

# PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA DE SALIVA PARA ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DA CAVIDADE ORAL

## STANDARDIZATION OF EXTRACTION AND PURIFICATION OF SALIVA DNA FOR ISOLATION OF ORAL CAVITY MICROORGANISMS

<sup>1</sup>DOS SANTOS, H. M. R.; <sup>2</sup>GATTI, L. L.

<sup>1e2</sup>Curso de Odontologia – Faculdades Integradas de Ourinhos-FIO/FEMM

### RESUMO

*Helicobacter pylori* é uma bactéria gram negativa conhecida por colonizar a mucosa gástrica humana, e tem sido fortemente associada com gastrite crônica, úlcera e carcinomas gástricos. Este microrganismo é adquirido principalmente pelas via oral-oral e fecal-oral. Sugere-se que a cavidade oral possa ser um reservatório da infecção baseado em várias técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase, com resultados diversos. Este trabalho teve como objetivo: Padronizar a extração de DNA genômico de material biológico, saliva; Padronizar a Reação em Cadeia da Polimerase para amplificação de Material Genético do *Helicobacter pylori*; e Diagnosticar *Helicobacter pylori* através da técnica de PCR, a partir de material coletado da saliva. Os resultados encontrados não foram observados a presença de DNA bacteriano utilizando a metodologia de extração com fenol. Desta forma das 50 amostras analisadas, somente os controles apresentaram positividade, sugerindo a aplicação de uma metodologia mais específica para extração de DNA de saliva em relação à aplicada.

**Palavras-chave:** *Helicobacter pylori*. Cavidade oral. Infecção gástrica. Padronização. DNA.

### ABSTRACT

*Helicobacter pylori* is a gram negative bacterium known to colonize the human gastric mucosa, and has been strongly associated with chronic gastritis, ulcer and gastric carcinomas. This microorganism is mainly acquired by oral-oral and fecal-oral route. It is suggested that the oral cavity may be a reservoir of infection based on various molecular techniques, such as Polymerase Chain Reaction, with diverse results. This work aimed to: Standardize the extraction of genomic DNA from biological material, saliva; Standardize Polymerase Chain Reaction for Amplification of *Helicobacter pylori* Genetic Material; and Diagnose *Helicobacter pylori* by PCR, from material collected from saliva. The results found were not observed the presence of bacterial DNA using the phenol extraction methodology. Thus, of the 50 samples analyzed, only the controls were positive, suggesting the application of a more specific methodology for saliva DNA extraction in relation to the applied one.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*. Oral cavity. Gastric Infection. Padronization. DNA.

### INTRODUÇÃO

A infecção por *Helicobacter pylori* nos seres humanos é muito comum, sendo que aproximadamente metade da população mundial está infectada pela bactéria, sendo este patógeno o responsável por doenças como, gastrite, úlcera péptica e risco para o desenvolvimento de câncer gástrico. A transmissão dessa bactéria pode ocorrer de pessoa para pessoa nas formas oral-oral, gástrica-oral e fecal-oral, e a cavidade bucal pode ser considerada importante no processo de transmissão da bactéria ou

na reinfecção do estômago após a terapia de erradicação (GATTI; LUSCENTI, 2008).

Há muitos métodos úteis para o diagnóstico de infecção por *Helicobacter pylori*, alguns deles se utilizam da endoscopia gastrointestinal como meio de obtenção de material para o exame, no entanto, outros métodos não invasivos podem ser utilizados para este fim, utilizando-se dessa forma materiais como a saliva e o biofilme dental (BALLAM *et al.*, 2000). O surgimento dos testes moleculares permitiu-se detectar a bactéria em amostras que não são obtidas por meio de biópsia gástrica, dessa forma, pode-se determinar essa bactéria na saliva, no biofilme dental, nas secreções gástricas, nas fezes, possibilitando o diagnóstico clínico e o entendimento dos mecanismos de transmissão bacteriana (LU *et al.*, 2002).

O uso da saliva como meio para diagnóstico da infecção parece ser uma possibilidade atrativa para estudos epidemiológicos da infecção devido a natureza não invasiva do exame (MOURA *et al.*, 2004).

