

# UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Instituto de Biologia

Ciências Biológicas - Bacharelado



## Trabalho de Conclusão de Curso

Avaliação quantitativa e qualitativa de DNA obtido a partir de lesões potencialmente malignas e do carcinoma espinocelular de boca

Fausto Gueths Gomes

Pelotas, 2011

Fausto Gueths Gomes

Avaliação quantitativa e qualitativa de DNA obtido a partir de lesões potencialmente malignas e do carcinoma espinocelular de boca

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Sandra Beatriz Chaves Tarquinio

Co-orientadora: Fernanda Nedel

Pelotas, 2011

Dados de catalogação na fonte:  
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901  
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

G633a      Gomes, Fausto Gueths  
Avaliação quantitativa e qualitativa de DNA obtido a partir de lesões potencialmente malignas e do carcinoma espinocelular de boca / Fausto Gueths Gomes. – 67p. : fig. – Monografia (Conclusão de curso). Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia, Faculdade de Odontologia. Pelotas, 2011. – Orientador Sandra Beatriz Chaves Tarquinio ; co-orientador Fernanda Nedel.

1. Biologia. 2. Carcinoma espinocelular bucal. 3. Escova citológica. 4. Quantificação de DNA. 5. Qualidade de DNA.  
I. Tarquinio, Sandra Beatriz Chaves. II. Nedel, Fernanda.  
III. Título.

CDD: 616.99431

Banca examinadora:

Profa Dra Sandra Beatriz Chaves Tarquinio (orientadora), UFPEL

Prof Dr Fábio Pereira Leivas Leite, UFPEL

Me. Marcus Cristian Muniz Conde, UFPEL

Ma. Raquel Venâncio Dantas (suplente), UFPEL

“À minha família e aos meus amigos”

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer à minha orientadora, profa. Sandra Beatriz Chaves Tarquinio, pela excelente orientação.

Também gostaria de agradecer à minha co-orientadora, Fernanda Nedel, por todo o apoio.

Agradeço por me ensinarem muito, tanto em termos acadêmicos, quanto em termos de princípios, integridade e bondade.

Também gostaria de agradecer à FAPERGS e ao CNPq, pela concessão de bolsas de iniciação científica, em seus respectivos períodos.

*“Vou mostrando como sou  
e vou sendo como posso  
Lançando meu corpo no mundo  
andando por todos os cantos  
e pela lei natural dos encontros  
eu deixo e recebo um tanto  
e passo aos olhos nus  
ou vestidos de lunetas  
Passado, presente  
participo sendo o mistério do planeta (...)  
Abra um parêntesis  
não esqueça  
que independente disso  
eu não passo  
de um malandro  
de um moleque do Brasil”*

Galvão e Moraes Moreira – Mistério do Planeta (Novos Baianos)

## Resumo

GOMES, Fausto Gueths. **Avaliação quantitativa e qualitativa do DNA obtido a partir de lesões potencialmente malignas e do carcinoma espinocelular de boca.** 2011. 67f. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Ciências Biológicas (bacharelado). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O câncer é uma doença com alta incidência em um contexto global. A metodologia padrão e de fundamental importância para o diagnóstico de lesões potencialmente malignas e malignas bucais é a biópsia do local afetado seguida do exame histopatológico da lesão. É necessário, porém, o aprimoramento de técnicas auxiliares que possam complementar o diagnóstico de tais lesões. Para que novas formas de análises moleculares possam ser desenvolvidas, é fundamental uma coleta de material biológico adequada, bem como métodos eficazes de extração de DNA para que este possa ser utilizado no auxílio de diagnóstico. O intuito deste trabalho foi avaliar se os métodos de coleta de material por escova citológica e extração de DNA utilizados proporcionam DNA de quantidade e qualidade para futuras análises moleculares em lesões potencialmente malignas e carcinoma espinocelular da boca. As verificações da quantidade de DNA amostral foram feitas através de espectrofotometria (Nanovue, GE Healthcare Life Sciences) e a qualidade do mesmo através de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), associada à genotipagem do códon 72, gene Tp53. Os resultados obtidos apontam médias e desvio padrão na concentração de DNA de 10,30µg/escova ( $\pm 11,97$ ) para carcinoma espinocelular e 8,51 µg/escova ( $\pm 6,64$ ) nos controles (n=15), 2,39µg/escova ( $\pm 2,69$ ) para líquen plano e 4,80 µg/escova ( $\pm 3,37$ ) nos controles (n=13), 1,31µg/escova ( $\pm 1,35$ ) em displasias epiteliais de moderada a severa e 3,23µg/escova ( $\pm 3,53$ ) nos controles (n=12) e 0,93µg/escova ( $\pm 1,00$ ) em displasias discretas associadas ou não a quadros de hiperqueratose e acantose e 6,44µg/escova ( $\pm 8,36$ ) nos controles (n=15). Todas as amostras foram genotipadas com sucesso. Com base em nossos resultados concluímos que a metodologia aplicada, tanto em lesões quanto em tecidos saudáveis da boca, apesar da variação quantitativa, leva à quantidade e qualidade de material genético passível de ser utilizado em futuras análises moleculares.

Palavras-chave: Carcinoma espinocelular bucal. Escova citológica. Quantificação de DNA. Qualidade de DNA.



## Abstract

GOMES, Fausto Gueths. **Avaliação quantitativa e qualitativa do DNA obtido a partir de lesões potencialmente malignas e do carcinoma espinocelular de boca.** 2011. 67f. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Ciências Biológicas (bacharelado). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Generally, cancer, is a disease that have demonstrated a growing incidence in the world. The gold-standard and most important diagnostic method for oral premalignant and malignant lesions is the biopsy of the affected site, followed by an histopathological exam. Auxiliary diagnostic methods, however, need to be improved. In order to develop new molecular analysis methods, it is fundamental to use proper biologic material for the DNA collection and DNA extraction. The purpose of this study is to evaluate whether both collection and extraction methods performed provides quantity and quality of DNA liable in order to be used in further molecular analysis. The quantitative analysis were performed through spectrophotometry (Nanovue, GE Healthcare Life Sciences) and the qualitative measures were achieved by Polimerase Chain Reaction (PCR) followed by the genotyping of the 72 codon, Tp53 gene. The results point out to DNA concentrations of 10,30 $\mu$ g/cytobrush ( $\pm$ 11,97) for squamous cell carcinoma with 8,51  $\mu$ g/cytobrush ( $\pm$ 6,64) on the controls (n=15), 2,39 $\mu$ g/cytobrush ( $\pm$ 2,69) for liquen planus with 4,80  $\mu$ g/cytobrush ( $\pm$ 3,37) on the controls (n=13), 1,31 $\mu$ g/cytobrush ( $\pm$ 1,35) for intermediate to severe dysplasia with 3,23 $\mu$ g/cytobrush ( $\pm$ 3,53) on the controls (n=12) and 0,93 $\mu$ g/cytobrush ( $\pm$ 1,00) for samples of, discrete dysplasia with or without acanthosis or hypercerathosis with 6,44 $\mu$ g/cytobrush ( $\pm$ 8,36) on the controls (n=15). All samples were genotyped with success. Based on our results, we concluded that the applied methodology, despite of the quantitative variations in both lesional and healthy samples, provided satisfactory genetic material in relation to their quantity and quality, being liable to be used in further molecular analysis approaches.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma. Cytobrush. DNA quantification. DNA quality.

## Lista de figuras

Figura 1	Apresentação clínica de leucoplasia (placa branca de superfície irregular) em ventre lingual/assoalho bucal .....	17
Figura 2	Lesão leucoeritoplásica em palato duro e reborbo alveolar superior	17
Figura 3	Aspecto clínico do Líquen Plano em mucosa jugal esquerda, revelando estrias esbranquiçadas em fundo eritematoso .....	17
Figura 4	Quadro histológico de Carcinoma <i>in situ</i> .....	18
Figura 5	Aspecto histológico de Carcinoma espinocelular invasivo.....	18
Figura 6	Escova citológica sendo utilizada em coleta de mucosa bucal Aspecto clínico sadio (controle) .....	23
Figura 7	Identificação dos genótipos do códon 72 do gene da TP53 (Arginina/Arginina, Arginina/Prolina e Prolina/Prolina) .....	26
Figura 8	Gráfico ilustrativo dos dados quantitativos das amostras de DNA dos grupos histológicos descritos no estudo .....	27
Figura 9	Gel de agarose com amostras genotipadas correspondentes aos grupos diagnósticos estudados .....	28

## Lista de tabelas

Tabela 1	Seqüências dos oligo iniciadores para a detecção do polimorfismo Do Códon 7 no exon 4.....	24
Tabela 2	Reagentes utilizados na reação de PCR (equivalente a uma reação) .....	24
Tabela 3	Reagentes utilizados na digestão do produto de PCR .....	25
Tabela 4	Fragmentos do polimorfismo do códon 72 obtidos com a RFLP e seus respectivos genótipos .....	25
Tabela 5	Número de amostras por grupo de diagnóstico histológico e seus respectivos dados quantitativos de DNA (média e desvio padrão) ...	27

## Sumário

1	Introdução .....	13
2	Objetivos .....	15
2.1	Objetivo geral .....	15
2.2	Objetivos específicos .....	15
3	Revisão de literatura .....	16
4	Materiais e Métodos .....	23
5	Resultados .....	27
6	Discussão .....	29
7	Conclusão .....	32
8	Referências .....	33
	Apêndices .....	38
	Anexos .....	64

## 1 Introdução

O câncer, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), “é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (**maligno**) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (**metástase**) para outras regiões do corpo”. Em âmbito mundial, é uma das maiores causas de morte contabilizando um total aproximado de 7,6 milhões (13%) de óbitos no ano de 2008. (GLOBOCAN, 2008). Para o Brasil, foi estimado um total de 489.270 novos casos de câncer em 2010, sendo 236.240 (aproximadamente 48%) e 253.030 (aproximadamente 52%) para homens e mulheres, respectivamente. Com relação ao câncer oral, 10.330 (4,37%) de novos casos dessa forma de neoplasia foram estimados para homens e 3.790 (1,5%) para mulheres (Estimativas INCA, 2010). O câncer é uma doença com importante componente genético, em que, a partir de alterações, oriundas de heranças familiares ou de fatores externos, no genoma de um indivíduo pode levá-lo a desenvolver uma condição cancerosa (TSANTOULIS et al., 2007). Acredita-se atualmente que o microambiente, as células componentes do estroma e a matriz extracelular podem atuar no desenvolvimento tumoral, não somente na inibição de seu crescimento, mas também na própria oncogênese (LELIÈVRE et al., 1996; BISSELL; HINES, 2011).

O diagnóstico definitivo de lesões potencialmente malignas e carcinoma espinocelular (CEC) bucal por vezes pode ser difícil, quando se trata de diferenciar clinicamente cada uma dessas lesões (ACHA et al., 2005). Além disso, histologicamente tanto as lesões potencialmente malignas quanto o próprio CEC apresentam diferentes graus de alterações displásicas e anaplásicas. Até o momento, o padrão-ouro para o diagnóstico de condições malignas e potencialmente malignas da boca é o procedimento de biópsia do local afetado (EPSTEIN et al., 2002; ACHA et al., 2005). Tal metodologia de diagnóstico, por mais importante que seja, é uma técnica com implicações cirúrgicas e que pode, portanto, resultar eventualmente em danos físicos e mesmo psicológicos a determinados pacientes (ACHA et al., 2005). Além do fato de que a confirmação do diagnóstico histopatológico, por vezes pode se tornar subjetiva de acordo com as observações particulares de cada profissional (ACHA et al., 2005). Sem o intuito de substituir essa forma de diagnóstico, técnicas auxiliares vêm sendo estudadas a fim de auxiliar a

identificação de lesões potencialmente malignas e carcinoma espinocelular bucal. O uso de escovas citológicas vem apresentando-se promissor na obtenção de material para análise de expressão gênica e no estudo da progressão de carcinoma oral (SCHWARTZ et al., 2008). É um método bem aceito pelo paciente, não causa grandes danos ao mesmo e busca oferecer material celular de qualidade para futuras análises moleculares.

## **2 Objetivos:**

### **2.1 Objetivo geral**

- Avaliar o método de coleta de material por escova citológica em portadores de lesões pré-malignas e de CEC, observando se o mesmo é passível de ser utilizado como metodologia de obtenção de material genético visando futuras análises moleculares.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Analisar a quantidade de DNA existente nas amostras coletadas, através do uso da espectrofotometria.
- Avaliar a qualidade do DNA extraído de lesões potencialmente malignas e do Carcinoma Espinocelular de boca, através da amplificação de fragmento de DNA correspondente ao códon 72 do gene *TP53* via PCR e análise do genótipo do mesmo ,via restrição enzimática.

### 3 Revisão de Literatura

Segundo dados do INCA (2010, válidos para 2011), o câncer bucal é a sexta neoplasia de maior ocorrência no Brasil, sendo o carcinoma espinocelular (CEC) ou epidermóide, originário do epitélio que reveste a mucosa bucal, o tumor mais prevalente (94% de todos os tumores da boca) em indivíduos acima dos 45 anos. Apesar das diversas pesquisas realizadas no sentido de tentar contribuir para a melhoria do prognóstico dos indivíduos portadores de CEC, os índices gerais de sobrevida de 5 anos não ultrapassam a ordem dos 50% dos casos.

Clinicamente, lesões potencialmente malignas e carcinoma espinocelular de boca podem apresentar-se na forma de leucoplasias (Fig. 1), eritroplasias leucoeritroplasias (Fig. 2), (WAAL, 2009), ou ainda, como líquen plano (Fig. 3). Sendo esta uma condição que vem sendo discutida na literatura, com relação ao seu real potencial de malignização (GONZALES-MOLES et al., 2008). A OMS define como leucoplasia e eritroplasia, respectivamente, lesões apresentando-se como manchas ou placas brancas e alterações avermelhadas, que não podem ser caracterizadas clinicamente como nenhuma outra doença.

A prevalência das leucoplasias varia em torno de 0,7% a 24%, sendo esta diversidade pronunciadamente observada em diferentes países, em diferentes regiões de um mesmo país e também numa mesma população. Isto pode ser atribuído às variações metodológicas de análise, aos diversos critérios de diagnóstico e seleção das populações-alvo, e ainda, aos hábitos relacionados à sua principal etiologia, a qual vem sendo associada ao hábito de fumar, nas diferentes formas de uso do tabaco (LAMBERT et al., 2011).

Tem sido claramente documentado que pelo menos as eritroplasias homogêneas são as mais perigosas lesões pré-malignas, devido ao seu alto potencial de malignização (REICHART; PHILIPSEN, 2005). Uma variação de prevalência das eritroplasias em diferentes áreas do globo, que vai de 0,02 a 0,83%, tem sido documentada, sendo tal condição mais comum em indivíduos de meia idade ou idosos, consumidores de fumo e álcool (REICHART; PHILIPSEN, 2005).





Figura 1- Apresentação clínica de leucoplasia (placa branca de superfície irregular) em ventre lingual/assoalho bucal  
Fonte: CDDB, Faculdade de Odontologia, UFPEL

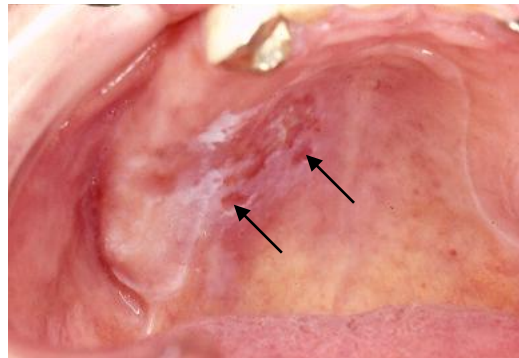


Figura 2- Lesão leucoeritroplásica em palato duro e reborbo alveolar superior. As setas apontam áreas de eritroplasia.  
Fonte: CDDB, Faculdade de Odontologia, UFPEL

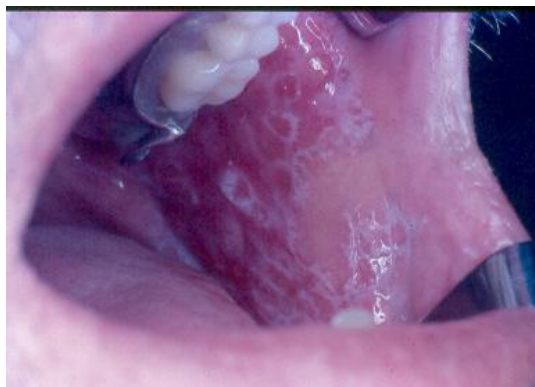


Figura 3- Aspecto clínico do Líquen Plano em mucosa jugal esquerda, revelando estrias esbranquiçadas em fundo eritematoso.  
Fonte: CDDB, Faculdade de Odontologia, UFPEL

Histopatologicamente, para as alterações clínicas descritas anteriormente podem ser observados diferentes graus de displasias epiteliais (acompanhados ou não de hiperqueratose e/ou acantose), carcinoma *in situ* (grande quantidade de atipias celulares, porém sem haver invasão a tecidos adjacentes) (Fig. 4) ou mesmo o carcinoma espinocelular invasivo (Fig. 5) podem se manifestar com o mesmo aspecto clínico. O líquen plano permanece como um diagnóstico a parte, tanto clínica quanto histopatologicamente.

