

**DETECÇÃO DE PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV) A PARTIR DE RASPADO DE  
CÉLULAS DE MUCOSA BUCAL**

*DETECTION OF HUMAN PAPILOMAVIRUS (HPV) FROM BUCCAL SWABS*

Amanda Helena DINGUELESKI<sup>1</sup>  
Edelaine KLUK<sup>1</sup>  
Géssica Vanessa Thomas ROTTA<sup>1</sup>  
\*Magda Eline Guerrart PORTUGAL<sup>2</sup>  
Lígia Moura BURCI<sup>3</sup>  
Sonia Mara RABONI<sup>4</sup>

---

**RESUMO**

O sucesso da utilização de material genético de vírus, bactérias e outros patógenos, na investigação clínica de patologias está diretamente relacionada à qualidade do material genético extraído, principalmente quando utilizadas para detecção de vírus oncogênicos, o HPV, que podem estar presentes, mas em um baixo número de cópias. O objetivo deste trabalho é descrever a padronização da técnica de extração de DNA, a partir de raspado de células de mucosa bucal, utilizada para detecção do HPV. Foram utilizadas amostras de raspado bucal de 49 indivíduos, que foram submetidas à extração do material genético. O material extraído foi submetido à análise de quantidade e qualidade por espectrofotometria e amplificação do gene da  $\beta$ -globina humana. Para detecção do HPV, foi utilizada a metodologia de *nested* PCR com os oligonucleotídeos iniciadores MY11/MY09 e GP5+/GP6+. A metodologia utilizada neste trabalho para coleta, transporte, armazenamento e extração do material genético mostrou-se eficaz para a detecção do DNA de HPV.

---

**PALAVRAS-CHAVE:** papilomavírus humano, biologia molecular, carcinoma de células escamosas.

---

**ABSTRACT**

The success of the use of genetic material from viruses, bacteria and other pathogens in the clinical investigation of pathologies is directly related to the quality of the genetic material isolated, especially when used for the detection of oncogenic virus, such as HPV, which may be present, but in low copy number. The objective of this work is to describe the standardization of the technique of DNA extraction from buccal swabs, to detect the presence of HPV DNA. Mouth scrapped samples were collected from 49 individuals and submitted to DNA isolation, which was subjected to purity and concentration analysis by spectrophotometry. Adequacy of DNA extracts, for the PCR-based assays, was assessed by amplifying a 268-bp region of the human  $\beta$ -globin gene. For HPV DNA detection, the nested PCR methodology was used, with the MY11/MY09 and GP5+/GP6+ primers. The methodology used in this work for collection, transport, storage and DNA isolation of is effective for HPV DNA detection.

---

**KEY WORDS:** human papillomavirus, molecular biology, squamous cell carcinoma.

---

<sup>1</sup> Acadêmica do Curso de Odontologia da Faculdade Herrero - Curitiba – PR.

<sup>2</sup> Doutoranda em Medicina Interna – UFPR; Mestre em Bioquímica e Biologia molecular – UFPR; Professora dos Cursos de Odontologia e Enfermagem da Faculdade Herrero - Curitiba – PR.

<sup>3</sup> Doutoranda em Ciências Farmacêuticas – UFPR; Mestre em Farmacologia – UFPR; Professora dos Cursos de Odontologia e Enfermagem da Faculdade Herrero - Curitiba – PR

<sup>4</sup> Pós-Doutora em Virologia Molecular – Instituto de Salud Carlos III, Espanha; Chefe do Departamento de Infectologia HC/UFPR; Médica do Laboratório de Virologia HC/UFPR.

\*Email para correspondência: portugal.magda@gmail.com

## 1. INTRODUÇÃO

As técnicas de biologia molecular são amplamente utilizadas, não apenas no diagnóstico de morbidades, como também nas atividades de pesquisa e medicina forense (MURDOCH-KINCH, 1999). A reação em cadeia da polimerase (PCR) permite a amplificação em larga escala de DNA e RNA, sendo uma metodologia amplamente difundida (MULLIS, 1990; SAMBROOK et al 1989). Entretanto, o sucesso da PCR depende da quantidade e qualidade do material genético utilizado nas reações e, apesar do grande avanço científico e tecnológico dos últimos anos, a obtenção de DNA/RNA de boa qualidade pode ser um grande desafio dependendo do tipo de amostra utilizada. Biópsias de tecido a fresco, sangue periférico, lavado naso-faríngeo, entre outras, são exemplos de amostras com bom rendimento de DNA ou RNA extraído, tendo em vista o grande número de células presentes (VALONES, et al 2009).