O presente trabalho teve como objetivos, padronizar a extração de DNA genômico de material biológico saliva, utilizando a metodologia de fenol para tal; padronizar a Reação em Cadeia da Polimerase para amplificação de Material Genético do *Helicobacter pylori*, bem como diagnosticar *Helicobacter pylori* através da técnica de PCR, a partir de material coletado da saliva.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram coletadas 50 amostras de saliva (Aprovado Pelo Comitê de Ética – Parecer 3.360.563 e financiado pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica UNIFIO – Processo 003/18), sendo armazenadas em tubos cônicos graduados de 50ml devidamente identificados e transportadas em gelo picado, os pacientes foram submetidos à auto-estimulação das glândulas salivares e coletado aproximadamente 2ml de saliva total expectorada diretamente em um tubo cônico graduado de 50ml estéril de acordo com ASHIMOTO *et al.* (1996) e WANG *et al.* (2002).

Para extração do DNA da saliva, foi utilizado 300 µl da amostra, e adicionado 30 µl de SDS 10%, com 15 µl de proteinase K (PK). O fenol deixando em Banho Maria a 56C por uma hora em 56º, sendo homogeneizado de 20 em 20 minutos. Posteriormente adicionado 300 µl de fenol e homogeneizado no Vortex. A solução foi centrifugada à 10000 rpm/5min. O sobrenadante, resultado da centrifugação, foi

extraído e colocado em outro microtubo, o qual foi adicionado 300 µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugado à 10000 rpm/ 5 minutos. Novamente tem-se a formação de sobrenadante, o qual foi coletado 250 µl deste, e transferido para outro microtubo. Após a transferência, adicionou-se 62 µl de acetato de amônia (AA) e 780 µl de etanol 100%, sendo a solução formada armazenada na geladeira durante 30 minutos. Após permanecer na geladeira durante 30 minutos, o material foi centrifugado novamente à 10000 rpm/ 15 minutos. O sobrenadante formado então é descartado. Posteriormente, adicionou-se 1 ml de etanol 70% e centrifugado à 10000 rpm/ 15 minutos, sendo que o sobrenadante formado foi descartado. O material restante foi secado, adicionado 50 µl de Tris EDTA (TE).

Para a detecção de *H. pylori* através da técnica de PCR, foi utilizado um par de oligonucleotídeos Hpx1/Hpx2 o qual amplifica um fragmento de 150pb referente ao fragmento da fração 16S do rRNA bacteriano. A reação de PCR foi realizada na seguinte condição: 40 ciclos de amplificação, onde cada ciclo consistiu de 1 minuto de desnaturação a 94°C, um de associação 1 minuto a 59°C e um último de 1 minuto de extensão a 72°C. Como controle negativo foi utilizada água estéril e como controle positivo uma amostra de material fresco sabidamente positiva para o *H. pylori*. Para todas reações foi utilizado 5ul dos 200ul totais do DNA extraído da saliva. Os fragmentos foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 2,0%, documentados e analisados através do sistema de captura e análise de imagens no Laboratório de Biologia Molecular do Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos.

## DESENVOLVIMENTO

Segundo MARSHALL; WARREN (1983) e PETERSON (1991) *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), é uma bactéria GRAM negativa conhecida por colonizar a mucosa gástrica humana, e tem sido fortemente associada com gastrite crônica, úlcera péptica e duodenal e é um risco para câncer gástrico, acrescentou AKAI et al. (2007). A bactéria tem uma potente atividade ureásica que participa da colonização gástrica, permitindo sua sobrevivência em meio ácido (SIQUEIRA *et al.*, 2007). Várias evidências apontam para possível papel do *H. pylori* na patogênese do adenocarcinoma gástrico. Em 1994, a bactéria foi classificada como carcinógeno do tipo 1 para câncer de estômago pelo Agência Internacional para Pesquisa em Câncer IARC (pertencente à Organização Mundial da Saúde). O câncer gástrico é a

segunda causa de morte no mundo, com incidência de 800.000 casos por ano. Acredita-se que mais de um terço dos carcinomas gástricos seja atribuído à infecção pelo *H. pylori* (KODAIRA; ESCOBAR; GRISI, 2002).

