

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA CONSERVADORA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM PATOLOGIA BUCAL

JÚLIA SILVEIRA NUNES

**COMPARAÇÃO DE DIFERENTES SOLUÇÕES PARA PRESERVAÇÃO DO  
DNA DE AMOSTRAS CITOLÓGICAS BUCAIS**

PORTO ALEGRE

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM PATOLOGIA BUCAL

JÚLIA SILVEIRA NUNES

COMPARAÇÃO DE DIFERENTES SOLUÇÕES PARA PRESERVAÇÃO DO  
DNA DE AMOSTRAS CITOLÓGICAS BUCAIS

Linha de Pesquisa: Câncer bucal

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia  
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
como requisito à obtenção do título de mestre  
em Odontologia.

*Área de Concentração: Patologia Bucal*

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Visioli

PORTO ALEGRE, 2019

Nunes, Júlia Silveira

Comparação de Diferentes Soluções para Preservação do DNA de Amostras Citológicas Bucais / Júlia Silveira Nunes. -- 2019.

47 f.

Orientadora: Fernanda Visioli.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Câncer de boca. 2. DNA. 3. Soluções preservadoras de DNA. 4. Citologia Oral. 5. Análise Molecular. I. Visioli, Fernanda, orient. II. Título.

## AGRADECIMENTOS

Pensei muitas vezes como eu iria escrever esta parte da minha dissertação. Foram tantos os acontecimentos durante este período que eu não queria deixar ninguém de fora. Porém, acredito que uma das grandes tarefas que eu aprendi durante o mestrado foi agradecer. A formalização deste ato é importante, mas eu tenho certeza que cada uma destas pessoas sabe o quanto eu sou grata por tê-los na minha vida.

Não poderia deixar de registrar aqui o agradecimento aos meus pais. Foram eles que nos momentos mais difíceis desprenderam de uma energia, da qual nem eles sabiam que existia, para que eu me tornasse mais forte. Foram eles que estiveram comigo em toda e qualquer hora que eu precisei de ajuda, me ensinando e mostrando o caminho certo. Foram eles que vibraram e vibram comigo as minhas vitórias, sendo elas um desenho na escola ou a aprovação no vestibular. Foram eles que nunca mediram esforços para me dar amor e me ensinaram a amar.

Agradeço, imensamente, a toda a minha família e aos meus amigos, que estiveram comigo. Vocês são os personagens principais dessa história.

Agradeço também ao meu companheiro, Marcos, com quem há um tempo embarquei nessa maré do amor e aprendi que as tormentas ficam muito mais fáceis de serem encaradas quando há companheirismo, cumplicidade e afeto. Sou extremamente grata a tudo que ele fez e faz por mim.

Por último, agradeço a minha orientadora, Fernanda. Ela que é um exemplo de profissional, mulher, mãe e pesquisadora. Obrigada por me estimular a fazer ciência nesse país onde o investimento em pesquisa é tão baixo. Obrigada por acreditar em mim e me incentivar a ir mais longe. Obrigada também pela compreensão em todos os momentos que eu me precisei me ausentar. Muito mais que orientadora, a Fernanda é uma mistura de amiga, mãe e irmã.

Este período de mestrado me trouxe bem mais que ensinamentos acadêmicos. Eu aprendi que não existe bem maior do que estar vivo. As pessoas inseridas no mundo acadêmico têm, muitas vezes, suas vidas dominadas por ele. Deixam de lado momentos importantes entre família e amigos, passam por noites mal dormidas, fazem da faculdade sua segunda -

às vezes, primeira - casa. Tudo isso pelo “bem da ciência”. Sou extremamente grata à ciência e quero continuar me dedicando a ela, mas nunca esquecendo a importância da minha vida lá fora.

## RESUMO

**Introdução:** O processo da carcinogênese é desencadeado pelo acúmulo de mutações genéticas. Por isso, o uso de testes que identifiquem essas alterações, pode ser um valioso preditor de risco para o câncer de boca. O DNA isolado de células bucais esfoliadas pode ser empregado com sucesso para tal fim. Para isso, a utilização de soluções de preservação de DNA formuladas em laboratório, a um baixo custo e que garantam a viabilidade do material coletado pode ser um fator contribuinte para emprego destes testes em grande escala populacional. **Objetivo:** Avaliar a preservação do DNA de células bucais esfoliadas mantidas em soluções de preservação formuladas em laboratório em comparação com uma solução comercial e uma solução tampão. **Materiais e Métodos:** Foram manipuladas soluções de preservação de DNA: *Nucleic Acid Preservation Buffer* (NAP), *Dimethyl sulphoxide disodium-EDTA-saturated NaCl* (DESS) e *Tris-EDTA-NaCl-Tween20 buffer* (TENT) e uma solução tampão *phosphate buffered saline* (PBS). Utilizou-se também a solução comercial *Liqui-PREP* (LP). As células esfoliadas da mucosa jugal foram divididas em cinco grupos: PBS, LP, NAP, DESS e TENT. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente ou a 4°C durante os tempos: 0h, 24h, 72h, 7 dias, 30 dias, 90 dias, 180 dias e 360 dias. O DNA foi extraído através do QIAamp DNA mini Kit. A quantificação e pureza do DNA amostral foram mensuradas através do espectrofotômetro de microvolume NanoDrop e análise fluorométrica QuBit. Por último, o DNA foi analisado quanto a sua integridade pela eletroforese em gel de agarose e amplificação através das reação em cadeia da polimerase (PCR). **Resultados:** a quantidade de DNA obtida flutuou ao longo do tempo, mas em geral o PBS forneceu maiores quantidades, seguido das soluções DESS e TENT. Melhores níveis de pureza foram obtidos pela solução PBS. A solução DESS resultou em mais amostras com DNA íntegro, e o número de amostras com integridade aceitável foi maior no período até 30 dias. A amplificação por PCR para o primer IFNA foi possível para amostras armazenadas por até 7 dias. **Conclusão:** a solução DESS é a mais adequada para a obtenção de DNA a partir de amostras citológicas bucais e estas podem ser armazenadas em 4°C ou temperatura ambiente por até 7 dias.

**Palavras-chaves:** Câncer de boca, DNA, Soluções preservadoras de DNA, Citologia Oral, Análise Molecular.

## ABSTRACT

**Introduction:** The carcinogenesis process is triggered by the accumulation of genetic mutations. Therefore, the use of specific tests to identify these changes can be a valuable predictor of risk for oral cancer. DNA isolated from exfoliated buccal cells can be successfully employed for this purpose. For this reason, the use of low-cost laboratory-formulated DNA preservation solutions that guarantee the viability of the collected sample may be a contributing factor for the use of these tests in large-scale population. **Aim:** Evaluate the preservation capacity of exfoliated buccal cells DNA among different laboratory formulated preservation solutions compared to a commercial solution and a buffer solution. **Methods:** The following DNA preservation solutions were manipulated: Nucleic Acid Preservation Buffer (NAP), Dimethyl sulphoxide disodium-EDTA-saturated NaCl (DESS) and Tris-EDTA-NaCl-Tween20 buffer (TENT) and a phosphate buffered saline buffer (PBS). The commercial solution Liqui-PREP was also used. Exfoliated cells of the buccal mucosa were divided into five groups: PBS, LP, NAP, DESS and TENT. They were kept at room temperature and at 4 ° C during the times: 0h, 24h, 72h, 7 days, 30 days, 90 days, 180 days and 360 days. The DNA was extracted with the QIAamp DNA mini Kit. The quantification and purity of the DNA sample were measured using the NanoDrop microvolume spectrophotometer and Qubit fluorometric analysis. Finally, DNA was analyzed for integrity by agarose gel electrophoresis and amplification through polymerase chain reaction (PCR). **Results:** The amount of DNA obtained fluctuated over time, however, in most of the samples, PBS provided larger amounts of DNA, followed by DESS and TENT solutions. Best purity levels were obtained by the PBS solution, and within 30 days. The DESS solution resulted in more samples with intact DNA, and the number of samples with acceptable integrity was higher up to 30 days. PCR amplification for the IFNA primer was possible for samples stored for up to 7 days. **Conclusion:** DESS solution is the most suitable for obtaining DNA from oral cytological samples and these can be stored at 4 C or room temperature for up to 7 days.

**Key-words:** oral cancer, DNA, DNA preservation solutions, oral cytology, molecular analysis.

## SUMÁRIO

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA.....	9
1.1. Carcinogênese Bucal.....	9
1.2. Citopatologia.....	10
1.3. Citopatologia para Obtenção de DNA.....	12
1.4. Soluções de Preservação de DNA.....	14
1.5. Análise da Quantidade e Qualidade do DNA.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. Objetivo Geral.....	19
2.2. Objetivos Específicos.....	19
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	20
3.1. Introdução.....	21
3.2. Materiais e Métodos.....	22
3.3. Resultados.....	25
3.4. Discussão.....	31
3.5. Referências Bibliográficas.....	35
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
6. ANEXOS.....	43

## 1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

### 1.1 Carcinogênese Bucal

O câncer é uma das principais causas de morte da população mundial e projeta-se o diagnóstico anual de vinte milhões de novos casos até o ano 2025. (FERLAY et al., 2014). O câncer da cavidade oral pertence ao conjunto de tumores que acometem a região de cabeça e pescoço e o carcinoma espinocelular (CEC) de boca representa mais de 90% do total das neoplasias malignas que acometem esta região (GÜNERI; EPSTEIN, 2014; D'SOUZA; ADDEPALLI, 2018).

Em 2012, ocorreram 300.400 novos casos da doença e 145.400 mortes no mundo (TORRE et al., 2015). No Brasil, o câncer da cavidade oral é o quinto mais comum em homens e o décimo segundo mais comum em mulheres. Para o biênio 2018-2019, estimam-se 11.200 novos casos da doença em homens e 3.500 casos em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 10,86 casos novos a cada 100 mil homens e 3,28 a cada 100 mil mulheres. (INCA, 2018).

Os fatores etiológicos associados a essa patologia podem ser intrínsecos - condições sistêmicas e hereditariedade - ou extrínsecos - exposição ao tabaco, ao álcool e à radiação ultravioleta (no caso específico do câncer de lábio inferior). Diversos estudos mostram que o câncer bucal surge como resultado do acúmulo de eventos mutagênicos, decorrentes principalmente do efeito sinérgico ou independente do consumo de tabaco e álcool (DHULL et al, 2018; LA VECCHIA et al., 1997).

Ao fumo tem sido atribuído um papel principal, uma vez que suas toxinas atuam como agentes iniciadores, provocando mutações nos genes que regulam os fenômenos de proliferação e morte celular. Ainda que a exposição ao fumo associada ao álcool tenha mostrado efeito multiplicador, o papel do álcool como agente isolado ainda não é claro (OGDEN, WIGHT, 1998; OGDEN, WIGHT, RICE, 1999). O consumo de álcool é um dos fatores de risco para o desenvolvimento do câncer bucal; entretanto, os mecanismos envolvidos no dano gerado pelo álcool são parcialmente compreendidos. Determinadas concentrações de álcool causam aumento da permeabilidade da

mucosa bucal, potencializando a penetração de carcinógenos. Além disso, o álcool é responsável por um aumento na proliferação epitelial, bem como pela modificação do seu processo de maturação. Outras alterações, como redução da capacidade de reparo de DNA, distúrbios do sistema imune e do estado nutricional podem contribuir na sua relação com o desenvolvimento do câncer bucal (CARRARD et al., 2008).

