

ESTOCAGEM DE DNA A TEMPERATURAS VARIADAS: ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO.

Guilherme Gomes Martinez¹, André Luís Fernandes dos Santos², Carolina de Queiroz Pereira Oliveira³, Tamiris Invecioni Moraes⁴.

1. Aluno do curso técnico de análises clínicas da Fundação Instituto de Educação de Barueri - Prof^ª. Maria Sylvia Chaluppe Mello
2. Orientador: Professor da Fundação Instituto de Educação de Barueri - Prof^ª. Maria Sylvia Chaluppe Mello.
3. Colaboradora da Fundação Instituto de Educação de Barueri - Prof^ª. Maria Sylvia Chaluppe Mello.
4. Colaboradora do Centro Universitário Amparense – UNIFIA

RESUMO

Após a descoberta da molécula de DNA no século XX, houve avanços importantes tecnológicos, principalmente com o advento do programa genoma, sendo que o DNA é uma molécula de suma importância utilizado em grande escala nos processos de diagnóstico molecular. Este estudo avaliou os efeitos da temperatura de conservação do DNA, na concentração e qualidade, utilizando-se a espectrofotometria e avaliou a interferência de temperatura no congelamento e descongelamento das amostras. Para a obtenção do DNA utilizamos o protocolo de extração de DNA de tecido, a amostra foi distribuída em 80 tubos, divididos em quatro grupos, submetidos a diferentes temperaturas de estocagem: temperatura ambiente (entre 20 a 25°C), 10°C, -20°C e -70°C, as amostras permaneceram armazenadas por 90 dias, realizando a determinação da concentração, relações 260/280 e 260/230 aos 30 e 90 dias de estocagem. Os resultados obtidos mostraram que a variação de temperatura e o fator de congelamento e descongelamento das amostras interferiram consideravelmente na concentração do DNA, degradando-o e colaborando para a evaporação do solvente onde o mesmo fora diluído, sendo que a qualidade não se mostrou alterada, permanecendo próximo ao valor aceitável de 1,8 para a relação 260/280, porém impura, pois seus valores de pureza se mostraram abaixo da média aceitável de 1,8-2,2 na relação 260/230. Por sua qualidade se manter inalterada, podemos concluir que todas as temperaturas se mostraram viáveis para o armazenamento do DNA extraído, e que o mesmo possa ser submetido a técnicas onde a pureza do DNA não seja tão impactante no resultado final, como em algumas reações de PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) ou RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

Palavras-chave: DNA, extração de DNA, estocagem de material genético, qualidade do DNA.

INTRODUÇÃO

O ácido desoxirribonucleico (DNA) foi descoberto em 1869 pelo suíço Johann Friedrich Miescher (1844-1895), ao analisar células Miescher pode descobrir que os ácidos nucleicos são macromoléculas de natureza química, formados por nucleotídeos constituídos por um grupamento fosfórico (fosfato), um glicídio e bases nitrogenadas (adenina, guanina, timina e citosina), constituindo assim o material genético dos seres vivos (DUCLOS, 2004).

Em 1953, o biólogo norte-americano James D. Watson e o físico inglês Francis H. C. Crick, propuseram o modelo de dupla hélice do DNA, procurando esclarecer a sua estrutura e os princípios do

seu funcionamento, impulsionando as pesquisas na área genética, essa descoberta foi um grande ganho no campo científico. (SILVA, 2010).

Com os numerosos avanços tecnológicos, temos a molécula de DNA usada em larga escala, como por exemplo, nas técnicas de PCR (reação em cadeia polimerase), sequenciamento para o diagnóstico, o uso do material genético nas investigações criminais, já que podemos realizar a identificação do réu a partir de pequenas amostras orgânicas, como sangue, leite, saliva, bulbo capilar. (CALDART, et al, 2011). Atualmente o DNA é muito utilizado nos testes de investigação de paternidade, para o diagnóstico de doenças genéticas e na formação de bancos gênicos, com intuito de estocá-lo para diversos estudos. (PARADA, 2002).

Para a obtenção de uma molécula de DNA é necessária uma extração adequada do material genético, para garantir uma amostra na quantidade e qualidade adequadas, outro fator importante para a qualidade do DNA é a estocagem do DNA extraído, especialmente ao que se refere à temperatura em que o mesmo permanecerá estocado, pois sua estocagem em temperatura inadequada pode causar sua degradação (COELHO *et al.*, 2004).