O *H. pylori* tem distribuição cosmopolita, a prevalência da infecção varia com a idade e o nível socioeconômico (SIQUEIRA *et al.*, 2007). Aproximadamente 50% da população mundial é infectada pelo *H. pylori* (MITCHELL, 1999), o que a torna uma das infecções bacterianas mais comuns no mundo, (PARSONNET *et al.*, 1991; HOPKINS; GIRARDI; TURNEY, 1996; DE VRIES *et al.*, 2007).

No Brasil a prevalência de *H. pylori* pode alcançar 80% em adultos (SOUTO *et al.*, 1998; MITCHELL *et al.*, 2003).

Várias pesquisas sobre o modo de transmissão desse microrganismo estão sendo desenvolvidas. As principais vias de infecção estabelecidas são a fecal-oral e a oral-oral, sendo que não há possibilidade de transmissão através do ato sexual comum (SIQUEIRA *et al.*, 2007).

Alguns autores KRAJDEN *et al.* (1989), MADMUJAR *et al.* (1990), NGUYEN; el-ZAATARI; GRAHAM (1995), LOSTER *et al.* (2006), DE SOUZA *et al.* (2006) e SOUTO *et al.* (2008), relataram que a cavidade oral pode ser um reservatório da infecção baseado em várias culturas e técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com resultados diversos. Para CLAYTON *et al.* (1992), a detecção de *H. pylori* por PCR possibilitará análises retrospectivas e prospectivas de amostras clínicas, elucidando o papel desse organismo na doença gastroduodenal.

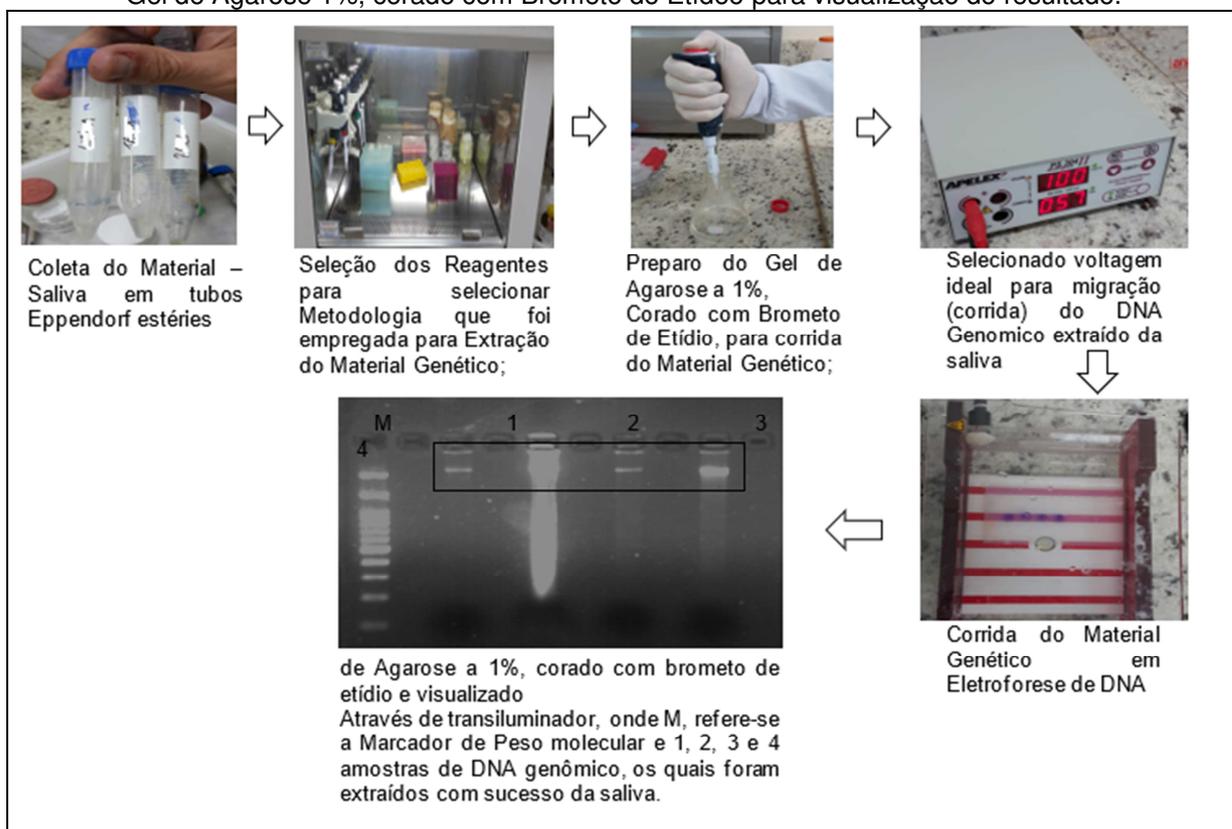
BERROTERAN *et al.* (2002), GERABA *et al.* (2004) concluíram que a cavidade oral pode ser um reservatório para a infecção por *H. pylori* e as secreções orais podem ser um importante meio de transmissão de *H. pylori*, e a colonização deste microrganismo não está restrita à mucosa gástrica, acrescentado por NGUYEN *et al.* (1993).