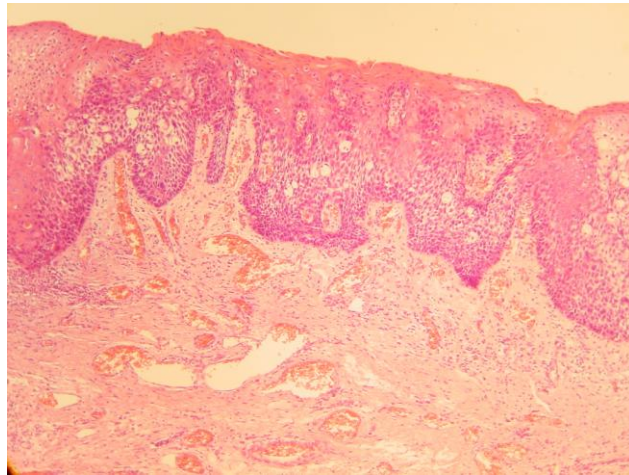


Figura 4- Quadro histológico de Carcinoma *in situ*

Fonte: Histopatologia bucal, guia de aulas práticas (ARAÚJO; GOMES, 2010)

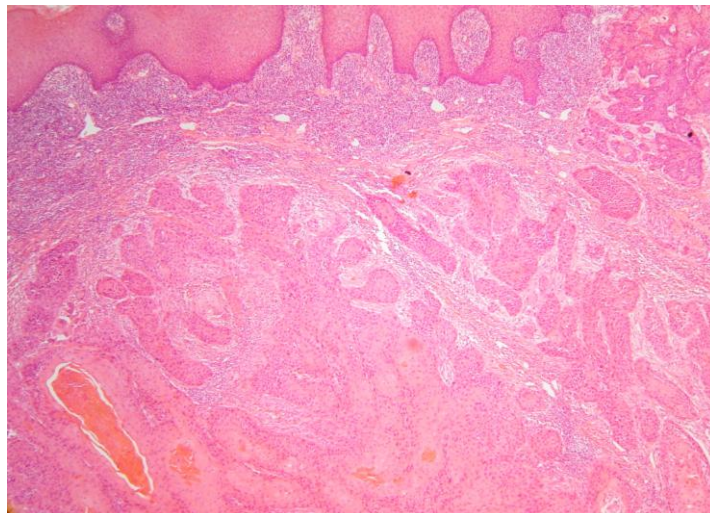


Figura 5- Aspecto histológico de Carcinoma espinocelular invasivo.

Fonte: Histopatologia buca, guia de aulas práticas (ARAÚJO; GOMES, 2010)

Existem análises que podem ser utilizadas para inferir, por exemplo, qual a predisposição de um indivíduo para adquirir uma condição cancerosa (ENG et al., 2000), ou auxiliar na determinação do prognóstico de câncer (KOSARI et al., 2008). Quanto maior for a quantidade de alterações em genes responsáveis pela regulação do processo de mitose celular, como por exemplo o gene *TP53*, maior será a probabilidade dessa lesão apresentar um maior grau de multiplicação celular e agressividade (KOUSHIK et al., 2004; JAYSHREE et al., 2009). Com relação ao gene *TP53*, este apresenta funções bastante ligadas ao estresse celular, atuando basicamente promovendo a interrupção do ciclo celular ou mesmo a apoptose (SUZUKI; MATSUBARA, 2011). Foi estimado que pudesse haver mutações neste gene em mais da metade das formas de câncer em humanos (SOUSSI; BÉROUD, 2001) e que a incidência/frequência destas mutações também pode variar nos diferentes tipos de neoplasias, desde aproximadamente 10% em cânceres de origem hematológica (PELLER; ROTTER, 2003), a 50-70% em câncer de ovário (SCHUIJER; BERNIS, 2003), de cólon retal (IACOPETA, 2003) e de cabeça e pescoço (BLONS; PUIG, 2003). Neste último, as mutações comumente surgem como um resultado da exposição recorrente ao tabaco e/ou álcool e a sua presença está associada com a recorrência precoce de tumores secundários (CHOI & MYERS, 2008). Por ser o *TP53* um gene bastante estudado, inclusive em lesões cancerosas da cavidade bucal, a avaliação qualitativa do presente estudo se justifica através da amplificação e genotipagem do códon 72 do mesmo.

Com relação ao câncer bucal, análises de expressão em diferentes genes (sejam eles marcadores ou mesmo associados ao metabolismo de álcool, por exemplo) podem ser feitas (JI et al., 2011; HAKENEWERTH et al., 2011), bem como a identificação de presença de DNA viral associados a quadros de CEC bucal (MAO; SMITH, 1993; WOODS et al., 1993). Tais formas de análise podem ser realizadas a partir de amostras coletadas da cavidade bucal com o uso de escovas citológicas ou swabs.

No entanto a fim de estudar o papel genético nas diferentes doenças devem ser obtidos DNA genômico de qualidade e quantidade suficiente, de forma que testes utilizando altos volumes de amostras possam ser realizados (GARCÍA-CLOSAS et al., 2001; BECKETT et al., 2008). Historicamente, a fonte mais comum de DNA para fins clínicos e de pesquisa é obtido a partir de amostras de sangue periférico, o qual fornece alta quantidade de células nucleadas (DNA) (BECKETT et

al., 2008; ETTER et al., 2005; RICHARDS et al., 1993; FEIGELSON et al., 2001; HANSEN et al., 2007). Estas amostras normalmente fornecem um mínimo de 30 µg de DNA/mL de sangue total, o que os torna uma fonte ideal para uma variedade de análises genéticas (HERRAEZ; STONEKING 2008; FEIGELSON et al., 2001).

Contudo, a coleta de sangue periférico torna-se difícil principalmente em estudos epidemiológicos, onde os indivíduos podem ser de locais distantes de onde o estudo está sendo conduzido. Como este método de coleta envolve a punção venosa, os indivíduos podem se recusar a participar do estudo, especialmente em casos de pessoas idosas, deficientes, doentes ou bebês. Ainda, para executar este método se faz necessário uma assistência médica (por exemplo, enfermeiro), para a coleta da amostra, devendo a mesma ser imediatamente armazenada e transportada, o que pode gerar um importante problema de logística. Sobretudo, estas amostras podem expor os manipuladores a agentes etiológicos de várias alterações patológicas presentes no sangue periférico, como HIV e o vírus da hepatite (NEDEL et al., 2009; ETTER et al., 2005; HANSEN et al., 2007; SAAB et al., 2007; WALKER et al., 1999; RICHARDS et al., 1993; BECKETT et al., 2008; HERRAEZ; STONEKING 2008).

Novos avanços nas técnicas de biologia molecular, especialmente a reação em cadeia de polimerase (PCR), possibilitaram o uso de pequenas quantidades de DNA para fins de análise genética. Permitindo, assim, a obtenção de DNA de diferentes fontes além do sangue periférico, tais como: gota de sangue proveniente da polpa do dedo, tecido parafinado, urina, esperma, raiz de cabelo, secreção nasal e especialmente de células bucais (LEMA et al., 2006; MARCHAND et al., 1998; RICHARDS et al., 1993). Contudo, cada método possui as suas limitações, por exemplo, a gota de sangue retirada da polpa do dedo ainda é um método invasivo (LEMA et al., 2006); tecido parafinado pode apresentar fragmentação do DNA devido ao período prolongado entre o procedimento cirúrgico e a fixação, o método empregado e a duração do procedimento de fixação, e a própria fixação em formalina (CAO et al., 2003); a extração de DNA da urina pode ser difícil, a qualidade do material genético pode não ser adequado e a amostra pode conter inibidores de PCR (CAO et al., 2003; MULOT et al., 2005). A fonte ideal de DNA deve preencher os seguintes requisitos: ser um método não-invasivo, fácil e rápido de realizar; permitir o armazenamento por períodos relativamente longos em temperatura ambiente antes da extração de DNA (um importante critério para estudo

de campo), com o mínimo de perda na qualidade do DNA; e permitir a aquisição de uma quantidade suficiente de DNA para uma ampla variedade de aplicações.

A obtenção de DNA a partir de células bucais também possui as suas limitações, o rendimento e a quantidade de DNA obtido a partir de células bucais são menores do que aqueles obtidos a partir de sangue periféricos (WALKER et al., 1999; BECKETT et al., 2008). Ainda, amostras de células bucais podem apresentar um grande número de DNA exógeno, como o DNA bacteriano, uma vez que a cavidade bucal é colonizada por uma grande quantidade de células de origem não humana, as quais podem ser co-extraídas com o DNA genômico humano (HERRAEZ; STONEKING 2008). Contudo, a coleta de células bucais é um método não invasivo e, portanto, melhor tolerado por adultos, crianças, bebês e indivíduos deficientes. Em um estudo elaborado por Hansen et al. (2007) foi verificado que o grau de aceitação de cada um dos métodos de coleta de DNA em uma coorte de enfermeiras dinamarquesas foi de 31% para coleta sanguínea, 72% para amostra salivar, 76% para o uso de cartões FTA e 80% para a coleta de células bucais via swabs. Estes resultados demonstram a dificuldade de se adquirir amostras provenientes de sangue em comparação com métodos menos invasivos como coleta de saliva e células bucais. A quantidade média de DNA das amostras foi de 56,8 em sangue; 108,0 em enxágue bucal; 3,6 ng/μl em cartões FTA e 128,8 em swabs. Apesar da ampla aceitação dos indivíduos e a quantidade satisfatória de DNA obtido através do método de coleta de células bucais, a avaliação da qualidade deste DNA, via estudo de amplificação e genotipagem dos genes HFE-282 e HFE-63, demonstrou que apenas 23% das amostras puderam ser amplificadas e nenhuma pode ser genotipada. Em contrapartida, Hansen et al. (2007) demonstraram com o método de coleta salivar, que 84% das amostras foram amplificadas e 72% genotipadas, concluindo que, para estudos epidemiológicos, o método de coleta salivar seria mais adequado em função da aceitação e qualidade/quantidade de DNA obtidos; porém, quando o foco do estudo for o material genético de doenças da cavidade bucal, a coleta salivar pode não ser a mais apropriada, uma vez que a coleta local (lesão) pode ser fundamental para as avaliações subseqüentes.

Diferentemente de Hansen et al. (2007), um estudo realizado por Juárez-Cedillo et al. (2010) mostrou que a quantidade e qualidade de DNA não tiveram diferenças estatísticas significativas quando comparados o método de coleta sanguínea com o uso das escovas citológicas. Algumas ressalvas foram feitas por

esses autores em relação a evitar-se o contato da escova citológica com os dentes, além de manter as amostras a uma temperatura ideal de aproximadamente  $-4^{\circ}\text{C}$ , onde ambos os procedimentos visariam evitar contaminação bacteriana. Resultados diferentes são apontados, dependendo possivelmente de detalhes da metodologia aplicada em diferentes laboratórios, como a forma de transporte das amostras coletadas até o laboratório, a forma de coleta e armazenamento, dentre outros (HANSEN et al., 2007; JUÁREZ-CEDILLO et al., 2010).

Cabe ressaltar que a utilização de métodos não invasivos de obtenção de amostras de material genético, com quantidade e qualidade satisfatórias tem sido alvo de muitas pesquisas na atualidade (HANSEN et al., 2007; JUÁREZ-CEDILLO et al., 2010). Por tais razões, é importante o seguimento nessa forma de pesquisa, a fim de que os protocolos de coleta e extração de material possam ser cada vez estabelecidos e comprovados em relação à quantidade e qualidade do que é obtido.

Assim, o intuito deste trabalho é avaliar a quantidade e qualidade do material genético obtido a partir da coleta, por escova citológica, de células de lesões potencialmente malignas e do CEC de boca e extração de DNA, de um grupo selecionado de indivíduos.

#### 4 Materiais e Métodos

Os pacientes encaminhados ou que procuraram o Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDDB-UFPEL) foram examinados detalhadamente e, uma vez identificadas lesões potencialmente malignas ou malignas, os mesmos foram encaminhados para a biópsia. Os pacientes foram informados a respeito do presente estudo e tendo se disponibilizado a participar, assinaram termos de consentimento livre e esclarecido (ver Apêndice A). O presente estudo obteve a aprovação do Comitê de Ética (CEP) em Pesquisa da Universidade Federal de Pelotas (Parecer n. 058/ 2008 do CEP da FOUFPEL) (ver Anexo A).

As amostras foram coletadas no momento da biópsia, com o paciente anestesiado. Foram utilizadas escovas citológicas descartáveis para friccionar as lesões por aproximadamente 30 segundos, realizando-se movimentos de rotação e em direção às regiões anterior e posterior da lesão (vai-e-vem). Foram coletadas duas amostras de material diretamente da lesão e ainda duas amostras provenientes de algum sítio de mucosa bucal clinicamente aparentando normalidade (Fig. 6), nos mesmos indivíduos. Após a coleta, cada escova foi armazenada em um tubo de microcentrífuga contendo solução de lise, em temperatura ambiente (NEDEL et al., 2009).



Figura 6- Escova citológica sendo utilizada em coleta de mucosa bucal com aspecto clínico sadio (controle)

Fonte: CDDDB, Faculdade de Odontologia, UFPEL

Após 24 horas procedeu-se à extração de DNA, seguindo as instruções do fabricante (Puregene Buccal Cell Kit- Gentra Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota, USA) (ver Anexo B).

As amostras foram acondicionadas em ultra-freezer (-80°C) até o momento da realização da leitura quantitativa. Para cada uma das amostras foi obtido 20µl de solução final e deste volume, 2µl foram retirados para a quantificação de DNA no espectrofotômetro Nanovue (GE Healthcare Life Sciences).

Os fragmentos contendo o polimorfismo do códon 72 foram amplificados utilizando *primers* do exon 4 (tab. 1) visando a amplificação do fragmento e posterior observação dos genótipos.

Tabela 1 – Sequências dos oligoiniciadores para a detecção do polimorfismo do códon 72 no exon 4

Primer	Sequência * (5'-3')	Tamanho (bp)	Referência
72 S	TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA	199	ANSCHAU et al., 2005
72 A	TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC		

O DNA genômico foi diluído 1:10 para a realização da reação de PCR. A amplificação do DNA genômico foi realizado utilizando os primers da tab. 1. A reação de PCR, com os reagentes e os seus volumes, está presente na tab. 2.

Tabela 2- Reagentes utilizados na reação de PCR (equivalente a uma reação)

Regentes	Quantidades (µL)
PCR Master Mix (Promega)	6,0
72S	1,0
72A	1,0
H <sub>2</sub> O	3,4
DNA	0,6
Volume final da reação	12,0



O protocolo de amplificação foi realizado em um termociclador Mastercycler gradient Eppendorf, Hamburg, Germany): 33 ciclos a 94°C por 5 minutos, 94°C por 60 segundos, 57°C por 60 segundos e 72°C por 60 segundos, seguida por uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

Com o objetivo de avaliar a qualidade da amplificação dos genes, foi realizado a eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M), a 80V, durante 1 hora e 30 minutos. A cada 6µL de produto de PCR foi acrescido 3µL de GelRed (Uniscience, Cambridge, UK). A visualização das bandas foi realizada utilizando transiluminador U.V (Loccus Biotecnologia, Brasil).

