

## Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR

### *Evaluation of three methods of DNA extraction from paraffin-embedded material for the amplification of genomic DNA by means of the PCR technique*

Ricardo Alves MESQUITA\*

Evelyn K. ANZAI\*\*

Rogério Nogueira OLIVEIRA\*\*\*

Fábio Daumas NUNES\*\*\*\*

---

MESQUITA, R. A.; ANZAI, E. K.; OLIVEIRA, R. N.; NUNES, F. D. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesqui Odontol Bras**, v. 15, n. 4, p. 314-319, out./dez. 2001.

Existem na literatura vários protocolos para extração de DNA genômico a partir de material fixado em formol e embebido em parafina. A obtenção de DNA genômico é importante para realização de experimentos em biologia molecular, dentre eles a PCR. Este trabalho teve por objetivo otimizar a extração de DNA genômico a partir de material fixado (hiperplasia fibrosa inflamatória) e não-fixado (mucosa bucal normal) em formol, comparando-se três metodologias diferentes: fenol com digestão enzimática, partículas de sílica com e sem digestão enzimática. Para amplificação do DNA pela técnica da PCR, utilizou-se iniciadores para o éxon 7 da citoqueratina humana tipo 14. O sucesso da amplificação foi verificado pela eletroforese do produto em gel de poli-acrilamida 8% contendo glicerol 5% corado com prata. Obteve-se amplificação do DNA genômico extraído com fenol/digestão enzimática e com partículas de sílica/digestão enzimática, para ambos tecidos utilizados. O método padronizado tem potencial para auxiliar no diagnóstico histopatológico, assim como no estudo retrospectivo de material de arquivo.

UNITERMOS: DNA; Reação em cadeia por polimerase; Queratina.

---

## INTRODUÇÃO

A reação em cadeia da polimerase (PCR - “polymerase chain reaction”) é uma técnica *in vitro* que permite a amplificação de seqüências específicas de ácido desoxirribonucléico (DNA - “deoxyribonucleic acid”) ou de ácido ribonucléico (RNA - “ribonucleic acid”), sendo este último realizado a partir da síntese de ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA - “complementary deoxyribonucleic acid”). A PCR foi originalmente descrita por SAIKI *et al.*<sup>8</sup> (1985) e desde então tem sido utilizada em vários campos da ciência. É uma técnica com alta especificidade e aplicabilidade, com centenas de métodos descritos. A característica mais importante da PCR é a capacidade de amplificar expo-

nencialmente cópias de DNA a partir de pouca quantidade de material. Esta técnica pode ser utilizada na realização de estudos de DNA obtidos a partir de material fixado em formol e embebidos em parafina, possibilitando assim o seu uso como técnica auxiliar no diagnóstico de rotina e a realização de estudos retrospectivos<sup>2,4,10</sup>.

Para a realização da PCR, existe a necessidade da obtenção de ácidos nucléicos, sendo que na literatura existem varias técnicas descritas com essa finalidade, utilizando substâncias e estratégias diferentes<sup>1,2,4,6,7,10</sup>. O método mais freqüentemente utilizado de extração a partir de material parafinado utiliza a digestão com enzimas proteolíticas, purificação com solventes orgânicos e precipitação com etanol<sup>3,5</sup>.

---

\*Aluno do Curso de Pós-graduação (Doutorado) em Patologia Bucal; \*\*Aluna do Curso de Pós-graduação (Mestrado) em Deontologia e Odontologia Legal; \*\*\*Professor Doutor da Disciplina de Deontologia e Odontologia Legal; \*\*\*\*Professor Assistente Doutor da Disciplina de Patologia Bucal – Faculdade de Odontologia da USP.

O objetivo deste trabalho foi o de comparar três diferentes técnicas de extração de DNA genômico de material parafinado, ou seja, fenol com digestão enzimática, partículas de sílica sem digestão enzimática e partículas de sílica associada à digestão enzimática, com a finalidade de otimização e de utilização no Laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados fragmentos de um caso de hiperplasia fibrosa inflamatória, fixados em formol 10% e embebidos em parafina, pertencentes ao arquivo da Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP. Para efeito de comparação, utilizou-se fragmento de mucosa bucal normal obtida de plastia gengival pós-exodontia, fixado em paraformaldeído 4% durante 24 horas e embocado em material crioprotetor (OCT, VWR, Willard, OH, EUA). Foram obtidos 10 cortes de 10 µm de ambos tecidos, e estes transferidos para tubos de centrifugação de 1,5 ml. Os procedimentos laboratoriais foram realizados por apenas um pesquisador (RAM).