## RESULTADOS

A idade dos indivíduos voluntários teve uma variação de 18 a 25 anos, sendo 25 indivíduos do sexo masculino e 25 do sexo feminino. Após a coleta do material (saliva), o mesmo foi submetido ao protocolo de extração de DNA com fenol clorofórmio. Amostras estas utilizadas para padronização da metodologia de extração no material de saliva. O protocolo para a extração de DNA com fenol foi

baseado no método descrito por Isola *et al.* (1994), conforme esquematizado na Figura 1.

**Figura 1.** Fluxograma do processo de Extração do Material Genético de Saliva, bem como corrida em Gel de Agarose 1%, corado com Brometo de Etídeo para visualização do resultado.

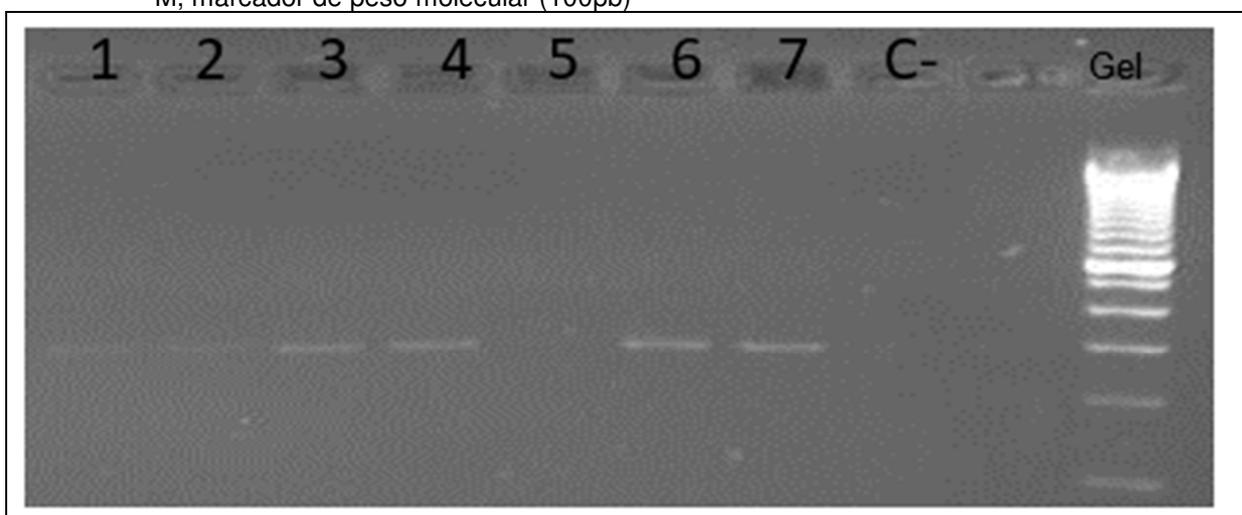


As diferentes metodologias utilizadas e otimizadas para a extração de DNA mostram que os métodos baseados na digestão enzimática (digestão com proteinase K), independentemente do método de extração do DNA genômico (fenol ou partículas de sílica), resultam em material com quantidade e pureza satisfatórias para amplificação do DNA pela técnica da PCR (MESQUITA, 2001). Para quantificação do Material Genético extraído pela metodologia do Fenol Clorofórmio, além da corrida de gel de agarose a 1%, o mesmo foi quantificado com a utilização do Sistema de Nanodrop 2000C, no qual consiste em ensaios biomoleculares que estão continuamente a serem desenvolvidos, onde utiliza quantidades progressivamente menores de material, muitas vezes impossibilitando o uso de cubeta convencional baseada em instrumentos para quantificação de ácidos nucleicos para aqueles que podem realizar quantificação microvolume. Foi observado uma variação da concentração de DNA de 11,6 ng/μl até 14553,0 ng/μl, o que pode ser sugerido uma contaminação do DNA devido a metodologia utilizada