Apesar dos grandes esforços realizados no sentido de prevenir e buscar novos protocolos de tratamento para o CEC bucal, o prognóstico desta doença pouco tem se modificado nas últimas décadas tendo taxas de sobrevida que variam em torno de 50% em cinco anos (ARGIRIS et al., 2008; WARNAKULASURIYA, 2009). Um dos fatores importantes para tal desfecho é o diagnóstico tardio (GÜNERI; EPSTEIN, 2014).

Quando as lesões são detectadas nos estágios iniciais da doença, as taxas de sobrevida são de aproximadamente 80 a 90% (GÜNERI; EPSTEIN, 2014). Portanto, um dos grandes objetivos é concentrar-se em medidas preventivas para que a mortalidade por câncer de boca seja reduzida. Nesse sentido, métodos de diagnóstico precoce são necessários e a análise de marcadores genéticos através da citologia esfoliativa pode contribuir para os resultados relacionados à agressividade e prognóstico desta doença (VOKAČ et al., 2014).

## **1.2 Citopatologia**

A citologia é um método diagnóstico não invasivo baseado na análise de células esfoliadas, o qual é amplamente empregado no controle do câncer ginecológico (KAZANOWSKA; HAION; RADWAN-OCZKO, 2014). Entretanto, para o diagnóstico do câncer bucal, a citologia ainda não está bem estabelecida. Antigamente, pelo seu baixo índice de acurácia em razão dos altos índices de exames falso-positivos e falso-negativos esse exame foi deixado de lado pela odontologia (BÁNÓCZY, 1976).

Objetivando aumentar a acurácia deste método diagnóstico, foram estabelecidas técnicas de análise do raspado citológico como a quantificação dos diferentes tipos celulares encontrados, sendo elas: células basais, parabasais, intermediárias, superficiais e inflamatórias. Burzlaff et al. (2007) observaram padrões de descamação celular da mucosa bucal alterados em

indivíduos expostos à carcinógenos ou com leucoplasias e carcinoma espinocelular. Foram encontradas em maior proporção as células parabasais e intermediárias nos grupos com lesões e em menor proporção as células superficiais nos indivíduos fumantes e alcoolistas se comparados com o grupo controle.

Dentre as alterações celulares que ocorrem durante o processo da carcinogênese, o aumento da relação núcleo/citoplasma é bastante evidente e pode ser observado antes dos primeiros sinais clínicos. Nesse contexto, outra análise que pode ser realizada através da coloração de Papanicolau é a citomorfometria, na qual se quantifica a relação núcleo citoplasma das células encontradas no raspado citológico. (OGDEN; COWPE; GREEN, 1990; KHOT et al., 2015). Estudos utilizando esta técnica observaram um aumento da relação núcleo/citoplasma em indivíduos fumantes quando comparados a indivíduos não fumantes (NIVIA et al., 2015; KHOT et al., 2015). Além disso, a literatura também mostrou um aumento significativo do diâmetro nuclear e uma diminuição significativa do diâmetro citoplasmático do raspado citológico de indivíduos fumantes se comparados ao de não fumantes (NADAF et al., 2014).

A análise de AgNORs é outra técnica quantitativa que pode ser empregada na análise citológica. As Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs) são sequências de DNA que codificam o RNA ribossômico. Quando essas regiões são ativamente transcritas, elas se associam a proteínas que têm afinidade pela prata e aparecem como pontos pretos dentro do núcleo, sendo então chamadas de AgNORs. A maior expressão de AgNORs no núcleo celular é sinal de maior atividade proliferativa, conseqüentemente, maior a necessidade de produção de ribossomos para as células-filhas. Portanto, esta técnica informa a velocidade do ciclo celular e não apenas a fração de crescimento (QUINN; WRIGHT, 1990; DERENZINI et al., 2000). Gedoz et al. (2007) realizaram um estudo longitudinal que comprovou o aumento progressivo da velocidade de proliferação celular em mucosa bucal de pacientes fumantes. Ao mesmo tempo, demonstraram que o monitoramento citopatológico pode ser feito, mas o valor preditivo individual deve ser levado em conta.

Apesar dos avanços na pesquisa empregando citopatologia como ferramenta de monitoramento e de diagnóstico de risco existe ainda a necessidade de utilização de testes mais precisos para verificar o potencial de malignização de forma individual (REIBEL, 2003). A detecção de alterações genéticas pode ser um poderoso preditor de risco para o desenvolvimento do câncer bucal. Como resultado, seria possível identificar com mais precisão quais os pacientes devem ser acompanhados com maior frequência (ROSIN et al., 2000).

### **1.3 Citopatologia para Obtenção de DNA**

O uso de amostra sanguínea é recorrente na área da genética molecular sendo uma excelente fonte de DNA genômico. No entanto, esse método de coleta é menos aceito pelos pacientes e mais difícil de ser implementado em estudos epidemiológicos por fatores econômicos ou logísticos. Nesse contexto, a utilização de células epiteliais esfoliadas da mucosa bucal passou a ser uma alternativa importante, tendo em vista que também funciona como uma fonte promissora de DNA e podem apresentar mutações não visualizadas no sangue. Estas células podem ser obtidas de maneira não invasiva, indolor e de forma rápida. Além disso, trazem uma fácil aceitação dos indivíduos, os quais também podem praticar a auto-coleta (GARCÍA-CLOSAS et al., 2001; HUANG et al., 1999).

O procedimento de coleta das células epiteliais bucais pode ser feito de duas maneiras: a seco ou com líquidos enxaguatórios. O método a seco utiliza escovas citológicas ou *swabs* de algodão. Este é um método simples, econômico e a literatura mostrou uma menor sensibilidade das amostras ao efeito do armazenamento em longo prazo. Além disso, ambos os tipos de instrumentos de coleta a seco trouxeram quantidades de DNA similares. Em contrapartida, a utilização de enxaguatórios bucais, requer mais etapas de processamento das amostras e possui um custo mais elevado (KING et al., 2002).

Independentemente do protocolo de coleta, o DNA isolado de células bucais pode ser usado com sucesso para realizar ensaios baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR). Huang e colaboradores (2002) utilizaram o

raspado de células epiteliais da mucosa bucal para investigação do gene p53 por meio de PCR, uma das alterações genéticas mais frequentes nos cânceres humanos e também no câncer de boca. Sabe-se que durante a carcinogênese e malignização há a ativação de pró-oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor, como p53. Através das células coletadas nos raspados bucais, eles observaram que a inativação do gene p53 está envolvida na progressão do câncer de boca. Porém, tendo em vista o grande número de mutações que possa ocorrer, a detecção de mutações pontuais em p53 como específica para CEC oral não parece ter grande utilidade (PÉREZ-SAYÁNSM et al., 2010).

Alves et al. (2017) avaliou o efeito do tabagismo crônico na expressão dos genes de MLH1, MSH2 e ATM na mucosa oral de pacientes fumantes crônicos sem alterações clínicas na mucosa, assim como em pacientes nunca fumantes. Eles puderam concluir que a expressão destes genes na mucosa oral normal de fumantes crônicos foi reduzida. Os genes MLH1 e MSH2 estão envolvidos no reparo de erros no emparelhamento de bases de DNA e a perda de suas respectivas proteínas devido à hipermetilação foi descrita em CEC oral e é relatada como um dos primeiros eventos de progressão tumoral (GONZÁLEZ-RAMIREZ et al. 2011; SENGUPTA et al. 2007). O gene ATM é supressor de tumor e pertence ao grupo de genes de reparo de DNA. A hipermetilação do gene ATM foi observada em um número significativo de CEC de cabeça e pescoço, nos quais os casos que exibem expressão reduzida ou ausente foram mais agressivos (Al et al., 2004).

Outra abordagem da citologia oral é a técnica de Hibridização in situ (FISH), a qual utiliza sondas de DNA marcadas com fluorescência para detectar anomalias cromossômicas. Vokač et al. (2014) utilizaram desta técnica para avaliar se TERC e SOX2 - genes relacionados ao desenvolvimento de CEC oral - são marcadores apropriados para detecção precoce de carcinoma espinocelular oral. Eles viram que as amplificações destes genes são comuns em todos os carcinomas de células escamosas e sua visualização nos estágios iniciais pode ser crucial para a detecção precoce e prognóstico mais preciso desta doença.

Os avanços da pesquisa na área da genética molecular proporcionaram o melhor entendimento da patogênese de diversas doenças humanas e, conseqüentemente, trazem grande aplicação clínica (KÜCHLER et al., 2012). A análise molecular pode ser a técnica chave para o diagnóstico e tratamento do câncer de boca. A mesma traz a possibilidade de um diagnóstico precoce, identificação de alterações antes que elas se tornem clinicamente visíveis e avaliação de respostas aos diferentes tratamentos (PÉREZ-SAYÁNSM et al., 2010).

Para viabilidade da análise do DNA proveniente do raspado de células da mucosa oral, o mesmo deve ser isolado logo após a coleta, criopreservado ou mantido em meios de preservação. O DNA degrada com o aumento do tempo e temperatura (LUDES et al. 1993) Por isso, existe no mercado cartões e soluções de preservação do DNA. Entretanto, nem sempre se tem acesso imediato aos equipamentos necessários e aos meios de preservação comercializados, os quais possuem um alto custo, o que pode inviabilizar a sua utilização em estudos epidemiológicos (GREEN et al., 2019; REEVE et al., 2018). Nesse sentido, a utilização de soluções de preservação de DNA formuladas em laboratório, a um baixo custo e que garantam a viabilidade do material coletado, é uma alternativa promissora nesta área.

#### **1.4 Soluções de Preservação de DNA**

Existem formulações ou kits comerciais de armazenamento e preservação de DNA por longo tempo. O *SalivaGard DNA* (Biométrica, San Diego – Estados Unidos) utiliza a saliva como fonte de DNA e preserva seu material por até 9 meses em temperatura ambiente. *DNAgenotek kits* (Ottawa – Canadá) também utilizam a saliva como fonte de DNA, mas garante a preservação durante anos em temperatura ambiente. *DNAgard Tissue* (Biométrica, San Diego – Estados Unidos) protege o DNA de tecidos, células e material de biópsia por até 6 meses em temperatura ambiente. *Isohelix DNA Buccal Swabs* (Isohelix, Harriestsham – Inglaterra) possui um swab e um tubo coletor com solução de armazenamento, que mantém o DNA por até 3 anos. Porém, esses produtos são vendidos por um alto custo no mercado, tornando-

se difícil a utilização dos mesmos na área da pesquisa ou na aplicabilidade clínica de rotina.

A ciência forense vem estudando soluções não comerciais que sejam capazes de preservar DNA. Situações como em desastres naturais em climas tropicais exigem que as amostras sejam processadas rapidamente, à medida que a degradação dos corpos é acelerada e a análise do DNA deve ser o mais fácil e eficiente possível (ALLEN-HALL; MCNEVIN, 2012). Os principais objetivos destas soluções são evitar ou eliminar a atividade enzimática (nucleases) que leve ao dano e degradação de ácidos nucleicos e evitar a degradação oxidativa, assim preservando o DNA (NAGY, 2010).