Este trabalho tem como o objetivo verificar o efeito da temperatura de conservação do DNA, na concentração e qualidade, utilizando-se a espectrofotometria e avaliar a interferência da temperatura no congelamento e descongelamento das amostras.

MATERIAL E MÉTODOS

Uma porção de carne bovina, previamente macerada, foi utilizada para a extração do DNA. Ao macerado adicionou-se solução de extração e proteinase K. As caudas foram incubadas em banho seco, a 55 °C, *over night*. Após a incubação o DNA foi precipitado com isopropanol e centrifugado por 15 minutos a 14000g. O *pellet* foi ressuscitado em 50 µL de tampão Tris-EDTA e realizou-se outra centrifugação, por 10 minutos a 14000g.

Após a obtenção da amostra de DNA inicial foi realizado a determinação da sua concentração e das relações 260/280 e 260/230, por espectrofotometria, no equipamento NanoDrop 1000®; neste momento realizou-se vinte quantificações da amostra inicial, para se obter concentração e o desvio-padrão no dia 0; após dividiu-se o conteúdo da amostra inicial em 80 tubos, divididos em quatro grupos distintos, de acordo com a temperatura de estocagem: grupo temperatura ambiente (entre 20 a 25°C), grupo 10°C, grupo -20°C e grupo -70°C, e cada grupo com 20 alíquotas da amostra inicial. A determinação das concentrações e das relações 260/280 e 260/230, foi mensurada por espectrofotometria, no equipamento NanoDrop 1000®.

As amostras permaneceram armazenadas nas temperaturas conforme o grupo pré-estabelecido, por 90 dias com interrupções no congelamento (30 dias de estocagem; descongelamento; estocagem por mais 60 dias); realizou-se a determinação da concentração, relações 260/280 e 260/230 aos 30 e 60 dias de estocagem, respectivamente.

A análise estatística foi realizada nos programas Microsoft Excel® (gráficos e estatísticas descritivas) e MiniTab® (inferência estatística). Na inferência estatística utilizamos o teste ANOVA, com nível de significância de 5%, e o método de Turkey para a comparação das médias dos grupos. As amostras possuíam distribuição normal (teste de Kolmogorov-Sminorff).

RESULTADOS

A solução DNA inicial foi dividida em 20 amostras, que apresentaram concentração inicial média de $98,2 \pm 1,4$ ng/ μ L (260/280= $1,76 \pm 0,02$ e 260/230= $1,04 \pm 0,06$), conforme apresentado na tabela 1 e na figura 1.

Tabela 1- Concentração, relação 260/280 e 260/230 da solução inicial (concentração inicial- dia 0).

Quantificação	Concentração (ng/ μ L)	260/280	260/230
1	99,2	1,78	1,09
2	95,9	1,75	1,15
3	96,1	1,75	1,15
4	96,4	1,73	1,13
5	97,1	1,77	1,10
6	97,3	1,77	1,10
7	96,4	1,77	1,08
8	96,6	1,77	1,07
9	100,1	1,76	1,06
10	98,5	1,74	1,03
11	99,1	1,77	1,03
12	99,7	1,75	1,01
13	98,1	1,77	1,01
14	99,8	1,75	0,98
15	97,7	1,78	1,00
16	99,0	1,78	0,99
17	98,9	1,76	0,98
18	99,1	1,76	0,96
19	98,8	1,79	0,97
20	100,2	1,75	0,95
Mediana	98,7	1,77	1,03
Média	98,2	1,76	1,04
Desvio Padrão	1,4	0,02	0,06
Coef. de variação (%)	1,4	0,86	6,13

As amostras conservadas, durante 30 dias e apresentaram os seguintes resultados, temperaturas ambiente uma concentração de $98,2 \pm 1,4$ ng/ μ L e relações $260/280=1,80 \pm 0,02$ e $260/230=1,30 \pm 0,07$, as amostras armazenadas a 10°C apresentaram um média de concentração $80,8 \pm 18,3$ ng/ μ L e relações $260/280=1,80 \pm 0,03$, $260/230=1,27 \pm 0,19$, as amostras armazenadas a -20°C apresentaram uma média de concentração $118,3 \pm 58,0$ ng/ μ L e relações $260/280=1,74 \pm 0,04$, $260/230=1,46 \pm 0,20$, e amostras armazenadas a -70°C apresentaram uma média de concentração de $91,4 \pm 12,1$ ng/ μ L e relações $260/280=1,74 \pm 0,02$, $260/230=1,41 \pm 0,07$, conforme tabela 2.