A digestão do produto de PCR, foi realizada utilizando a enzima de restrição BstUI (New England Biolabs, UK), a qual é uma enzima de corte freqüente com sítio

de clivagem  $5' \dots \overset{\vee}{\text{CGCG}} \dots 3'$   
 $3' \dots \text{GCGC} \dots 5'$ . A digestão foi realizada com os reagentes presentes na tab. 3.

Tabela - 3 Reagentes utilizados na digestão do produto de PCR

Regentes	Quantidades (µL)
BstUI	0,2 (10,000U/mL)
Tampão	1,8
Produto de PCR	12,0
Volume final da reação	12,2

Dependendo da clivagem ou não da enzima *BstUI*, fragmentos de três diferentes tamanhos podem ser observados na determinação dos genótipos (tab. 4), (Fig.7).

Tabela 4 – Fragmentos do polimorfismo do códon 72 obtidos com a RFLP e seus respectivos genótipos

Fragmentos (pb)	Pro/Pro	Genótipos Pro/Arg	Arg/Arg
199	Sim	Sim	Não
113	Não	Sim	Sim
86	Não	Sim	Sim

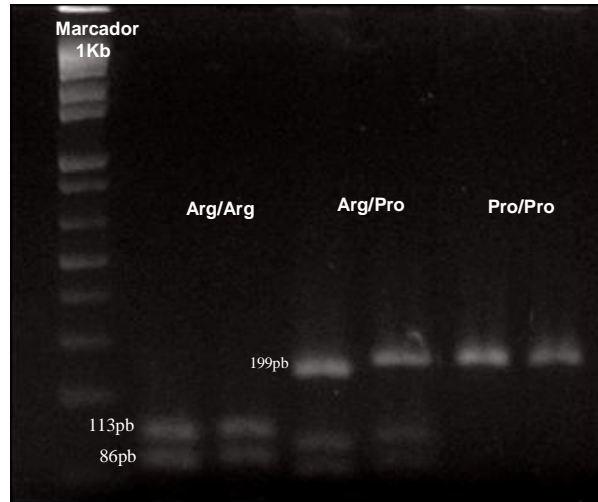


Figura 7- Identificação dos genótipos do códon 72 do gene da Tp53 (Arginina/Arginina, Arginina/Prolina e Prolina/Prolina)

Os diagnósticos histopatológicos encontrados no presente estudo foram categorizados em quatro grupos: CEC invasivo (1), líquen plano (2), displasia epitelial moderada e severa ou de moderada a severa (3) e acantose, hiperqueratose e/ou displasia epitelial leve (4).

## 5 Resultados

Os resultados quantitativos encontrados estão expostos na tab. 5. A Fig. 8 ilustra, na forma de gráfico, os dados encontrados nos diferentes grupos de diagnóstico.

Tabela 5- Número de amostras por grupo de diagnóstico histológico e seus respectivos dados quantitativos de DNA (média e desvio padrão).

Grupo diagnóstico	n	Média DNA lesão ( $\mu\text{g}/\text{escova}$ )	Média DNA controle ( $\mu\text{g}/\text{escova}$ )
1	15	10,30 ( $\pm 11,97$ )	8,51 ( $\pm 6,64$ )
2	13	2,39 ( $\pm 2,69$ )	4,80 ( $\pm 3,37$ )
3	12	1,31 ( $\pm 1,35$ )	3,23 ( $\pm 3,53$ )
4	15	0,93 ( $\pm 1,00$ )	6,44 ( $\pm 8,36$ )

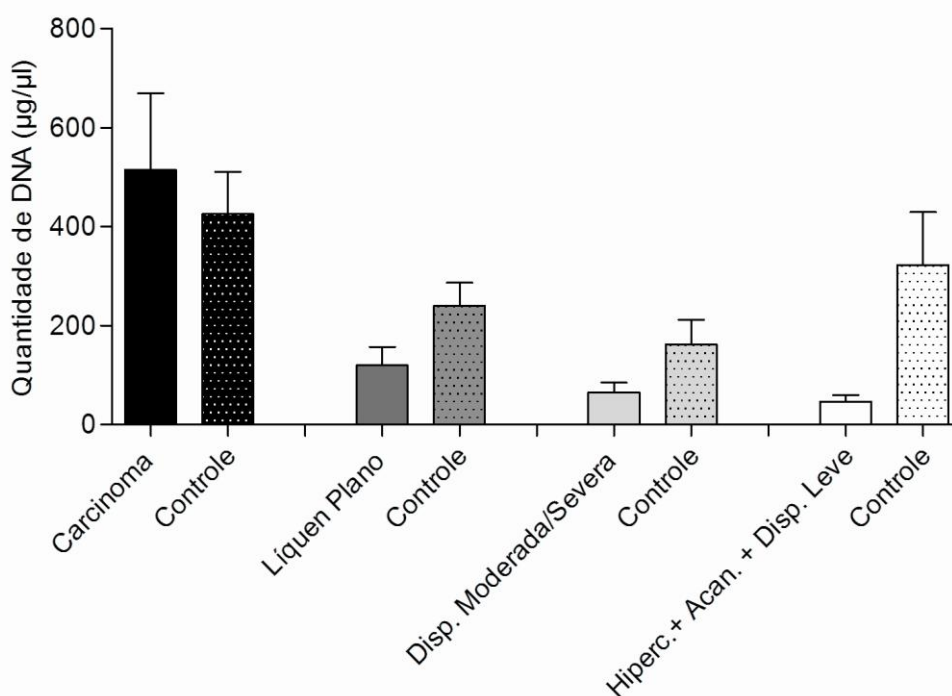


Figura 8- Gráfico ilustrativo dos dados quantitativos das amostras de DNA dos grupos histológicos descritos no estudo

As maiores quantidades de DNA foram encontradas no grupo 1 (10,30  $\pm 11,97$ ), sendo progressivamente menores nos grupos 2 (2,39  $\pm 2,69$ ), 3 (1,31  $\pm 1,35$ )

e 4 ( $0,93 \pm 1,00$ ). Os únicos controles que geraram quantidades de DNA menores do que as a partir das lesões correspondentes foram os do grupo 1. Os restantes levaram a concentrações de DNA superiores às encontradas nas lesões.

Todas as amostras utilizadas no presente trabalho (55 casos), tanto de tecidos lesionados quanto de saudáveis, foram amplificadas e genotipadas com sucesso. A Fig. 9 demonstra ampliações ocorridas em cada um dos grupos de diagnóstico estudados.

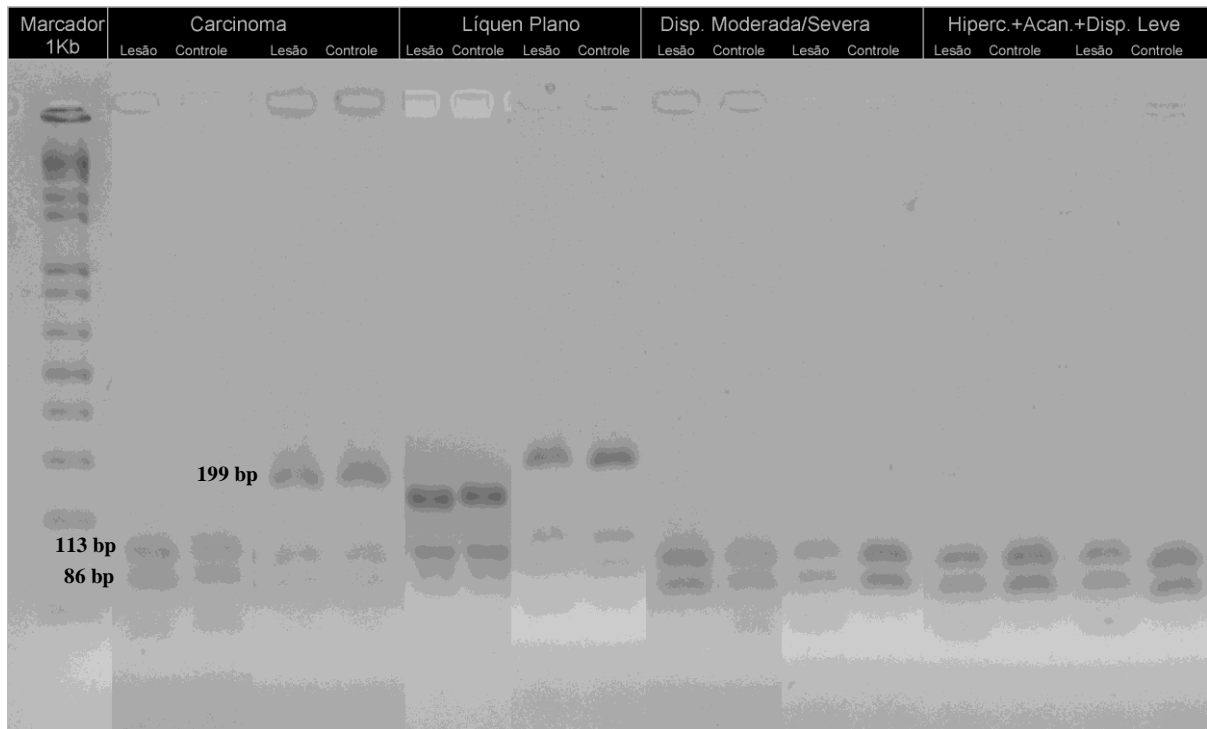


Figura 9- Gel de agarose com amostras genotipadas correspondentes aos grupos diagnósticos estudados

Conforme exposto na Fig. 9, o material genético analisado não apresentou fragmentação.

## 6 Discussão

Independentemente da quantidade de DNA presente, a amplificação do fragmento do códon 72, gene *TP53* (199 bp) e posterior genotipagem do mesmo foi realizada com sucesso em todas as amostras. O quanto de material genético presente não se faz tão relevante à medida que é realizada uma diluição de 1:10 em água, e deste diluído, apenas 0,6 µl são utilizados nas reações de PCR e genotipagem. Sem dúvidas, porém, são muito importantes resultados quantitativos de material genético presente em diferentes formas de coleta em mucosa bucal, tanto em tecidos sadios quanto lesionados, e serão posteriormente abordados nesta discussão.

Com relação aos resultados obtidos no trabalho, podem ser feitas algumas especulações. Nos casos com diagnósticos histopatológicos de displasias moderadas/severas e acantose, hiperqueratose e/ou displasia epitelial discreta, as amostras têm como correspondente diagnóstico clínico mais frequente as leucoplasias, sendo observado um espessamento da camada de ceratina, motivo este pelo qual, provavelmente, seja mais difícil de ser obtido DNA viável a partir das células coletadas dessa forma de lesão. Além disso, características próprias de cada paciente, como salivação e descamação do epitélio da mucosa bucal também podem interferir na quantidade de DNA extraído. Exceção feita aos casos de CEC (grupo 1), todos os controles obtidos a partir de amostras de DNA de mucosa bucal com aspecto de normalidade, provenientes de diferentes sítios bucais, foram quantitativamente maiores do que seus correspondentes lesionais. Como as leucoplasias também para estes diagnósticos histológicos foram os tipos de lesão mais frequentes encontrados na maioria desses casos, a maior ceratinização e menor obtenção de células com DNA viável também parece ser a melhor explicação para esses achados. O CEC apesar de poder ocorrer sob a forma de leucoplasias, tem nas lesões ulceradas a sua principal variante clínica (NEVILLE et al., 2009), o que poderia explicar a maior quantidade de DNA em suas lesões.

Apesar de todas essas variações na quantidade de DNA, contudo, o método de coleta utilizando as escovas citológicas mostrou ser efetivo na obtenção de material genético de lesões bucais e em mucosa oral normal, o que valoriza o seu emprego, tendo em vista a simplicidade da técnica, além de seu baixo custo, aceitação pela população e pouca invasividade (MEHROTRA et al., 2009).

Com relação à qualidade do material, muitos estudos mostram de forma indireta, ao demonstrarem os seus resultados, como as suas amostras se comportaram em seus experimentos, por mais que não mencionem que tenham verificado a qualidade do DNA obtido (LOW et al., 2000 ;TSUI et al., 2009).

Em tecidos sadios, há um maior aporte de estudos relacionando quantidade e qualidade de material obtido a partir de diferentes métodos de coleta, principalmente para análises de cunho epidemiológico. King et al. (2002) perceberam haver diferenças estatisticamente não significativas entre as quantidades de DNA de amostras coletadas por enxágue bucal e escovas citológicas (médias de 15,8 e 12,0µg, respectivamente). A qualidade desse material genético, entretanto, variou bastante, visto que 81% das amostras provenientes do enxágue bucal foram amplificadas por PCR com sucesso, enquanto nenhuma amostra de escova citológica teve o mesmo resultado (KING et al., 2002). Mulot et al. (2005) observaram uma média menor na quantidade de DNA quando os dois métodos citados foram utilizados (3,5µg por escova e 4µg por enxágue bucal). Foi mostrado por estes autores, entretanto, que 98,3% dos casos referentes a ambos métodos amplificaram fragmentos de 481 pares de bases (bp) via PCR e que 96,6% das amostras de cartões tratados amplificaram este fragmento com sucesso (MULOT *et al.*, 2005). No presente estudo foi verificado que todas as amostras utilizadas, amplificaram o fragmento do polimorfismo do códon 72 no exon 4 do gene da *TP53*, o qual possui 199 pb, onde foi possível a determinação posterior dos genótipos de todos os pacientes avaliados. No entanto de acordo com King et al. (2002), o DNA proveniente de escovas citológicas sofre um processo de degradação, o qual pode ser observado em gel de agarose, o que poderia justificar o sucesso na amplificação de fragmentos de DNA de tamanho médio e intermediário (acima de 1,1 kb), com pobres resultados de amplificação para fragmentos maiores (por exemplo, 7,8 kb). Diferenças entre os resultados dos estudos podem ser explicadas pelas variações nas técnicas e no tempo de obtenção das amostras.

Nessa mesma linha de pensamento, Nedel et al. (2009), coletando amostras de mucosa bucal, observaram diferenças entre as médias quantitativas de DNA presente nos fundos de sulco vestibular superior (12,2 µg) e inferior (9,4 µg), quando o próprio indivíduo realizava a coleta. Os autores acreditam que tal diferença ocorra em função da maior disponibilidade de saliva no fundo de sulco inferior em relação ao superior (força gravitacional), contribuindo para a remoção contínua das células

epiteliais localizadas no neste sítio. Ainda, o acúmulo de saliva pode reduzir o atrito entre a mucosa jugal e gengival diminuindo o processo de descamação.

Até o presente momento são escassos os estudos que abordem as análises quantitativas de DNA proveniente de lesões potencialmente malignas e do CEC de boca. Assim, parâmetros na literatura para fins de comparação entre dados com análise semelhante são difíceis de ser encontrados, em tecidos lesionados. A citologia esfoliativa (método de esfregaço) tem sido utilizada como um teste de diagnóstico em lesões pré-malignas e malignas presentes na cavidade oral, onde, em raras ocasiões, tem-se relatado a extração de material genético destas amostras. Mollaoglu et al. (2001) relatou que 1-5 µg de DNA por amostra pode ser obtido diretamente de leucoplasias bucais por meio da coleta de células bucais por esfregaço. Semelhante ao método de coleta de células bucais com escovas citológicas supra citado, o método do esfregaço consiste na obtenção de células utilizando diferentes sistemas que atritam a superfície da mucosa bucal, onde tem sido demonstrado que escovas citológicas seria o mecanismo mais adequado, uma vez que tal ferramenta produz amostras de grande qualidade, as quais são coletadas com relativa facilidade. Após a aquisição da amostra, a mesma é transferida para uma lamínula de vidro (Mehrotra et al. 2006), etapa que não ocorre no método de coleta de células bucais com escovas citológicas.

Com relação às análises qualitativas do material extraído utilizando a eletroforese em gel de agarose e observação do padrão de bandas, como Nedel et al. (2009), também foram obtidos resultados exitosos no presente estudo, o que reforça a indicação dessa técnica não invasiva e de simples execução para estudos de material genético obtidos a partir de amostras bucais.

## **7 Conclusão**

A metodologia utilizada na coleta e extração de DNA, proveniente das lesões estudadas e de seus controles sadios, demonstrou ser passível de se obter material genético de quantidade e qualidade satisfatórias.



## 8 Referências

ACHA, A.; RUESGA, M.T.; RODRÍGUEZ, M.J.; PANCORBO, M.A.M.; AGUIRRE, J.M. Applications of the oral scraped (exfoliative) cytology in oral cancer and precancer. **Oral Cytology in Cancer**, v. 10, n. 2, p. 95-102, 2005.