Existem compostos usualmente utilizados nessas soluções de preservação. Há séculos, o cloreto de sódio (NaCl) é utilizado como um conservante. Na sua forma sólida, desidrata a amostra, inativando nucleases e retardando o crescimento microbiano e na forma líquida, desnatura proteínas e também inativa nucleases. Outros dessecantes, como a sílica, têm efeito semelhante. O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) é um agente quelante capaz de se ligar a íons metálicos, que são necessários para as nucleases desempenharem suas funções, as quais são, conseqüentemente, paralisadas ou retardadas. Detergentes como o Tween 20 também é utilizado com o objetivo de lise celular e inativação de proteínas. O dimetilsulfóxido (DMSO) é outro composto frequentemente encontrado, mas seu papel não é preservar diretamente o DNA. Em razão de ser conhecido na indústria química pela promoção da absorção dérmica de produtos com os quais é misturado, sua função na solução de preservação é aumentar a absorção dos outros conservantes. O etanol remove a água das amostras, desnatura proteínas e nucleases e serve como um agente antimicrobiano. Além desses compostos, o uso de reagentes com o objetivo de tamponamento do pH da solução é muito importante para a estabilidade do DNA e diminuição da sua taxa de depuração (NAGY, 2010; ALLEN-HALL; MCNEVIN, 2012).

Allen-hall e Mcnevin (2012) examinaram oito conservantes de tecidos, sendo três disponíveis comercialmente (*RNAlater*, *DNA Genotek Tissue Stabilising Kit* and *DNAgard*) e cinco não comercializadas (sal, DMSO, etanol,

etanol com EDTA e Tris-EDTANaCl-Tween20 - TENT *buffer*). Foram comparadas a quantidade e a qualidade do DNA extraído diretamente do tecido e da solução conservadora na qual o tecido estava imerso, sendo as amostras mantidas a 35°C por até 28 dias. A solução de DMSO foi capaz de produzir perfis completos do DNA estudado tanto diretamente do tecido quanto da solução conservadora.

Se o ato de preservação do tecido também liberasse o DNA em solução, deixando-o pronto para reação em cadeia da polimerase (PCR), o processo poderia ser mais simplificado. Sorensen et al. (2015), explorou essa possibilidade, adicionando soluções conservadoras de DNA em torno de amostras de músculo humano fresco e em decomposição. Eles formularam as soluções DMSO e TENT *buffer* e as compararam com soluções já comercializadas (DNAgard - Biomatrix® - e DNA Genotek). Foi possível obter perfis de DNA do músculo fresco e decomposto preservado a 35 ° C por até 28 dias para todos os quatro conservantes.

Camacho-Sanchez et al. (2013) compararam diferentes soluções de preservação apropriadas para amostragem em campo e as testaram em sangue e tecidos de rato. Eles compararam, para preservação de DNA, uma solução formulada em laboratório e não comercializada chamada *Nucleic Acid Preservation* (NAP *buffer*) com etanol 95% e tampão Longmire. O NAP *buffer* obteve um desempenho um pouco melhor, mas o DNA de alto peso molecular foi preservado em todas as condições. Ou seja, eles puderam concluir que quando a criopreservação é impossível, o NAP *buffer* é uma alternativa econômica para preservação do DNA por pelo menos 10 meses. Menke et al. (2017) também avaliou NAP *buffer*. Porém, para a investigação de microbiomas gastrointestinais da vida selvagem por sequenciamento de nova geração. Eles comparam as fezes de ovelhas que foram mantidas por 10 dias em NAP *buffer* e soluções já comercializadas e, no geral, NAP tinha melhores qualidades de preservação, tornando esse *buffer* uma solução valiosa em estudos de microbiomas da vida selvagem.

Diante disto, podemos observar que soluções de preservação formuladas em laboratório são tão eficazes quanto os kits comerciais de

preservação de DNA. No entanto, nenhuma dessas soluções foi testada em relação a preservação do DNA de amostras citológicas de raspado bucal.

### **1.5 Análises da Quantidade e Qualidade do DNA**

A análise genética parte do princípio que as moléculas de DNA de um tecido podem ser extraídas de maneira simples através do uso de enzimas e solventes orgânicos. Estes irão permitir a segmentação do DNA dos outros constituintes celulares, sendo possível seu isolamento pelo processo de centrifugação (PINHO, 2005).

Para a avaliação da quantidade e pureza do DNA genômico obtido, geralmente, a técnica da espectrofotometria é muito utilizada. O espectrofotômetro realiza a leitura da absorbância da amostra em vários comprimentos de onda diferentes para avaliar a concentração e a pureza dos ácidos nucleicos. O comprimento de onda na faixa de 260 nanômetros é quantitativo para preparação de ácidos nucleicos. Já as proteínas mostram uma leitura de absorbância na faixa de 280 nanômetros. Por esse motivo, a razão entre o comprimento de onda de DNA e proteínas (260nm/280nm) indica a pureza do ácido nucleico da amostra extraída (GALLANGHER, 2017).

O espectrofotômetro NanoDrop é um sistema de retenção de amostras de microvolume que as analisa com alta precisão e reprodutibilidade. Este sistema funciona pela combinação da tensão superficial da amostra que é posicionada entre duas fibras óticas, permitindo a análise de pequenos volumes e em altas concentrações, dispensando diluições. O total do tempo de um ciclo de medição é extremamente curto e a preparação para a leitura da próxima amostra requer apenas a limpeza das superfícies óticas. Ou seja, este sistema é muito viável para todas as medidas espectrofotométricas (DESJARDINS; CONKLIN, 2010; BRZOBOHATÁ et al., 2017).

Com os avanços nessa área experimental, surgiu também a análise fluorescente de amostras de ácidos nucleicos. Esta tecnologia também utiliza do mesmo sistema de retenção de amostras, permitindo medições fluorescentes com apenas 2 µL de material. O aparelho fluorômetro Qubit mede

a fluorescência de corantes específicos para o alvo de interesse. Ou seja, mesmo em baixas concentrações, esses corantes quando ligados às moléculas alvo (DNA, RNA ou proteína) emitem fluorescência que é quantificada pelo aparelho. Este método é mais sensível que a espectrofotometria, tendo em vista que a absorbância em 260 nanômetros pode ser lida por outras macromoléculas e a precisão para medição em baixas concentrações de DNA e RNA é menor (BRZOBOHATÁ et al., 2017).

Dentre as etapas de análise do material genético, é fundamental a amplificação do volume do DNA extraído. Através dessa técnica, é possível a amplificação de sequências de segmentos do DNA previamente determinado, possibilitando seu estudo de diversas formas de acordo com a informação requerida. Nesse contexto, é necessário o conhecimento da sequência de nucleotídeos que compõem o segmento de DNA a ser estudado, sendo importante também saber qual cromossomo está contida e sua localização dentro dele. Isto pode ser feito através do sequenciamento genético, o qual é realizado por aparelhos sequenciadores, os quais estão disponíveis em poucos laboratórios e por um alto custo. Porém, pode ser feito através de uma técnica bastante convencional chamada eletroforese (PINHO, 2005).

Para que a amplificação ocorra adequadamente é importante que o DNA extraído esteja íntegro. A eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida tem o objetivo de separar moléculas através de géis com diferentes níveis de porosidade. A migração das partículas acontece quando colocada uma diferença de potencial. As moléculas serão separadas de acordo com o seu tamanho, sendo que as maiores migrarão menos. Se o DNA submetido à eletroforese estiver fragmentado, inúmeras bandas serão visualizadas ao invés de uma única e íntegra banda (PINHO, 2005).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar a preservação do DNA de células bucais esfoliadas mantidas em soluções de preservação formuladas em laboratório em comparação com uma solução comercial e uma solução tampão.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Comparar a concentração e pureza do DNA extraído e mantido previamente em soluções de preservação formuladas em laboratório com uma solução comercial e uma solução tampão;
- Avaliar a capacidade de preservação do DNA mantido nas diferentes soluções em diferentes tempos experimentais ao longo de um ano;
- Avaliar e comparar a capacidade de preservação do DNA mantido nas diferentes soluções sob duas condições de temperatura: temperatura ambiente e a 4° Celsius (C);
- Comparar a integridade e a capacidade de amplificação do primer IFNA entre o DNA extraído e mantido previamente em soluções de preservação formuladas em laboratório com uma solução comercial e uma solução tampão.

### 3. ARTIGO CIENTÍFICO

#### **Título: COMPARAÇÃO DE DIFERENTES SOLUÇÕES PARA PRESERVAÇÃO DO DNA DE AMOSTRAS CITOLÓGICAS BUCAIS**

Periódico: Experimental and Molecular Pathology

Qualis A2; Fator de Impacto: 2.350

Autores: Júlia Silveira Nunes<sup>1</sup>, Luisa Pimentel Vera<sup>2</sup>, Bianca de Bem Prunes<sup>1</sup>, Pantelis Varvaki Rados<sup>1</sup>, Fernanda Visioli<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Patologia Bucal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Centro de Terapia Gênica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brasil.

#### **Resumo**

**Introdução:** o uso de testes mais específicos, que identifiquem alterações gênicas relacionadas ao câncer de boca pode ser um valioso preditor de risco para a doença. Para o desempenho desses testes em grande escala populacional, as células esfoliadas da mucosa bucal funcionam como uma fonte conveniente de DNA e o material coletado precisa estar viável para sua análise. **Objetivo:** Avaliar a preservação do DNA de células bucais esfoliadas mantidas em soluções de preservação formuladas em laboratório em comparação com uma solução comercial e uma solução tampão. **Materiais e métodos:** foram manipuladas soluções de preservação de DNA: *Nucleic Acid Preservation Buffer* (NAP), *Dimethyl sulphoxide disodium-EDTA-saturated NaCl* (DESS) e *Tris-EDTA-NaCl-Tween20 buffer* (TENT) e uma solução tampão *phosphate buffered saline* (PBS). Também foi utilizada a solução comercial Liqui-PREP (LP). As células esfoliadas da mucosa jugal foram divididas em cinco grupos: PBS, LP, NAP, DESS e TENT. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente ou a 4°C durante os tempos: imediato, 24h, 72h, 7 dias, 30 dias, 90 dias, 180 dias e 360 dias. O DNA foi extraído e foi analisado em relação a sua concentração, pureza integridade e capacidade de amplificação do primer IFNA. **Resultados:** a quantidade de DNA obtida flutuou ao longo do tempo, mas em geral o PBS forneceu maiores quantidades, seguido das soluções DESS e TENT. Melhores níveis de pureza foram obtidos pela solução PBS. A solução DESS resultou em amostras com DNA íntegro, e o número de amostras com integridade aceitável foi maior no período até 30 dias. A amplificação por PCR para o primer IFNA foi possível para amostras armazenadas por até 7 dias. **Conclusão:** a solução DESS é a mais adequada para a obtenção de DNA a partir de amostras citológicas bucais e estas podem ser armazenadas em 4°C ou temperatura ambiente por até 7 dias.

