



OBTENÇÃO DO BANCO DE DNA DA COORTE DE INDIVÍDUOS NASCIDOS EM PELOTAS-RS NO ANO DE 1993 COM UTILIZAÇÃO DO *KIT ORAGENE™*

SILVA, Liziane Pereira¹; MILECH, Cristini²; SANTOS, Betânia Rodrigues¹; RAMOS, Camila Inhagorê³; MADRUGA, Samanta Winck⁴; NUNES, Ana Paula⁴; OLIVEIRA, Isabel Oliveira de⁵

1- Acadêmica de Ciências Biológicas, Laboratório de Fisiologia Molecular, UFPel; 2- Bióloga, Laboratório de Fisiologia Molecular, UFPel. 3- Nutricionista, Programa de Pós-graduação em Epidemiologia- UFPel; 4- Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Epidemiologia-UFPel; 5 Pro-Doc, Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia-UFPel, Laboratório de Fisiologia Molecular, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, IB_ UFPel.
lizibio@yahoo.com.br

1) INTRODUÇÃO

Estudos do ciclo vital permitem avaliar efeitos a longo prazo de diferentes exposições sobre a saúde ou sobre o risco de doenças durante as várias fases da vida dos indivíduos, como na gestação, infância, adolescência, na fase adulta e no idoso. Neste sentido, os estudos de coortes de nascimentos são essenciais para investigar os determinantes precoces da morbidade e do estado nutricional de adultos. Existem grandes estudos de coortes realizados em diferentes países, como o de ALSPAC (Ness, 2004) e o Millenium Cohort Study (Smith *et al.*, 2002), ambos no Reino Unido; The Cebu Study Team, 1991, nas Filipinas); The National Children's Study, nos EUA (Landrigan *et al.*, 2006) e "Birth to Twenty", na África do Sul (Richter *et al.*, 2007).

O Centro de Pesquisas Epidemiológicas (CPE) da UFPel possui três estudos de coorte de nascimentos: a coorte de 1982, a coorte de 1993 e a coorte de 2004. Nesses estudos todos os nascimentos ocorridos na cidade de Pelotas, RS-Brasil, nos respectivos anos, foram monitorados e as mães foram entrevistadas nas maternidades, sendo coletadas informações de caráter demográfico, biológico e sócio-econômico. Desde o nascimento, os participantes das coortes têm sido acompanhados em diferentes momentos de suas vidas.

Em 1993, com o objetivo de avaliar possíveis mudanças nos indicadores de saúde materno-infantil se iniciou o estudo da coorte de 93 totalizando, naquele ano, 5.304 nascimentos ocorridos na zona urbana de Pelotas (Tomasi *et al.*, 1996). Os indivíduos foram acompanhados com 1, 3, 6 e 12 meses; 4,11 anos e, mais recentemente, 14-15 anos.

Considerando a necessidade de reforçar os achados observacionais resultantes da metodologia epidemiológica clássica, o CPE propôs a organização de um banco de DNA dos participantes da coorte 1993 durante o acompanhamento de 2008. Portanto, a obtenção do banco de DNA dessa coorte representa um passo fundamental para o avanço do grupo na área de epidemiologia genética, uma vez

que será possível a realização de estudos de associações de genes com fatores de risco para doenças crônicas, tais como a asma, a diabetes, a hipertensão e o câncer. O objetivo do estudo é descrever o uso do kit Oragene™ na obtenção do banco de DNA da coorte de 93.

2) MATERIAL E MÉTODOS

De janeiro a agosto de 2008 foi realizado um novo acompanhamento com os indivíduos pertencentes à coorte 1993, quando os participantes foram convidados a comparecer ao CPE para a realização de medidas antropométricas, clínicas e coleta de material biológico. Foram coletadas 4.105 amostras de saliva usando o kit comercial *Oragene™ (DNA Self-Collection Kit- Genotek, Ottawa, Ontário, Canadá)*. Os adolescentes eram instruídos a não comer, fumar ou beber durante os 30 minutos anteriores à coleta de saliva. Chegando ao local da coleta, os participantes faziam um bochecho com água e aguardavam, no mínimo, 15 minutos antes da obtenção da amostra, conforme recomendação do fabricante do *kit*. Os frascos contendo saliva foram armazenados à temperatura ambiente até a etapa de extração do DNA realizada no laboratório de Fisiologia Molecular do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Biologia-UFPeI.