para a extração do DNA que foi o fenol/clorofórmio. De acordo com relatos do fabricante, as fontes comuns de contaminantes específicos associados com técnicas de isolamento de ácido nucléico incluem a extração de fenol / Trizol e coluna. No caso da extração de fenol / Trizol, a contaminação do reagente residual pode ser indicada por espectros anormal, o que pode ter ocorrido durante o procedimento adotado, porém não interferiu na realização da Reação em Cadeia da Polimerase. Na figura 2 abaixo, encontra-se demonstrado a dinâmica da realização da quantificação.

Para que fosse confirmado a presença de Material genômico no material extraído da saliva, foi selecionado a amplificação do gene da *IL-6* de todas as amostras, uma vez que refere-se a um gene presente de forma constitutiva no ser humano, para validar a PCR posterior, onde foi realizado primers específicos para a detecção de material genético da bactéria *Helicobacter pylori*. Com a utilização dos primers selecionados foi possível a amplificação de um fragmento de 300pb. Com a utilização dos primers sense (F1) e antisense (R1), obteve-se um fragmento de 300pb, referente a região promotora do gene da *IL-6* selecionado, utilizando as seguintes condições da PCR: 94C por 5 minutos, 30 ciclos de 94C por 30 segundos, 60C por 30 segundos, 72C por 30 segundos seguido de um ciclo de 72C por 5 minutos e refrigeração por 4C. Os produtos da PCR foram corridos em gel de agarose a 2%, os quais encontram-se demonstrados na Figura 2 abaixo:

**Figura 2.** Gel de agarose a 2%, corado com Brometo de Etídio. 1-7, amostras de DNA, amplificadas o fragmento de 300pb, referente à região promotora do gene da *IL-6*. C-, controle negativo e M, marcador de peso molecular (100pb)



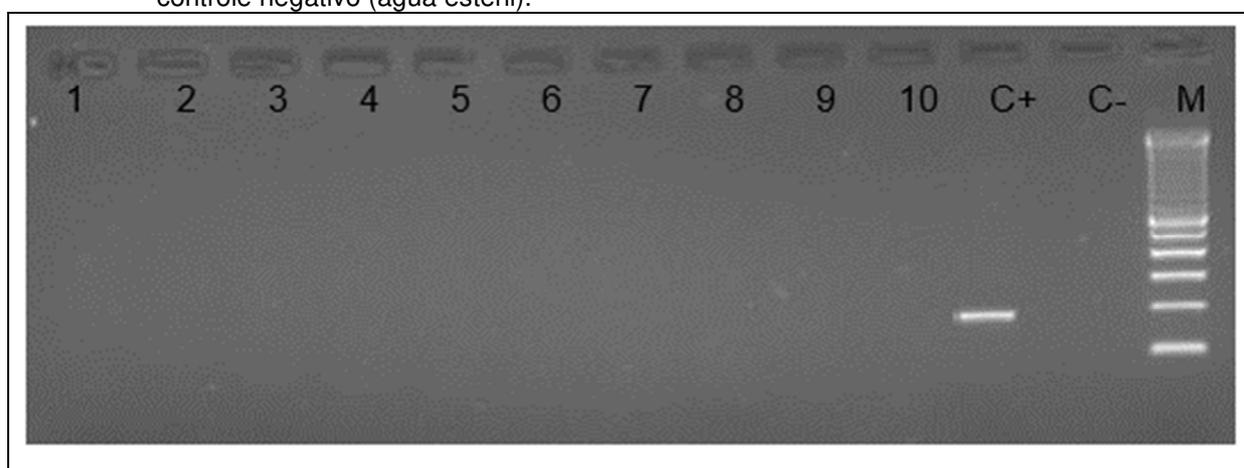
Desta forma, foi observado a amplificação esperada, demonstrando a presença de material genômico no DNA extraído da saliva, apesar das possíveis contaminações apresentadas durante a quantificação do material por Nanodrop.

