

ANÁLISE DE DNA POR ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHA POR TRANSFORMADA DE *FOURIER*

Jéssica Camila da Silva, Maiara Lima Castilho, Leandro Raniero, Airton Abrahão Martin, Renata de Azevedo Canevari

Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica, IP&D - Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP,
Av Shishima Hifumi, 2911 - São José dos Campos, SP, Brasil, 12244-000
jeeh_biomedica@yahoo.com.br

Resumo - O ácido desoxirribonucléico (DNA) contém toda a informação genética do indivíduo. A técnica de espectroscopia infravermelha por transformada de Fourier (FT-IR) tem sido amplamente utilizada na área biomédica para diferenciação de tecidos biológicos. O FT-IR é uma técnica muito sensível, e para realizar a extração de DNA utiliza-se muitos reagentes que interferem em sua análise. Portanto, faz-se necessário a utilização de um protocolo de purificação para a análise do DNA no FT-IR. Neste estudo, 25 amostras de carcinomas mamários de ratas foram utilizadas para a comparação de dois protocolos de purificação de DNA utilizados em rotina em laboratórios de biologia molecular. Após a extração (*DNeasy Mini Kit* - Qiagen™), o DNA foi purificado pelo protocolo *QIAamp® DNA* (Qiagen™) e pelo protocolo de acetato-etanol. Os resultados obtidos permitiram evidenciar que o DNA mais adequado para a análise em FT-IR é obtido por meio da purificação em acetato-etanol. Este protocolo estabelecido poderá tornar a tecnologia de FT-IR uma ferramenta efetiva na análise bioquímica do DNA que possivelmente poderá ser utilizado na diferenciação histológica de tecidos de carcinomas mamários.

Palavras-chave: *espectroscopia, FT-IR, DNA, câncer de mama*

Área do Conhecimento: Biomedicina

Introdução

O ácido desoxirribonucléico (DNA) é um composto orgânico cujas moléculas contêm as instruções genéticas que coordenam o desenvolvimento e o funcionamento de todos os seres vivos (GRIFFITHS, 2007). O DNA pode ser obtido de qualquer tecido. A extração e a purificação do DNA genômico compreendem vários passos que incluem a lise das células, extração das proteínas e do RNA e precipitação do DNA (FARAH, 1997).

A espectroscopia é cada vez mais reconhecida como uma poderosa tecnologia na pesquisa biomédica (KELLY *et al.*, 2011). A integração dos constituintes celulares do DNA pode ser visualizada pela técnica de Espectroscopia Infravermelha por Transformada de Fourier (FT-IR) que se baseia na absorção das vibrações moleculares, permitindo visualizar a integração dos constituintes celulares do DNA além de permitir a distinção entre tecidos normais e tumorais, sendo atualmente considerada uma técnica com grande potencial diagnóstico. (LASCH, 2004).

Este método é rápido, não destrutivo, oferece alta resolução espacial e não necessita de preparação da amostra (coloração). Além disto, os

dados espectrais podem ser facilmente correlacionados com os resultados histopatológicos. Deste modo, esta metodologia poderá se tornar uma ferramenta clínica que poderá ajudar profissionais da área médica a melhorar os diagnósticos e tratamento de doenças (KUBANEK, 2004).

O FT-IR é uma técnica muito sensível, e para realizar a extração de DNA utiliza-se muitos reagentes que interferem em sua análise. Portanto, faz-se necessário um protocolo de purificação para análise de DNA no FT-IR. O objetivo deste trabalho é a obtenção de DNA com elevado grau de pureza, no sentido de evitar a interferência de reagentes durante a análise em FT-IR, garantindo assim a melhor eficiência desta técnica.

Metodologia

Casuística

Esta pesquisa seguiu as políticas e normas que regulamentam as pesquisas envolvendo animais e os princípios éticos sobre a experimentação animal, editado pelo Comitê Brasileiro de Experimentação em Animais - COBEA e obteve

aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba - CEP / UNIVAP (protocolo no A022/2006/CEP).

