minutos a 95 °C, 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 62 °C e 30 segundos a 72 °C, e um último ciclo de 10 minutos a 72 °C.

Para todas as reações de amplificação utilizou-se uma amostra de DNA extraída de sangue periférico com concentração conhecida como controle positivo.

Por fim, na etapa de eletroforese, o DNA de cada amostra amplificada (amplicons) resultante da etapa anterior foi avaliado por meio de gel de agarose 2% corado com SYBR

Safe DNA Gel Stain (Invitrogen Life Technologies®, Grand Island, NY, USA). Os amplicons foram adicionados com 3 μ L de *Green GoTaq® flexibuffer* (Promega™) e submetidos a eletroforese nas seguintes configurações: 150V, 300mA, 150W e 12 minutos. Ao final, o gel foi analisado mediante a luz UV do transluminador (Figura 2).

Figura 2. Análise fotométrica dos amplicons após a eletroforese.



A; LD100pb: Ladder de 100 pares de bases. CQ: DNA extraído do colostro por Qiagen™. TQ: DNA extraído do leite de transição por Qiagen™. MQ: DNA extraído do leite de maduro por Qiagen™. C+: Controle positivo (amostra de DNA extraída de sangue total).

B; LD100pb: Ladder de 100 pares de bases CB: DNA extraído do colostro por Biopur®. TB: DNA extraído do leite de transição por Biopur®. MB: DNA extraído do leite de maduro por Biopur®. C+: Controle positivo (amostra de DNA extraída de sangue total).

C; LD100pb: Ladder de 100 pares de bases. CS: DNA extraído do colostro por *Salting-out* modificado. TS: DNA extraído do leite de transição por *Salting-out* modificado. MS: DNA extraído do leite maduro por *Salting-out* modificado. C+: Controle positivo (amostra de DNA extraída de sangue total).

3 CONCLUSÃO

Concluimos que a extração de DNA genômico das 3 fases do LH é possível pelas metodologias por Biopur®, Qiagen™ e *salting-out* modificado. Referente à metodologia por Qiagen™, notou-se a maior quantidade de DNA extraído em relação às outras duas, porém, devido ao fato de que foi utilizado apenas 1 μ L por amostra das 3 fases do leite, nas etapas de amplificação e eletroforese, a análise fotométrica ficou atenuada em comparação às outras duas metodologias, já que utilizamos 6 μ L de ambas.

No que tange as extrações por Biopur® e *salting-out* modificado, as concentrações de DNA geradas foram modestas, em comparação ao Qiagen™ e similares entre as duas metodologias, sendo que a pureza do material obtido pelo *salting-out* foi alta, enquanto a avaliação das amostras extraídas por BioPur® não foi passível de realização em Nanodrop 2000™.

Vale ressaltar que na metodologia por *salting-out*, o procedimento de extração que compreende o uso de RCLB, embora a sua finalidade seja a lise de hemácias, as quais são insignificantes no LH, demonstra ser essencial para a obtenção de DNA integro e puro, posto que a extração sem esse composto acarreta em amostras com DNA às centenas de ng/ μ L, porém, o material obtido é degradado e impuro com inibidores de PCR. Já a adição de compostos tamponantes e quelantes contribuiu para que o material obtido mantivesse

a integridade genômica e a ausência de contaminantes e inibidores ao demonstrar a razão de absorvância no intervalo entre 1,80 e 1,90.

REFERÊNCIAS

- Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev.* 2015 Nov;91(11):629-35. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013
- Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am.* 2013 Feb;60(1):49-74. doi: 10.1016/j.pcl.2012.10.002.
- Brasil. Ministério da Saúde. RDC/ANVISA Nº 171, de 4 de setembro de 2006. Dispõe sobre o regulamento técnico para o funcionamento de bancos de leite humano. https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2006/res0171_04_09_2006.html#:~:text=Estabelecer%20os%20requisitos%20para%20instala%C3%A7%C3%A3o,sanit%C3%A1ria%20do%20leite%20humano%20ordenado. Acessado em 13.05.2021.
- Cardozo D, Guelsin G, Clementino S, Melo F, Braga M, Souza C, et al. Extração de DNA a partir de sangue humano coagulado para aplicação nas técnicas de genotipagem de antígenos leucocitários humanos e de receptores. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009;42(6):651–6. doi: 10.1590/S0037-86822009000600008.
- Funes-Huacca ME, Opel K, Thompson R, McCord BR. A comparison of the effects of PCR inhibition in quantitative PCR and forensic STR analysis. *Electrophoresis.* 2011 Apr;32(9):1084-9. doi: 10.1002/elps.201000584.
- John SW, Weitzner G, Rozen R, Scriver CR. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Res.* 1991 Jan 25;19(2):408. doi: 10.1093/nar/19.2.408.
- Mosca F, Gianni ML. Human milk: composition and health benefits. *Pediatr Med Chir.* 2017 Jun 28;39(2):155. doi: 10.4081/pmc.2017.155.
- Witkowska-Zimny M, Kaminska-El-Hassan E. Cells of human breast milk. *Cell Mol Biol Lett.* 2017 Jul 13;22:11. doi: 10.1186/s11658-017-0042-4.