ANSCHAU, F.; SCHMITT, V.M.; GONÇALVES, M.A.G.; GARICOCHEA, B. Association of codon 72 polymorphism with premalignant and malignant cervical lesions. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v. 27, p. 607-12, 2005.

ARAÚJO, L.M.A.; GOMES, A.P.N. Histopatologia bucal, Guia de aulas práticas. Faculdade de Odontologia, UFPEL, 2010.

BECKETT, S.M.; LAUGHTON, S.J.; POZZA, L.D.; MCCOWAGE, G.B.; MARSHALL, G.; COHN, R.J. Buccal swabs and treated cards: methodological considerations for molecular epidemiologic studies examining pediatric populations. **American Journal of Epidemiology**. v. 167, n. 10, p. 1260-1267, 2008.

BISSELL, M.J., HINES, W.C. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. **Nature Medicine**, v. 17, n. 3, p. 320-329, 2011.

BLONS, H.; LAURENT-PUIG, P. TP53 and head and neck neoplasms. **Human Mutation**. v. 21, n.3, p. 252-257, 2003.

Cao, W.; Hashibe, M.; Rao, J.Y. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. **Cancer Detection and Prevention**. v. 27, n.5, p. 397-404, 2003.

CHOI, S.; MYERS, J.N. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. **Journal of Dental Research**. n. 87, p. 14-32, 2008.

ENG, C.; HAMPEL, H.; CHAPELLE, A. Genetic testing for cancer predisposition. **Annual Reviews**, v. 52, p.371-400, 2000.

EPSTEIN, J.B.; ZHANG, L.; ROSIN, M. Advances in the Diagnosis of Oral Premalignant and Malignant Lesions. **Journal of the Canadian Dental Association**, v. 68, n.10, p. 617-621, 2002.

ESTIMATIVAS 2010, Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>> acesso em: 29 Jul. 2011.

ETTER, J.F.; NEIDHART, E.; BERTRAND, S.; MALAFOSSE, A.; BERTRAND, D. Collecting saliva by mail for genetic and cotinine analyses in participants recruited through the Internet. **European Journal of Epidemiology**. v. 20, n. 10, p. 833-838, 2005.

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 Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. v. 10, n. 9, p. 1005-1008, 2001.

GARCÍA-CLOSAS, M.; EGAN, K.M.; ABRUZZO, J.; NEWCOMB, P.A.; TITUS-ERNSTOFF, L.; FRANKLIN, T. Collection of genomic DNA from adults in epidemiological studies by buccal cytobrush and mouthwash. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. v. 10, n. 6, p. 687-696, 2001.

GLOBOCAN 2008, FAST STATS. Disponível em:  
<<http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>> acesso em: 29 Jul. 2011.

GONZALES-MOLES, M.A., SCULLY, C., GIL-MONTOYA, J.A. Oral lichen planus: controversies surrounding malignant transformation. **Oral Diseases**, v. 14, n. 3, p. 229-243, 2008.

HAKENEWERTH, A.M., MILLIKAN, R.C., RUSYN, I., HERRING, A.H., NORTH, K.E., BARNHOLTZ-SLOAN, J.S., FUNKHOUSER, W., WEISSLER, M.C., OLSHAN, A.F. Joint effects of alcohol consumption and polymorphisms in alcohol and oxidative stress metabolism genes on risk of head and neck cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**. (Epub ahead of print), 2011.

HANSEN, T.V.O.; SIMONSEN, M.K.; NIELSEN, F.C.; HUNDRUP, Y.A. Collection of Blood, Saliva, and Buccal Cell Samples in a Pilot Study on the Danish Nurse Cohort: Comparison of the Response Rate and Quality of Genomic DNA. **American Association of Cancer Research**, v. 16, n.10, p.2072-2076, 2007.

HERRÁEZ, D.L.; STONEKING, M. High fractions of exogenous DNA in human buccal samples reduce the quality of large-scale genotyping. **Analytical Biochemistry**. v. 383, n.2, p. 329-331, 2008.

IACOPETTA, B. TP53 mutation in colorectal cancer. *Human Mutation*. v. 21, n. 3, p. 271-276, 2003.

JAYSHREE, R.S.; SREENIVAS, A.; TESSY, M.; KRISHNA, S. Cell intrinsic & extrinsic factors in cervical carcinogenesis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 103, n. 3, p. 286-295, 2009.

JI, Y.B.; TAE, K.; AHN, T.H.; LEE, S.H.; KIM, K.R.; PARK, C.W.; PARK, B.L.; SHIN, H.D. ADH1B and ALDH2 polymorphisms and their associations with increased risk of squamous cell carcinoma of the head and neck in the Korean population. **Oral Oncology**, v. 47, n. 7, p. 583-587, 2011.

JUÁREZ-CEDILLO, T.; SÁNCHEZ-GARCIA, S.; MOULD-QUEVEDO, J.F.; GARCIA-PEÑA, C.; GALLO, J.J.; WAGNER, F.A.; VARGAS-ALARCÓN, G. Cost-effective analysis of genotyping using oral cells in the geriatric population. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n.3, p. 1886-1895, 2010.

KING, I.B.; SATIA-ABOUT A, 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 Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.11, p. 1130-1133, 2002.

KOSARI, F.; MUNZ, J.M.A.; SAVCI-HEIJINK, C.D.; SPIRO, C.; KLEE, E.W.; KUBE, D.M.; TILLMANN, L.; SLEZAK, J.; KARNES, R.J.; CHEVILLE, J.C.; VASMATZIS, G. Identification of Prognostic Biomarkers for Prostate Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n.6, p. 1734-1743, 2008.

KOUSHIK, A.; PLATT, R.W.; FRANCO, E.L. p53 Codon 72 Polymorphism and Cervical Neoplasia: A Meta-Analysis Review. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 13, n. 1, p. 11-22, 2004.

LAMBERT, R.; SAUVAGET, C.; CANCELA, M.C.; SANKARANARAYANAN R. Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**. v. 23, n. 8, p. 633-641, 2011.

LELIÈVRE, S.; WEAVER, V.M.; BISSELL, M.J. Extracellular Matrix Signaling from the Cellular Membrane Skeleton to the Nuclear Skeleton: A Model of Gene Regulation. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 51, p. 417-432, 1996.

LEMA, C.; KOHL-WHITE, K.; LEWIS, L.R.; DAO, D.D. Optimized pH method for DNA elution from buccal cells collected in Whatman FTA cards. **Genetic Testing and molecular biomarkers**. v. 10, n. 2, p. 126-130, 2006.

LOW, E.O.; JONES, A.M.; GIBBINS, J.R.; WALKER, D.M. Analysis of the amplification refractory mutation allele-specific polymerase chain reaction system for sensitive and specific detection of p53 mutations in DNA. **Journal of Pathology**, v. 190, n. 4, p. 512-515, 2000.

MAO, E.J.; SMITH, C.J. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) DNA by the polymerase chain reaction (PCR) in oral smears from healthy individuals and patients with squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 22, n.1, p. 12-17, 1993.

MEHROTRA, R.; GUPTA, A.; SINGH, M.; IBRAHIM, R. Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. **Molecular Cancer**. v. 5, 2006.

MEHROTRA, R.; HULLMANN, M.; SEETS, R.; REICHERT, T.R.; DRIEMEL, O. Oral cytology revisited. **Journal of Oral Pathology & Medicine**. v. 38, p. 161-166, 2009.

MOLLAOGLU, N.; WILSON, M.J.; COWPE, J.G. Extraction of DNA from oral cytological samples by scraping and smear method suitable for restriction site mutation analysis: a pilot study. **Diagnostic cytopathology**. v. 25, n. 2, p. 83-85, 2001.

MULOT, C.; STÜCKER, I.; CLAVEL, J.; BEAUNE, P.; LORIOT, M.A. Collection of Human Genomic DNA From Buccal Cells for Genetics Studies: Comparison Between Cytobrush, Mouthwash, and Treated Card. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, n. 3, p. 291-296, 2005.

NEDEL, F.; CONDE; M.C.M., OLIVEIRA, I.O.; TARQUINIO, S.B.C.; DEMARCO, F.F. Comparison Between DNA Obtained From Buccal Cells of the Upper and Lower Gutter Área. **Brazilian Dental Journal**, v. 20, n. 4, p. 275-278, 2009.

NEVILLE, B.W.; DAMM, D.D.; ALLEN, C.M.; BOUQUOT, J.E. Patologia Oral e Maxilofacial, 3ª edição. In: cap. 10, Patologia epitelial. São Paulo: Elsevier editora Ltda, 2009. p. 363-454.

O que é Câncer? Disponível em:

<[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322)> acesso em: 3 Dez. 2011.

PELLER, S.; ROTTER, V. TP53 in Hematological Cancer: Low Incidence of Mutations With Significant Clinical Relevance. **Human Mutation**. v. 21, n. 3, p. 277-284, 2003.

REICHART, P.A.; PHILIPSEN, H.P. Oral erythroplakya – a review. **Oral Oncology**. v. 41, n. 6, p. 551-561, 2005.

RICHARDS, B.; SKOLETSKY, J.; SHUBER, A.P.; BALFOUR, R.; STERN, R.C.; DORKIN, H.L.; PARAD, R.B.; WITT, D.; KLINGER, K.W. Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from buccal brushes/ swabs. **Human Molecular Genetics**. v. 2, n. 2, p. 159-163, 1993.

SAAB, Y.B.; KABBARA, W.; CHBIB, C.; GARD, P.R. Buccal cell DNA extraction: yield, purity, and cost: a comparison of two methods. **Genetic Testing and molecular biomarkers**. v. 11, n. 4, p. 413-416, 2007.

SCHUIJER, M.; BERNS, E.M.J.J. TP53 and ovarian cancer. **Human Mutation**. v. 21, n. 3, p. 285-291, 2003.

SCHWARTZ, J.L.; PANDA, S.; BEAM, C.; BACH, L.E.; ADAMI, G.R. RNA from brush oral cytology to measure squamous cell carcinoma gene expression. **Journal of Oral Pathology & Medicine**. v. 37, n. 2, p. 70-77, 2008.

SOUSSI, T.; BÉROUD, C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. **Nature Reviews/Cancer**. v. 1, n. 3, p. 233-240, 2001.

SUZUKI, K.; MATSUBARA, H. Recent Advances in p53 Research and Cancer Treatment. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. (Epub ahead of print), 2011.

TSANTOULIS, P.K.; KASTRINAKIS, N.G.; TOURVAS, A.D.; LASKARIS, G.; GORGOULIS, V.G. Advances in the Biology of Oral Cancer. **Oral oncology**, v. 43, n. 6, p. 523-534, 2007.

TSUI, I.F.L., POH; C.F.; GARNIS, C.; ROSIN, M.P.; ZHANG, L.; LAM, W.L. Multiple pathways in the FGF signaling network are frequently deregulated by gene amplification in oral dysplasias. **International Journal of Cancer**, v. 125, n. 9, p. 2219–2228, 2009.

WAAL, ISAÄC. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncology**, v. 45, n. 4-5, p. 317-323, 2009.

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 reaction-based biomarker assays. **Environmental Health Perspectives**. v. 107, n. 7, p. 517-520, 1999.

WOODS, K.V.; SHILITOE, E.J.; SPITZ, M.R.; SCHANTZ, S.P.; ADLER-STORTHZ, K. Analysis of human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 22, n.3, p. 101-108, 1993.

## Apêndices

## Apêndice A- Termo de consentimento livre e esclarecido

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA*****Carta de Informação ao Paciente***

Neste estudo serão examinados os pacientes que utilizam os serviços do Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDDB), com idade superior ou igual a 45 anos, colhendo-se a história da evolução de cada lesão; e realizando-se um exame interno e externo da boca, sendo avaliada a necessidade de realização de biópsias de diagnóstico microscópico.

Serão coletadas amostras da mucosa bucal, utilizando escovinhas especiais que serão esfregadas sobre a região da lesão por aproximadamente 30 segundos, após a anestesia, realizando quatro coletas para análise do material genético. As técnicas utilizadas neste estudo tem como objetivo estudar os genes que podem estar envolvidos no desenvolvimento do câncer de boca. Os protocolos utilizados não implicam em nenhum risco à saúde física e mental do indivíduo.

Desta forma, estando informado do estudo que será realizado, dou pleno consentimento à Faculdade de Odontologia de Pelotas e ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas para que, por intermédio de seus professores, alunos de pós-graduação e graduação devidamente autorizados, utilizem o material biológico coletado, de acordo com os conhecimentos científicos e de forma ética.

Concordo também, que a documentação relativa ao estudo deverá ser arquivada na Faculdade de Odontologia e mantida sob a guarda dos autores do projeto de pesquisa, que se comprometem a manter sigilo dos dados coletados, e também a garantir que as informações geradas pelos resultados deste trabalho serão divulgadas apenas com finalidade científica e de ensino, preservando-se, totalmente, o anonimato dos pacientes. Assim, dou aos autores deste projeto de pesquisa, plenos direitos de uso, para fins de ensino e divulgação, respeitando os respectivos códigos de ética.

Pelotas, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2011.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

Documento: \_\_\_\_\_  
N.º \_\_\_\_\_

Termo de consentimento ético para pesquisa em seres humanos.

## UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Autorização para Pesquisa e Execução de Tratamento

**Projeto:** AÇÕES COLETIVAS PARA A PREVENÇÃO e DETECÇÃO do CÂNCER de BOCA E IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DO CARCINOMA ESPINOCELULAR NA POPULAÇÃO DA REGIÃO SUL DO RIO GRANDE DO SUL

**Responsável:** Prof. Dra. Sandra Beatriz Chaves Tarquinio

**NOME DO PACIENTE:** \_\_\_\_\_

**FICHA N.º:** \_\_\_\_\_

Por este instrumento que atende às exigências legais, o (a) senhor(a) \_\_\_\_\_, portador (a) da cédula de identidade n.º \_\_\_\_\_ SSP/\_\_\_\_, após leitura minuciosa da CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE, devidamente explicada pelo(s) profissional(is) em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e do explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em concordância em participar da pesquisa proposta no que lhe é cabível, conforme a CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE.

Fica claro que o paciente ou seu representante legal pode, a qualquer momento, retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, sem ser prejudicado no tratamento, e deixar de participar do estudo alvo da pesquisa e ciente que todo trabalho realizado torna-se informação confidencial guardada por força do sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética odontológica).

Por estarem entendidos e conformados, assinam o presente termo.

Pelotas, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2011.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

\_\_\_\_\_  
Responsáveis pelo estudo



## Apêndice B- Produção científica durante a graduação/bolsista de iniciação científica

- 1) Fausto Gueths Gomes; Fernanda Nedel; Flávio Fernando Demarco; Sandra Beatriz Chaves Tarquinio “DIFERENTES MÉTODOS DE COLETA DE CÉLULAS EPITELIAIS BUCAIS PARA EXTRAÇÃO DE DNA” XVIII congresso de iniciação científica (CIC) 2009

### 1. Introdução

Sabe-se que a estrutura da molécula de DNA foi publicada em 1953 pelos cientistas J.D. Watson e F.H.C. Crick, em uma edição da revista Nature. Porém, evidências do DNA como material responsável pela informação genética de um indivíduo surgiram muito antes. Em meados da década de 1880, já se pensava no núcleo celular servindo como sede da hereditariedade e que a cromatina (ou cromossomos) era(m) o material genético, propriamente dito (Scheid et al, 2005). A partir dessas descobertas, houve um crescente interesse em descobrir as bases genéticas de diferentes doenças como, diabetes, doenças cardiovasculares e, especialmente, diversos tipos de cânceres e tumores (Hansen et al., 2007, Nedel et al., 2009).

Entretanto, a fim de estudar o papel da genética nas doenças e regimes medicamentosos, DNA genômico de alta qualidade e quantidade deve ser obtido, de modo que grandes volumes de testes possam ser aplicados (Richards, 1993; García-Closas, 2001; Beckett, 2008). Historicamente, a fonte mais comum de DNA para fins de investigação clínica e pesquisa são amostras do sangue periférico, as quais fornecem não apenas células nucleadas contendo DNA, mas numerosos agentes fisiológicos contidos no plasma (Hansen, 2007). Essas amostras normalmente conferem um rendimento mínimo de 30 µg de DNA/ml, o que os torna a fonte mais adequada para uma série de análises genéticas (Herráez, 2008).