### Preparo dos cortes

Para o material parafinado, foi adicionado a cada tubo de centrifugação 1 ml de xilol aquecido a 65°C e mantido por 10 minutos. O tubo foi então centrifugado a 14.000 xg durante 5 minutos, desprezado o sobrenadante, seguido de novas trocas de xilol aquecido, até remoção completa da parafina. O precipitado foi reidratado com sucessivas trocas de etanol absoluto, etanol 95% e 70% em água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA), sendo cada troca precedida de homogeneização e centrifugação a 14.000 xg durante 5 minutos. Os cortes do material congelado foram lavados duas vezes com PBS ("phosphate-buffered saline", 1X, pH 7,4) acrescido de Tween 20 a 0,1%, e cada lavagem foi seguida de centrifugação nas mesmas condições anteriores. Os precipitados obtidos foram submetidos às técnicas de extração de DNA descritas a seguir.

### Extração com fenol

O protocolo para a extração de DNA com fenol foi baseado no método descrito por ISOLA *et al.*<sup>4</sup> (1994). Foi adicionado ao precipitado 200 µl de tampão de lise (NaCl 1 M; Tris-HCl pH 8,0 1 M; EDTA 0,5 M pH 8,0; SDS 10%) estéril e proteinase K (Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA)

na concentração final de 500 µg/ml. Os tubos foram mantidos a 55°C em banho-maria (Precision, VWR, Willard, OH, EUA) por 3-5 dias até a completa dissolução do precipitado. Foi adicionada proteinase K (10-30 µl de uma solução estoque a 250 µg/ml) em intervalos de 24 horas, e os tubos foram invertidos uma vez ao dia. Para inativação da proteinase K, os tubos foram incubados a 95°C durante 10 minutos.

Após a inativação, foi adicionado 1 ml de fenol saturado (Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA) e tamponado (pH 8,0), e os tubos centrifugados a 4.200 xg por 20 minutos, quando o sobrenadante foi transferido para outro tubo. Foi então acrescentado 1 ml de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizado, e centrifugado a 4.200 xg por 20 minutos. O sobrenadante foi novamente transferido para outro tubo de 1,5 ml. Para precipitação do DNA genômico foram adicionados 2 a 3 volumes de etanol absoluto gelado (-20°C) e 1/10 do volume de acetato de amônio 7 M (Sigma®, St. Louis, EUA), e o tubo deixado "overnight" a -20°C. O tubo foi centrifugado a 19.600 xg durante 20 minutos, o precipitado de DNA lavado com etanol 70%, e após evaporação do etanol a temperatura ambiente, o precipitado foi dissolvido em 30-50 µl de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 e EDTA 1 mM, pH 8,0) e mantido a 4°C até quantificação.

### Extração com partículas de sílica

O protocolo de extração com partículas de sílica foi baseado no trabalho de BOOM *et al.*<sup>1</sup> (1990). Preparou-se solução de sílica fracionada, colocando-se 12 g de dióxido de sílica (Sigma®, S-5631, St. Louis, EUA) em proveta graduada e adicionando-se água Milli-Q para 100 ml. Após dissolução da sílica, permitiu-se sua sedimentação por 24 horas a temperatura ambiente. Foi então removido o sobrenadante (86 ml) com nova adição de água Milli-Q até atingir o volume de 100 ml. Aguardou-se novamente sua sedimentação durante 5 horas, quando se removeu o sobrenadante (88 ml) e foi adicionado HCl (1 M) até atingir pH 2,0. A solução de sílica foi alíquotada em tubos de centrifugação, e mantida a -20°C até a sua utilização. Foram também preparadas as soluções tampão L2 (Tris-HCl 0,1 M, pH 6,4; tiocianato de guanidina 4 mM e sílica fracionada 6%) e L6 (Tris-HCl 80 mM, pH 6,4; EDTA 36 mM; Triton X-100 0,5% e sílica fracionada 6%).