Outras amostras, como raspado de células de mucosa bucal (*swab* bucal), representam um grande desafio para obtenção do material genético em quantidades suficientes para análise, principalmente quando utilizadas para detecção de vírus oncogênicos, como papiloma vírus humano (HPV), que podem estar presentes, mas em um baixo número de cópias (ZARAVINOS, 2009; ABREU, et al 2004).

Assim, o objetivo deste trabalho é descrever a padronização da técnica de extração de DNA, a partir de raspado de células de mucosa bucal, utilizada para detecção do HPV.

## 2. MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho foi realizado sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) (Parecer nº 1.101.574) e foi realizado de acordo com a Resolução RDC 466/12 para pesquisa envolvendo seres humanos.

### 2.1 Coleta das Amostras

Amostras de raspado oral de 49 indivíduos foram coletadas raspando a face interna das bochechas e assoalho bucal com pequenas escovas citológicas estéreis, fazendo movimentos circulares aproximadamente 30 vezes, armazenadas em recipientes unitários contendo Sistema Universal de Meio de Transporte (UTM™) (COPAN *Diagnostics*) e identificados por sequência numérica, tendo sido mantidas em ambiente refrigerado (4° C) até o armazenamento final a -20° C, para posterior processamento.

### 2.2 Extração do Material Genético

Previamente ao procedimento de extração do DNA, as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e centrifugadas por 10 minutos, a 4.000 rpm, a 4° C. Foram coletados 200 uL do sobrenadante de cada amostra e transferidos para tubos de polipropileno (tipo *Eppendorf*) novos e livres de DNase e RNase.

As etapas subsequentes foram realizadas com a utilização dos reagentes do Kit *Purelink Genomic DNA extraction kit* (Invitrogen®) seguindo as especificações do fabricante, com as modificações descritas a seguir. Foram adicionados 200 uL do tampão de lise (*Lysis Buffer*) e 25 uL de Proteinase K aos 200 uL do sobrenadante coletado das amostras. Os tubos foram fechados, homogeneizados em Vórtex por 15 segundos e incubados a 56° C em termobloco, por 15 minutos. Após a etapa de lise, os tubos foram centrifugados ligeiramente para remoção de eventuais gotas acumuladas nas paredes ou na tampa dos tubos, e 250 uL de etanol absoluto foram adicionados em cada tubo, seguindo-se agitação em vórtex por 15 segundos e incubação por 5 minutos em temperatura ambiente. O material contendo o lisado foi transferido para uma coluna de sílica (*Viral Spin Column*) fornecida pelo fabricante do Kit Comercial, devidamente identificada com o número da amostra, seguindo-se a centrifugação por 1 minuto a 8.000 rpm. A coluna foi então transferida

para um tubo de coleta novo de 2 mL para início da etapa das lavagens. Foram adicionados 500 uL de tampão de lavagem (*Wash Buffer – WII*) e procedeu-se nova centrifugação por 1 minuto a 8.000 rpm. A etapa de lavagem foi executada mais uma vez conforme descrição acima e então a coluna foi transferida para um tubo novo, que foi submetido a nova centrifugação por 1 minuto mas a 14.000 rpm, para secar completamente a membrana.

A eluição do material genético foi realizada transferindo-se a coluna para um novo tubo, devidamente identificado, ao qual acrescentou-se 50 uL de água ultra pura (Invitrogen®), seguindo-se incubação por 5 minutos a temperatura ambiente. Procedeu-se nova centrifugação a 14.000 rpm por 2 min para eluição do material genético extraído.

### 2.3 Quantificação do material genético extraído

Após a extração, as amostras com o material genético extraído foram quantificadas utilizando espectrofotômetro DeNovix® DS-11+ (DeNovix Inc.), conforme especificações do fabricante, mediante análise da concentração e pureza de DNA, utilizando 1µL do material extraído para o parâmetro dsDNA (*double-stranded DNA*) e considerando a leitura da relação de absorbância A260/280 entre 1,8 e 2,0 como uma extração com alto nível de pureza oligonucleica.

### 2.4 Amplificação do gene da $\beta$ -globina humana

Para analisar qualitativamente as amostras com DNA extraído, foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para o gene da  $\beta$ -globina humana, com os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) GH20/PC04 (Quadro 1) (BELL et al, 1993). O fragmento da PCR de aproximadamente 264 pares de base (pb) foi analisado em gel de agarose 1%.

Quadro 1 - Iniciadores utilizados na amplificação do gene da  $\beta$ -globina humana.