O grupo experimental de animais foi constituído por ratas fêmeas virgens da raça *Sprague-Dawley*. Um total de 25 amostras de carcinomas mamários de ratas, sendo 12 amostras de adenocarcinoma cribriforme e 13 amostras de adenocarcinoma papilar foram obtidas de 18 ratas. Para algumas ratas foram analisados mais de dois tumores. Os tumores da glândula mamária foram induzidos com uma dose única de 50 mg de DMBA (7,12-dimetilbenz(a)antraceno). Todas as ratas, com peso médio de 185 gramas, receberam o carcinógeno químico na idade de 40 dias. Imediatamente após a biópsia, as amostras foram transferidas para nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até a etapa de extração de DNA.

Extração de DNA

O método de extração de DNA utilizado foi o protocolo *DNeasy Mini Kit* (QiagenTM) que consistiu na lise do tecido por meio da utilização de tampão de extração com proteinase K e a incubação do amostra em banho-maria a 55°C por 3-4 horas. A amostra foi purificada em uma coluna *spin* que contém uma membrana de sílica-gel. Posteriormente o DNA foi armazenado em água ultra pura e quantificado por espectroscopia óptica (Nanodrop, ND-1000, Labtrade). Adicionalmente, a qualidade do DNA das amostras foi visualizada em eletroforese em gel de agarose com coloração com brometo de etídeo.

Purificação das amostras

Após a extração do DNA, dois protocolos de purificação foram testados: protocolo de purificação *QIAamp® DNA* (QiagenTM) e o protocolo de purificação com acetato-etanol. Ambos os protocolos foram empregados para cada uma das amostras de DNA. Em seguida, as amostras de DNA purificadas foram quantificadas por espectroscopia de absorção por ultravioleta (Nanodrop, ND-1000, Labtrade).

FT-IR

Para análise no FT-IR, o DNA foi padronizado na concentração de 100 ng/ μl , depositado em janela de fluoreto de cálcio (CaF_2) e liofilizado em um concentrador a vácuo (Concentrator 5301, Eppendorf). A análise no FT-IR foi realizada no equipamento Spectrum Spotlight 400 (Perkin-Elmer), na resolução de 4 cm^{-1} , região espectral de 4000 cm^{-1} a 900 e com 64 varreduras. Cinco espectros de cada amostra foram obtidos.

Análise espectral

Os espectros obtidos foram extraídos para o programa *Bruker OPUS™ Software* no qual foram tratados e normalizados. Foi realizada a normalização vetorial, linha de base, correções de ruídos e exclusão do pico de CO_2 que não são utilizados em análises estatísticas. O programa *Origin 8.0® software* (Microcal software, Inc., Northampton, MA, USA) foi utilizado para realizar as médias dos espectros.

Resultados

A quantificação e a análise do DNA no FT-IR foram realizadas para cada amostra imediatamente após sua extração, após a purificação com o protocolo *QIAamp® DNA* e após a purificação com o protocolo acetato-etanol. Todas as amostras de DNA extraídas apresentaram razão de 260/280 nm entre 1,8 e 2,0, indicando pureza das mesmas (PALMA *et al.*, 2008).

Na figura 1, estão representadas as médias espectrais de cada análise realizada no DNA. Observou-se que o DNA tratado pelo protocolo de purificação de acetato-etanol apresenta picos mais definidos e com uma quantidade maior de picos quando comparado ao DNA submetido ao protocolo de purificação *QIAamp® DNA* (QiagenTM) e ao DNA onde não foi realizada a purificação.

Após a extração, os picos detectados no espectro de DNA foram $3394, 3299, 3158, 2799, 2155, 1767, 1541, 1222$ e 1045 cm^{-1} (Figura 2). Nos espectros obtidos após a purificação com *QIAamp® DNA* foram encontrados os picos de $3393, 3158, 2789, 2155, 1667$ e 1541 cm^{-1} (Figura 3). Após a purificação com acetato-etanol os espectros obtidos apresentaram um número maior de picos: $3356, 3196, 2980, 2338, 2242, 1789, 1655, 1487, 1417, 1231, 1087, 1065$ e 965 cm^{-1} (Figura 4).