**Palavras-chave:** Câncer de boca, DNA, Soluções preservadoras de DNA, Citologia Oral, Análise Molecular.

### 3.1. Introdução

O carcinoma espinocelular (CEC) de boca representa mais de 90% das neoplasias malignas da cavidade oral (1,2). Em 2012, ocorreram 300.400 novos casos da doença e 145.400 mortes no mundo, mostrando uma maior incidência em homens do que em mulheres (3). Infelizmente, suas taxas de sobrevivência pouco se alteraram nas últimas décadas, sendo de 50% em cinco anos (4,5). Uma das justificativas para tal fato é o diagnóstico tardio. Uma vez que detectado nos estágios iniciais da doença, as taxas de sobrevivência aumentam para, aproximadamente, 80% a 90% (1).

Nesse sentido, novos métodos de diagnóstico precoce ou rastreamento são necessários e a utilização de células epiteliais esfoliadas da mucosa bucal passou a ser uma alternativa importante, tendo em vista que também funciona como uma fonte promissora de DNA. Estas células podem ser obtidas de maneira não invasiva, indolor e de forma rápida. Além disso, trazem uma fácil aceitação dos indivíduos, sendo um método de fácil aplicação na prática clínica de rotina (6,7).

O procedimento de coleta das células epiteliais bucais pode ser feito de duas maneiras: a seco ou com líquidos enxaguatórios. O método a seco utiliza escovas citológicas ou *swabs* de algodão. Este é um método simples, econômico e a literatura mostrou uma menor sensibilidade das amostras ao efeito do armazenamento em longo prazo. Além disso, ambos os tipos de instrumentos de coleta a seco trouxeram quantidades de DNA similares (8)

O DNA advindo de células epiteliais esfoliadas da mucosa bucal pode ser usado com sucesso para realização de ensaios baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) (6,7). Através da coleta citológica bucal já foi possível observar que a inativação do gene p53 (gene supressor de tumor) está envolvida na progressão do câncer de boca (7). Além disso, que o tabagismo crônico diminui a expressão de genes de reparo de DNA (MLH1, MSH2 e ATM) (9).

Nessa perspectiva, a análise molecular pode ser a técnica chave para o diagnóstico precoce e tratamento do câncer de boca (10). Entretanto, o DNA degrada com o aumento do tempo e da temperatura e para a sua viabilidade, o mesmo deve ser isolado logo após a coleta, criopreservado ou mantido em meios de preservação (11). Porém, em diversas situações não há a possibilidade imediata de acesso aos equipamentos necessários e os cartões e soluções de preservação comercializados possuem um alto custo de mercado, o que pode inviabilizar a sua utilização em estudos epidemiológicos ou em grande escala populacional (12, 13). Nesse sentido, a utilização de soluções de preservação de DNA formuladas em laboratório, a um baixo custo e que garantam a viabilidade do material coletado, é uma alternativa promissora nesta área.

Diante disso, este estudo tem como objetivo comparar a capacidade de preservação do DNA proveniente de células bucais esfoliadas, mantidas sob diferentes tempos e temperaturas, de soluções de preservação formuladas em laboratório em comparação com uma solução comercial e uma solução tampão.

### **3.2. Materiais e Métodos**

Este trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e pelo comitê de ética em pesquisa para seres humanos (n° 3.389.711). O seu conjunto de experimentos foi realizado no Núcleo de Pesquisa Básica em Odontologia, localizado na Faculdade de Odontologia da UFRGS e na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

#### **Soluções de Preservação**

Foram manipuladas três diferentes soluções de preservação de DNA, sendo elas: *Nucleic Acid Preservation Buffer* (NAP Buffer), *Dimethyl sulphoxide disodium-EDTA-saturated NaCl* (DESS) e *Tris-EDTA-NaCl-Tween20 buffer* (TENT buffer). A solução NAP Buffer consistiu de EDTA dissódico dihidratado 0.019M (Dinâmica Química Contemporânea, Indaiatuba, Brasil– 91001), citrato

de sódio dihidratado 0.018M (Dinâmica Química Contemporânea – 95602), sulfato de amônio 3.8M (Dinâmica Química Contemporânea – 83521) e ácido sulfúrico (NEON, Suzano, Brasil – 40670) para ajuste do pH 5.2 (Camacho-Sanchez, 2013). A solução DESS foi composta por 0.25M de EDTA dissódico (Dinâmica Química Contemporânea – 91001), 20% de DMSO (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemanha – RNBD3327) e cloreto de sódio para saturação (Sigma Aldrich – SLBR9752V) (Allen-Hall; McNevin, 2012; Sorensen et al., 2015). Por último, a solução TENT Buffer consistiu de 10 mM de Trizma base (Sigma-Aldrich – SLBLO891V), 10 mM de EDTA (Dinâmica Química Contemporânea – 91001), 100 mM de cloreto de sódio (Sigma Aldrich – SLBR9752V) e 2% de Tween 20 (Dako, Santa Clara, Estados Unidos – 10078013) (Allen-Hall; McNevin, 2012; Sorensen et al., 2015). Além destas, também foi manipulada a solução tamponada fosfato salina (PBS – LB LABORCLIN – 50603010). Todas foram filtradas, aliquotadas e mantidas em temperatura ambiente.

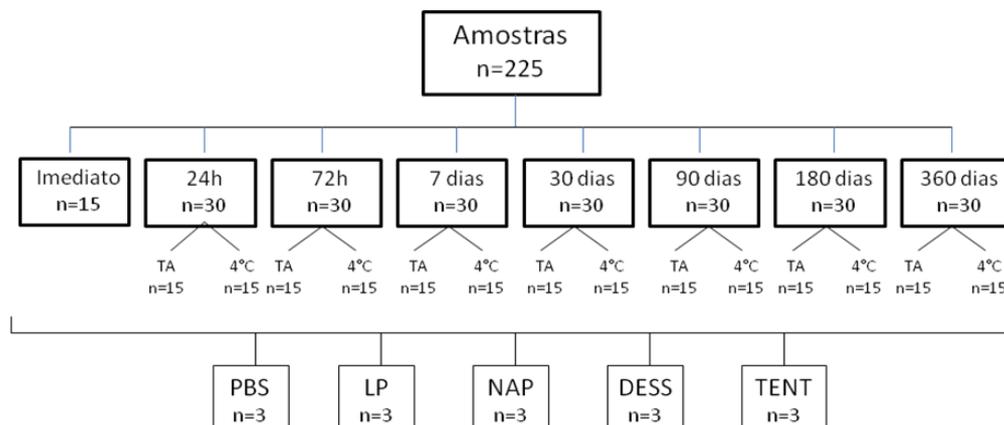
A solução LiquiPREP™ ( LGM International, Inc, Melbourne, Estados Unidos) (P0702216V), a qual é comercializada para o desempenho de citologia líquida, também foi utilizada tendo em vista que, segundo o fabricante, ela é capaz de preservar DNA.

### **Coleta das Amostras Citológicas**

Com o auxílio de escovas citológicas, as coletas de células esfoliadas da mucosa jugal foram realizadas, sendo desempenhadas 15 coletas a cada 7 dias até completar o total de 225 coletas. A mucosa jugal do lado esquerdo e direito era intercalada, sendo realizado 10 giros com a escova citológica por vez. As células coletadas eram soltas por 30 segundos contra a parede de um tubo do tipo eppendorff contendo uma das soluções. Prévio às coletas, o voluntário realizou bochecho com água por 1 minuto e o mesmo examinador (JSN) realizou todas as coletas. O voluntário consentiu com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido apresentado (Anexo 1).

As amostras foram divididas em cinco grupos de acordo com as diferentes soluções, sendo eles: PBS, LP, NAP Buffer, DESS e TENT Buffer. Os mesmos foram mantidos em duas condições de temperatura - temperatura ambiente (TA) e 4° Celsius (C) - durante oito diferentes tempos prévios à extração de

DNA, sendo eles: imediato, 24 horas (h), 72h, 7 dias (d), 30d, 90d, 180d e 360d. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (Figura 1).



**Figura 1.** Fluxograma mostrando as condições de armazenamento das amostras. TA: temperatura ambiente; PBS: solução tamponado fosfato salina; LP: Liquei-Prep; NAP: *Nucleic Acid Preservation Buffer*; DESS: *Dimethyl sulphoxide disodium-EDTA-saturated NaCl*; TENT: *Tris-EDTA-NaCl-Tween20 buffer*.

### Extração do DNA

Ao completar os devidos tempos, a extração do DNA foi realizada com o kit QIAamp DNA mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), de acordo com as instruções do fabricante para extração de amostras citológicas de raspado bucal. No final, cada amostra apresentava um volume de 150µl de solução contendo o DNA.

### Quantificação e Pureza do DNA

A pureza do DNA amostral foi mensurada através do espectrofotômetro de microvolume NanoDrop (Thermo Scientific). A razão entre os picos 260nm/280nm indicou a pureza do DNA amostral, sendo considerado puro um valor entre 1.8 e 2.0. Para isso, 1,5µl do DNA amostral foi dispensado no pedestal do aparelho e a leitura foi realizada. A quantificação do DNA foi mensurada através do aparelho de quantificação fluorométrica Qubit 2.0 (Thermo Scientific). Para a realização desta, foi utilizado o *Qubit DNA Assay Kit* (Thermo Scientific) conforme as instruções do fabricante, sendo adicionado 10µl de DNA amostral para cada leitura.

### Análise da integridade do DNA

A análise da integridade do DNA amostral foi verificada por eletroforese em gel de agarose, sendo realizado um gel de agarose a 1%. Para isso, o pó

de agarose (KASVI) foi pesado e diluído em TBE 1x (KASVI) e misturado com SybrSafe (Thermo Scientific). Em uma cuba horizontal, o gel foi disposto e em cada poço foi pipetado 50ng de DNA misturado ao brometo de etídeo 6x concentrado. Foi realizada a corrida a 80v, 300mA por 40 minutos e, ao final, o gel foi visualizado e fotografado. As amostras que continham concentrações menores que 187,5ng/150µl não puderam ser adicionados ao ensaio por baixa concentração.

### **Amplificação por PCR**

A reação de PCR foi realizada num volume total de 20µL contendo 10ng de DNA, primer IFNA (R: GTAAGGTGGAAACCCCACT; F:FAMTCGGCGTTAAGTTAATTFGTT), solução tampão, oligonucleotídeos, enzima Taq DNA Polimerase e 14,3µl de água ultrapura. Apenas uma das amostras de cada triplicata foi selecionada para desempenhar o ensaio. Para isso, foram selecionadas as amostras com concentração mais alta e melhores valores de pureza. Foi padronizada a concentração de 10ng/µl de DNA para a reação e, por este motivo, soluções com valores inferiores a 110ng/150µl foram excluídas do ensaio. A amplificação do primer consistiu em 30 a 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento em 55°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos. Em seguida foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 2%, com os mesmos padrões descritos acima. Porém, foi adicionado um ladder em cada gel para verificação de amplificação de banda na altura de 150bp.

### **Análise Estatística**

Os dados do presente estudo foram computados no Programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) e a normalidade da distribuição dos dados obtidos nos diferentes desfechos foi testada pela análise de histogramas e pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os valores da concentração do DNA foram avaliados por média e desvio padrão, e os grupos comparados pelo teste ANOVA seguido do teste *Post Hoc* de Tukey. Os dados qualitativos referentes à pureza, amplificação do primer IFNA e da fragmentação de DNA foram analisados de forma descritiva.