Após estas mensurações de concentração estas amostras foram congeladas novamente exceto a armazenada em temperatura ambiente e permaneceram estocadas, nas diferentes temperaturas, por mais 60 dias.

Tabela 2- Concentração, relação 260/280 e 260/230 das soluções estocadas na temperatura ambiente,

Amostras	Concentração (ng/ μ L)				Relação (260/280)				Relação (260/230)			
	Ambiente	10°C	-20°C	-70°C	Ambiente	10°C	-20°C	-70°C	Ambiente	10°C	-20°C	-70°C
1	95,7	90,7	64,2	84,5	1,78	1,77	1,75	1,73	1,31	1,32	1,46	1,61
2	90,9	75,6	84,9	114,4	1,84	1,84	1,80	1,76	1,35	1,26	1,64	1,47
3	93,1	80,6	148,7	109,2	1,83	1,83	1,81	1,73	1,36	1,38	1,93	1,39
4	92,5	55,5	66,0	79,8	1,80	1,84	1,74	1,70	1,36	1,60	1,43	1,33
5	92,9	73,2	47,8	74,8	1,82	1,81	1,69	1,71	1,38	1,01	1,31	1,28
6	104,7	72,4	144,9	88,3	1,76	1,84	1,73	1,71	1,16	1,05	1,40	1,38
7	90,8	77,3	162,1	73,8	1,81	1,82	1,77	1,73	1,38	1,13	1,50	1,33
8	93,2	68,0	215,7	103,3	1,79	1,83	1,71	1,76	1,33	1,26	1,32	1,47
9	94,7	75,2	181,3	94,5	1,76	1,76	1,76	1,74	1,33	1,53	1,48	1,45
10	95,4	87,6	142,4	82,7	1,80	1,75	1,78	1,70	1,30	1,34	1,74	1,41
11	94,1	86,4	118,2	77,2	1,81	1,77	1,73	1,72	1,35	1,37	1,34	1,43
12	94,8	116,9	83,3	83,5	1,81	1,76	1,80	1,74	1,26	1,33	1,64	1,38
13	95,7	85,7	50,4	101,3	1,81	1,80	1,72	1,74	1,24	1,20	1,07	1,44
14	98,3	76,8	93,7	83,1	1,80	1,82	1,79	1,73	1,24	1,48	1,65	1,33
15	98,8	54,0	171,9	87,9	1,81	1,76	1,76	1,73	1,22	1,01	1,58	1,38
16	96,6	68,5	73,2	93,4	1,79	1,78	1,70	1,73	1,23	0,80	1,25	1,44
17	99,2	134,5	67,6	89,2	1,80	1,80	1,68	1,72	1,25	1,31	1,30	1,31
18	97,1	81,6	166,8	108,4	1,82	1,82	1,74	1,77	1,21	1,33	1,38	1,43
19	87,3	72,3	48,2	93,1	1,77	1,78	1,67	1,76	1,44	1,35	1,32	1,43
20	95,4	83,2	234,3	105,7	1,80	1,83	1,75	1,79	1,23	1,33	1,50	1,44
Mediana	98,7	77,1	105,9	88,8	1,80	1,81	1,75	1,73	1,31	1,33	1,45	1,42
Média	98,2	80,8	118,3	91,4	1,80	1,80	1,74	1,74	1,30	1,27	1,46	1,41
Desvio Padrão	1,4	18,3	58,0	12,1	0,02	0,03	0,04	0,02	0,07	0,19	0,20	0,07
Coef. de variação (%)	1,4	22,6	49,1	13,3	1,17	1,74	2,35	1,35	5,64	15,10	13,38	5,20

10°C, -20°C e -70°C após 30 dias de estocagem.

As amostras conservadas, durante 60 dias, apresentaram os seguintes resultados, amostras armazenadas em temperatura ambiente apresentou uma média de concentração de 142,6±51,8 ng/μL e relações 260/280=1,79±0,02, 260/230=1,04±0,21, amostras armazenadas a 10°C apresentou uma média de concentração de 137,6±85,6 ng/μL e relações 260/280=1,73±0,05, 260/230=1,66±0,73, amostras armazenadas a -20°C apresentaram uma média de concentração de 106,9±86,3 ng/μL e relações 260/280=1,76±0,06, 260/230=1,80±0,29) e amostras armazenadas a -70°C 109,1±23,3 ng/μL e relações 260/280=1,71±0,03, 260/230=1,81±0,17 conforme tabela 3.