Foi adicionado a cada um dos precipitados 820 µl do tampão L6 seguido de incubação a 60°C

por 2 horas, realizando-se homogeneização a cada 15 minutos. Centrifugou-se o tubo a 4.200 xg por 5 minutos, removendo-se 500 µl do sobrenadante para outro tubo. A este foram adicionados 500 µl de tampão L6 e 40 µl de sílica fracionada. Após homogeneização, os tubos foram mantidos em repouso por 15 minutos, seguindo-se centrifugação por 30 segundos a 2.800 xg e remoção do sobrenadante. O precipitado foi lavado e centrifugado a 14.000 xg durante 10 segundos, com passagens sucessivas do tampão L2, etanol 70% (duas vezes) e acetona, sendo utilizado 1 ml de cada solução. Após a evaporação da acetona, foram adicionados ao precipitado 65 µl de água Milli-Q, seguido de incubação a 56°C por 10 minutos. Após esta incubação, o tubo foi centrifugado a 14.000 xg por 1 minuto, quando se removeu o sobrenadante contendo o DNA genômico que foi mantido a 4°C até quantificação.

### Extração com sílica associada à digestão enzimática

Para o método de extração com sílica associada à digestão enzimática, utilizou-se tampão de lise e proteinase K como descrito anteriormente. Após a dissolução do precipitado, efetuou-se a extração com partículas de sílica como descrito anteriormente e o DNA genômico obtido foi mantido a 4°C até quantificação.

### Quantificação e amplificação do DNA

A quantidade e pureza do DNA genômico obtido foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (DU-640, Beckman, Palo Alto, CA, EUA). O DNA genômico foi amplificado utilizando-se da PCR e iniciadores para parte do éxon 7 (190 pares de bases - pb) do gene da citoqueratina humana tipo 14 (CK-14), que se localiza no cromossomo 17q. A seqüência dos iniciadores foi obtida com base no GeneBank (número de acesso J00124), sendo 5'-GTTCTGAACCAAGAACTGAGGG-3' e 5'-CCAGAGAGAGGCGAGAATTA-3'. A reação foi realizada em um termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc., Watertown, MS, EUA) adicionando-se os seguintes reagentes a um tubo de 0,5 ml: formamida 1%, tampão 1X (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4; KCl 500 mM), dNTPs 0,25 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, iniciadores 10 pM; Taq polymerase (Life Technologies, São Paulo, Brasil) 1 U; 100 ng de DNA e H<sub>2</sub>O estéril para 25 µl. A ciclagem utilizada foi de desnaturação inicial a 95°C/3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C/1 minuto, associação a 58°C/1 minu-

to, extensão a 72°C/50 segundos, com uma extensão final de 72°C durante 7 minutos. O sucesso da amplificação do DNA foi verificado pela eletroforese do produto (8 horas; 2 Watts) em gel de poliacrilamida 8% contendo glicerol 5%, utilizando-se uma cuba vertical (Life Technologies Gaithersburg, MD, EUA) com tampão de corrida TAE 0,5X (Tris-HCl, 0,04 M; ácido acético glacial 0,02 M; EDTA 0,01 M). Para a visualização das bandas, o gel foi corado com prata segundo protocolo de SAMBROOK *et al.*<sup>9</sup> (1989), e secado em papel celofane para preservação.

## RESULTADOS

A quantidade e pureza do DNA genômico de ambos os tecidos, utilizando-se as três técnicas, foram satisfatórias para a realização da PCR e os resultados podem ser observados na Tabela 1. Houve amplificação do éxon 7 da CK-14 a partir do DNA genômico obtido dos dois tecidos, pela técnica de extração com fenol e com sílica associada à digestão enzimática. Não se obteve amplificação do DNA genômico obtido a partir da extração com sílica sem digestão enzimática (Figura 1).