### **3.3. Resultados**

A tabela 1 mostra as médias de concentração de DNA em 150 $\mu$ L de amostra. As soluções PBS, DESS e TENT mostraram uma flutuação dos valores de concentração de DNA nas diferentes temperaturas ao longo de um ano. Porém, para a solução TENT essa diferença não foi estatisticamente significativa. Para solução LP, a manutenção em 4°C foi importante, mas com o passar do tempo, as concentrações foram diminuindo constantemente ( $p < 0,05$ ). Para solução NAP, em ambas as temperaturas, as concentrações foram inferiores às médias das outras soluções. Porém, em TA nos tempos 72h, 7d e 30d houve um aumento de concentração se comparados aos outros tempos ( $p < 0,05$ ). De maneira geral, as maiores quantidades de DNA foram obtidas através da solução PBS, tanto em temperatura ambiente quanto em 4°C. Nos tempos inferiores a 30 dias, em 4°C não houve diferença estatisticamente significativa entre as soluções e em TA o PBS mostrou maiores quantidades nos tempos 24 e 72 horas ( $p < 0,05$ ). Em 30 dias de preservação, a solução DESS mostrou valores consideráveis de concentração de DNA, sendo estatisticamente superiores às outras soluções em 4°C e em TA ( $p < 0,05$ ).

Em relação a pureza das amostras a tabela 2 mostra, de maneira geral, os melhores níveis de pureza dentro de até 30 dias. A solução PBS apresentou melhores resultados em relação às outras soluções, independentemente da temperatura. Os piores valores de pureza foram observados para as soluções NAP e TENT. A solução LP mostrou-se sensível em relação à temperatura, pois apresentou melhor pureza quando mantida a 4°C.

**Tabela 1.** Concentração total de DNA (ng) obtida nos diferentes tempos nas duas condições de temperatura– média ± DP (n=3).

	Solução	Imediato	24h	72h	7d	30d	90d	180d	360d	P
TA	PBS	267(±148,5)	249(±55,5)a	852(±183)a	508,5(±339)	348(±210)a,c	466,5(±262,5)a	363(±75)a	930(±523,5)a	=0,05
	LP	318(±129)A	63(±10,5)b;B	63(±16,5)b;B	54(±22,5)B	30(±27)a,b;B	1,5(±0,51)b,c;B	0,075(±0,00)b;B	0,79(±1,24)b;B	< 0.0001
	NAP	96(±33)A,C,D,E	49,5(±10,5)b;A,C,D,E	271,5(±31,5)b;B,D	258(±91,5)D	186(±303)a,c;A,D	61,5(±24)b,c;A,C	36(±21)b;E,C	64,5(±36)b,c;A,C	< 0.0001
	DESS	231(±205,5)A,C	153(±72)a,b;A,C	411(±121,5)b;A,C	750(±337,5)A,B	555(±303)c;A,C	187,5(±73,5)a,c;A,C	135(±79,5)b;C	213(±280,5)a,c;A,C	0,02
	TENT	186(±142,5)	190,5(±105)a,b	357(±228)b	487,5(±450)	162(±40,5)a,c	127,5(±90)a,c	360(±144)a	49,5(±43,5)b,c	.>0,05
	p	.>0,05	<0,05	0,0007	.>0,05	0,03	0,01	0,0005	0,0086	
4°C	PBS	267(±148,5)A	364,5(±234)A,C	370,5(±237)A,C	228(±61,5)A,B	454,5(±120)a;A,C	708(±445,5)a;A,C	1072,5(±505,5)a;C	376,5(±93)/A,C	0,03
	LP	318(±129)A	370,5(±160,5)A,D	204(±97,5)A,B,C,D	208,5(±118,5)A,B,C,D	106,5(±18)b;B,C	75(±31,5)b;A,C	31,5(±7,5)b;C	33(±19,5)C	0,0018
	NAP	96(±33)	81(±51)	93(±45)	78(±36)	118,5(±99)b	52,5(±22,5)b	70,5(±22,5)b	82,5(±37,5)	.>0,05
	DESS	231(±205,5)	591(±462)	340,5(±174)	207(±90)	718,5(±159)a,c	135(±30)b	144(±19,5)b	334,5(±184,5)	=0,05
	TENT	186(±142,5)	349,5(±135)	415,5(±94,5)	120(±39)	397,5(±163,5)a,b	277,5(±144)a,b	106,5(±27)b	331,5(±250,5)	.>0,05
	p	.>0,05	.>0,05	.>0,05	.>0,05	0,0006	0,01	0,001	=0,05	

Letras minúsculas: diferença entre o mesmo tempo; letras maiúsculas:diferença entre a mesma solução; ANOVA, post-hoc Tukey

TA: temperatura ambiente; PBS: solução tamponado fosfato salina; LP: Liqui-Prep; NAP: *Nucleic Acid Preservation Buffer*; DESS: *Dimethyl sulphoxide disodium-EDTA-saturated NaCl*; TENT: *Tris-EDTA-NaCl-Tween20 buffer*;

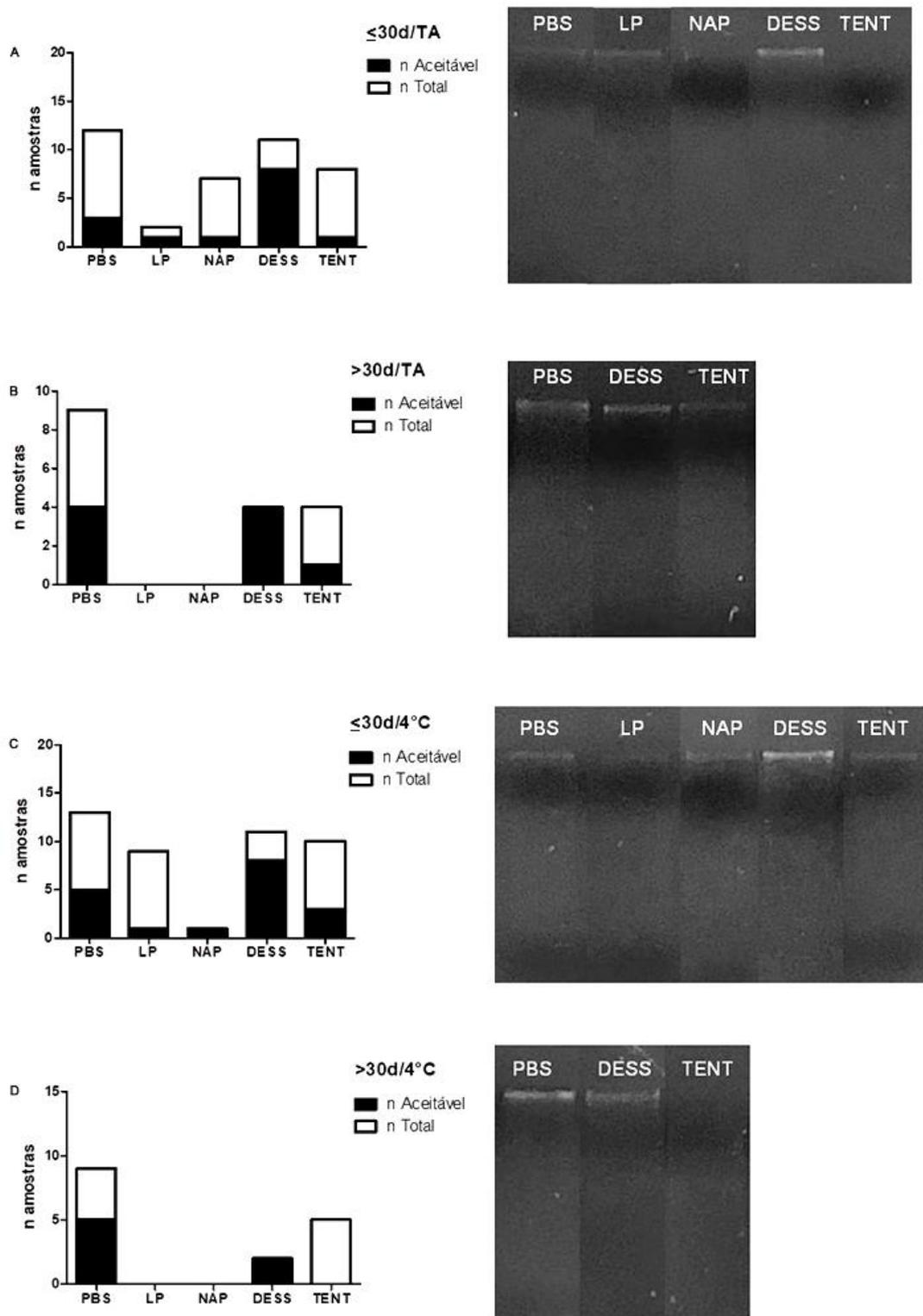
**Tabela 2.** Pureza do DNA indicada pela razão entre os picos - Média  $\pm$  DP (n=3).

	Solução	Imediato	24h	72h	7d	30d	90d	180d	360d
TA	<b>PBS</b>	2,24( $\pm$ 0,46)	2,17( $\pm$ 0,74)	2,55( $\pm$ 0,41)	2,13( $\pm$ 0,38)	1,85( $\pm$ 0,16)	1,93( $\pm$ 0,72)	1,67( $\pm$ 0,16)	1,64( $\pm$ 0,11)
	<b>LP</b>	2,09( $\pm$ 0,37)	2,23( $\pm$ 0,28)	2,61( $\pm$ 0,46)	2,21( $\pm$ 1,64)	1,82( $\pm$ 0,50)	1,79( $\pm$ 0,03)	1,57( $\pm$ 0,71)	1,42( $\pm$ 0,30)
	<b>NAP</b>	1,72( $\pm$ 0,13)	2,71( $\pm$ 0,38)	2,03( $\pm$ 0,31)	2,33( $\pm$ 0,73)	2,13( $\pm$ 0,36)	2,62( $\pm$ 0,74)	0,92( $\pm$ 0,23)	1,19( $\pm$ 0,25)
	<b>DESS</b>	2,75( $\pm$ 0,12)	2,06( $\pm$ 0,34)	2,26( $\pm$ 0,43)	2,18( $\pm$ 0,06)	2,32( $\pm$ 0,24)	2,00( $\pm$ 0,32)	1,56( $\pm$ 0,33)	1,75( $\pm$ 0,19)
	<b>TENT</b>	2,27( $\pm$ 0,47)	3,58( $\pm$ 0,60)	2,26( $\pm$ 0,50)	3,03( $\pm$ 0,87)	2,06( $\pm$ 0,24)	2,30( $\pm$ 0,46)	2,81( $\pm$ 0,82)	1,55( $\pm$ 0,50)
4°C	<b>PBS</b>	2,24( $\pm$ 0,46)	2,04( $\pm$ 0,18)	1,67( $\pm$ 0,20)	2,08( $\pm$ 0,39)	2,15( $\pm$ 0,60)	2,31( $\pm$ 0,24)	2,04( $\pm$ 0,07)	1,72( $\pm$ 0,37)
	<b>LP</b>	2,09( $\pm$ 0,37)	1,71( $\pm$ 0,31)	2,16( $\pm$ 0,41)	2,18( $\pm$ 0,50)	1,94( $\pm$ 0,37)	1,91( $\pm$ 0,03)	2,87( $\pm$ 0,68)	1,18( $\pm$ 0,65)
	<b>NAP</b>	1,72( $\pm$ 0,13)	1,95( $\pm$ 1,02)	1,57( $\pm$ 0,67)	2,45( $\pm$ 0,67)	1,57( $\pm$ 0,04)	2,20( $\pm$ 0,18)	2,50( $\pm$ 1,10)	1,13( $\pm$ 0,12)
	<b>DESS</b>	2,75( $\pm$ 0,12)	2,12( $\pm$ 0,15)	1,61( $\pm$ 0,37)	3,02( $\pm$ 0,56)	2,02( $\pm$ 0,17)	2,31( $\pm$ 0,20)	2,72( $\pm$ 0,57)	1,50( $\pm$ 0,24)
	<b>TENT</b>	2,27( $\pm$ 0,47)	1,88( $\pm$ 0,33)	2,31( $\pm$ 1,18)	2,28( $\pm$ 0,48)	1,58( $\pm$ 0,29)	2,25( $\pm$ 0,33)	2,77( $\pm$ 0,76)	1,53( $\pm$ 0,10)