Contudo, a coleta de sangue é difícil em estudos epidemiológicos onde os participantes podem estar distantes do local onde o estudo está sendo realizado. Além disso, a coleta sanguínea envolve realização de procedimento invasivo, com a perfuração de tecido utilizando-se agulha, o que pode contribuir para a não adesão à pesquisa. Para realizar este método um assistente médico é necessário (por exemplo: enfermeiro); uma vez que a amostra é coletada ela é recolhida, armazenada e transportada o que pode representar um importante problema logístico. Ademais, há o risco das amostras possuírem algum tipo de agente infeccioso como os vírus HIV e da hepatite. Em resumo, a extração de DNA do sangue é morosa e cara (Richards, 1993; Walker, 1999; Cao, 2003; Hansen, 2007; Saab, 2007; Beckett, 2008; Herráez, 2008; Nedel et al., 2009).

Os novos avanços nas técnicas de biologia molecular, especialmente ligados ao desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR), permitiram o uso de pequenas quantidades de DNA para fins genéticos (Nedel et al., 2009), permitindo

obter DNA a partir de diferentes fontes além do sangue periférico, tais como: sangue da polpa do dedo, tecidos parafinados, urina, esperma, raiz de cabelo, secreção nasal e especialmente, de células bucais (Richards, 1993). Contudo, todos os métodos possuem as suas limitações, por exemplo, o sangue da polpa do dedo é um método ainda invasivo (Lema, 2006); tecidos parafinados podem apresentar problemas como fragmentação do DNA devido à fixação com formalina, degradação do DNA alvo devido a longos períodos entre a remoção cirúrgica e a fixação do tecido, o tipo e duração do método de fixação ou a ausência de quantidades detectáveis de DNA nas amostras (Cao, 2003).

Assim, este trabalho visa realizar uma breve revisão acerca dos métodos mais utilizados na extração de DNA de células bucais.

## **2. Material e Métodos**

Para a realização do trabalho foram consultadas as principais bases de dados nacionais e internacionais, onde por fim foi utilizado como referência o PubMed pela qualidade dos artigos. Os descritores utilizados foram “Buccal cells”, “DNA extraction” e “DNA collection”. Como o grupo já possui dois artigos publicados na área a seleção dos artigos foi realizada baseada no conhecimento prévio da equipe.

## **3. Resultados e Discussão**

A obtenção de DNA de células bucais também tem as suas limitações, o rendimento e a quantidade de DNA obtido é mais baixo que aquelas obtidas de sangue periférico (Walker, 1999; Beckett, 2008); além disso, amostras de células bucais podem apresentar um número grande de DNA exógeno, como o DNA bacteriano, uma vez que a cavidade oral é abundantemente colonizada por uma gama de microorganismos, que poderiam ser co-extraídos com o DNA humano (Herráez, 2008). Contudo, a coleta de células bucais é um método não invasivo e, portanto melhor tolerado por adultos, crianças e indivíduos portadores de deficiências. Em um estudo recente, com uma coorte de enfermeiras dinamarquesas, cada grupo de enfermeiras foi solicitado a fornecer amostra de sangue, amostra de células bucais coletadas por swabs, cartões FTA e saliva, onde a taxa de adesão foi respectivamente 31, 80, 76 e 72% (Hansen, 2007). Cabe salientar que o método de coleta não requer um assistente médico treinado e os participantes podem auto-coletar as amostras e destiná-las aos laboratórios de pesquisa e análise, podendo eles mesmo remetê-las por correio. Além disso, a própria técnica é de simples realização e barata, quando comparada aos outros métodos (García-Closas, 2001; Saftlas, 2004; Beckett, 2008; Nedel et al., 2009).

A fim de extrair DNA, primeiro é necessário coletar células bucais. Este passo é muito importante uma vez que o tipo de coleta escolhido pode interferir na quantidade e qualidade do DNA obtido. Dois tipos de procedimentos são utilizados, o seco que usa escovas citológicas, swabs ou outros utensílios utilizados para raspar a mucosa oral; e o método úmido que consiste em bochechar líquido na cavidade oral e cuspir-lo em um copo coletor (Figura 1) (Saab, 2007; Nedel et al., 2009).

A coleta de células bucais com escovas citológicas tem fornecido um rendimento de DNA de 1-7,5 µg/escova citológica (Saftlas, 2004), coletas com swabs de algodão forneceram 1,3-3,8 µg/swabs (García-Closas, 2001), enxaguatórios bucais 25,9-57,3µg/10-ml de enxaguatório (García-Closas, 2001). A

maioria dos estudos que envolvem a coleta de células bucais e subsequente extração de DNA usa escovas citológicas e enxaguatórios bucais como método de coleta (Saftlas, 2004).

A coleta com escovas citológicas consiste em atritar a escova na mucosa oral por um período de tempo, onde a mucosa jugal (Figura 2) é a região de eleição em muitos estudos (Saftlas, 2004). Saftlas et al. propôs, como um método alternativo, a coleta de células bucais na região de fundo de sulco (região localizada entre a linha gengival superior e a mucosa do lábio superior e a mucosa jugal), em função da maximização da área de contato entre a escova citológica e a mucosa. Em um estudo recente, Nedel et al. (2009) também demonstraram que o fundo de sulco é uma boa fonte para a obtenção de DNA.



Figura 1 – Demonstração da coleta de células bucais utilizando o método úmido.



Figura 2 – Demonstração de coleta de células bucais com escova citológica.

Os primeiros estudos envolvendo o método úmido para a coleta de DNA, para uso em reações de PCR, utilizaram soluções salinas como enxaguatórios bucais. As amostras eram congeladas ou processadas imediatamente após a coleta. Outro estudo avaliou a estabilidade das amostras coletadas com o mesmo enxaguatório, no entanto as armazenou por sete dias a temperatura ambiente, condição em que as amostras ficam suscetíveis em coletas que envolvem o envio pelo correio. Este estudo indicou que amostras armazenadas a 25°C e 37°C tendem a ter grandes quantidades de DNA de alto peso molecular em comparação com amostras que são armazenadas a temperaturas mais baixas (-20°C e 4°C), sugerindo a presença de DNA de origem bacteriana (García-Closas, 2001).

Em outro estudo foi proposto o uso de enxaguatórios que continham álcool, o qual seria mais apropriado para a auto-coleta e envio por correio em casos de estudos epidemiológicos. Foi demonstrado que a amostra coletada com enxaguatório contendo álcool e mantido a temperatura ambiente ou a 37°C por sete dias não afetou o rendimento de DNA ou a habilidade de amplificá-lo com PCR, quando comparado com amostras mantidas a -20°C (García-Closas, 2001). Assim, a utilização de enxaguatórios contendo álcool tem sido aplicado com sucesso para a coleta de células bucais com o método úmido.

#### 4. Conclusões

A partir da presente revisão é possível concluir que ambos os métodos (úmido e seco) são efetivos para obter DNA de boa qualidade e quantidade. Contudo, ambos possuem vantagens e desvantagens, o método úmido possui um rendimento médio de DNA superior, fragmentos maiores de DNA e uma maior porcentagem de DNA humano, contudo requer mais passos para a extração, é mais trabalhoso e com um maior custo. Em contrapartida, o método seco é simples, com melhor custo-benefício, e é considerado menos sensível aos longos períodos de armazenamento a temperatura ambiente, o que pode ser crucial em estudos multicêntricos. Assim, a escolha por um método ou outro deve estar baseada nos objetivos que se deseja alcançar, por exemplo, tamanho do primer que se deseja utilizar, ou ainda a população que vai ser estudada, uma vez que, por exemplo, as crianças não podem utilizar o método úmido em que sejam empregados exagotários contendo álcool.

#### 5. Referências bibliográficas

- BECKETT, S. M., LAUGHTON, S. J., POZZA, L. D., MCCOWAGE, G. B., MARSHALL, G., COHN, R. J., MILNE, E., ASHTON, L. J. Buccal swabs and treated cards: methodological considerations for molecular epidemiologic studies examining pediatric populations. **American Journal of Epidemiology**, 2008, 167, p.1260-7.
- CAO, W., HASHIBE, M., RAO, J. Y., MORGENSTERN, H., ZHANG, Z. F. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. **Cancer Detection and Prevention**, 2003, 27, p. 397-404.
- GARCIA-CLOSAS, M., EGAN, K. M., ABRUZZO, J., NEWCOMB, P. A., TITUS-ERNSTOFF, L., FRANKLIN, T., BENDER, P. K., BECK, J. C., LE MARCHAND, 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 Epidemiology Biomarkers & Prevention**, 2001, 10, p. 687-696.
- HANSEN, T. V., SIMONSEN, M. K., NIELSEN, F. C., HUNDRUP, Y. A. Collection of blood, saliva, and buccal cell samples in a pilot study on the Danish nurse cohort: comparison of the response rate and quality of genomic DNA. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, 2007, 16, p. 2072-6.
- HERRÁEZ, D. L., STONEKING, M. High fractions of exogenous DNA in human buccal samples reduce the quality of large-scale genotyping. **Analytical Biochemistry**, 2008, 383, p. 329-31.
- LEMA, C., KOHL-WHITE, K., LEWIS, L. R., DAO, D. D. Optimized pH method for DNA elution from buccal cells collected in Whatman FTA cards. **Genetic Testing**, 2006, 10, p. 126-30.
- NEDEL, F., ANDRÉ, D. A., OLIVEIRA, I. O., TARQUINIO, S. B. C., DEMARCO, F. F. Buccal cells submitted to three different storage conditions before DNA extraction. **Jornal of Applied Oral Science**, 2009, 17, p. 113-115.
- RICHARDS, B., SKOLETSKY, J., SHUBER, A. P., BALFOUR, R., STERN, R. C, DORKIN, H. L., PARAD, R. B., WITT, D., KLINGER, K. W. Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from buccal brushes/swabs. **Human Molecular Genetics**, 1993, 2, p. 159-63.

SAAB, Y. B, KABBARA, W., CHBIB, C., GARD, P. R. Buccal cell DNA extraction: yield, purity, and cost: a comparison of two methods. **Genetic Testing**, 2007, 11, p. 413-6.

SAFTLAS, A. F., WALDSCHMIDT, M., LOGSDEN-SACKETT, N., TRICHE, E., FIELD, E. Optimizing buccal cell DNA yields in mothers and infants for human leukocyte antigen genotyping. **American Journal of Epidemiology**, 2004, 1, p.77-84.

SCHEID, N. M. J., FERRARI, N., DELIZOICOV, D. A construção coletiva do conhecimento científico sobre a estrutura do DNA. **Ciência & Educação**, 2005, 11, p.223-233.

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 reaction-based biomarker assays. **Environmental Health Perspectives**, 1999, 107, p. 517-20.

- 2) Fausto Gueths Gomes; Fernanda Nedel; Luísa Jardim Oliveira; Sandra Beatriz Chaves Tarquinio " Quantificação do DNA coletado de lesões malignas e potencialmente malignas da boca: um estudo piloto" XVIII congresso de iniciação científica (CIC), 2009

**Resumo:**

## 1. INTRODUÇÃO

Conforme publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2005, o câncer oral é a décima primeira forma de câncer mais frequente no mundo. O consumo excessivo de álcool e o uso de tabaco (incluindo a forma não fumável) são fatores participantes em cerca de 90% das manifestações de câncer oral ao redor do globo. Também nos dados da OMS consta que o índice de mortalidade por câncer oral em homens é maior do que em mulheres, com particularidades específicas entre os diferentes países. No Brasil é a sétima neoplasia mais prevalente nos homens e a nona nas mulheres (estimativas INCA - Brasil, 2008).

Nessa forma de câncer, a progressão clínica que pode vir a culminar no surgimento de um processo invasivo se dá da seguinte forma: hiperplasia benigna, displasia, carcinoma *in situ* e, finalmente, câncer avançado com alterações genéticas acompanhando essas manifestações clínicas (TSANTOULIS *et al.*, 2007).

É importante ressaltar também a presença de condições potencialmente cancerígenas, além de displasia ou hiperplasia, com igual importância no estudo de neoplasias bucais. Leucoplasias e eritroplasias são bastante importantes dentro desse grupo, pois esses quadros clínicos podem disparar a cadeia de progressão tumorigênica citada anteriormente. Portanto, notando-se qualquer uma dessas desordens aconselha-se, se possível, a sua remoção mesmo sem sinais clínicos de malignidade (ISAÄC VAN DER WAAL, 2009). O Líquen plano é uma condição patológica oral que está em debate sobre a sua possível evolução a um quadro de displasia, havendo a tendência de acreditar-se que se trata de uma lesão potencialmente maligna, embora seja rara a sua evolução para uma displasia liquenóide e posterior carcinoma espinocelular (HSUE *et al.*, 2007).

Tomando-se como base um workshop da OMS ocorrido em 2005, a terminologia corretamente utilizada para condições como leucoplasia e eritroplasia é de desordens potencialmente malignas, tendo sido abandonada a nomenclatura previamente utilizada de lesões pré-cancerígenas. Esta postura deve-se ao fato de que essas condições não necessariamente levam a um quadro clínico de tumor oral invasivo (ISAÄC VAN DER WAAL, 2009).

Com isso, muitos estudos foram e estão sendo desenvolvidos com o intuito de avaliar possíveis pontos-chave na progressão tumorigênica em câncer oral, sendo que várias dessas pesquisas utilizam-se do material genético das lesões para fins prognósticos. Assim, este trabalho visa analisar quantitativamente o DNA presente em lesões cancerígenas e potencialmente malignas a partir do uso de escovas citológicas, com posterior espectrofotometria e leitura do material coletado.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os pacientes encaminhados ou que procuraram o Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDDB-UFPEl) foram examinados detalhadamente e uma vez identificadas lesões potencialmente malignas ou malignas, os mesmos foram encaminhados para a biópsia. Os pacientes foram informados a respeito do presente estudo e uma vez que se disponibilizaram a participar assinaram termos de consentimento. O presente estudo obteve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pelotas (UFPEl).

As amostras foram coletadas no momento da biópsia, no qual o paciente encontrava-se anestesiado, evitando-se assim qualquer desconforto. Foram utilizadas escovas citológicas descartáveis para friccionar as lesões por aproximadamente 30 segundos, realizando-se movimentos de rotação e em direção às regiões anterior e posterior da lesão (vai-e-vem). Foram coletadas duas amostras de DNA diretamente da lesão. Após a coleta, cada escova foi armazenada em um tubo de microcentrífuga contendo solução de lise.

Após 24 horas se procedeu à extração de DNA, seguindo-se as instruções do fabricante (Puregene DNA Tissue Kits - Gentra Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota). As amostras foram acondicionadas em ultra-freezer (-80°C) até o momento da realização da leitura no espectrofotômetro. Para cada uma das amostras foi obtido 20µl de solução e deste volume, 1µl foi retirado e acrescido a 99µl de água Milli-Q para então proceder-se à leitura no espectrofotômetro.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 mostra a quantidade de DNA por escova citológica e a sua pureza (260/280), o local da biópsia e o diagnóstico de cada um dos sete pacientes que tiveram o material coletado para o estudo.

Tabela 1. Espectrofotometria realizada a partir de amostras coletadas de sete pacientes.