Para amplificação do gene da região ribossomal do *H. pylori* foi utilizado as condições adequadas para a reação de PCR de 40 ciclos de amplificação, onde cada ciclo consistiu de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 minuto de associação a 59°C e um último de 1 minuto de extensão a 72°C. Utilizando os primers:

Oligo	Sequência ( 5'-3' )	Orientação	Gene	Bibliografia
Hpx1	CTGGAGARACTAAGYCCTCC	Sense	Fração 16S rRNA	SCHOLTE <i>et al.</i> , 1997
Hpx2	GAGGAATACTCATTGCGAAGG CGA	Anti-sense	Fração 16S rRNA	SCHOLTE <i>et al.</i> , 1997

Após a realização da PCR nas condições acima, foi observado a amplificação do fragmento de 150pb, somente da amostra controle positivo, demonstrando desta forma que das 50 amostras analisadas, nenhuma apresentou positividade para o material genético da bactéria na saliva. O resultado da amplificação, encontra-se na figura 3 abaixo:

**Figura 3.** Gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo para visualização da amplificação do fragmento de 150pb, referente ao fragmento gênico do RNA ribossomos do *H. pylori*. Amostras 1-10, C+, controle positivo (amplificação de um fragmento de 150pb e C-, controle negativo (água estéril).





## CONCLUSÃO

Diante o exposto, é permitido dizer que, mesmo com a extração do material genético das amostras de saliva, confirmado pela amplificação do gene da *Interleucina 6* por meio de PCR, a amplificação do gene da região do RNA de *H. Pylori* não apresentou resultado positivo para essas amostras, uma vez que apenas o controle positivo apresentou este resultado. Além disso, a negatividade das amostras para o gene de *H. pylori*, pôde ser comprovado pela quantificação das amostras por meio do sistema Nanodrop. De acordo com os fatos, permite se dizer que a metodologia utilizada para expressa finalidade não possui eficácia para o objetivo proposto, sendo assim, a extração por fenol / Trizol não é fidedigno para a amplificação do gene da região do RNA de *H. Pylori*, sendo assim necessário a utilização de metodologias mais específicas para tal procedimento.

## REFERÊNCIAS

ASHIMOTO, A.; CHEN, C.; BAKKER, I.; SLOT, J.; **Polymerase chain reaction of 8 pulative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol. Immunol.*** v. 11(4): 226-73, 1996.

BALLAM, L. D. et al. Western blotting is useful in the salivary diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Journal of clinical pathology**, v. 53, n. 4, p. 314-317, 2000.

BERROTERAN, Alejandra et al. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in the oral cavity and gastroduodenal system of a Venezuelan population. **Journal of medical microbiology**, v. 51, n. 9, p. 764-770, 2002.

CLAYTON, C. L. et al. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 192-200, 1992.

DE SOUZA L.; VASQUEZ L.; VELASCO J.; PARLAPIANO D. Isolation of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa, dental plaque and saliva in a population from the Venezuelan Andes. **Investigation Clinica**, v. 47(2): 109-116, 2006.

DE VRIES, A. C.; KUIPERS, E. J. *Helicobacter pylori* eradication for the prevention of gastric cancer. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 26, p. 25-35, 2007.

GATTI, LL; LUSCENTI RS. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA INFECÇÃO PELO HELICOBACTER PYLORI EM MUCOSA GÁSTRICA. **Revista Paraense de Medicina**, V.22 (1) janeiro a março 2008.