Na figura 5, está ilustrado os filmes finos de DNA liofilizados no microscópio do FT-IR, onde claramente se observa as diferenças entre os DNAs submetidos ao protocolo de purificação *QIAamp® DNA*, os DNAs submetidos ao protocolo de purificação acetato-etanol e o DNA sem purificação. Foi detectada a presença de cristais de sais nos DNAs sem purificação e nos DNAs submetidos ao *QIAamp® DNA*. Nos DNAs submetidos ao protocolo de purificação acetato-etanol, não foi observada a presença desses cristais, o que indica que as impurezas contidas no DNA não estão mais presentes.

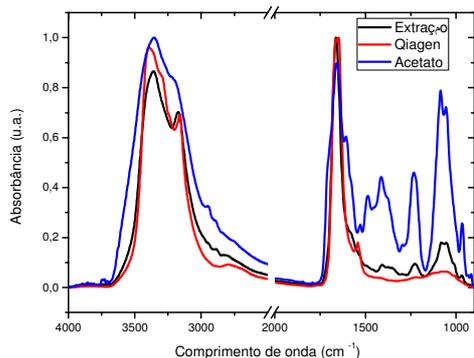


Figura 1: Médias espectrais da análise do DNA por FT-IR. DNA sem purificação (extração), DNA purificado com QIAamp® e DNA purificado com acetato-etanol.

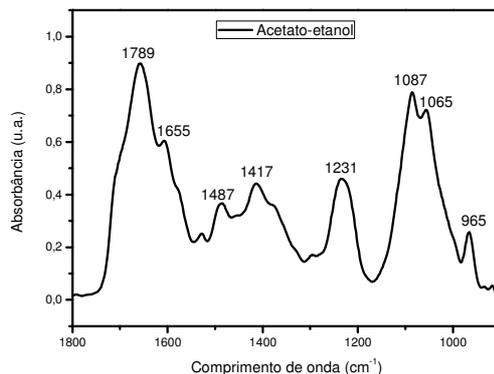


Figura 4: Espectro médio dos DNAs purificados com acetato-etanol obtidos pela técnica de FT-IR.

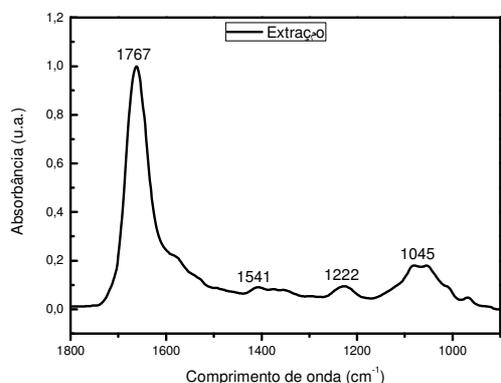


Figura 2: Espectro médio dos DNAs sem purificação (extração) obtidos pela técnica de FT-IR.

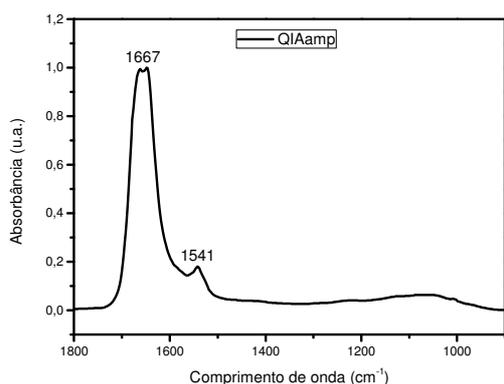


Figura 3: Espectro médio dos DNAs com purificação QIAamp® DNA obtidos pela técnica de FT-IR.