No. PC	Local da biópsia	Diagnóstico	µg/escova	260/280
1	Língua (borda lateral esquerda)	Carcinoma <i>in situ</i>	2.2	1.67
2	Língua (borda lateral esquerda)	Processo inflamatório crônico com ulceração e eosinofilia	1.4	2.37
3	Mucosa labial superior esquerda	Acantose e hiperortoceratose com displasia epitelial de moderada a severa	2.4	2.05
4	Pilar amigdaliano esquerdo	Carcinoma espinocelular	5.0	1.45
5	Mucosa jugal direita	Displasia Liquenóide	5.2	1.51
6	Lábio inferior	Acantose e hiperortoceratose com displasia epitelial discreta	1.8	1.03
7	Mucosa jugal direita	Carcinoma espinocelular	4.4	1.75

Os valores obtidos em todas as leituras condizem com o que é preconizado pelo fabricante, onde a expectativa de DNA por escova citológica deve estar entre 0.2 e 2.0 µg. Ainda, a quantidade obtida é considerada adequada para estudos epidemiológicos (1,0 a 2,0 µg) (Nedel, 2009). Os maiores valores referentes à quantidade total de DNA foram observados nas amostras cinco (5,2 µg/escova) e quatro (5,0 µg/escova), representando displasia liquenóide e carcinoma espinocelular respectivamente. O terceiro maior valor foi o da amostra sete (4,4 µg/escova), um carcinoma espinocelular. Após essas três amostras com média de 4,9 µg/escova, a média das outras quatro diminuiu para aproximadamente 2,0 µg/escova, sem fugir muito desse valor com concentrações extremas de 1,4 e 2,4 µg/escova. A coleta de material a partir de lábio e língua é relativamente mais difícil quando comparada com a coleta em mucosa jugal. Dificuldades decorrentes da coleta como, região de difícil acesso da lesão e/ou em casos de difícil apreensão do tecido (língua) e/ou o tamanhos muito reduzidos de lesão podem interferir na coleta do material e influenciar diretamente na quantidade de DNA obtido. Além disso, as diferenças podem ser atribuídas a variações na descamação da mucosa oral de cada indivíduo (NEDEL et al., 2009).

Entre as três amostras com maior quantidade de DNA, duas eram provenientes de carcinoma espinocelular. Por ser um processo já de tumor maligno, é natural que o carcinoma tenha uma relevante quantidade de material genético por apresentar um alto grau de multiplicação celular. Entre as displasias, a com maior concentração foi a displasia liquenóide, mas o mais interessante entre as amostras com diagnóstico displásico é a comparação entre uma displasia epitelial discreta e uma de moderada a severa. Esta última apresentou maior concentração de DNA. Este fato pode ser explicado por um crescimento de forma mais anormal em comparação com uma displasia discreta. Para ilustrar essa informação é possível se utilizar de pesquisas relacionando a expressão do fator de crescimento de células endoteliais vasculares (VEGF) e o grau de displasia presente na lesão. Pesquisas mostram um aumento significativo da vascularização durante a transição de uma mucosa oral normal, para diferentes graus de displasia, culminando em um quadro de carcinoma invasivo (CARLILE *et al.*, 2001). Essa vascularização foi relacionada com um aumento gradual da presença de VEGF nessas lesões. Porém, existem alguns resultados conflitantes na literatura a respeito da contribuição do VEGF para a displasia e o carcinoma (JOHNSTONE & LOGAN., 2005). Foi sugerido então que a expressão de isoformas de VEGF nos tecidos junto com a reação cruzada de anticorpos pudesse ter interferido nesses resultados (CARLILE *et al.*, 2001; WONG et al., 2003).

Com relação à pureza do DNA (260/280) os valores encontrados foram bastante favoráveis, obtendo-se uma média de 1,69. De acordo com Ahn *et al.* absorvâncias de 1.7-2.0 predizem "DNA limpo", valores que estão muito próximos aos obtidos no presente estudo. Assim, podemos sugerir que o kit utilizado no estudo apresentou um desempenho adequado.

#### 4. CONCLUSÕES

Em conclusão, observa-se um aumento na quantidade de DNA relacionado ao agravamento do quadro de displasia, podendo o mesmo ser observado em duas amostras. No entanto, estudos com um número maior de amostras devem ser realizados para que observações mais concretas a respeito da quantidade de DNA



em lesões malignas e em desordens com potencialidade maligna possam ser afirmadas.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

NEDEL F., CONDE M.C.M., OLIVEIRA I.O., TARQUINIO S.B.C., DEMARCO F.F. Comparison between DNA obtained from buccal cells of the upper and lower gutter area. **Brazilian Dental Journal** (accepted article 2009).

AHN S.J., COSTA J., EMANUEL J.R. Picogreen quantification of DNA: effective evaluation of samples pré- or post- PCR. **Nucleic Acids Research**, V.24, n.13, p.2623-2625, 1996.

TSANTOULIS P.K., KASTRINAKIS N.G., TOURVAS A.D., LASKARIS G., GORGOULIS V.G. Advances in the biology of oral cancer. **Oral Oncology**, v.45, n.43, p.523-534, 2007.

WAAL I. V. D., Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncology**, v.45, n.45, p.317-323, 2009.

HSUE S.S., WANG W.C., CHEN C.H., LIN C.C., CHEN Y.K., LIN L.M. Malignant transformation in 1458 patients with potentially malignant oral mucosal disorders: a follow up study based in a Taiwanese hospital. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v.38, n.36, p.25-29, 2007.

CARLILE J., HARADA K., BAILLIE R., MACCLUSKEY M., CHISHOLM D.M. OGDEN G.R., SCHOR S.L., SCHOR A.M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in oral tissues: possible relevance to angiogenesis, tumour progression and field cancerisation. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v.38, n.30, p.449-457, 2001.

JOHNSTONE S., LOGAN R.M. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v.45, n.42, p.337-342, 2006.

WONG Y.K., LIU C.J., KWAN P.C., CHAO S.Y. Microvascular density and vascular endothelial growth factor immunoreactivity as predictors of regional lymph node metastasis from betel-associated oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.67, n.61, p.1257-1262, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, ORAL HEALTH PROGRAMME. Global data on incidence of oral cancer. Disponível em:<  
[http://www.who.int/oral\\_health/publications/oral\\_cancer\\_brochure.pdf](http://www.who.int/oral_health/publications/oral_cancer_brochure.pdf)> acesso em: 20 ago. 2009

ESTIMATIVAS INCA 2008, Incidência de câncer no Brasil <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/versaofinal.pdf>> acesso em: 20 ago. 2009

3) Fausto Gueths Gomes; Fernanda Nedel; Vinícius Farias Campos; Fabiana Kömmling Seixas; Sandra Beatriz Chaves Tarquinio "DNA quantification: contribution for the investigation of potentially malignant lesions and cancer in oral mucosa." XV Encontro da SBBC (sociedade brasileira de biologia celular)

**Resumo:**

There has been a growing interest to develop easier and faster techniques that can improve the understanding of cellular and molecular mechanisms involved in oral cancer. This study aimed to compare the DNA quantity obtained from potentially malignant disorders or cancer lesions (both clinically diagnosed) and the normal oral mucosa. Buccal cells were collected from the lesions (n=20) and normal mucosa (n=20) from the same patients, using special cytobrush, and totaling 2 collections for individual. DNA was extracted according to the manufacturer's instructions (Puregene DNA buccal cell kit, Gentra Systems, Inc.). DNA obtained was then quantitatively evaluated using a fluorometer (Qubit fluorometer, Invitrogen). Data was statistically analyzed by one-way ANOVA to compare normal and diseased tissues, with  $p < 0.05$ . The means ( $\pm$ SD) of DNA quantity (ng of DNA) for lesions and normal mucosa were respectively: 662.5 ( $\pm$  304) and 1525 ( $\pm$  680) in lichen planus (LP); 819 ( $\pm$  571) and 1559.5 ( $\pm$  420) in oral squamous cell carcinoma (OSCC) cases. And the medians for lesion and normal mucosa in leukoplakia were respectively 406 and 682 ng of DNA. When comparing DNA obtained from oral lesions with that obtained from normal mucosa, statistically significant differences were found for LP ( $p = 0.042$ ) and leukoplakia ( $p = 0.040$ ), but not for OSCC ( $p=0.082$ ). Within the limitations of this study, we could infer that in some situations DNA quantification was different in normal tissue and diseased tissue, which may contribute in the DNA analysis of potentially malignant pathologies and oral cancer.

4) Fausto Gueths Gomes; Fernanda Nedel; Vinícius Farias Campos; Fabiana Kömmling Seixas; Sandra Beatriz Chaves Tarquínio " Avaliação quantitativa e qualitativa de DNA e RNA extraídos de escovas citológicas em lesões potencialmente malignas e cancerígenas da mucosa oral: estudo piloto" XIX Congresso de iniciação científica (CIC), 2010

## 1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2005, publicou a informação de que o câncer oral é a décima primeira neoplasia mais frequente no mundo, com certas particularidades entre os diferentes países. Por exemplo, na Índia, o câncer oral é a forma de lesão maligna mais presente na população (MEHROTRA *et al.*, 2003). Conforme o Instituto Nacional do Câncer (INCA) publicou em 2008, no Brasil, tal forma de câncer é a sétima lesão maligna mais presente em homens e a nona em mulheres.

O câncer oral é a neoplasia mais frequente dentre as lesões malignas da região de cabeça e pescoço, sendo que a maioria destas são carcinomas epiteliais de células escamosas (ACHA *et al.*, 2004). Sabe-se que estes carcinomas podem surgir de lesões previamente identificáveis, porém não invasivas como, por exemplo, leucoplasia (WAAL, 2009) e líquen plano (HSUE *et al.*, 2007).

Exames clínicos e estudos histopatológicos de material biopsiado ainda são os procedimentos-padrão que são utilizados visando o diagnóstico de lesões cancerígenas e/ou potencialmente malignas da cavidade oral (ACHA *et al.*, 2004; DRIEMEL *et al.*, 2007). A biópsia de mucosa oral é uma técnica invasiva, com implicações cirúrgicas e que pode causar danos aos pacientes. Além de apresentar limitações como, por exemplo, em lesões relativamente grandes onde o local a ser biopsiado pode não ser representativo da lesão acarretando em erros ou dificuldades no diagnóstico e possivelmente na terapia do paciente (EPSTEIN *et al.*, 2002).

A citologia exfoliativa é uma técnica na qual há um crescente interesse em utilizá-la como uma ferramenta de auxílio ao diagnóstico de lesões cancerígenas da mucosa oral, além do fato dessa técnica propiciar a obtenção de material celular para futuras análises moleculares (DRIEMEL *et al.*, 2007). Por ser uma técnica pouco invasiva, a citologia exfoliativa é bem aceita pelo paciente e conseqüentemente pode vir a se tornar uma forma eficaz de diagnóstico de lesões malignas em estágios iniciais, porém ainda não há uma especificidade ideal para essa forma de prática (MEHROTRA *et al.*, 2006).

O presente trabalho tem como finalidade avaliar quantitativo e qualitativamente o DNA e RNA obtidos, com escovas citológicas, de lesões pré-malignas e malignas da mucosa oral.

## 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

O material foi coletado a partir de usuários do centro de diagnóstico das Doenças da Boca da Faculdade de Odontologia, UFPEL. As células foram obtidas através do uso de escovas citológicas, com fricção no local da lesão por aproximadamente trinta segundos, e coletas individualizadas para DNA (n=20) e RNA (n=3). Após o material ter sido coletado, as escovas foram colocadas em um tubo de microcentrífuga.

Para a extração de DNA, as escovas foram postas em tubos contendo solução de lise celular, sendo que as próximas etapas da extração ocorreram conforme instruções do fabricante (Puregene DNA Tissue Kits – Gentra Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota). O RNA celular foi obtido através da utilização de TRIZOL<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen). Visando análises quantitativas, as amostras foram avaliadas através do uso de fluorômetro (Qubit fluorometer, Invitrogen).

Qualitativamente, o DNA foi avaliado através da genotipagem do polimorfismo do códon 72 do gene da p53 utilizando-se PCR-RFLP. E o RNA foi avaliado por meio da expressão de GAPDH, utilizando para isso o PCR em tempo real (Cycler<sup>®</sup> 480 SYBR Green I Master Kit, Roche; LightCycler<sup>®</sup> 480 Real Time PCR System, Roche), onde o cDNA foi preparado através do kit Superscript II first-strand cDNA synthesis, Invitrogen.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Quantitativamente, a média de concentração de DNA foi de (0,97 µg/escova) em leucoplasia, (0,65 µg/escova) em líquen plano e (0,62 µg/escova) em carcinoma espinocelular. Segundo Saftlas e colaboradores (2004), a coleta de células epiteliais bucais tem fornecido, em média, de 1 a 7,5 µg/escova. Conforme Nedel e colaboradores (2009), a concentração de DNA considerada adequada para estudos epidemiológicos é entre 1 e 2 µg/escova. O fabricante (Puregene DNA Tissue Kits – Gentra Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota) preconiza, em extração de DNA, uma quantidade entre 0,2 e 2 µg/escova, portanto, mesmo sendo os valores encontrados não presentes entre o intervalo considerado ideal para estudos epidemiológicos, a concentração obtida no experimento está bem estabelecida entre os valores previstos pelo fabricante e suficientes para o uso em análises moleculares a partir desse material. Com relação ao RNA, sua quantidade, em carcinoma espinocelular, foi de 0,285 µg/escova.

Qualitativamente, todas as amostras, tanto de DNA quanto de RNA, apresentaram amplificação dos fragmentos estudados (Figura 1 e 2). O gene GAPDH é considerado um gene controle de qualidade de DNA e RNA. Ele codifica uma enzima chamada gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, a qual participa do metabolismo de glicose na respiração celular. Portanto, é utilizado como um gene controle por apresentar uma expressão constante no interior da célula sob diferentes condições experimentais (ZHONG & SIMONS, 1999). Além do fato de que evidências apontam ao GAPDH como participante no processo de carcinogênese (COLELL *et al.*, 2009). A presença do gene TP53 e da integridade de seus fragmentos é essencial ao estudo do material genético proveniente de células de lesões potencialmente malignas e/ou malignas da boca. Sabe-se que mutações existentes nesse gene significam elevados riscos de surgimento de tais lesões (MISRA *et al.*, 2009; NYLANDER *et al.*, 2000). Sendo, portanto, relevante a análise de ambos os genes para se avaliar a qualidade do material genético obtido a partir de lesões potencialmente malignas e malignas da cavidade oral.



Figura 1: Genótipos do polimorfismo do códon 72 do gene da p53

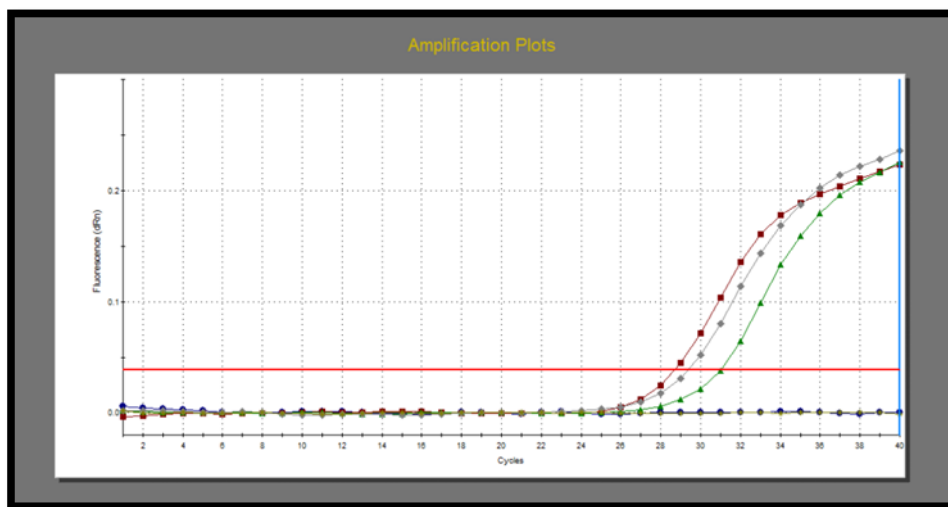


Figura 2: Expressão de GAPDH nas amostras (verde, cinza e vermelho) de RNA.

#### 4 CONCLUSÕES

É possível inferir, que as técnicas utilizadas tanto na obtenção das células epiteliais da mucosa oral dos pacientes quanto de extração proporcionam DNA e RNA de boas quantidade e qualidade.

#### 5 REFERÊNCIAS

- ACHA, A., RUESGA, M.T., RODRÍGUEZ, M.J., PANCORBO, M.A.M., AGUIRRE, J.M., Aplications of the oral scraped (exfoliative) cytology in oral cancer and precancer. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal** v. 10, p. 95-102, 2005.
- COLELL, A., GREEN, D.R., RICCI, J.E. Novel roles for GAPDH in cell death and carcinogenesis. **Cell Death Differ.** n. 16, v. 12, p. 1573-1581, 2009.
- DRIEMEL, O., KUNKEL, M., HULLMAN, M., EGGELING, F., URS, M.R., KOSMEHL, H., REICHERT, T.E. Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions. **JDDG.** n. 12, v.5, p. 1095-1100, 2007.
- EPSTEIN, J.B., ZHANG, L., ROSIN, M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. **Can Dent Assoc.** n. 68, v. 10, p. 617-621, 2002.