GENE	Primer	SEQUÊNCIA (5'– 3')	Número de pares de base
$\beta$ -globina	GH20	5' - GAAGAGCCAAGGACAGGTAC - 3'	264
	PC04	5' - CAACTTCATCCACGTTACC - 3'	

FONTE: BELL et al., 1993.

### 2.5 PCR para o gene da $\beta$ -globina humana

Para a reação em cadeia da polimerase (PCR) que amplifica o gene da  $\beta$ -globina humana, foi utilizado o seguinte protocolo: 5 µL do DNA extraído; 1 µL (10 µM) de cada um dos iniciadores (GH20 e PC04), que amplificam uma região de aproximadamente 264pb do gene da  $\beta$ -globina humana; 5 µL do tampão (10X PCR *Buffer*); 1,5 µL (1,5 mM) MgCl<sub>2</sub>; 1 µL (200 µM) de dNTP's; 0,25 µl de *Taq*DNA polimerase Platinum®; água ultrapura para completar o volume final de 50 µL. A PCR foi realizada em termociclador modelo Veriti 96-*well*, 0,2 mL (Applied Biosystems) com as seguintes condições de termociclagem: um ciclo de desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 30 segundos, hibridização dos iniciadores a 55° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 1 minuto.

### 2.6 Amplificação do material genético do HPV

Para detectar a presença do HPV no material genético extraído, a estratégia foi a de amplificar a região do genoma que codifica a proteína estrutural L1 (*L1 gene*). Para isso, foi realizada a técnica de *nested* PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) MY11/MY09 (BAUER et al., 1993) e GP5+/GP6+ (JACOBS et al., 1995) descritos no Quadro 2.

Quadro 2 - Iniciadores utilizados na amplificação do gene *L1* do HPV.

GENE	Primer	SEQUÊNCIA (5'-3')	Número de pares de base
<i>L1</i>	MY11	5'- GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG - 3'	460
	MY09	5'- CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC - 3'	
	GP5+	5' - TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACY AC - 3'	150
	GP6+	5' - GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C - 3'	

FONTE: BAUER et al., 1993; JACOBS et al., 1995.

### 2.7 PCR para o gene *L1*

**1ª PCR:** 5 µL do DNA extraído; 1 µL (10 µM) de cada um dos iniciadores (MY11 e MY09), que amplificam uma região mais externa à região alvo; 5 µL do tampão (10X PCR *Buffer*); 1,5 µL (1,5 mM) MgCl<sub>2</sub>; 1 µL (200 µM) de dNTP's; 0,25 µl de *TaqDNA* polimerase Platinum®; água ultrapura para completar o volume final de 50 µL. A PCR foi realizada em termociclador modelo Veriti 96-*well*, 0,2 mL (Applied Biosystems) com as seguintes condições de termociclagem: um ciclo de desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 30 segundos, hibridização dos iniciadores a 56° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 1 minutos.

**2ª PCR:** 3 µL do produto da primeira PCR; 1 µL (10 µM) de cada um dos iniciadores (GP5+ e GP6+), que amplificam uma região mais interna do genoma viral amplificado na primeira PCR. 5 µL do tampão (10X PCR *Buffer*); 1,5 µL (1,5mM) MgCl<sub>2</sub>; 1 µL (200 µM) de dNTP's; 0,25 µl de *TaqDNA* polimerase Platinum®; água ultrapura para completar o volume final de 50 µL. A PCR foi realizada em termociclador modelo Veriti 96-*well*, 0,2 mL (Applied Biosystems) com as seguintes condições de termociclagem: um ciclo de desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 30 segundos, hibridização dos iniciadores a 40° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 1 minutos.

Após a realização da amplificação, 8 µL do material foram aplicados em um gel de agarose 2% corado com EasyView® (Dongsheng Biotech Co., Ltd) para visualização do produto de 150 pb para o gene *L1*.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferentes estudos mostram que mais de 90% dos carcinomas de células escamosas de cavidade bucal, orofaringe, faringe e laringe estão associados HPV. Desta forma, a detecção precoce do vírus em cavidade bucal é de grande importância para estudos epidemiológicos e protocolos de intervenção clínica (CARVALHO et al, 2005; FURNISS et al, 2009; GILLISON et al, 2000; SMITH et al, 1998). Todavia, como o HPV não cresce em cultura de células e a precisão dos métodos diagnósticos sorológicos é limitada, a detecção do HPV depende das metodologias de biologia molecular que, embora extremamente sensíveis, podem ter como fator limitante resultados falso negativos quando realizadas com material genético extraído de baixa qualidade (LETO et al, 2011; MOLIJN et al, 2005).