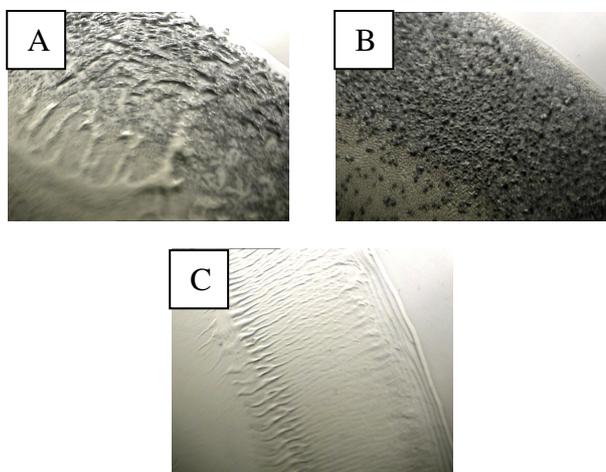


Figura 5: Fotos do DNA liofilizados em janela de CaF2 obtidas do microscópio do FT-IR. (A) DNA que não foi submetido a purificação (extração), (B) DNA purificado pelo QIAamp® DNA e (C) DNA purificado pelo protocolo acetato-etanol.

Discussão

Neste trabalho foram analisadas 25 amostras de DNA extraído de mama de ratas. Os resultados da quantificação mostraram DNAs em boas concentrações e com a razão de 260/280 nm, o que está dentro dos parâmetros estabelecidos para um DNA puro, evidenciando que a extração foi eficiente e que não há resíduos que possam atrapalhar a análise molecular do DNA.

O FT-IR é uma técnica extremamente sensível, onde todos os constituintes bioquímicos de uma determinada amostra analisada são determinados. Na análise por FT-IR das amostras de DNA extraídas sem nenhum tipo de tratamento posterior, foi possível observar que os picos não estavam explícitos. Uma explicação provável para isso, seria devido a presença de reagentes utilizados no processo de extração, como os

compostos EDTA e TE, que poderiam exercer um efeito inibitório na formação dos picos nos espectros. Portanto, foram utilizados e comparados dois protocolos de purificação com o intuito de purificar o DNA a ser analisado por FT-IR com o objetivo de oferecer assim uma maior confiabilidade e precisão na análise.

Os picos 1767 cm^{-1} e 1789 cm^{-1} que correspondem a C=O e os picos de 1222 cm^{-1} e 1231 cm^{-1} que correspondem a estiramentos de fosfato aparecem tanto nos espectros das amostras em que foi realizado somente a extração quanto nos espectros das amostras em que foi utilizado o protocolo de purificação acetato-etanol.

Na análise do DNA submetido ao protocolo de purificação *QIAamp*® DNA foi possível observar que os picos 1667 cm^{-1} (C₂=O citosina) e 1541 cm^{-1} (guanina), que estavam presentes em baixa intensidade no espectro do DNA extraído não purificado, estavam ausentes no espectro do DNA submetido a este protocolo de purificação. Uma provável explicação para a ausência desses picos no espectro do DNA purificado pode ser devido a interferência dos reagentes utilizados neste protocolo de purificação específico.

A utilização do protocolo acetato-etanol conseguiu superar esta interferência, onde os picos que representam os constituintes bioquímicos do DNA: 1789 cm^{-1} (C=O timina), 1655 cm^{-1} (C₂=O citosina), 1487 cm^{-1} (guanina), 1417 cm^{-1} (deformação C-H, N-H; estiramento C-N), 1231 cm^{-1} e 1087 cm^{-1} (estiramentos de PO₂), 1065 cm^{-1} (estiramento de C-O desoxirribose), 965 cm^{-1} (C-C desoxirribose), são claramente observados e apresentam uma alta intensidade nos espectros. O espectro obtido com o DNA purificado com este protocolo indica que o DNA não está mais sofrendo a interferência de reagentes, e provavelmente o acetato e o etanol utilizados carregam todas as impurezas contidas na amostra, sendo possível assim a obtenção de um DNA com alto grau de pureza.