Tabela 3- Concentração, relação 260/280 e 260/230 das soluções estocadas na temperatura ambiente, 10°C, -20°C e -70°C após 60 dias de estocagem.

Amostras	Concentração (ng/μL)				Relação (260/280)				Relação (260/230)			
	Ambiente	10°C	-20°C	-70°C	Ambiente	10°C	-20°C	-70°C	Ambiente	10°C	-20°C	-70°C
1	247,4	108,8	51,5	90,1	1,81	1,75	1,75	1,73	0,79	1,31	1,84	1,86
2	98,2	78,5	76,0	91,5	1,79	1,76	1,78	1,68	1,34	1,50	1,97	1,60
3	124,9	214,5	30,7	91,3	1,80	1,76	1,78	1,72	1,03	1,33	1,86	1,89
4	115,8	315,0	38,5	94,5	1,82	1,75	1,85	1,65	1,09	1,32	1,98	1,77
5	109,3	84,9	113,8	112,0	1,80	1,83	1,78	1,66	1,18	1,15	2,00	1,74
6	116,9	69,1	114,4	92,1	1,78	1,68	1,79	1,67	1,12	1,64	1,85	2,00
7	138,6	134,6	230,2	101,6	1,79	1,70	1,70	1,70	0,94	1,40	1,33	1,98
8	107,1	248,3	66,8	115,7	1,78	1,75	1,82	1,71	1,19	1,44	1,98	1,56
9	228,6	46,3	73,4	107,9	1,83	1,71	1,75	1,66	0,74	1,21	1,73	1,55
10	113,3	228,2	141,9	65,2	1,80	1,75	1,80	1,69	1,05	1,78	2,31	1,83
11	102,2	81,6	265,8	126,9	1,75	1,76	1,60	1,72	1,13	1,32	1,13	2,29
12	85,9	38,7	67,6	103,8	1,77	1,67	1,84	1,68	1,57	1,61	2,09	1,72
13	141,7	188,2	72,1	133,2	1,82	1,74	1,81	1,74	0,94	1,83	1,80	1,83
14	128,3	129,2	43,1	156,0	1,79	1,70	1,71	1,74	0,99	1,42	1,54	1,77
15	250,0	130,7	91,7	101,0	1,81	1,75	1,74	1,72	0,75	1,72	1,57	1,95
16	157,0	38,9	69,0	130,0	1,80	1,63	1,78	1,76	0,87	4,54	1,86	1,85
17	117,4	154,7	68,7	149,8	1,81	1,76	1,77	1,75	1,07	1,58	1,75	1,83
18	125,2	303,7	44,7	87,9	1,75	1,75	1,78	1,69	1,07	1,48	2,09	1,74
19	116,8	103,5	368,9	138,2	1,76	1,68	1,68	1,75	1,11	1,28	1,39	1,70
20	227,6	54,0	109,1	94,5	1,82	1,63	1,73	1,70	0,74	2,42	1,93	1,78
Mediana	121,1	119	72,7	102,7	1,80	1,75	1,75	1,71	1,06	1,46	1,86	1,81
Média	142,6	137,6	106,9	109,1	1,79	1,73	1,76	1,71	1,04	1,66	1,80	1,81
Desvio Padrão	51,8	85,6	86,3	23,3	0,02	0,05	0,06	0,03	0,21	0,73	0,29	0,17
Coef. de variação (%)	36,3	62,3	80,7	21,3	1,30	2,87	3,31	1,94	19,99	298,24	15,90	9,26

A figura 1 demonstra a relação entre as concentrações obtidas e analisadas durante todo o período, juntamente com a relação dos desvios padrões obtidos em cada uma das amostras e respectivas temperaturas.