GEBARA, E. C. E. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* detected by polymerase chain reaction in the oral cavity of periodontitis patients. **Oral microbiology and immunology**, v. 19, n. 4, p. 277-280, 2004.

HOPKINS, R.; GIRARDI, L.S.; TURNEY, E.A. Relationship between *Helicobacter pylori* eradication and reduced duodenal and gastric ulcer recurrence: a review. **Gastroenterology**, v. 110, p. 1244-1252, 1996.

ISOLA, Jorma et al. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. **The American Journal of Pathology**, v. 145, n. 6, p. 1301, 1994.

KODAIRA, Marcia S.; ESCOBAR, Ana Maria de Uihôa; GRISI, Sandra. Aspectos epidemiológicos do *Helicobacter pylori* na infância e adolescência. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, p. 356-369, 2002.

KRAJDEN, S. et al. Examination of human stomach biopsies, saliva, and dental plaque for *Campylobacter pylori*. **Journal of clinical microbiology**, v. 27, n. 6, p. 1397-1398, 1989.

LOSTER, B. W. et al. The relationship between the presence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity and gastric in the stomach. **J Physiol Pharmacol**, v. 57, n. Suppl 3, p. 91-100, 2006.

LU, Yingzhi et al. Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated municipal wastewater. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 3, p. 1436-1439, 2002.

MAJMUDAR, P. et al. Isolation of *Helicobacter pylori* from dental plaques in healthy volunteers. **Indian journal of gastroenterology: official journal of the Indian Society of Gastroenterology**, v. 9, n. 4, p. 271-272, 1990.

MARSHALL, B.J.; WARREN, J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **The Lancet**, v. 983, p. 1311-1315, 1983.

MESQUITA, Ricardo Alves et al. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 15, n. 4, p. 314-318, 2001.

MITCHELL, Anastasia et al. Age-specific *Helicobacter pylori* seropositivity rates of children in an impoverished urban area of northeast Brazil. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 3, p. 1326-1328, 2003.

MITCHELL, H. M. The epidemiology of *Helicobacter pylori*. In: **Gastrointestinal Disease and Helicobacter pylori**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1999.

MOURA, S. A. B. et al. Identificação de *Helicobacter pylori* na saliva e biofilme dental. **Int. J. Of Dent., Recife**, v. 3, n. 2, p. 349-352, 2004.

NGUYEN, A. M. et al. Detection of *Helicobacter pylori* in dental plaque by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Journal of clinical microbiology**, v. 31, n. 4, p. 783-787, 1993.

NGUYEN, Anne-Marie H.; EL-ZAATARI, Found AK; GRAHAM, David Y. *Helicobacter pylori* in the oral cavity: A critical review of the literature. **Oral Surgery, Oral**

**Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 79, n. 6, p. 705-709, 1995.

PARSONNET, Julie et al. Helicobacter pylori infection in intestinal-and diffuse-type gastric adenocarcinomas. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, n. 9, p. 640-643, 1991.

PETERSON, Walter L. Helicobacter pylori and peptic ulcer disease. **New England Journal of Medicine**, v. 324, n. 15, p. 1043-1048, 1991.

SIQUEIRA, Jullyana S. et al. Aspectos Gerais nas Infecções por Helicobacter pylori Revisão. **RBAC**, v. 39, n. 1, p. 9-13, 2007.

SOUTO, Francisco José Dutra et al. Prevalence of Helicobacter pylori infection in a rural area of the state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 2, p. 171-174, 1998.

SOUTO, Renata; COLOMBO, Ana Paula Vieira. Detection of Helicobacter pylori by polymerase chain reaction in the subgingival biofilm and saliva of non-dyspeptic periodontal patients. **Journal of periodontology**, v. 79, n. 1, p. 97-103, 2008.

AKAI, Yuichi et al. Green tea polyphenols reduce gastric epithelial cell proliferation and apoptosis stimulated by Helicobacter pylori infection. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 40, n. 2, p. 108-115, 2007.

WANG, Jie et al. Comparison of cytotoxin genotypes of Helicobacter pylori in stomach and saliva. **Digestive diseases and sciences**, v. 47, n. 8, p. 1850-1856, 2002.