

TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE DNA: revisão de literatura

Helyandro Manoel Rodrigues¹

Gabriely Rodrigues da Silva¹

Karoline de Sousa Neiva¹

Hudson Tiago Novais dos Santos¹

Jakeline Ferreira de Araújo Lobo²

RESUMO: Objetivo: Elaborar, por meio de revisão da literatura, as principais técnicas de extração de DNA utilizadas atualmente de acordo com sua aplicabilidade e particularidade de cada técnica. **Método:** Trata-se de uma revisão sistemática da literatura, caracterizada por análises nos bancos de dados *PUBMED*, *BVS* (Biblioteca Virtual em Saúde), *Scielo* (*Scientific Electronic Library Online*), *SCIENCE DIRECT* e *NCBI* (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia), posteriormente foram selecionados artigos mais pertinentes para esta revisão literária. **Resultados:** Foram encontrados diversos artigos, nos quais, foram dissertadas variadas formas e materiais para extração de material genético. **Conclusão:** A partir da descoberta do DNA e a sua extração, o material foi bastante estudado é fundamental para elucidação de dúvidas no âmbito da saúde, justiça, e ciências forenses.

PALAVRAS-CHAVE: DNA. Extração. Metodologia.

1 INTRODUÇÃO

Na década de 1940, os biólogos tinham dificuldade em aceitar que o DNA era um material genético, porque a molécula tem a constituição muito simples, um longo polímero composto apenas por quatro tipos de subunidades, semelhantes quimicamente entre si. No início da década de 1950, o DNA foi examinado por difração de raios X, uma técnica utilizada para determinar a estrutura atômica tridimensional de uma molécula. Os primeiros resultados indicaram que o DNA era composto por duas fitas de um polímero enroladas no formato de dupla hélice. Essa observação foi fundamental na elucidação do modelo da estrutura do DNA de Watson e Crick, o que possibilitou a replicação e armazenamento da informação genética (ALBERTS, 2017).

¹ Acadêmicos do Instituto de Ciências da Saúde do Centro Universitário Alfredo Nasser. E-mail: helyandro.manoel@gmail.com.

² Doutoranda em Ciências da Saúde pela Universidade Federal de Goiás, Professora do curso de Fisioterapia no Centro Universitário Alfredo Nasser e orientadora da atual pesquisa.

Para realizar a extração de DNA, deve-se observar uma série de fatores que influenciam na técnica a ser usada, dentre esses fatores estão presentes, a quantidade de amostra que se dispõe para a extração do DNA, o grau de pureza com que se quer obter o material extraído, o tempo que cada método consome, o seu custo e rendimento esperado, e o uso destinado ao DNA extraído (ROSENBAUM *et al.*, 2019).

A partir disso, é possível determinar se o método de extração pode ser por incubação do lisado; lise por ruptura mecânica; extração com solventes mecânicos; lisado e purificação com detergente iônico; método de Brometo de Cetil-Trimetil- Amônio (CTAB); método de *salting-out*, utilização da proteinase K e dodecilsulfato de sódio; método de extração de DNA com iodeto de sódio como agente caotrópico num único tubo; extração com gradientes de cloreto de cério – brometo de etídio; troca aniônica para a extração de DNA do lisado celular; uso de matrizes celulósicas para a extração de DNA de amostras biológicas, uso de resinas de troca iônica, entre diversas outras técnicas (LIMA *et al.* 2020).

Diante disso é observado que a extração de DNA pode ser feita de várias formas, desde métodos mais baratos e com materiais biológicos simples, até os de valor mais elevados, extrações específicas e com materiais biológicos mais complexos. Por isso, este trabalho tem como objetivo diferenciar os métodos de extração de DNA, quais suas vantagens e desvantagens, por meio de uma revisão de literatura.

2 METODOLOGIA

As técnicas e protocolos utilizados para a extração de DNA são variadas, e podem sofrer alterações e aprimoramentos ao longo do tempo. São elas que irão determinar os bons resultados dos estudos na avaliação da extração de DNA.

A pesquisa foi realizada nos bancos de dados da *PubMed* (*National Library of Medicine*), *BVS* (*Biblioteca Virtual em Saúde*), *SciELO* (*Scientific Electronic Library Online*), e *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*) selecionaram-se artigos publicados entre 2007 a 2022, em inglês e português nos quais se destacam protocolos e técnicas relacionadas à extração de DNA.