Para garantir um material genético em condições satisfatórias para as análises subsequentes por biologia molecular, é necessário garantir que os procedimentos para coleta, transporte e armazenamento das amostras tenham sido rigorosamente seguidos. O meio universal de transporte UTM™ (COPAN *Diagnostics*) utilizado neste trabalho, é um meio para transporte de amostras biológicas nas quais pretende-se realizar a detecção de vírus e bactérias. É um meio estável em temperatura ambiente, servindo para a coleta, o transporte, a manutenção e o armazenamento a longo prazo de espécimes-alvo (COPAN *Diagnostics*).

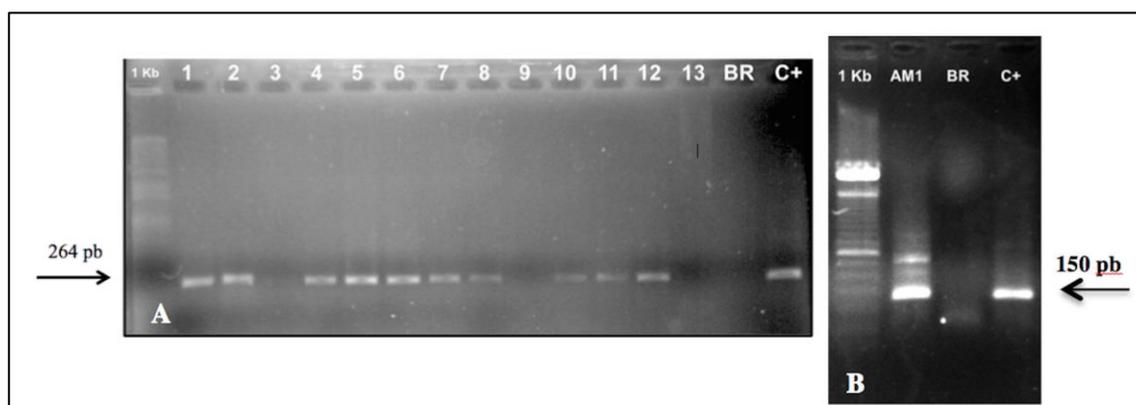
A correta manipulação das amostras para a extração do material genético também é essencial para garantir um resultado satisfatório. Amostras de raspados de células bucais devem ter os procedimentos de centrifugação realizados a 4° C, respeitando-se o limite de velocidade de 4.000 rpm da centrífuga, para tais amostras.

A lise das células se dá através do uso de um tampão de lise (que contém alta concentração de sais detergentes) e Proteinase K. O tampão de lise desfaz ligações de hidrogênio, interações de Van der Waals e interações hidrofóbicas, o que juntamente com a ação desnaturante da Proteinase K, proporciona condições de ligação do na membrana de sílica. A precipitação do material genético é feita por redução de constante dielétrica, causada pelo etanol absoluto à 37% na concentração final, o que promove a adsorção dos ácidos nucleicos na sílica, enquanto a maioria das outras moléculas passam através da coluna. A purificação do material é realizada por lavagens da coluna de sílica com tampão específico para a retirada de material orgânico como proteínas e nucleases, que podem também ligar-se inespecificamente à coluna. O material genético então é eluído em água ultra pura.<sup>15</sup>

A quantificação por espectrofotometria do material extraído das 49 amostras mostrou que houve boa recuperação de DNA, com uma média de 12 ng/uL de DNA extraído por amostra. A avaliação da pureza desse material, também por espectrofotometria, apresentou resultados satisfatórios, tendo sido observada a medida 1,8 e 2,0 para a relação A260/280, para todas as amostras extraídas.

Outra maneira de avaliar a qualidade da extração é por meio da realização da PCR para o gene da  $\beta$ -globina humana, e os resultados obtidos com as 49 amostras mostraram amplificação do gene-alvo em 46 das 49 amostras, conforme apresentado na Figura 1A, para as amostras de 1 a 13. A possibilidade de problemas com a PCR em si foi descartada mediante amplificação do controle positivo (C+). Da mesma forma, a possibilidade de contaminação foi descartada pela não amplificação do controle sem amostra, o branco (BR).

As 3 amostras negativas para o gene da  $\beta$ -globina humana, foram as que apresentaram menor concentração de DNA após a extração. Assim, uma nova PCR dessas amostras para o gene da  $\beta$ -globina humana, com um *input* maior de DNA, certamente mostrará amplificação do gene-alvo. Outra abordagem para amostras com baixas concentrações de DNA total extraído é a utilização da tecnologia de PCR em tempo real, que permite a quantificação precisa do material genético presente com excelente reprodutibilidade. Todavia, é uma técnica com custos mais elevados e que requer treinamento especializado.