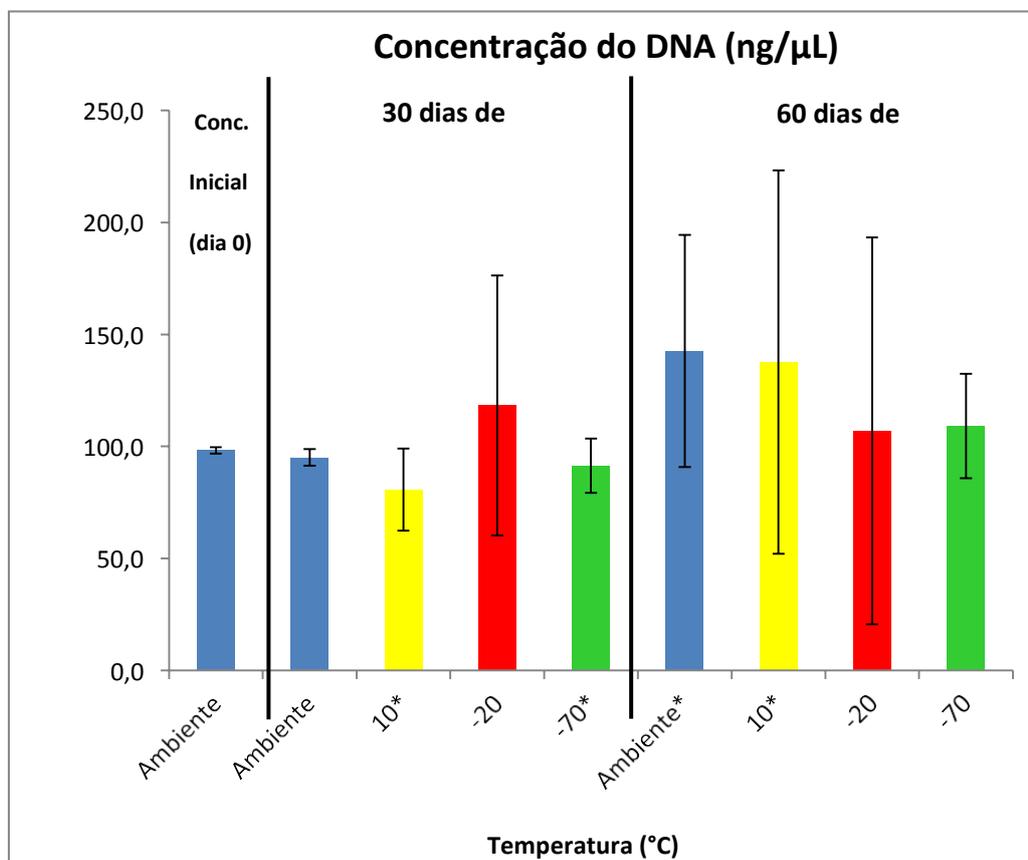


Figura 1- Variação da concentração em ng/dL e temperatura, nos 90 dias de análises (* $p < 0,05$)

A análise realizada pelo teste ANOVA e a comparação das médias mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) na média dos seguintes grupos: temperatura ambiente (60 dias de estocagem); 10°C (30 e 60 dias de estocagem) e -70°C (30 dias de estocagem). Nos demais grupos não houve diferenças significativas entre as concentrações.

DISCUSSÃO

Após os resultados e da análise pelo teste ANOVA, obtivemos as seguintes variações significativas ($p < 0,05$): as amostras armazenadas a 10°C e -70°C, durante 30 dias, apresentaram diminuição na concentração, que pode ser imputada a uma possível degradação do DNA; já as amostras estocadas em temperatura ambiente (entre 20 a 25°C) e 10°C, após um novo congelamento e 60 dias de

estocagem, apresentaram aumento evidente na concentração; este aumento pode ser devido à evaporação do Tris-EDTA, o solvente da amostra do DNA, devido aos processos de congelamento, descongelamento. Nos demais grupos não tivemos diferenças estatísticas, quando comparados à concentração da solução inicial.

Nos grupos onde a variação na concentração do DNA apresentou diferenças estatísticas significantes, não houve variações na relação 260/280, que se manteve com uma média aceitável próxima do valor 1,8, ou seja, DNA de boa qualidade na extração, indicando que não há resquícios de proteína. Já a relação 260/230 se manteve a baixo do valor de referência que vai de 1,8 a 2,2, indicando que o material pode estar contaminado com substâncias orgânicas, provavelmente o isopropanol usado na precipitação do DNA (ND-1000 Spectrophotometer v3. 3 User's Manual, 2006).

Todas as nossas amostras possuem material com boa concentração e podem ser submetidas a estudo por métodos simples como a Reação da Polimerase em Cadeia (“*Polymerase Chain Reaction*” - PCR), DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (“*Random Amplified Polymorphic DNA*” – RAPD, para metodologias mais complexas como exoma e sequenciamento não seria viável, por necessitar de uma amostra altamente pura e integra. Melo *et al.* (2010) afirmam que DNA pode ser armazenado em tampão Tris-EDTA por 26 semanas, por um ano, por até sete anos e por tempo indeterminado se for estocado nas temperaturas ambiente, 2-8°C, -20°C e -70°C, respectivamente. Esse fato explica a boa concentração das amostras em todas as fases deste estudo. Além disso a técnica utilizada de extração do DNA utilizada neste estudo, quando comparada a outras já conhecidas, como as utilizam fenol e clorofórmio, apresentam segundo Khun *et al.* (2017), menor impureza e fragmentação do DNA.