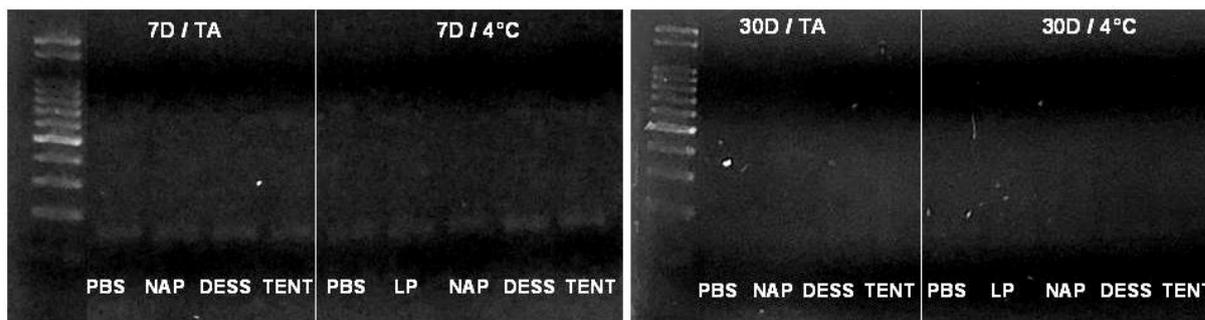
TA: temperatura ambiente; PBS: solução tamponado fosfato salina; LP: Liqui-Prep; NAP: *Nucleic Acid Preservation Buffer*; DESS: *Dimethyl sulphoxide disodium-EDTA-saturated NaCl*; TENT: *Tris-EDTA-NaCl-Tween20 buffer*;

Para a análise da integridade do DNA, as amostras que continham concentrações menores que 187,5ng/150µl não puderam ser adicionados ao ensaio devido à baixa concentração. A solução PBS obteve maior número amostras analisadas, seguida pela solução DESS, TENT, LP e NAP, respectivamente. O DNA foi considerado com integridade aceitável quando as bandas mostravam intensidade forte ou moderada e o “smear” era fraco ou inexistente. Dentre as amostras mantidas em temperatura ambiente e 4°C por tempo menor ou igual a 30 dias, a solução DESS apresentou DNA com melhor integridade se comparada às outras soluções (Figura 1 – A e C). Para a manutenção por tempo maior que 30 dias, em temperatura ambiente, a solução DESS continuou mostrando resultados melhores de integridade, mas o número de amostras analisadas foi baixo (Figura 1 – B). Para o mesmo tempo e manutenção em 4°C, a solução PBS mostrou melhores resultados se comparada às outras soluções, mas seu número de amostras com DNA íntegro foi baixo se comparado ao número de amostras analisadas para a mesma solução (Fig 1 – D). Dentre as poucas amostras analisadas para as soluções LP e NAP, a integridade do DNA era baixa (Figura 2).

As amostras mantidas nas soluções PBS, DESS e TENT por até 7 dias, tanto em TA quanto em 4°C, amplificaram o primer IFNA. Após esse período, houve perda da qualidade de amplificação. Apenas as amostras mantidas em 4°C por até 30 dias puderam ser submetidas à amplificação para o grupo LP. Após esse período, a concentração de DNA não era suficiente para desempenho da análise. As amostras do grupo LP preservadas por 72h e 7d em 4°C amplificaram o primer IFNA. Assim como este grupo, as amostras preservadas na solução NAP amplificaram o primer IFNA apenas nos tempos 72h e 7d, mas isso ocorreu tanto em 4°C quanto em TA (Figura 3).



**Figura 2.** Análise da integridade do DNA: os gráficos representam o número de amostras analisadas e integridade de DNA aceitável por solução em TA e 4°C por tempos  $\leq 30$  dias e  $>30$  dias; as imagens são representativas das bandas mostradas por cada solução em TA e 4°C por tempos  $\leq 30$  dias e  $>30$  dias. TA: temperatura ambiente; 4°C: 4° Celsius; PBS: solução tamponado fosfato salina; LP: Liqui-Prep; NAP: *Nucleic Acid Preservation Buffer*; DESS: *Dimethyl sulphoxide disodium-EDTA-saturated NaCl*; TENT: *Tris-EDTA-NaCl-Tween20 buffer*;



**Figura 3.** Qualidade de amplificação em até 7 dias e após 30 dias. TA: temperatura ambiente; 4°C: 4° Celsius; PBS: solução tamponado fosfato salina; LP: Liqui-Prep; NAP: *Nucleic Acid Preservation Buffer*; DESS: *Dimethyl sulphoxide disodium-EDTA-satured NaCl*; TENT: *Tris-EDTA-NaCl-Tween20 buffer*;

### 3.4 Discussão

A detecção do CEC nos estágios iniciais aumenta consideravelmente a sua taxa de sobrevivência e a análise molecular pode trazer grande contribuição para o diagnóstico precoce e tratamento desta doença (1,10). As células esfoliadas da mucosa bucal são uma fonte promissora de DNA e as mesmas podem ser obtidas de maneira conveniente (6,7). Porém, para sua análise, o DNA deve ser isolado imediatamente, criopreservado ou mantido em meios de preservação, já que o mesmo degrada com o aumento de tempo e temperatura (11). Tendo em vista que existem situações nas quais não há acesso aos equipamentos necessários e os cartões e soluções de preservação comercializados possuem um alto custo de mercado, esse estudo avaliou a capacidade de preservação do DNA proveniente de células esfoliadas da mucosa bucal mantidas em soluções formuladas em laboratório sob diferentes tempos e temperaturas de armazenamento.

Nedel e colaboradores avaliaram a qualidade do DNA proveniente de células bucais coletadas por raspado bucal comparando a integridade das amostras mantidas por 72h em TA e 4°C sem meio de preservação e extraídas imediatamente. Foi possível notar que o DNA apresentou degradação mesmo sendo preservado em geladeira. Por isso, a importância de um meio de preservação das amostras coletadas (14).

A solução PBS é uma solução tampão, fosfato salina, de baixo custo a qual pode ser utilizada na coleta das células do raspado bucal, tendo em vista que não é tóxica às mesmas. Porém, o material coletado deve ser logo

processado já que esta solução não possui outros componentes além de água e fosfato de sódio (15). Neste estudo, as amostras coletadas e armazenadas em PBS mostraram as melhores concentrações de DNA ao longo de um ano, tanto em TA quanto em 4°C e, de maneira geral, a pureza das mesmas também variou entre os valores considerados positivos. Como as concentrações de DNA foram altas, a maioria das amostras pode ser analisada quanto a sua integridade e capacidade de amplificação do primer IFNA. Entretanto, a qualidade do DNA em relação a sua integridade é baixa, mostrando uma pequena melhora para as amostras preservadas em 4°C e também nos períodos maiores que 30 dias. Isto pode ser indicativo de contaminação bacteriana, já que não houve amplificação do primer IFNA nos períodos maiores que 7 dias.

A citologia líquida possibilita a realização de várias técnicas além da citologia convencional como: imunocitoquímica, hibridização in situ e análise molecular. A maioria destes líquidos de preservação são à base de álcool e o formaldeído também pode ser adicionado para melhora da preservação da morfologia celular. No entanto, a presença de formaldeído pode diminuir notavelmente a sensibilidade de detecção de ácido nucleico (16). Nesse estudo, utilizamos o Liqui-PREP para preservação do DNA das células coletadas. Segundo o fabricante, este líquido contém uma mistura diluída em menos de 20% de álcool e pode ser utilizado para biologia molecular, já que evita o crescimento bacteriano, estabilizando a amostra por até 60 dias em até 30°C. No entanto, de maneira geral, os resultados obtidos com esta solução não foram satisfatórios. Foi possível notar uma influência importante da temperatura nas amostras coletadas e mantidas em LP. A manutenção em 4°C mostrou concentração de DNA mais alta e melhores valores de pureza. Além disso, apenas as amostras mantidas em 4°C por até 7 dias puderam ser submetidas aos ensaios para avaliação da integridade. Porém, apenas o DNA extraído imediatamente após a coleta apresentou-se íntegro. Mesmo com esses resultados, houve amplificação do primer IFNA nos tempos 72h e 7d em 4°C, mostrando que uma baixa concentração de DNA é capaz de desempenhar um ensaio de PCR efetivo.

Camacho-Sanchez, Burraco, Gomez-Mestre e Leonard (2013) (17) avaliaram a capacidade de preservação de DNA advindo de amostras de diferentes órgãos de ratos, mantidos em diferentes soluções formuladas em laboratório e comercializadas, sendo uma delas o NAP buffer. Estas amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 7 semanas e 10 meses e as médias de concentração de DNA observadas para a solução foram de 70ng/ul e 50ng/ul, respectivamente. Além disso, eles também avaliaram a integridade deste DNA, o qual mostrou bandas bem marcadas com “smears” fracos em amostras mantidas por até 7 semanas em temperatura ambiente. Entretanto, no presente estudo, a solução NAP apresentou uma média de concentração de DNA baixa e a poucas amostras mostraram valores de pureza dentro do ideal. Ao contrário da solução LP, houve uma pequena melhora de concentração e pureza nas amostras mantidas em temperatura ambiente. No entanto, o DNA analisado não apresentou integridade desejada. Mesmo assim, houve amplificação do primer IFNA para as amostras preservadas por 72h e 7d em TA e 4°C. A diferença entre o presente estudo e o citado acima pode ser explicada pelo tipo de amostra analisada, já que o mesmo foi avaliado em fragmentos de tecido onde a quantidade celular e conseqüentemente de DNA é maior.

Outra solução formulada no presente estudo foi a solução DESS, a qual mostrou um bom desempenho. As concentrações de DNA foram boas até 30 dias de preservação, tanto em TA quanto em 4°C. Isto é acompanhado por um DNA bastante íntegro para ambas as condições de temperatura. No entanto, mesmo com esses resultados positivos em até 30 dias de preservação, não houve amplificação de qualidade do primer IFNA para períodos superiores a 7 dias, tanto em TA quanto em 4°C. Allen-Hall e McNevin (2012) (18) avaliaram a capacidade de preservação de DNA para amostras de tecido muscular mantidas nas soluções TENT e DESS por até 28 dias em 35°C e concluíram que a solução DESS foi capaz de produzir perfis completos de genotipagem em até 28 dias de preservação, mas a solução TENT apresentou perfis parciais. Mesmo que essa análise não tenha sido realizada no presente estudo, esse resultado de efetividade da solução DESS por aproximadamente 30 dias

e pouca efetividade da solução TENT para preservação do DNA vai ao encontro dos nossos resultados encontrados.

