

XVIII

CIC

XI ENPOS  
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:  
por uma ciência do devir



## DIFERENTES MÉTODOS DE COLETA DE CÉLULAS EPITELIAIS BUCAIS PARA EXTRAÇÃO DE DNA

**GOMES, Fausto Gueths<sup>1</sup>; NEDEL, Fernanda<sup>2</sup>; DEMARCO, Flávio Fernando<sup>3</sup>;  
TARQUINIO, Sandra Beatriz Chaves<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Acadêmico do Curso de Biologia - UFPel

<sup>2</sup> Acadêmica da Faculdade de Odontologia – UFPel

<sup>3</sup> Departamento de Odontologia Restauradora - UFPel

<sup>4</sup> Departamento de Semiologia e Clínica da Faculdade de Odontologia - UFPel  
Faculdade de Odontologia – Rua Gonçalves Chaves n°457 – CEP 96015-560.  
faustogomes@gmail.com

### 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.