## DISCUSSÃO

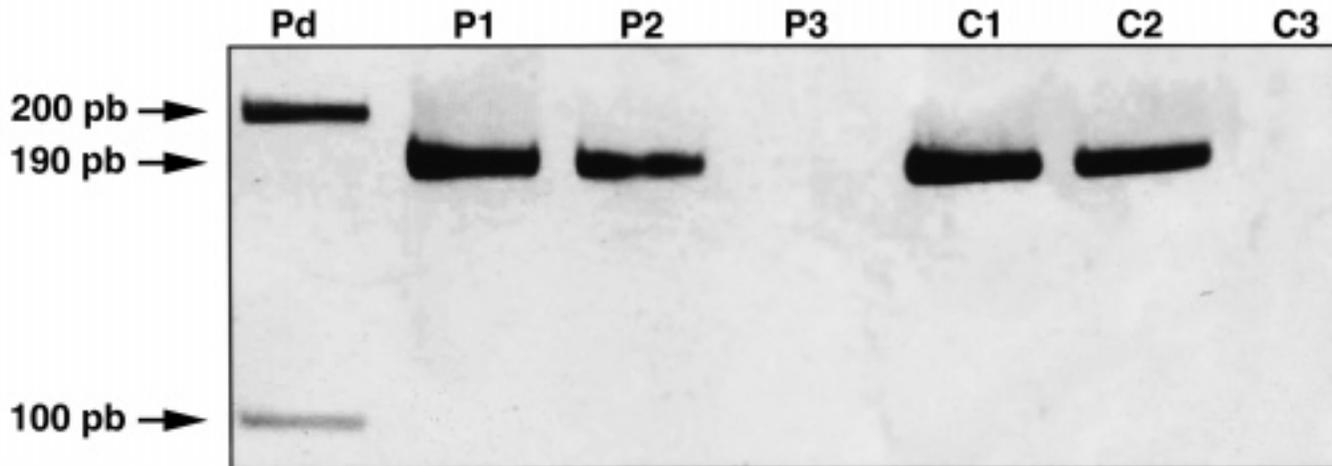
As técnicas utilizadas e otimizadas no nosso laboratório mostraram que os métodos baseados na digestão enzimática (digestão com proteinase K), independentemente do método de extração do DNA genômico (fenol ou partículas de sílica), resul-

**TABELA 1** - Quantidade (valor de 260), pureza (valor da relação 260/280) e concentração do DNA obtidos a partir das três técnicas de extração para os casos de hiperplasia fibrosa inflamatória (P) e mucosa bucal normal (C).

Casos	OD* 260	OD 280	Relação 260/280	Concentração de DNA** (µg/µl)
P1	0,0239	0,0111	2,1615	0,239
P2	0,0139	0,0103	1,3472	0,139
P3	0,0087	0,0064	1,3709	0,087
C1	0,0256	0,0112	2,2748	0,256
C2	0,0063	0,0040	1,5633	0,063
C3	0,0180	0,0107	1,6822	0,180

\*Densidade óptica. \*\*Valor obtido através da fórmula:  $(OD_{260} \times 50 \times \text{fator de diluição}) / 1000$ .

P1/C1: extração com fenol do material parafinado/congelado. P2/C2: extração com sílica/enzima do material parafinado/congelado. P3/C3: extração com sílica do material parafinado/congelado.



**FIGURA 1**- Amplificação do éxon 7 da CK-14 (190 pb) do DNA genômico obtido a partir da extração com fenol do material parafinado/congelado (P1/C1) e da extração com sílica/enzima do material parafinado/congelado (P2/C2). O DNA genômico obtido a partir da extração com sílica do material parafinado/congelado (P3/C3) não apresentou amplificação. Peso molecular em pares de base (pb) (eletroforese em gel de poliacrilamida 8% com glicerol 5%).

taram em material com quantidade e pureza satisfatórias para amplificação do DNA pela técnica da PCR. A técnica de isolar ácidos nucleicos de tecidos/células em quantidade, pureza e integridade suficientes é uma fase essencial na prática da biologia molecular. A quantidade, pureza e integridade do ácido nucleico extraído dependem de muitos fatores e têm uma grande influência no resultado das técnicas que serão nele aplicadas, como por exemplo, na PCR<sup>11</sup>.

A fixação de tecidos com formol a 10% é um método prático e eficiente para a preservação arquitetural do tecido, sendo assim um método largamente utilizado em anatomia patológica. Porém, esse tipo de fixação resulta no envelhecimento de proteínas nucleares, na formação de ligações entre proteínas e DNA, assim como na desfragmentação do DNA<sup>4</sup>. Portanto, a extração de DNA de material fixado em formol não constitui uma metodologia fácil de ser realizada. Existem vários trabalhos na literatura que utilizam técnicas e estratégias diferentes para a obtenção de DNA de tecido fixado em formol para a aplicabilidade na PCR ou em outras abordagens de biologia molecular<sup>1,2,5,10</sup>. Com finalidade de comparação, nós utilizamos em nosso experimento fragmentos de tecidos fixados e não-fixados em formol e não verificamos diferenças na amplificação do DNA quanto a esta variável, de forma que tecidos fixados em formol potencialmente fornecem DNA de qualidade e quantidade suficientes para experimentos em biologia molecular.