As extrações do material genômico a partir das células da mucosa oral presentes na saliva foram realizadas utilizando um tampão purificador para a precipitação protéica, seguida de banho de gelo; precipitação do DNA com etanol 100%; e eluição final com T.E. (Tris-HCl 1M pH 8,0; e EDTA 0,5M pH 8,0). Após a extração, o material foi mantido à 4°C para análise espectrofotométrica e, posteriormente, armazenado em freezer à - 20°C.

A análise da quantidade e da pureza do DNA extraído foi realizada em 821 amostras (20% do total de amostras coletadas), através da leitura em espectrofotômetro (BioPhotometer, Eppendorf) com diluição de 5:95 (5 µL de amostra para 95 µL de água Milli-Q). Após a leitura, a concentração foi ajustada $[(A_{260} - A_{320}) \times 20 \times 50]$, bem como a relação entre as leituras das absorvâncias $[RAT = (A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})]$, conforme sugerido pelo fabricante do Kit.

Os resultados obtidos foram analisados pelo programa SPSS 10, através de uma análise descritiva dos dados.

3) RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da análise estatística foi obtida a média das variáveis de interesse (tabela 1). A concentração média de DNA extraído foi de 91,57 µg e a relação média A260/A280 nm foi de 1,78.

Tabela 1: Descrição das amostras de saliva dos indivíduos pertencentes à coorte de nascidos em 1993, Pelotas-RS (n=821)

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio
A260 nm	0,018	1,424	0,33008	0,218744
A320 nm	0,000	0,454	0,03064	0,039349
µg	3,900	401,1	91,571	59,5682

Volume (μL)	300	450	309,14	35,894
[$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	0,013	1,337	0,29933	0,197673
A260/A280	0,084	5,27	1,7823	0,16741

Existem vários métodos para obtenção de material genômico a partir de células bucais ou saliva, entre eles a utilização de *swabs*, escovas ou cartões de coleta (King *et al*, 2002; Harty *et al*, 2000; Steinberg *et al*, 2002). O método proposto pelo *kit OrageneTM* apresenta melhor rendimento quando comparado ao descrito com esses métodos (Walker *et al*, 1999; Garcia-Closas *et al*, 2001; Meulenbelt *et al*, 1995; Harty *et al*, 2000).

O *kit OrageneTM* para obtenção de DNA baseia-se num método não invasivo, simples, de fácil coleta, tornando-se alternativo à extração a partir de sangue periférico, que requer profissional especializado para a coleta (Rylander-Rudqvist *et al*, 2006) e uso de material perfuro-cortante (King *et al*, 2002; London *et al*, 2001). Outra importante vantagem do *kit* é a utilização de um purificador químico que preserva a integridade celular, e evita a degradação do material genômico e a contaminação bacteriana (Rylander-Rudqvist *et al*, 2006). De acordo com as indicações do *kit OrageneTM*, os frascos de coleta contendo a saliva, podem ficar estocados em temperatura ambiente por até um ano, sem que o DNA sofra degradação. Entretanto, em estudo que avaliou as diferenças na qualidade e quantidade do material extraído, com diferentes períodos de intervalos entre a coleta e a extração, foi demonstrado que há uma redução no sucesso da extração, proporcional ao período de estocagem (Feigelson *et al.*, 2001).

A concentração média de DNA a partir de 2,0 mL de saliva, segundo o fabricante, é de 110 μg . Os resultados da concentração de DNA obtida nesse estudo encontram-se abaixo do valor médio esperado. Sugerimos os seguintes fatores que podem ter contribuído para esse achado: a realização de um bochecho com água antes da coleta, que pode ter ocasionado lavagem da mucosa, diminuindo o número de células presentes na saliva; a presença de restos alimentares e/ou pigmentos observados em algumas salivas coletadas, apesar das recomendações feitas previamente aos doadores. Por outro lado, existe escassa literatura científica relatando o rendimento obtido com o uso do *kit OrageneTM* para extração de DNA.

A RAT média observada no estudo encontra-se na faixa recomendada (1,8-2,0) em protocolos de extração de DNA (Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989).

4) CONCLUSÃO

As amostras de DNA extraídas apresentam qualidade e quantidade satisfatórias para posteriores estudos genéticos. O protocolo sugerido é de fácil execução, otimizando o trabalho de extração de DNA genômico de um grande número de amostras que caracterizam um estudo de coorte de nascimentos.

5) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FEIGELSON, H. S., RODRIGUEZ, C., ROBERTSON, A. S., JACOBS, E. J., CALLE, E. E., REID, Y. A., THUN, M. J. Determinants of DNA yield and quality from buccal

cell samples collected with mouthwash. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 2001, 10, p.1005 – 8.