**Figura 1:** A) Eletroforese em gel de agarose (1,0%) evidenciando os produtos de amplificação do gene da  $\beta$ -globina humana por PCR. B) Eletroforese em gel de agarose (2,0%) evidenciando o produto de amplificação do gene *L1* do HPV por PCR. 1 Kb – marcador de peso molecular; BR – branco; C+ - controle positivo.

A presença de DNA do HPV foi avaliada por meio de *nested* PCR utilizando os *primers* MY11/MY09 (BAUER et al, 1993) e GP5+/GP6+ (JACOBS et al, 1995). Das dez primeiras amostras analisadas, uma apresentou resultado positivo para HPV, conforme mostra a Figura 1B.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia utilizada neste trabalho para coleta, transporte, armazenamento e extração do material genético a partir de raspado de células de mucosa bucal (*swab*) mostrou-se eficaz para a detecção do DNA de HPV em cavidade bucal.

#### 5. PERSPECTIVAS

As demais amostras serão avaliadas quanto à presença de HPV por meio da técnica descrita neste trabalho, seguindo-se purificação e sequenciamento nucleotídico pelo método de Sanger das amostras positivas, para genotipagem do HPV. A padronização de uma PCR em tempo real será realizada e as amostras submetidas a nova análise.

#### 6. REFERÊNCIAS

MURDOCH-KINCH C.A. Oral medicine: advances in diagnostic procedures. **J. Calif. Dent. Assoc.** v.27, n.10, p. 773–784. 1999.

MULLIS KB. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. **Ann. Biol. Clin.**, v. 48, n.8, p. 579–582, 1990.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

VALONES MAA, GUIMARÃES RL, BRANDÃO LAC, SOUZA PRE, CARVALHO AAT, CROVELA S. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. **Braz. J. Microbiol.**, v. 40, n.1, p.1-11, doi:10.1590/S1517-83822009000100001 ,2009.

ZARAVINOS A, MAMMAS IN, SOURVINOS G, SPANDIDOS DA. Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). **Int J Biol Markers**, v. 24, n.4, p. 215-22, 2009

ABREU ALP, SOUZA RP, GIMENES F, CONSOLARO MEL. A review of methods for detect human *Papillomavirus* infection. **Virology Journal**; v. 9, p. 262, doi:10.1186/1743-422X-9-262, 2012.

COPAN Diagnostics. Copan Universal Transport Medium (UTM-RT). Product Information and How-to-Use, 2004.

BELL DA, TAYLOR JA, PAULSON DF, ROBERTSON CN, MOHLER JL, LUCIER GW. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, n.14, p. 1159-64, 1993.

CARVALHO A, NISHIMOTO I, CALIFANO J, KOWALSKI LP. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: A site-specific analysis of the SEER database. **International Journal of Cancer**, v.114, n.5, p.806-16, 2005.

FURNISS CS, MCCLEAN MD, SMITH JF, BRYAN J, APPLEBAUM KM, NELSON HH, *et al.* Human papillomavirus 6 seropositivity is associated with risk of head and neck squamous cell carcinoma, independent of tobacco and alcohol use. **Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v.20, n.3, p. 534-41, 2009.

GILLISON ML, KOCH WM, CAPONE RB, SPAFFORD M, WESTRA WH, WU L, *ET AL.* Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. **Journal of the National Cancer Institute**, v.92, n.9, p.709-20, 2000.

SMITH EM, HOFFMAN HT, SUMMERSGILL KS, KIRCHNER MSL, TUREK LP, HAUGEN TH. Human papilloma virus and risk of oral cancer. **The Laryngoscope**, v.108, n.7, p. 1098-1103, 1998.

LETO MGP, SANTOS JUNIOR GF, PORRO AM, TOMIMORI J. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. **An. Bras. Dermatol.**, v.86, n.2, p.306-317, 2011

MOLIJN A, KLETER B, QUINT W, DOORN LJV. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. **Journal of Clinical Virology**, v.32, p. 43–51, 2005.

DHALIWAL A. DNA extraction and purification. **Materiais e Métodos**,v.3, p.191, 2013.

BAUER HM, MANOS MM. PCR detection of genital human papillomavirus. In: **Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications**. Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White JT (Editors). **American Society for Microbiology**; 1993, p. 407-13.

JACOBS MV, HUSMAN AMR, BRULE AJVD, SNIJDERS PJ, MEIJER CJ, WALBOOMERS JM. Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. **Journal of clinical microbiology**, v.33, n.4, p. 901-5, 1995.