Com exceção dos ácidos nucleicos produzidos *in vitro* (produtos da PCR), na técnica de extração de DNA, a primeira fase representa a ruptura ou lise das membranas celulares com a finalidade de liberar os componentes citoplasmáticos e/ou nucleares intracelulares. Entre as metodologias utilizadas com esta finalidade, temos a fervura, a digestão enzimática (proteínase K, lisozima), a ruptura mecânica (homogeneização), as ondas sonoras (sonicação), os detergentes (SDS, Triton X-100) e soluções (solução salina hipotônica), na dependência do tipo da amostra ou célula<sup>1,10,11</sup>.

Freqüentemente, as células de animais podem requerer a utilização de duas ou mais substâncias com a finalidade de romper a matriz tecidual e assim com melhor disponibilização das células para a substância de lise. SEPP *et al.*<sup>10</sup> (1994) utilizaram fervura ou digestão com proteínase K associados com uma solução de resina quelante (Chelex-100<sup>®</sup>), para avaliar a extração de DNA de material fixado e parafinado, e observaram que ambas estratégias proporcionaram a obtenção de DNA para utilização na PCR. BLOOM *et al.*<sup>1</sup> (1990) utilizaram em seu protocolo para a obtenção de ácidos nucleicos, a partir de soro, urina humana e colônias de bactérias, o detergente Triton X-100 e o tiocianato de guanidina, verificando também a efetividade dessas substâncias na ruptura ou lise das membranas celulares. ISOLA *et al.*<sup>4</sup> (1994) utilizaram para a extração de DNA de material fixado e parafinado o detergente SDS e a digestão enzimática

ca com proteinase K, verificando a validade dessas substâncias na extração do DNA.

Além das diferentes substâncias, o tempo no qual as células ficam em contato e as concentrações das substâncias, influenciam na qualidade/quantidade final de DNA extraído. ISOLA *et al.*<sup>4</sup> (1994) verificaram que a digestão com proteinase K em baixa concentração e por longo período de tempo (3-5 dias) determinam uma qualidade/quantidade final de DNA melhor que digestão com proteinase K em alta concentração e por curto período de tempo. Assim como estes autores, nós utilizamos em dois de nossos protocolos a proteinase K em baixa concentração, e por longo tempo. Estes parâmetros podem justificar a baixa quantidade de DNA e a alta quantidade de proteína obtida pelo protocolo de extração da sílica, em que não se utilizou a proteinase K e foi realizado em curto período de tempo (Tabela 1, casos P3/C3). Este fato pode representar a causa mais provável da não amplificação pela PCR do DNA obtido com esta metodologia de extração. O mecanismo pelo qual a proteinase K por longo período de tempo proporciona uma qualidade final melhor na extração de DNA ainda é desconhecido, sendo que para ISOLA *et al.*<sup>4</sup> (1994) este efeito pode estar relacionado a uma reversão parcial do enovelamento de proteínas criado pela fixação com formol.

Após a obtenção do lisado contendo proteínas, ácidos nucleicos (DNA/RNA) e lípidos, existe a necessidade de separar os ácidos nucleicos das outras moléculas. O método mais utilizado para essa separação emprega os solventes orgânicos fenol, clorofórmio e álcool isoamílico. O princípio dessa separação é a diferença de solubilidade dos ácidos nucleicos, proteínas e lípidos nestes solventes orgânicos, de forma que após a realização desta separação se obtém uma fase aquosa onde se encon-

tra o ácido nucléico<sup>4,11</sup>. A propriedade de ligação do DNA com a sílica faz com que esta substância também possa ser utilizada na purificação de ácidos nucleicos<sup>1</sup>. Assim como ISOLA *et al.*<sup>4</sup> (1994) e BLOOM *et al.*<sup>1</sup> (1990), nós utilizamos em nossa metodologia fenol, clorofórmio e álcool isoamílico e partículas de sílica para a separação e captação do DNA, verificando que ambas substâncias podem ser utilizadas com esta finalidade.

Após a fase de separação, o DNA deve ser recuperado e isto pode ser realizado por precipitação através de centrifugação, sendo que a adição de etanol ou acetona aumentam a pureza das preparações de DNA<sup>1,4,11</sup>. Nós utilizamos estas duas substâncias na fase final de precipitação do DNA, tanto na metodologia de extração com fenol como na de partículas com sílica.

## CONCLUSÕES

Nossos achados nos permitem concluir que, em qualquer dos dois métodos empregados (fenol ou sílica), a etapa de digestão enzimática foi fundamental na obtenção de DNA genômico de material fixado em formol e embebido em parafina. A otimização desta técnica de extração de DNA nos permitiu utilizar esse ácido nucléico na reação da PCR com resultados satisfatórios. A utilização desta metodologia é possível e viável de ser utilizada em laboratórios de patologia, e a opção por uma delas fica a critério do laboratório, na dependência de fatores como custo e adaptação à técnica.