Na temperatura de -20°C o DNA não sofreu grandes oscilações nos valores de concentração, durante os 90 dias, fato que coaduna com a literatura, onde é usual armazenar o DNA a -20°C (CARDOZO *et al.*, 2009; MOLINARI e CROCHEMORE, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2002). Porém alguns autores alertam para o armazenamento em *freezer* tipo *frost-free*, pois este mecanismo faz com que a temperatura oscile causando o cisalhamento do DNA (MELO *et al.* 2010; SMITH; MORIN, 2005). Em nosso estudo o *freezer* utilizado não possui o mecanismo *frost-free*, o que explica os resultados obtidos.

CONCLUSÃO

Foi possível concluir que a estocagem a -20°C é a melhor temperatura para armazenamento de amostras de DNA, pois foram observadas pequenas variações no valor de concentração, porém é necessário quantificar o DNA antes do seu uso, pois pode haver variações significativas na sua concentração dependendo a temperatura utilizada a sua estocagem.

Os fatores congelamento e descongelamento, interferiram na concentração do DNA, mas não na viabilidade das amostras. Testes para avaliar a integridade do material seriam necessários para complementar os nossos estudos.

REFERÊNCIAS

CALDART, E.T.; CHIAPPETTA, C.M.; LOPES, E.F.; RAVAZZOLO, A.P. Análise comparativa de métodos de extração de DNA genômico de células do sangue e do leite de pequenos ruminantes e do leite de pequenos ruminantes. do leite de pequenos ruminantes. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.39, n.1, p. 945. 2011.

CARDOZO, D. M. et al. Extração de DNA a partir de sangue humano coagulado para aplicação nas técnicas de genotipagem de antígenos leucocitários humanos e de receptores semelhantes à imunoglobulina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Maringá - PR, v. 42, n. 6, p. 651-656, nov./dez. 2009.

COELHO, E. G. A. et al. Comparação entre métodos de estocagem de DNA extraído de amostras de sangue, sêmen e pelos e entre técnicas de extração. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. Minas Gerais, v. 56, n. 1, p. 111-115, 2004.

DUCLOS, C. C. A. **Biologia Molecular: História, Descoberta do DNA**, 2004. Disponível em: <<http://www.biomol.org/historia/existencia.shtml>>. Acesso em: 13, jul. 2015.

KUHN, R.; BÖLLMANN, J.; KRAHL, K.; BRYANT, I.M.; MARTIENSSEN, M. Comparison of ten different DNA extraction procedures with respect to their suitability for environmental samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 143, p.78-86, 2017.

MELO, M. R.; MARTINS, A.R.; BARBOSA, I.V.; ROMANO, P.; SHCOLNIK, W. Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 46, n. 5, p. 375-381, 2010.

MOLINARI, H. B.; CROCHEMORE, M. L. Extração de DNA genômico de *Passiflora spp.* para análises PCR-RAPD. **Rev. Bras. Frutic**. Jaboticabal – SP, v. 23, n. 2, p. 447-450, ago. 2001.

ND - 1000 Spectrophotometer. **User's Manual**. v3. 3, 2006.

OLIVEIRA, C. M. et al. Análise comparativa da estabilidade do DNA de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) sob diferentes métodos de preservação para uso em RAPD-PCR. **Neotropical Entomology**, v. 31, n. 2, p. 225-231, Apr./June. 2002.

PARADA, C. A. S. **Bioética: DNA e a Bioética**, 2002. Disponível em: <<http://www.geocities.ws/carolparada/bioetica/dnabioetica.htm>>. Acesso em: 13, jul. 2015.

SILVA, M. R. As controvérsias a respeito da participação de Rosalind Franklin na construção do modelo da dupla hélice. **Scientiæ Zudia**, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 69-92, 2010.

SMITH, S.; MORIN, P. A. Optimal storage conditions for highly dilute DNA samples: a role for trehalose as a preserving agent. **J. Forensic. Sci.**, v. 50, n.5, p. 1101-1108, 2005.