ESTIMATIVAS INCA 2008, Incidência de câncer no Brasil

<<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/versaofinal.pdf>> acesso em: 20 ago. 2009  
HSUE, S.S., WANG, W.C., CHEN, C.H., LIN, C.C., CHEN, Y.K., LIN, L.M. Malignant transformation in 1458 patients with potentially malignant oral mucosal disorders: a follow-up study based in a Taiwanese hospital. **J Oral Pathol Med.** n. 36, p. 25-29, 2007.

MEHROHTRA, R., GUPTA, A., SINGH, M., IBRAHIM, R. Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant lesions. **Mol Cancer.** v. 5, p. 5-11, 2006.

MEHROTRA, R., SINGH, M., KUMAR, D., PANDEY, A.N., GUPTA, R.K., SINHA, U.S. Age specific incidence rate and pathological spectrum of oral cancer in Allahabad. **Indian Journal of Medical Sciences.** n. 9, v. 57, p. 400-404, 2003.

MISRA, C., MAJUMDER, M., BAJAJ, S., GHOSH, S., ROY, B., ROYCHOUDHURY, S. Polymorphisms at p53, p73, and MDM2 Loci modulate the risk of tobacco associated leukoplakia and oral cancer. **Molecular Carcinogenesis.** n. 48, p. 790-800, 2009.

NEDEL, F., CONDE, M.C., OLIVEIRA, L.O., TARQUINIO, S.B., DEMARCO, F.F. Comparison between DNA obtained from buccal cells of the upper and lower gutter area. **Braz Dent J.** n. 20, v.4, p. 275-278, 2009.

NYLANDER, K., DABELSTEEN, E., HALL, P. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. **Journal of Oral Pathology & Medicine.** v. 29, n. 9, p. 413-425, 2000.

SAFTLAS, A.F., WALDSCHMIDT, M., LONGSDEN-SACKET, N., TRICHE, E., FIELD, E. Optimizing buccal cell DNA yields in mothers and infants for human leukocyte antigen genotyping. **American Journal of Epidemiology.** n. 160, v.1, p. 77-84, 2004.

WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncology.** n. 45, p. 317-323, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, ORAL HEALTH PROGRAMME. Global data on incidence of oral cancer. Disponível em:

<[http://www.who.int/oral\\_health/publications/oral\\_cancer\\_brochure.pdf](http://www.who.int/oral_health/publications/oral_cancer_brochure.pdf)> acesso em: 20 ago. 2009

ZHONG, H., SIMONS, J.W. Direct Comparison of GAPDH, b-Actin, Cyclophilin, and 28S rRNA as Internal Standards for Quantifying RNA Levels under Hypoxia.

**Biochemical and Biophysical Research Communications.** n. 259, p. 523-526, 1999.

5) Fausto Gueths Gomes; Fernanda Nedel; Guilherme Demarco Antonello; Fabiana Kömmling Seixas; Sandra Beatriz Chaves Tarquínio “AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E QUALITATIVA DO DNA DE LESÕES POTENCIALMENTE MALIGNAS E CARCINOMA ESPINOCELULAR DE BOCA” XX Congresso de iniciação científica (CIC), 2011 (resumo aceito)

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é uma das maiores causas de morte, contabilizando um total aproximado de 7,6 milhões (13%) de óbitos no ano de 2008, sendo destes, aproximadamente, 4.222.842 para homens e 3.349.248 para mulheres. Para o Brasil, foi estimado um total de 489.270 novos casos de câncer em 2010, sendo 236.240 (aproximadamente 48%) e 253.030 (aproximadamente 52%) para homens e mulheres, respectivamente. Com relação ao câncer oral, 10.330 (4,37%) novos casos dessa forma de neoplasia foram estimados para homens e 3.790 (1,5%) para mulheres no Brasil em 2010 (Estimativas INCA, 2010).

Clinicamente, lesões potencialmente malignas e malignas da boca podem apresentar-se na forma de leucoplasias, eritroplasias, leucoeritroplasias, (WAAL, 2009), ou ainda, segundo alguns autores, como líquen plano (sendo esta uma condição que vem sendo discutida na literatura, com relação ao seu real potencial de malignização)(GONZALES-MOLES *et al.*, 2008). Histopatologicamente, diferentes graus de displasias epiteliais (acompanhados ou não de hiperqueratose e/ou acantose), carcinoma *in situ* ou mesmo o carcinoma espinocelular invasivo podem corresponder podem se manifestar com o mesmo aspecto clínico. O líquen plano permanece como um diagnóstico a parte, tanto clínica quanto histopatologicamente.

Conforme o paciente apresente suspeita clínica de alguma das lesões acima citadas, o procedimento que deve ser adotado é a realização de uma biópsia do local lesionado, para posterior confirmação de diagnóstico através de análises histopatológicas. Sendo a biópsia uma técnica com implicações cirúrgicas, eventualmente algumas sequelas podem decorrer desse procedimento (DONNELL *et al.*, 2008). Por tais razões, é importante o desenvolvimento de análises moleculares que possam favorecer o diagnóstico, auxiliando o método de biópsia. O intuito deste trabalho é avaliar a quantidade e qualidade do material genético obtido a partir da coleta de células de lesões potencialmente malignas e do carcinoma espinocelular de boca de pacientes usuários do Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDDB), da Faculdade de Odontologia – UFPEL.

## 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

O material foi coletado a partir de usuários do CDDDB da Faculdade de Odontologia da UFPEL. As células foram obtidas através do uso de escovas citológicas, com fricção no local da lesão por aproximadamente trinta segundos. Para cada coleta referente ao material genético lesional, foi obtido também material proveniente de mucosa normal de cada indivíduo, num sítio distante da alteração diagnosticada. As escovas foram então colocadas em um tubo de microcentrifuga contendo solução de lise celular. As próximas etapas da extração ocorreram

conforme instruções do fabricante (Puregene DNA Tissue Kits – Gentra Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota). Visando análises quantitativas, as amostras foram avaliadas através do equipamento Nanovue (GE Healthcare).

Qualitativamente, o DNA foi avaliado através da genotipagem do polimorfismo do códon 72 do gene da p53 utilizando-se PCR-RFLP.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados foram categorizados em grupos, onde os diagnósticos histopatológicos foram agrupados conforme exposto na Tabela 1. Os grupos são: 1(carcinoma espinocelular), 2(líquen plano), 3(displasias epiteliais moderada e severa ou de moderada a severa) e 4(acantose, hiperqueratose e/ou displasia epitelial discreta).

Tabela 1- Dados quantitativos de DNA encontrados a partir das coletas

Grupo diagnóstico	Número de casos por grupo	Média DNA lesão (µg/escova)	DP DNA lesão (µg/escova)	Média DNA controle (µg/escova)	DP DNA controle(µg/escova)
1	15	10,11	12,12	9,40	6,48
2	13	2,39	2,69	4,80	3,37
3	11	1,42	1,36	3,51	3,55
4	13	0,85	1,06	7,07	8,84

Todas as amostras utilizadas no presente trabalho (52), tanto de tecidos lesionados quanto de sadios, foram amplificadas e genotipadas com sucesso. A Figura 1 exemplifica um desses experimentos.

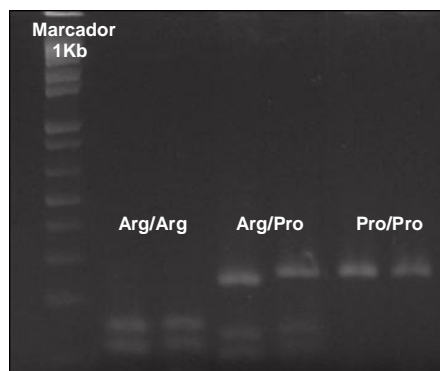


Figura 1- Genotipagem do códon 72, gene da p53

Até o presente momento são escassos os estudos que abordem as análises quantitativas de DNA proveniente de lesões potencialmente malignas e carcinoma espinocelular de boca. Assim, não há um parâmetro na literatura para fins



de comparação entre os dados do nosso estudo com outros que tenham realizado análise semelhante. Contudo, podem ser feitas algumas especulações sobre alguns resultados do presente estudo. Por exemplo, nos grupos 3 e 4, referentes, respectivamente, aos casos com diagnósticos histopatológicos de displasias moderadas/severas e acantose, hiperqueratose e/ou displasia epitelial discreta, as amostras têm como correspondente diagnóstico clínico mais frequente as leucoplasias, sendo observado um espessamento da camada de queratina, motivo este pelo qual, provavelmente, seja mais difícil de ser obtido DNA viável a partir das células coletadas dessa forma de lesão. Além disso, características próprias de cada paciente, como salivação e descamação do epitélio da mucosa bucal também podem interferir na quantidade de DNA extraído.

Com relação à qualidade do material, muitos estudos acabam mostrando de forma indireta, em seus resultados como as suas amostras se comportaram nos experimentos, por mais que não mencionem obrigatoriamente o termo “análise qualitativa de DNA” (ex: LOW *et al.*, 2000 ; TSUI *et al.*, 2009).

Em tecidos sadios, há um maior aporte de estudos relacionando quantidade e qualidade de material obtido a partir de diferentes métodos de coleta, principalmente para análises de cunho epidemiológico. King e colaboradores (2002) perceberam haver diferenças estatisticamente não significativas entre as quantidades de DNA de amostras coletadas por enxágue bucal e escovas citológicas (médias de 15,8 e 12,0µg, respectivamente). A qualidade desse material genético, entretanto, variou bastante, visto que 81% das amostras provenientes do enxágue bucal foram amplificadas por PCR com sucesso, enquanto nenhuma amostra de escova citológica teve o mesmo resultado (KING *et al.*, 2002). Mulot e colaboradores (2005) observaram uma média menor na quantidade de DNA em ambos os métodos (3,5µg por escova e 4µg por enxágue bucal). Foi mostrado, entretanto, que 98,3% (59 de 60 amostras) amplificaram fragmentos de 481 pares de bases (bp) via PCR (MULOT *et al.*, 2005). Diferenças entre as metodologias de coleta entre os estudos, quer sejam as referentes ao método do enxágue bucal ou as da escova citológica podem ser explicadas pelas variações nas técnicas e no tempo de obtenção das amostras. Nessa mesma linha de pensamento, Nedel e colaboradores (2009) observaram diferenças entre as médias quantitativas de DNA presente no fundo de sulco superior (12,2 µg) e inferior (9,4 µg), quando o próprio indivíduo realizava a coleta. Os autores acreditam que tal diferença ocorra em função da maior disposição de saliva no fundo de sulco inferior em relação ao superior (força gravitacional), contribuindo para remoção contínua das células epiteliais localizadas no neste sítio. Ainda o acúmulo de saliva pode reduzir o atrito entre a mucosa jugal e gengival diminuindo o processo de descamação. Com relação às análises qualitativas do material extraído utilizando a eletroforese em gel de agarose e observação do padrão de bandas , como NEDEL *et al.* (2009), também obtivemos resultados exitosos, o que reforça a indicação dessa técnica não invasiva e de simples execução para estudos de material genético obtidos a partir de amostras bucais.

#### **4 CONCLUSÃO**

Apesar das variações quantitativas observadas entre os grupos, a metodologia utilizada na coleta e extração de DNA proveniente das lesões estudadas e de seus controles sadios, demonstrou quantidade e qualidade de material genético passível de ser utilizado em posteriores análises moleculares.

## 5 REFERÊNCIAS

- ACHA, A., RUESGA, M.T., RODRÍGUEZ, M.J., PANCORBO, M.A.M., AGUIRRE, J.M., Applications of the oral scraped (exfoliative) cytology in oral cancer and precancer. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal** v. 10, p. 95-102, 2005.
- DONNELL A., JIN S., ZAVRAS A.I. Delay in the Diagnosis of Oral Cancer. **The Journal of Stomatological Investigation**. v. 2, p. 15-26, 2008.
- ESTIMATIVAS 2010, Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>> acesso em: 29 Jul. 2011.
- GLOBOCAN 2008, FAST STATS. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>> acesso em: 29 Jul. 2011.
- GONZALES-MOLES M.A., SCULLY C., GIL-MONTOYA J.A. Oral lichen planus: controversies surrounding malignant transformation. **Oral Diseases**. v. 14, p. 229-243, 2008.
- 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**. v. 11, p. 1130-1133, 2002.
- LOW E.O., JONES A.M., GIBBINS J.R., WALKER D.M. Analysis of the amplification refractory mutation allele-specific polymerase chain reaction system for sensitive and specific detection of p53 mutations in DNA. **Journal of Pathology**. v. 190, p. 512-515, 2000.
- MULOT C., STÜCKER I., CLAVEL J., BEAUNE P., LORIOT M.A. Collection of Human Genomic DNA From Buccal Cells for Genetics Studies: Comparison Between Cytobrush, Mouthwash, and Treated Card. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. v. 3, p. 291-296, 2005.
- NEDEL F., CONDE M.C.M., OLIVEIRA I.O., TARQUINIO S.B.C., DEMARCO F.F. Comparison Between DNA Obtained From Buccal Cells of the Upper and Lower Gutter Area. **Braz Dent J**. v. 20, n. 4, p. 275-278, 2009.
- TSUI I.F.L., POH C.F., GARNIS C., ROSIN M.P., ZHANG L., LAM W.L. Multiple pathways in the FGF signaling network are frequently deregulated by gene amplification in oral dysplasias. **Int J. Cancer**. v. 125, p. 2219-2228, 2009.
- WAAL, ISAËC VAN DER. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncology**. v. 45, p. 317-323, 2009.

6) Fausto Gueths Gomes; Fernanda Nedel; Alessandro Menna Alves; Sandra Beatriz Chaves Tarquinio “TÓPICOS EM MECANISMOS MICROAMBIENTAIS E INTERCELULARES ENVOLVIDOS NA ANGIOGÊNESE E LINFANGIOGÊNESE TUMORAIS: UMA BREVE REVISÃO” XX congresso de iniciação científica (CIC), 2011 (resumo aceito)

## 1 INTRODUÇÃO

Para que um tumor possa se desenvolver, sabe-se que é necessário o desequilíbrio entre fatores pró- e anti-angiogênicos, pendendo a favor da neovascularização tumoral, a partir, principalmente, da proliferação de células endoteliais de vasos pré-existentes. A linfangiogênese, por sua vez, se dá através da proliferação de células endoteliais linfáticas e, junto com a angiogênese, constituem ambos processos facilitadores da metástase e disseminação tumorais.

Os receptores e fatores de crescimento envolvidos na angiogênese podem, por vezes, ser os mesmos da linfangiogênese (SCAVELLI et al., 2004). As vias de sinalizações entre células tumorais e endoteliais tem também sido amplamente discutidas. Alguns estudos têm abordado como as células endoteliais, vasculares e linfáticas, podem estimular também as células tumorais (ex: NEIVA et al., 2009; ISSA et al., 2009) em mecanismos denominados sinalização cruzada, ou *crosstalk* celulares. Vários outros tipos celulares também podem interagir com células endoteliais vasculares e linfáticas, e ainda com as células malignas.

As drogas e estratégias terapêuticas anti-angiogênicas buscam interceptar a comunicação celular neste processo, inibindo a ação de fatores como VEGF (KNIES-BAMFORTH & WATSON, 2005). O bloqueio da via de VEGF-C e D e seu receptor VEGFR-3 é estudado na terapia anti-linfangiogênica (ACHEN et al., 2006). O intuito deste resumo é, a partir de uma revisão da literatura ampla sobre o tema, buscar o melhor entendimento dos mecanismos microambientais da matriz extracelular e celulares envolvidos nas diferentes vias da angiogênese e linfangiogênese tumorais, tendo como finalidade maior uma terapêutica antitumoral mais abrangente.