Os artigos foram separados e analisados detalhadamente, foram eleitos os que abordavam a temática dos principais protocolos de extração de DNA usados em diferentes tipos de amostras biológicas.

3 DISCUSSÕES, RESULTADOS E/OU ANÁLISE DE DADOS

Foram encontrados 125 artigos publicados na plataforma *PubMed*, 5 revisões de literatura na BVS, 51 trabalhos científicos na plataforma *Scielo*, 26 artigos no banco de dados *ScienceDirect* e 18 publicações no *NCBI*. Os trabalhos abrangeram as línguas inglesa, portuguesa e espanhola. Dos artigos encontrados, 9 se enquadraram ao tema abordado e foram utilizados na atual pesquisa. Por meio dos trabalhos encontrados foi possível discorrer sobre os principais métodos de extração de DNA.

A extração de DNA é um dos principais passos para a execução de grande parte das metodologias de biologia celular, e traz muitos benefícios para inúmeros campos da ciência como a medicina forense, exclusão de paternidade, a busca de marcadores tumorais ou agentes infecciosos, transplante de medula, causas de doenças genéticas, distinção e análises de vírus ou bactérias e até mesmo a criação de organismos geneticamente modificados (CALDAR *et al.*, 2011).

Para escolher a técnica de extração de DNA são necessários alguns fatores importantes como: tipo de tecido, nível de pureza do tecido e integridade para a aplicabilidade em que o DNA será utilizado (GAMA *et al.*, 2021).

Os protocolos para extração de DNA envolvem três etapas básicas: lise das membranas, limpeza de contaminantes (proteínas e macromoléculas), a precipitação do DNA. Posteriormente esse DNA extraído pode ser processado para que ocorra sua replicação, mutação e o reparo do DNA (CALDAR *et al.*, 2011).

Para a execução da extração de DNA é necessário um ambiente e equipamentos adequados, como centrífuga com rotor para vários tipos de tubos, capelas de exaustão, banho-maria com termostato ou com termômetro para aferição da temperatura, vidraria para preparo das amostras como: provetas, pipetas, bastões de vidro, microtubos de polipropileno, micropipetas automáticas para volumes diversos, gelo e nitrogênio líquido, caso seja necessária (LIMA, 2017).

Para cada tipo de extração de DNA é necessária uma técnica. Para a extração de DNA de amostra de tecidos de mamíferos, as amostras que são de origem animal devem ter fragmentação e digestão enzimática de proteínas, para isso devem-se cortar as amostras e submeter ao congelamento em nitrogênio líquido e rapidamente pulverizado por processo manual ou mecânico. Logo após são colocadas em solução-tampão de digestão (na proporção de 1,2mL de tampão para cada 100mg de tecido) no banho-maria em temperatura próxima a 50°C, para que ocorra a digestão. O tempo de incubação varia em torno de oito e dezesseis

horas, ou até que a amostra seja totalmente digerida, ou seja, apresenta aspecto viscoso (NARANJO, 2021).

Nos materiais extraídos de seres humanos, como sangue, sêmen e tecidos existem semelhanças nos métodos de extração e armazenamento a depender do protocolo a ser usado, quanto a disponibilidade e quantidade dos resíduos biológicos. Como exemplo a exclusão de paternidade, o melhor método é a coleta do material da cavidade oral, a fim de causar o menor desconforto possível a todas as partes. Já no método usando sêmen, em casos de perícia de possível crime de estupro, o material, é aquele mais fácil de ser encontrado no local, ou até mesmo na vítima. O sangue, se disponível, pode ser usado em ambas as análises de DNA.

A extração de DNA de amostra de sangue possui vários tipos de estratégias, que incluem os protocolos de extração de DNA com a finalidade de amplificação pela técnica de PCR. Na coleta, ainda são utilizados anticoagulantes como o citrato de sódio e o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). A heparina não é indicada como anticoagulante, devido a sua propriedade inibitória sobre a PCR. O sangue colhido com citrato de sódio ou com EDTA é armazenado por sete dias a -4°C ou durante vários anos a -80°C (AMARAL *et al.*, 2016).

Para a extração de DNA de amostra de sêmen, é necessário um processo mais minucioso com mais etapas, nesse tipo de extração são necessários dois tipos de soluções: tampão, PBS *hosphate buffered saline*) e tampão de lise. Deve-se descongelar uma pequena amostra de sêmen e, centrifugar em um tubo de eppendorf e inserir as soluções tampão, incubar e centrifugar novamente, além de processos com a adição de reagentes e novas centrifugações (BARTHOLAZZI *et al.*, 2019).