A solução TENT obteve concentrações de DNA favoráveis para o desempenho de todas as análises. Porém, seus valores de pureza fogem do ideal e o DNA preservado apresenta-se pouco íntegro. Mesmo assim, houve amplificação do primer IFNA por até 7 dias de preservação. Sorensen et al. (2015) (19) exploraram a ideia de obter perfis de DNA sem a extração prévia ao PCR através de amostras de tecido muscular humano fresco e de cadáveres. Estas amostras foram colocadas nas soluções DESS e TENT e mantidas em TA por até 28 dias. Eles concluíram que ambas as soluções de preservação foram capazes de amplificar o DNA sem a extração prévia do mesmo. No presente estudo, mesmo não realizando a amplificação sem extração prévia, ambas as soluções também foram capazes de amplificar DNA, mas por um período mais curto de preservação.

A coleta de amostras para extração de DNA é um procedimento crítico, pois consome muito tempo e pode envolver aspectos éticos. É, portanto, desejável que esse procedimento se torne mais simples, barato e produza quantidades de DNA suficientes para o desempenho da PCR (20). A tabela 3 resume o desempenho das soluções a partir das análises realizadas. Podemos concluir que as soluções LP, NAP e TENT não são adequadas para a preservação de DNA obtido por citopatologia bucal. Independentemente da solução de preservação estudada, observamos que o tempo de armazenamento é crítico, pois para a maioria das soluções observamos uma diminuição da quantidade de DNA obtida e principalmente da integridade do DNA. Portanto, não foi possível obter amplificação por PCR adequada em tempos maiores a 7 dias. A temperatura de armazenamento por outro lado não parece ser um fator crítico para as soluções DESS e PBS. Isto é positivo, já que facilita a logística de obtenção e armazenamento de amostras. Considerando por fim, a integridade de DNA obtido, concluímos que a solução DESS é a mais adequada para a obtenção de DNA a partir de amostras citológicas bucais e estas podem ser armazenadas em 4°C ou TA por até 7 dias.

**Tabela 3.** Desempenho de cada solução em relação às variáveis estudadas. Os símbolos em verde mostram resultados positivos e os em vermelho resultados negativos.

SOLUÇÃO	T	[ ]	PUREZA	INTEGRIDADE ≤30 dias	INTEGRIDADE >30 dias	AMPLIFICAÇÃO ≤7 dias	AMPLIFICAÇÃO >7 dias
PBS	TA	Y	Y	↓	↓	Y	X
	4°C	Y	Y	↓	↓	Y	X
LP	TA	X	X	X	X	X	X
	4°C	X	Y	↓	X	Y	X
NAP	TA	X	X	↓	X	Y	X
	4°C	X	X	↓	X	Y	X
DESS	TA	Y	X	Y	Y	Y	X
	4°C	Y	X	Y	Y	Y	X
TENT	TA	Y	X	↓	↓	Y	X
	4°C	Y	X	↓	↓	Y	X

PBS: solução tamponado fosfato salina; LP: Liqui-Prep; NAP: *Nucleic Acid Preservation Buffer*; DESS: *Dimethyl sulphoxide disodium-EDTA-satured NaCl*; TENT: *Tris-EDTA-NaCl-Tween20 buffer*; T: temperatura; TA: temperatura ambiente; 4°C: 4° Celsius; [ ]: concentração do DNA

### 3.5 Referências

1. Güneri P, Epstein JB. Late stage diagnosis of oral cancer : Components and possible solutions. *Oral Oncology* 2014;50:1131–6.
2. D'Souza, S, Addepalli, V. Preventive measures in oral cancer : An overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018;107:72–80.
3. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J. *Global Cancer Statistics , 2012.* *CA Cancer J Clin* 2015;65(2):87–108.
4. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet* 2008; 371: 1695–709.
5. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology* 2009;45:309–16.
6. García-Closas, M, Egan, KM, Abruzzo, J, Newcomb, PA, Titus-Ernstoff, L, Franklin, T, et al. Collection of Genomic DNA from Adults in Epidemiological Studies by Buccal Cytobrush and Mouthwash. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2001;10:687–96.
7. Huang M, Chang Y, Liao P, Huang T. Loss of heterozygosity of p53 gene of oral cancer detected by exfoliative cytology. *Oral Oncology* 1999;35:296–301.
8. King IB, Abouta JS, Thornquist MD, Bigler J, Patterson RE, Kristal AR, et al. Buccal Cell DNA Yield , Quality , and Collection Costs : Comparison of Methods for Large-scale Studies. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2002;11: 1130–133.

9. Ghislaine M, Alves O, Faig C, Carta L, Pimentel P, Barros D, et al. Archives of Oral Biology Repair genes expression profile of MLH1 , MSH2 and ATM in the normal oral mucosa of chronic smokers. 2017;73:60–5.
10. Pérez-Sayáns M, Somoza-Martín, JM, Barros-Angueira, F, Reboiras-López, MD, Gándara-Vila, P, Rey, JMG, et al. Exfoliative cytology for diagnosing oral cancer. Biotechnic & Histochemistry 2010;85(3):177–87.
11. Alaeddini R, Walsh SJ, Abbas A. Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA — A review. Forensic Science International: Genetics 2010;4:148–57.
12. Green H, Tillmar A, Pettersson G, Montelius K. The use of FTA cards to acquire DNA profiles from postmortem cases. International Journal of Legal Medicine 2019.
13. Reeve BWP, McFall SM, Song R, Warren R, Steingart KR, Theron G. Commercial products to preserve specimens for tuberculosis diagnosis: A systematic review. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease 2018;22: 741–53.
14. Nedel F, André DDA, De Oliveira IO, Tarquinio SBC, Demarco FF. Buccal cells submitted to three different storage conditions before DNA extraction. J Appl Oral Sci. 2009;17(2):113–5.
15. Police B, Clerk J, Building M, Buildings K, Road M. The use of phosphate buffered saline for the recovery of cells and spermatozoa from swabs. Scientific and technical 2006;46:179–84.
16. Fujii T DP, Asano A, Shimada K. Evaluation of RNA and DNA Extraction From Liquid-Based Cytology Specimens. Molecular Cytopathology 2016;44(10):833–40.
17. Camacho-Sanchez M, Burraco P, Gomez-Mestre I, Leonard JA. Preservation of RNA and DNA from mammal samples under field conditions. Molecular Ecology Resources 2013;663–73.
18. Allen-hall A. Preservation of human muscle in conditions commonly associated with mass disasters. Forensic Science International: Genetics 2012; 653–657.
19. Sorensen A, Berry C, Bruce D, Gahan ME, Hughes-Stamm S, McNevin D. Direct-to-PCR tissue preservation for DNA profiling. Int J Legal Med 2016;130:607–13.
20. Cozier YC, Palmer JR, Rosenberg L. Comparison of Methods for Collection of DNA Samples by Mail in the Black Women’s Health Study. 2004;(617).

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer de boca apresenta uma taxa de sobrevida de 50% em 5 anos, a qual aumenta, consideravelmente, se a doença é diagnosticada nos estágios iniciais. Nesse sentido, pesquisas voltadas para prevenção da doença e, conseqüentemente, seu diagnóstico precoce são de extrema importância. Infelizmente, o tratamento do câncer de boca ainda é limitado e na maioria das vezes os pacientes são submetidos a cirurgias radicais, aumentando muito a morbidade da doença. Novos métodos de diagnóstico são necessários para que haja alteração destes dados (GÜNERI; EPSTEIN, 2014; D'SOUZA; ADDEPALLI, 2018; (VOKAČ et al., 2014). Por isso, buscamos biomarcadores moleculares que identifiquem indivíduos de maior risco ao desenvolvimento destas lesões.

Para tanto, protocolos bem estabelecidos para obtenção de amostras de DNA são necessários para que as análises sejam desempenhadas com sucesso. Para que testes genéticos sejam acessíveis a toda população e repetidos de maneira sistemática, o mesmo deve possuir um baixo custo e ser desempenhado com facilidade (LUDES et al. 1993; GREEN et al., 2019; REEVE et al., 2018). Nestes estudo, avaliamos a capacidade de preservação de DNA de soluções formuladas em laboratório, as quais tem um custo viável para aplicação em escala populacional e as amostras coletadas para obtenção de DNA foram de raspado citológico bucal, ou seja, metodologia que proporciona conveniência para desempenho.

Uma das soluções analisadas, a solução DESS, proporcionou preservação de DNA de qualidade e com capacidade de desempenho da amplificação do primer IFNA para as amostras armazenadas em temperatura ambiente ou 4°C por até 7 dias. A capacidade de preservação em temperatura ambiente é muito importante para melhor aplicabilidade desta solução. Os resultados relacionados ao tempo de preservação podem ter sido influenciados pela concentração de DNA para o desempenho de ensaio de PCR, a qual poderia ser mais alta. Além disso, as amostras passaram pelo processo de congelamento e descongelamento algumas vezes até que todos os ensaios fossem realizados. Isto pode ter gerado degradação do DNA. Uma limitação

importante do nosso estudo é a diluição das amostras. As amostras deveriam ser diluídas em uma menor quantidade de buffer para que ficassem mais concentradas e os ensaios fossem desempenhados com maior facilidade.

A solução PBS apresentou as melhores concentrações de DNA e também foi capaz de amplificar o primer IFNA por até 7 dias. Mesmo assim, estas amostras podem estar contaminadas por outros microorganismos já que não possui nenhum componente que favoreça a preservação do DNA na sua formulação. Nesse sentido, como perspectiva futura, pretendemos realizar o ensaio da PCR com um primer bacteriano para avaliar a capacidade de amplificação do mesmo em todas as amostras.

A sequência desse estudo buscará avaliar o custo de cada solução e também o uso de outro kit ou método de extração de DNA de menor custo. Essas são questões importantes para justificar a utilização destas soluções e também a possibilidade de aplicação em grande escala.

## 5. REREFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al, L. et al. Ataxia-telangiectasi mutated (ATM) gene in head and neck squamous cell carcinoma: Promoter hypermethylation with clinical correlation in 100 cases. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.13, p.150–156, 2004.

ALLEN-HALL, A.; MCNEVIN, D. Human tissue preservation for disaster victim identification (DVI) in tropical climates. **Forensic Science International: Genetics**, Amsterdam, v. 6, n. 5, p. 653-657, 2012.

ALVES, M. G. O. et al. Repair genes expression profile of MLH1, MSH2 and ATM in the normal oral mucosa of chronic smokers. **Archives Of Oral Biology**, v. 73, p.60-65, 2017.

ARGIRIS, A. et al. Head and neck cancer. **The Lancet**, v. 371, n. 9625, p. 1695-1709, 2008.

BÁNÓCZY, J. Exfoliative cytologic examinations in the early diagnosis of oral cancer. **International Dental Federation**, v. 26, n. 4, p. 398-404, 1976.