## AGRADECIMENTOS

À CAPES pelo apoio. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo patrocínio (processo nº 97/13228-5).

---

MESQUITA, R. A.; ANZAI, E. K.; OLIVEIRA, R. N.; NUNES, F. D. Evaluation of three methods of DNA extraction from paraffin-embedded material for the amplification of genomic DNA by means of the PCR technique. **Pesqui Odontol Bras**, v. 15, n. 4, p. 314-319, out./dez. 2001.

There are several protocols reported in the literature for the extraction of genomic DNA from formalin-fixed paraffin-embedded samples. Genomic DNA is utilized in molecular analyses, including PCR. This study compares three different methods for the extraction of genomic DNA from formalin-fixed paraffin-embedded (inflammatory fibrous hyperplasia) and non-formalin-fixed (normal oral mucosa) samples: phenol with enzymatic digestion, and silica with and without enzymatic digestion. The amplification of DNA by means of the PCR technique was carried out with primers for the exon 7 of human keratin type 14. Amplicons were analyzed by means of electrophoresis in an 8% polyacrylamide gel with 5% glycerol, followed by silver-staining visualization. The phenol/enzymatic digestion and the silica/enzymatic digestion methods provided amplicons from both tissue samples. The method described is a potential aid in the establishment of the histopathologic diagnosis and in retrospective studies with archival paraffin-embedded samples.

UNITERMS: DNA; Polymerase chain reaction; Keratin.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M. *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 3, p. 495-503, Mar. 1990.
2. CHEN, B.; CLEJAN, S. Rapid preparation of tissue DNA from paraffin-embedded blocks and analysis by polymerase chain reaction. **J Histochem Cytochem**, v. 41, n. 5, p. 765-768, May 1993.
3. GOELZ, S. E.; HAMILTON, S. R.; VOLGELSTEIN, B. Purification of DNA from formaldehyde-fixed and paraffin-embedded human tissue. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 130, n. 1, p. 118-126, July 1985.
4. ISOLA, J.; DE VRIES, S.; CHU, L. *et al.* Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. **Am J Pathol**, v. 145, n. 6, p. 1301-1308, Dec. 1994.
5. JACKSON, D. P.; LEWIS, F. A.; TAYLOR, G. R. *et al.* Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction. **J Clin Pathol**, v. 43, n. 6, p. 499-504, June 1990.
6. KACZOROWSKI, T.; SEKTAS, M., SZYBALSKI, W. Rapid preparation of denatured double-stranded DNA templates for sequencing. **Mol Biotech**, v. 11, n. 2, p. 199-200, Apr. 1999.
7. PINTO, A. P.; VILLA, L. L. A spin cartridge system for DNA extraction from paraffin wax-embedded tissues. **Mol Pathol**, v. 51, n. 1, p. 48-49, Feb. 1998.
8. SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F. A. *et al.* Enzymatic amplification of  $\beta$  globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, Dec. 1985.
9. SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning** – a laboratory manual. 2. ed. USA : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 1886 p.
10. SEPP, R.; SZABÓ, I.; UDA, H. *et al.* Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. **J Clin Pathol**, v. 47, n. 4, p. 318-323, Apr. 1994.
11. WALKER, M. R.; RAPLEY, R. **Guia de rotas na tecnologia do gene**. São Paulo : Atheneu Editora, 1999. 334 p.

Recebido para publicação em 05/03/01  
Enviado para reformulação em 23/07/01  
Aceito para publicação em 15/08/01

# Participe da 19<sup>a</sup> Reunião Anual da SBPqO

- Setembro de 2002 -



Cerimônia de premiação na 18<sup>a</sup> reunião Anual da SBPqO



Prêmio E. H. Hatton  
Prêmio Myaki Issao  
Prêmio Fórum Científico  
Projetos de Pesquisa  
Consultório Científico  
Curso Pré-Congresso  
Pesquisa-Ensino  
Pesquisa Odontológica de Ação Coletiva

Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica  
Av. Professor Lineu Prestes, 2227 - CEP 05508-900  
Cidade Universitária - São Paulo - SP  
Tel./Fax: (11)3818-7855 - e-mail: sbpqoisbpo.org.br  
[www.sbpqo.org.br](http://www.sbpqo.org.br)

Visão panorâmica de Aguar de Lindóia