Os picos de 1608 cm^{-1} , 1529 cm^{-1} , 1505 cm^{-1} , 1487 cm^{-1} , 1453 cm^{-1} , 1417 cm^{-1} , 1374 cm^{-1} e 1294 cm^{-1} , que são característicos de amostras de DNA, aparecem somente nas amostras de acetato. Esses resultados corroboram com os encontrados por Kondepoti et al. (2005) e por Malins et al. (2005), onde foram localizadas, na região espectral entre $1750\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$, bandas vibracionais de bases de nucleotídeos, enquanto que a região entre $1300\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ foram atribuídos as vibrações de fosfatos.

Este trabalho contribui para a pesquisa de DNA por FT-IR, visto que a interferência de reagentes utilizados na extração pode proporcionar resultados não fidedignos. O estabelecimento do protocolo adequado para a purificação do DNA tornou possível a obtenção de espectros de alta

qualidade e com isso poderá possibilitar uma análise mais precisa entre DNAs de tecidos normais e tumorais e com isso ser uma ferramenta importante no diagnóstico de diversas neoplasias.

Conclusão

A interferência de reagentes químicos utilizados no processo de extração de DNA tem grandes interposições no espectro de DNA, inibindo algumas bandas. Os resultados obtidos neste estudo indicam que é possível se obter DNA de tecido mamário com excelente qualidade para a análise em FT-IR. Foi estabelecido que o protocolo mais adequado para este fim é obtido por meio da purificação em acetato-etanol, na qual proporcionou melhores espectros quando comparado com o DNA sem purificação e com o protocolo *QIAamp*® DNA (QiagenTM).

Com o protocolo estabelecido, a espectroscopia infravermelha por transformada de *Fourier* pode atuar como uma ferramenta efetiva na análise bioquímica do DNA, podendo ter inúmeras aplicações, dentre elas o auxílio no diagnóstico das neoplasias mamárias por meio da diferenciação histológica dessas lesões.

Agradecimentos

Ao CNPq / PIBIC e a FAPESP pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

- FARAH, S.B. DNA Segredos & mistérios. Sarvier, 1997.
- GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. Genética moderna. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- KELLY, J.G.; TREVISAN, J.; SCOTT, A.D.; CARMICHAEL, P.L.; POLLOCK, H.M.; MARTIN-HIRSCH, P.L.; MARTIN, F.L. Biospectroscopy to metabolically profile biomolecular structure: a multistage approach linking computational analysis with biomarkers. Journal Proteome Research, v. 10, n. 4, p. 1437-1448, 2011.
- KONDEPATI, V. R.; KEESE, M.; HEISE, H. M.; BACKHAUS, J. Detection of structural disorders in pancreatic tumour DNA with Fourier-transform infrared spectroscopy. Vibrational Spectroscopy, v. 40, n.1, p. 33-39, 2005.
- KUBANEK, P.; BUSCH, O.; THOMSON, S.; SCHMIDT, H. W.; SCHÜTH, F. Imaging reflection IR spectroscopy as a tool to achieve higher integration for high-throughput experimentation in

XVINICEncontro Latino Americano
de Iniciação Científica**XI EPG**Encontro Latino Americano
de Pós Graduação**VINIC Jr**Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica Júnior

catalysis research. Journal of combinatorial chemistry, v. 6, n. 3, p. 420-425, 2004.

LASCH, P.; HAENSCH, W.; NAUMANN, D.; DIEM, M. Imaging of colorectal adenocarcinoma using FT-IR microspectroscopy and cluster analysis. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis Of Disease, v.1688, n.2, p.176-186, 2004.

MALINS, D.C.; JOHNSON, P.M.; BARKER, E.A.; POLISSAR, N.L.; WHEELER, T.M.; ANDERSON, K.M. Cancer-related changes in prostate DNA as men age and early identification of metastasis in primary tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 100, n. 9, p. 5401-5406, 2003.

PALMA, B.F.; FERRARI, A.B.; BITAR, R.A.; CARDOSO, M.A.; MARTIN, A.A.; MARTINHO, H.S. DNA extraction systematics for spectroscopic studies. Sensors, v. 8, n. 6, p. 3624-3632, 2008.