GARCIA-CLOSAS, M., EGAN, K. M., ABRUZZO, J., NEWCOMB, P. A., TITUS-ERNSTOFF, L., FRANKLIN, T., BENDER, P. K., BECK, J. C., MARCHAND, L. L., LUM, A., ALAVANJA, M., HAYES, R. B., RUTTER, J., BUETOW, K., BRINTON, L. A., ROTHMAN, N. Collection of genomic DNA from adults in epidemiological studies by buccal cytobrush and mouthwash. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 2001, 10, p.687 – 96.

HARTY, L. C., GARCIA-CLOSAS, M., ROTHMAN, N., REID, Y. A., TUCKER, M. A., HARTGE, P. Collection of buccal cell DNA using treated cards. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 2000, 9, p.501 – 6.

KING, I. B., SATIA-ABOUTA, J., THORNQUIST, M. D., BIGLER, J., PATTERSON, R. E., KRISTAL, A. R., SHATTUCK, A. L., POTTER, J. D., WHITE, E. Buccal cell DNA yield, quality, and collection costs: comparison of methods for large-scale studies. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 2002, 11, p.1130 – 3.

LANDRIGAN, P.J., TRASANDE, L., THORPE, L.E., GWYNN, C., LIOY, P.J., D'ALTON, M.E., LIPKIND, H.S., SWANSON, J., WADHWA, P.D., CLARK, E.B., RAUTH, V.A., PERERA, F.P., SUSSER, E. The National Children's Study: A 21-year prospective Study of 100000 American Children. **Pediatrics**, 2006, 118, 5, p.2173-2186.

LONDON, S. J., XIA, J., LEHMAN, T. A., YANG, J. H., GRANADA, E., CHUNHONG, L., DUBEAU, L., LI, T., GLORIA L. DAVID-BEABES, G. L., LI, Y. Collection of buccal cell DNA in seventhgrade children using water and a toothbrush. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 2001, 10, p.1227 – 30.

MEULENBELT, I., DROOG, S., TROMMELEN, G. J., BOOMSMA, D. I., SLAGBOOM PE. Highyield noninvasive human genomic DNA isolation method for genetic studies in geographically dispersed families and populations. **Am J Hum Genet**, 1995, 57, p.1252 – 4.

NESS, A. R. The Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC) – a resource for the study of the environmental determinants of childhood obesity **European Journal of Endocrinology**, 2004, 151, p. U141–U149

RICHTER, L., NORRIS, S., PETTIFOR, J., YACH, D., CAMERON, N. Cohort Profile: Mandela's Children: The 1990 birth to twenty study in South Africa. **International J of Epidemiology**, 2007, 36:504-511.

RYLANDER-RUDQVIST, T., HA^oKANSSON, N., TYBRING, G., WOLK, A. Quality and Quantity of Saliva DNA Obtained from the Self-administrated Oragene Method— A Pilot Study on the Cohort of Swedish Men. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 2006, 15(9), p.1742-1745.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

SMITH K., JOSHI, H. The Millennium Cohort Study. **Popul Trends**. 2002;(107):30-4.

STEINBERG, K., BECK, J., NICKERSON, D., GARCIA-CLOSAS, M., GALLAGHER, M., CAGGANA, M., REID, Y., COSENTINO, M., JI, J., JOHNSON, D., HAYES, R. B., EARLEY, M., LOREY, F., HANNON, H., KHOURY, M. J., SAMPSON, E. DNA banking for epidemiologic studies: a review of current practices. **Epidemiology**, 2002, 13, p.246 – 54.

THE CEBU STUDY TEAM. Underlying and proximate determinants of child health: the Cebu Longitudinal Health and Nutrition Study. **Am. J. Epidemiol**, 1991, 133, p. 185-201.

TOMASI, E., BARROS, C. F., VICTORA, C. G. As mães e suas gestações: comparação de duas coortes de base populacional no Sul do Brasil. **Cad. Saúde Públ**, 1996,12 (Supl.1), p.21-25.

WALKER, A. H., NAJARIAN, D., WHITE, D. L., JAFFE, J. F., KANETSKY, P. A., REBBECK T. R. Collection of genomic DNA by buccal swabs for polymerase chain reactionbased biomarker assays. **Environ HealthPer spect** , 1999,107, p.517 – 20.

Apoio: Wellcome Trust Foundation, CNPq