Diferente das demais, a técnica com as amostras de artrópodes para extração de DNA requer boa digestão de todo o material, por um intervalo de tempo variável, que depende resumidamente do peso da amostra. Há uma limitação dos kits que apresentam a membrana de sílica em que as amostras devem conter peso limitado à capacidade máxima indicada no manual. Cerca de 20mg de tecido de carrapato macerado são utilizados para extração. Já os outros artrópodes menores podem ser processados inteiros, sem a necessidade de ser macerado (COSTA *et al.*, 2013).

A metodologia da extração de DNA de amostra de plantas é a mais diferente das outras explanadas, abrange a lise das células vegetais com o uso de detergente e logo após a separação e precipitação do DNA. O DNA das plantas é preparado pela técnica de centrifugação em gradiente de cloreto de cézio que produz DNA de alta pureza. Porém, existe outro protocolo que tem sido muito utilizado devido a sua facilidade e rapidez em que o

detergente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) é usado para liberar o DNA celular e em seguida separá-lo com isopropanol e etanol (BRAMMER, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Cotidianamente, a extração de DNA, resulta na sua amplificação para utilização na técnica de PCR, que é um dos, se não o mais utilizados pelos cientistas na investigação de mudanças no nível de uma única célula, muito abaixo do que é frequentemente necessário para aplicações derivadas de parasitas. A PCR teve um impacto substancial nos avanços feitos nas áreas de sistemática e epidemiologia parasitária, imunologia e interações parasita-hospedeiro, desenvolvimento de vacinas de DNA recombinante e, mais recentemente, a análise de genomas inteiros (LICÍNIO; AYRES, 2021).

4 CONCLUSÕES

Com base nas evidências dos estudos científicos analisados, foi possível observar que cada amostra de DNA tem suas particularidades, e depende da escolha do material a ser utilizado para realizar a extração.

A extração de DNA para seu posterior uso em estudos moleculares como PCR e RT-PCR e RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) se mostrou fundamental em estudos de exclusão de paternidade, investigações forenses, investigação de doenças de base genética, transgenia e melhoramento genético. Essa extração pode ser realizada de diferentes tipos de amostras biológicas como tecidos de mamíferos, sangue, sêmen, amostra de artrópodes e plantas, com variados protocolos, porém, três processos são de fundamental importância para a extração de DNA que são: lise das membranas, limpeza de contaminantes (macromoléculas e proteínas), a precipitação do DNA, para que só assim seja possível seu estudo específico nas áreas saúde, ecologia, entre outros.

REFERÊNCIAS

CALDART, E. T. *et al.* Análise comparativa de métodos de extração de DNA genômico de células do sangue e do leite de pequenos ruminantes. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 39, n. 1, p. 1-8, 2011.

COSTA, E. A. *et al.* Avaliação da eficácia da extração de dna total em escorpiões. *Arachnida: Scorpiones*, 2013.

CRISPIM, B. A. *et al.* Avaliação de protocolos para extração de DNA Genômico de sangue Bovino. *Journal of the Selva Andina Research Society*, v. 7, n. 2, p. 95-103, 2016.

GAMA, A. R. *et al.* Detecção de HPV em amostras de mucosa oral em pacientes pediátricos. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 57, 2021.

LEITE, V. S. *et al.* Uso das técnicas de biologia molecular na genética forense. *Derecho y Cambio Social*, v. 10, n. 34, p. 21, 2013.

LICÍNIO, C. O. L.; AYRES, F. M. *The use of real time PCR for arboviruses diagnostics: integrative review.* *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 57, 2021.

LIMA, O. C. A. **Prevalência de microbactérias não tuberculosas em pacientes suspeitos de tuberculose em uma unidade de referência na Amazônia brasileira.** 140f. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais e Infecciosas.) - Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, 2017.

LIMA, L. O. *et al.* Comparação de protocolos de extração de DNA genômico de *Capsicum* spp. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 5, p. 26419-26434, 2020.

NARANJO, C. D. G. **Desenvolvimento de um método para extrair DNA total de amostras biológicas empregando uma substância caotrópica e vidro reciclado como fonte de sílica.** 2021.

OLIVEIRA, M. C. S. *et al.* **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase.** 2007.

ROSENBAUM, J. *et al.* *Evaluation of Oral Cavity DNA Extraction Methods on Bacterial and Fungal Microbiota.* *Sci Rep.*, v. 9, n. 1, p. 1531, 6 feb. 2019.