## 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

A presente pesquisa bibliográfica foi desenvolvida através da busca de artigos em bases de dados como o Pubmed, muito acionado na área da saúde. Foram também realizadas buscas no Portal Periódicos da CAPES ou em sites mais amplos, como o Google e Google Scholar.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Angiogênese tumoral, matriz extracelular e mecanismos de sinalização entre células endoteliais vasculares e diferentes tipos celulares

A matriz extracelular pode influenciar a angiogênese, agindo tanto de uma forma supressora, através de inibidores angiogênicos endógenos (*arresten*, canstatina, fragmentos de colágeno, EFC-XV, endorepelina, endostatina, fragmentos de fibronectina, fibulina, tumstatina e trombospondina 1 e 2) (NYBERG et al., 2005),

quanto de maneira a estimulá-la, através de fatores como o próprio VEGF, FGF-2, PDGF, IL-8, TGF- $\beta$  e angiopoietinas, os quais estão presentes de forma constitutiva na matriz, podendo todos esses fatores serem mobilizados e atuarem na angiogênese tumoral (CRIVELLATO et al., 2008). Com relação a mecanismos de crosstalk endotelial vascular/tumoral, tem sido demonstrado que graças a um aumento na expressão de Bcl-2, um gene de sobrevivência celular, células endoteliais vasculares podem secretar diferentes fatores de crescimento e citocinas, sendo tal processo responsável por um aumento na expressão de Bcl-2 nas próprias células tumorais, bem como uma maior secreção de VEGF e citocinas pró-angiogênicas por ambas as células (NEIVA et al., 2009).

Células dendríticas imaturas podem responder a mediadores pró e anti-angiogênicos, além de apresentarem a capacidade de secretar, em um microambiente tumoral, diferentes fatores pró-angiogênicos como TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e GM-CSF (SOZZANI et al., 2007). Também os fibroblastos associados ao estroma neoplásico podem auxiliar na angiogênese tumoral através da produção de VEGF e metaloproteinases (MMPs) (KALURI & ZEISBERG, 2006). Os macrófagos presentes no microambiente tumoral podem exercer duas funções importantes. Em um primeiro momento, associados a outras células do sistema imune, podem exercer um efeito supressor tumoral, mas à medida em que, a neoplasia consegue escapar da vigilância imunológica, esses fagócitos, podem atuar promovendo a angiogênese e degradação de membrana basal, permitindo assim um maior potencial de migração das células tumorais em direção aos vasos, através da produção de VEGF, TNF- $\alpha$ , bFGF, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-12 e cyclo-oxygenase-2 (COX-2) (LEWIS & POLLARD, 2006). Pericitos também podem participar deste processo de estimulação da angiogênese, através da secreção de VEGF, em conjunto com células tumorais, sendo estimulados pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), produzido pelas células endoteliais e tumorais (REINMUTH et al., 2001). Foi visto também que linfócitos T ativados apresentaram uma maior expressão do receptor VEGFR-1 em suas membranas e que, na presença de VEGF, estas células aumentaram a produção de interleucina-10 (IL-10), sendo reduzida a secreção de interferon-gama, uma citocina anti-angiogênica, (SHIN et al., 2009).

Foi sugerido, então, que a presença de VEGF no microambiente tumoral pode ser responsável pelo recrutamento de linfócitos T e consequente favorecimento angiogênico e escape do sistema imune via IL-10 (SHIN et al., 2009). Mastócitos também podem secretar fatores pró-angiogênicos como VEGF, FGF-2, IL-8 e TGF- $\beta$  (CRIVELLATO et al., 2008).

### **3.2. Linfangiogênese tumoral, matriz extracelular e mecanismos de sinalização entre células endoteliais linfáticas e diferentes tipos celulares**

A síntese desregulada de ácido hialurônico, molécula componente da matriz extracelular, é descrita como um potente estimulador de desenvolvimento tumoral, principalmente através do recrutamento de células do estroma e pelo aumento da linfangiogênese, podendo estar associado inclusive com o estímulo à angiogênese (ITANO et al., 2008). Mishima e colaboradores (2007) mostraram que o fator de transcrição Prox-1, induzindo uma maior expressão de integrina  $\alpha 9$ , desencadeou aumento no potencial de migração de células endoteliais linfáticas em direção a células que expressassem VEGF-C. Ademais, interações entre integrinas como a  $\alpha 5\beta 1$  e a fibronectina de matriz foram relacionadas a um aumento na linfangiogênese (DIETRISCH et al., 2007).

Nessa mesma linha de pensamento, Issa e colaboradores (2009) verificaram que a secreção de VEGF-C por parte das células tumorais estimulou um aumento na produção de CCL21 nas células endoteliais linfáticas. Esta citocina por sua vez, ao se ligar aos receptores CXCR7 presentes nas células malignas, favoreceu a migração destas, em uma matriz tridimensional, em direção às células endoteliais linfáticas (ISSA et al., 2009). Também tem sido sugerido que fibroblastos, recrutados a um microambiente tumoral rico em ácido hialurônico, podem passar a produzir VEGF-D, estimulando a linfangiogênese em câncer (KOYAMA et al., 2008). Schoppmann e colaboradores (2002) isolaram uma subpopulação de monócitos da circulação expressando VEGFR-3, bem como, em tumores de cérvix, os chamados macrófagos associados a tumores malignos (TAMs), os quais secretavam VEGF-C e -D. Foi inferido, então, que a presença de VEGF-C no microambiente tumoral pode ser responsável pelo recrutamento de monócitos VEGFR-3+ circulantes com posterior diferenciação em TAMs secretores de VEGF-C e -D e consequente incremento na linfangiogênese tumoral (SCHOPPMANN et al., 2002). Mastócitos também foram observados como importantes participantes na linfangiogênese, sendo também secretores de VEGF-C (CRIVELLATO et al., 2008).

#### 4 CONCLUSÃO

A partir de uma revisão recente da literatura, realizada de forma concisa, pode-se concluir que diversos mecanismos moleculares tem sido implicados no desenvolvimento do câncer. Estes englobam as interações relativas ao microambiente tumoral, envolvendo a matriz extracelular e vários tipos celulares presentes no mesmo, bem como as sinalizações referentes aos *crosstalk* intercelulares que podem estar presentes tanto na angiogênese como na linfangiogênese tumorais. É de grande importância o contínuo aporte de estudos nessa área do conhecimento, visando um entendimento amplo dos fatores que podem participar do desenvolvimento e progressão das neoplasias. A partir da compreensão dos eventos celulares e moleculares interconectantes ocorrentes, então, é possível buscar estratégias terapêuticas cada vez mais completas, as quais podem ser direcionadas a interferir em diferentes mecanismos presentes em um mesmo processo da biologia tumoral.

#### 5 REFERÊNCIAS

- ACHEN M.G., MANN G.B., STACKER S.A. Targeting lymphangiogenesis to prevent tumour metastasis. *British Journal of Cancer*, v. 94, p.1355-1360, 2006.
- BROWN L.F., GUIDI A.J., SCHNITT S.J., WATER L.V.D., IRUELA-ARISPE M.L., YEO T.K., TOGNAZZI K., DVORAK H.F. Vascular Stroma Formation in Carcinoma in Situ, Invasive Carcinoma, and Metastatic Carcinoma of the Breast. **American Association for Cancer Research**. v. 5, p. 1041–1056, p. 1041-1056, 1999.
- CRIVELLATO E., NICO B., RIBATTI D. Mast cells and tumour angiogenesis: New insight from experimental carcinogenesis. **Cancer Letters**. v.269, p.1-6, 2008.
- DIETRICH T., ONDERKA J., BOCK F., KRUSE F.E., VOSSMEYER D., STRAGIES R., ZAHN G., CURSIEFEN C. Inhibition of Inflammatory Lymphangiogenesis by Integrin  $\alpha 5$  Blockade. **The American Journal of Pathology**. v. 171, n. 1, 2007.
- ISSA A., LE T.X., SHOUSHARI A.N., SHIELDS J.D., SWARTZ M.A. Vascular Endothelial Growth Factor-C and C-C Chemokine Receptor 7 in Tumor Cell–

- Lymphatic Cross-talk Promote Invasive Phenotype. **Cancer Res**, v. 69 n.1, p.349-357, 2009.
- ITANO N.,ZHUO L.,KIMATA K.Impact of the hyaluronan-rich tumor microenvironment on cancer initiation and progression. **Cancer Sci**. v. 99, n. 9, p.1720–1725, 2008.
- JI R.C. Lymphatic Endothelial Cells, Lymphangiogenesis, and Extracellular Matrix. **Lymphatic research and biology**. v. 4, n. 2, p. 83-100, 2006.
- KALLURI R., ZEISBERG M. Fibroblast in Cancer. **Nature Reviews/cancer**. v. 6p. 392-401, 2006.
- KNIES-BAMFORTH U., WATSON C. Napoleone Ferrara discusses Avastin™ and the future of anti-angiogenesis therapy. **DDT**. v .10, n. 8, p. 539-541, 2005.
- KOYAMA H., KOBAYASHI N., HARADA M., TAKEOKA M., KAWAI Y., SANO K., FUJIMORI M., AMANO J., OHHASHI T., KANNAGI R., KIMATA K., TANIGUCHI S., ITANO N. Significance of Tumor-Associated Stroma in Promotion of Intratumoral Lymphangiogenesis Pivotal Role of a Hyaluronan-Rich Tumor Microenvironment. **The American Journal of Pathology**. v. 172, n. 1, p. 179-193, 2008.
- LEWIS C.E., POLLARD J.W. Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments. **Cancer Res**. v. 66, n. 2, p. 605-612, 2006.
- MISHIMA K.,WATABE T.,SAITO A.,YOSHIMATSU Y.,IMAIZUMI N.,MASUI S.,HIRASHIMA M,MORISADA T.,OIKE Y,ARAIE M.,NIWA H,KUBO H.,SUDA T.,MIYAZONO K.Prox1 Induces Lymphatic Endothelial Differentiation via Integrin  $\alpha_9$  and Other Signaling Cascades.**Mol Biol Cell**.v. 18,p.1421–1429, 2007.
- NEIVA K.G., ZHANG Z., MIYAZAWA M., WARNER K.A., E. KARL., J.E. NÖR. Cross talk Initiated by Endothelial Cells Enhances Migration and Inhibits Anoikis of Squamous Cell Carcinoma Cells through STAT3/Akt/ERK Signaling. **Neoplasia**, v. 11, N. 6, p. 583–593, 2009.
- NYBERG P.,XIE L.,KALLURI R.Endogenous Inhibitors of Angiogenesis.**Cancer Res**. v.65, p.3967-3979,2005.
- PAUPERT J., SOUNNI N.E., NOËL A. Lymphangiogenesis in post-natal tissue remodeling: Lymphatic endothelial cell connection with its environment. **Mol Aspects Med**. p. 1-13, 2011.
- REINMUTH N., LIU W., JUNG Y.D., AHMAD S.A., SHAHEEN R.M., FAN F., BUCANA C.D., MCMAHON G., GALLICK G.E., ELLIS L.M. Induction of VEGF in perivascular cells defines a potential paracrine mechanism for endothelial cell survival. **FASEB**. v. 15, n.7, p. 1239-1257, 2001.
- SCAVELLI C.,VACCA A.,DI PIETRO G.,DAMMACCO F.,RIBATTI D.Crosstalk between angiogenesis and lymphangiogenesis in tumor progression. **Leukemia**, v. 18, p. 1054–1058, 2004.
- SCHOPPMANN S.F., BIRNER P., STÖCKL J., KALT R., ULLRICH R., CAUCIG C., KRIEHLER E., NAGY K., ALITALO K., KERJASCHKI D. Tumor-Associated Macrophages Express Lymphatic Endothelial Growth Factors and Are Related to Peritumoral Lymphangiogenesis. **American Journal of Pathology**. v. 161, n. 3, p. 947-956, 2002.
- SHIN J.Y., YOON I.H., KIM J.S., KIM B., PARK C.G.. Vascular endothelial growth factor-induced chemotaxis and IL-10 from T cells. **Cellular Immunology** v. 256, p. 72–78, 2009.
- SOZZANI S., RUSNATI M., RIBOLDI E., MITOLA S., PRESTA M. Dendritic cell–endothelial cell cross-talk in angiogenesis. **TRENDS in Immunology**. v. 28, n.9, p. 385-392, 2007.

7) Fausto Gueths Gomes; Fernanda Nedel; Alessandro Menna Alves; Sandra Beatriz Chaves Tarquinio “Tumor angiogenesis and lymphangiogenesis: Topics on the tumor/endothelial crosstalk and cellular/microenvironmental signaling mechanisms” (artigo no prelo- **Cancer Cell International**)

**Abstract:**

Tumor angiogenesis and lymphangiogenesis are processes largely related to tumor development and metastasis. The role of tumor cells - derived growth factors in the promotion of associated angiogenesis and lymphangiogenesis is much studied and, no doubt, very important for the development of current knowledge of cancer progression biology. This review aims to elucidate, however, some of the work that has been done concerning the pro-angiogenic and pro-lymphangiogenic intercellular interactions and the signaling pathways between microenvironment and cells that takes part in such processes occurring in cancer. These multifactor studies should be used in achieving future therapeutic approaches to treat cancer seeking to act in a more complex and complete manner.

Keywords: Angiogenesis; lymphangiogenesis; tumor microenvironment; crosstalk; extracellular matrix

## Anexos



## Anexo A- Parecer do comitê de ética

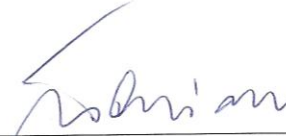


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PELOTAS, 19 de novembro de 2008.

PARECER N° 058/2008

O projeto de pesquisa intitulado: "AÇÕES COLETIVAS PARA A PREVENÇÃO E DETECÇÃO DO CÂNCER DE BOCA E IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DO CARCINOMA ESPINOCELULAR NA POPULAÇÃO DA REGIÃO SUL DO RIO GRANDE DO SUL", está constituído de forma adequada, cumprindo, nas suas plenitudes preceitos éticos estabelecidos por este Comitê e pela legislação vigente recebendo, portanto, **PARECER FAVORÁVEL** à sua execução.

  
Prof. Marcos Antonio Torriani  
Coordenador do CEP/FO/UFPel  
Prof. Marcos A. Torriani  
Coordenador  
de Ética e Pesquisa

Anexo B- Protocolo de extração de DNA (Puregene Buccal Cell Kit- Gentra Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota, USA)

### **Lise celular**

1. Lavar a escova num tubo de microcentrífuga contendo 300µl de solução de lise celular, levantando-a e abaixando-a, cerca de 10 vezes;
  2. Adicionar 1,5µl de Proteinase K (20mg/ml) ao lisado celular;
  3. Misturar, por inversão, 25 vezes;
  4. Incubar a 55° C por uma hora ou overnight a 37° C.
- Amostras são estáveis no tampão de lise por ao menos 18 meses à temperatura ambiente.

### **Tratamento com RNase A**

1. Adicionar 1,5µl de Solução de RNase A ao lisado celular;
2. Misturar a amostra, invertendo o tubo 25 vezes;
3. Incubar a 37° C por 15-60 minutos.

### **Precipitação da proteína**

1. Resfriar a amostra à temperatura ambiente;
  2. Adicionar 100µl de Solução de precipitação de proteína ao lisado celular;
  3. Misturar no agitador, em alta velocidade, por 20 segundos;
  4. Colocar o tubo no gelo por 5 minutos;
  5. Centrifugar a 13.000-16.000 g por 3 minutos
- Formação de um pellet branco e firme; se ele não se formar, repetir os passos 3,4 e 5.

### **Precipitação do DNA**

1. Transferir o sobrenadante contendo o DNA para um tubo novo de 1,5ml contendo 300 µl de Isopropanol a 100% (2-propanol) e 0,5µl de solução de glicogênio (200mg/ml);
2. Misturar por inversão, delicadamente, 50 vezes;
3. Incubar a temperatura ambiente por no mínimo 5 minutos;
4. Centrifugar a 13.000-16.000 g por 5 minutos (o pellet de DNA, pequeno e branco; pode não ser visível);
5. Desprezar o sobrenadante e secar o tubo sobre um papel absorvente limpo;
6. Adicionar 300µl de Etanol 70% e inverter o tubo várias vezes para lavar o DNA;
7. Centrifugar a 13.000-16.000 g por 1 minuto. Cuidadosamente retirar o etanol (cuidado, o pellet pode ficar frouxo);
8. Inverter o tubo; secar com papel absorvente e deixar ao ar ambiente por 10-15 minutos.

### **Hidratação do DNA**

1. Adicionar 20µl de Solução de hidratação de DNA;
2. Reidratar o DNA incubando a amostra por uma hora a 65° C ou overnight a temperatura ambiente;
3. Armazenar o DNA a 4° C, ou para longo tempo de armazenamento, a -20°C ou -80° C.