BIOMÁTRICA. **DNAgard Tissue: Collect, ship and store tissues and cells at room temperature.** 2018. Disponível em: <<https://www.biomatica.com/product/salivagard-dna/>>. Acesso em: 17 out. 2018

BIOMÁTRICA. **SalivaGard DNA: Reliable and cost-effective saliva DNA collection.** 2018. Disponível em: <<https://www.biomatica.com/product/salivagard-dna/>>. Acesso em: 17 out. 2018.

BRZOBOHATÁ, K. et al. Comparison of Suitability of the Most Common Ancient DNA Quantification Methods. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 21, n. 4, p. 265-271, 2017.

BURZLAFF, J. B. et al. Exposure to alcohol or tobacco affects the pattern of maturation in oral mucosal cells: a cytohistological study. **Cytopathology**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 367-375, 2007.

CAMACHO-SANCHEZ, M. Preservation of RNA and DNA from mammal samples under field conditions. **Molecular Ecology Resources**, v. 13, n. 4, p. 663-673, 2013.

CARRARD, V.C., PIRES, A.S., PAIVA, R.L., CHAVES, A.C.M., SANT'ANA FILHO, M. Alcohol and Oral Cancer: Comments on Related Mechanisms. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 54, n.1, p. 49-56, 2008.

D'SOUZA, S.; ADDEPALLI, V. Preventive measures in oral cancer: An overview. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 107, p. 72-80, 2018.

DERENZINI, M. et al. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. **The Journal Of Pathology**, v. 191, n. 2, p. 181-186, 2000.

DESJARDINS, P.; CONKLIN, D. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. **Journal of Visualized Experiments**, n. -1, p. 1-4, 2010.

DHULL, A. K. et al. Major Risk Factors in Head and Neck Cancer: A Retrospective Analysis of 12-Year Experiences. **World Journal Of Oncology**, v. 9, n. 3, p. 80-84, 2018.

DNAGENOTEK. **DNA Collection Kits for Research**: Collect superior samples for your genetic analysis. 2018. Disponível em: <<https://www.dnagenotek.com/ROW/products/collection-human/oragene-dna/500-series/OG-500.html>>. Acesso em: 17 out. 2018.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal Of Cancer**, v. 136, n. 5, p. 359-386, 2014..

GALLANGER, S.R. Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. **Current Protocols**, v. 2, n. 116, p. A3L-A3L14, 2017.

GARCÍA-CLOSAS, M. et al. 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.

GEDOZ, L et al. Proliferative activity in clinically healthy oral mucosa exposed to tobacco smoking and alcohol: a longitudinal study using the agNOR staining technique. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, v. 29, n. 4, p.231-238, 2007.

GREEN, H et al. The use of FTA cards to acquire DNA profiles from postmortem cases. **International Journal of Legal Medicine**, 2019.

GONZÁLEZ-RAMIREZ, I. et al. hMLH1 promoter methylation is an early event in oral cancer. **Oral Oncology**, v.47, p.22–26, 2011.

GÜNERI, P.; EPSTEIN, J. B. Late stage diagnosis of oral cancer: Components and possible solutions. **Oral Oncology**, v. 50, n. 12, p. 1131-1136, 2014.

HUANG, M. et al. Loss of heterozygosity of p53 gene of oral cancer detected by exfoliative cytology. **Oral Oncology**, v. 35, n. 3, p. 296-301, 1999.

INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em: 14 ago. 2018.

ISOHELIX. **Isohelix DNA Buccal Swabs**: DNA sampling and purification. 2018. Disponível em: <[https://isohelix.com/products/isohelix-dna-buccal-swabs/?gclid=CjwKCAjwu5veBRBBEiwAFTqDwU\\_hnsD7201bWW-v3FoHu4WoVeSMR8KG1HGmox3G87ZU87PLxly-xBoCoHIQAvD\\_BwE](https://isohelix.com/products/isohelix-dna-buccal-swabs/?gclid=CjwKCAjwu5veBRBBEiwAFTqDwU_hnsD7201bWW-v3FoHu4WoVeSMR8KG1HGmox3G87ZU87PLxly-xBoCoHIQAvD_BwE)>. Acesso em: 17 out. 2018.

KAZANOWSKA, K.; HAŁOŃ, A.; RADWAN-OCZKO, M. The role and application of exfoliative cytology in the diagnosis of oral mucosa pathology - contemporary

knowledge with review of the literature. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 23, n. 2, p. 299-305, 2014.

KHOT, K. et al. A cytomorphometric analysis of oral mucosal changes in tobacco users. **Journal Of Natural Science, Biology And Medicine**, v. 6, n. 3, p. 22-24, 2015.

KING I. B. et al. Buccal Cell DNA Yield, Quality, and Collection Costs: Comparison of Methods for Large-scale Studies. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 11, n. 10, p. 1130-1133, 2002.

KÜCHLER, E. C. et al. Buccal cells DNA extraction to obtain high quality human genomic DNA suitable for polymorphism genotyping by PCR-RFLP and Real-Time PCR. **Journal of Applied Oral Science**, v. 20, n. 4, p. 467-471, 2012.

LA VECCHIA, C. et al. Epidemiology and Prevention of Oral Cancer. **Oral Oncology**, v. 33, n. 5, p. 302-12, 1997.

LUDES, B.; PFITZINGER, H.; MANGIN, P. DNA fingerprinting from tissues after variable postmortem periods. **Journal of Forensic Sciences**, v.38, p.686–690, 1993.

MENKE, S. et al. Home-Made Cost Effective Preservation Buffer Is a Better Alternative to Commercial Preservation Methods for Microbiome Research. **Frontiers In Microbiology**, v. 8, p.1-12, 2017.

NADAF, A. et al. A phase contrast cytomorphometric study of squames of normal oral mucosa and oral leukoplakia: Original study. **Journal Of Oral And Maxillofacial Pathology**, v. 18, n. 4, p. 32-38, 2014.

NAGY, Z. T. A hands-on overview of tissue preservation methods for molecular genetic analyses. **Organisms Diversity & Evolution**. v. 10, n. 1, p. 91-105, 2010.

NIVIA, M. et al. Comparative cytomorphometric analysis of oral mucosal cells in normal, tobacco users, oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. **Journal Of Cytology**, v. 32, n. 4, p. 253-260, 2015.

OGDEN, G. R.; COWPE, J.G.; GREEN, M.W. Quantitative exfoliative cytology of normal buccal mucosa: effect of smoking. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 19, n. 2, p. 53-55, 1990.

OGDEN, G.R.; WIGHT, A.J. A etiology of oral cancer: alcohol. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 36, n. 4, p. 247-251, 1998.

OGDEN, G.R., WIGHT, A.J., RICE, P. Effect of alcohol on the oral mucosa assessed by quantitative cytomorphometry. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 28, n. 5, p. 216-220, 1999.

PÉREZ-SAYÁNSM, M et al. Exfoliative cytology for diagnosing oral cancer. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 85, n. 3, p. 177-187, 2010.

PINHO, M. **Biologia Molecular do Câncer**: fundamentos para a prática médica. Rio de Janeiro: Revinter, 2005.

QUINN, C. M.; WRIGHT, N. A. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: Evaluation of methods and applications as prognostic variables. **The Journal of Pathology**, v. 160, n. 2, p. 93-102, 1990.

REEVE, B. W. P. et al. Commercial products to preserve specimens for tuberculosis diagnosis: a systematic review. **The International Journal of Tuberculosis And Lung Disease**, v. 22, n. 7, p.741-753, 2018.

REIBEL, J. Prognosis of Oral Pre-malignant Lesions: Significance of Clinical, Histopathological, and Molecular Biological Characteristics. **Critical Reviews In Oral Biology & Medicine**, v. 14, n. 1, p. 47-62, 2003.

ROJAS, E. et al. DNA damage in exfoliated buccal cells of smokers assessed by the single cell gel electrophoresis assay. **Mutation Research**, v. 370, n. 2, p. 115-120, 1996.

ROSIN, M.P. et al. New Hope for an Oral Cancer Solution: Together We Can Make a Difference. **Journal of the Canadian Dental Association**, v. 74, n. 3, p. 261–266, 2008.

SAMBROOK. J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3.ed.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SENGUNPTA, S. et al. Inactivation of human mutL homolog 1 and mutS homolog 2 genes in head and neck squamous cell carcinoma tumors and leukoplakia samples by promoter hypermethylation and its relation with microsatellite instability phenotype. **Cancer**, v. 109, 703–712, 2007.

SHUMWAY, B. S. et al. Effects of a Topically Applied Bioadhesive Berry Gel on Loss of Heterozygosity Indices in Premalignant Oral Lesions. **Clinical Cancer Research**, v.14, n. 8, p. 2421-2430, 2008.

SORENSEN, A. et al. Direct-to-PCR tissue preservation for DNA profiling. **International Journal Of Legal Medicine**, v. 130, n. 3, p.607-613, 2015.

TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncology**, v. 45, n. 4-5, p. 309-316, 2009.

WILFINGER, W. W.; MACKEY, K.; CHOMCZYNSKI, P. Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. **Biotechniques**, v. 22, n. 3, p. 474-481, 1997

VOKAČ, N. K. et al. An evaluation of SOX2 and hTERT gene amplifications as screening markers in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. **Molecular Cytogenetics**, v. 5, n. 7, p.1-8, 2014.

## 6. ANEXOS

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caro participante,

Esta pesquisa, cujo título é: “COMPARAÇÃO DE DIFERENTES SOLUÇÕES PARA PRESERVAÇÃO DO DNA DE AMOSTRAS CITOLÓGICAS BUCAIS” será realizada na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e tem como objetivo comparar a capacidade de preservação do DNA proveniente de células bucais de soluções de preservação formuladas em laboratório em comparação com uma solução comercial e uma solução tampão. Se você concordar em participar do estudo, terá sua boca examinada e terá células coletadas, aplicando uma pequena escova na sua mucosa da bochecha para obtenção de amostras de células para posterior obtenção de DNA. Você terá que submeter-se a raspados da parte interna da bochecha em 8 períodos diferentes, com intervalos de 7 dias, totalizando 2 meses de participação no estudo.

O método de coleta de células bucais utilizado neste estudo é não invasivo e não causa nenhum dano, porém há o risco de haver algum desconforto durante a raspagem para coleta de células da bochecha. Serão utilizados materiais descartáveis e esterilizados, portanto, sem riscos adicionais. Não há benefícios diretos para você. O benefício indireto é a identificação de uma solução que preserve o DNA adequadamente para realização de estudos futuros sobre o risco de desenvolver câncer de boca, potencialmente diminuindo a mortalidade causada por essa doença.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir após a assinatura desse Termo, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição. Você poderá entrar em contato a qualquer momento para conhecimento dos resultados obtidos com a utilização das suas amostras. Além disso, fica assegurado o direito ao sigilo de todas as informações coletadas.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e não haverá nenhum custo com respeito aos procedimentos

envolvidos. Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável, Fernanda Visioli, pelo telefone (051) 981378940, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, o telefone para contato é: (51) 33083738.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e seu responsável e outra para os pesquisadores.

Eu, \_\_\_\_\_ (Assinatura do participante), declaro que fui informado dos objetivos e procedimentos que serão realizados nesta pesquisa, bem como sei dos meus direitos e dos deveres dos pesquisadores. Declaro, ainda, que recebi uma cópia deste Termo.

Nome Completo: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_.