

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Curso de Ciências Biológicas Bacharelado



Trabalho de Conclusão de Curso

**Comparação entre diferentes métodos de obtenção de DNA de origem bucal
em estudos epidemiológicos**

Angelita Milech

Pelotas, 2018

Angelita Milech

Comparação entre diferentes métodos de obtenção de DNA de origem bucal em estudos epidemiológicos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Isabel Oliveira de Oliveira

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M642c Milech, Angelita

Comparação entre diferentes métodos de obtenção de dna de origem bucal em estudos epidemiológicos / Angelita Milech ; Isabel Oliveira de Oliveira, orientadora. — Pelotas, 2018.

41 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) — Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Biorrepositório. 2. Saliva. 3. Dna. 4. Oragene. 5. Dna.sal. I. Oliveira, Isabel Oliveira de, orient. II. Título.

CDD : 616.31

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Angelita Milech

Comparação entre diferentes métodos de obtenção de DNA de origem bucal em estudos epidemiológicos

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de bacharel em ciências biológicas, Instituto de Biologia Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 09 de fevereiro de 2018

Banca examinadora:

Prof. Dr. Isabel Oliveira de Oliveira (orientadora)
Doutora em Ciências Biológicas (Fisiologia) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Prof. Dr. Luciana Tovo Rodrigues
Doutora em Genética e Biologia Molecular Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Prof. Dr. Gustavo Dias Ferreira
Doutorado em Ciências Biológicas (Fisiologia) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Para todos que já tiveram um momento de fraqueza. Não vai doer para sempre, então não deixe isso afetar o que há de melhor em você.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente minha família. Aos meus pais Rubin e Ruth por acreditarem em mim e não me deixarem desistir. Por me encorajarem a enfrentar meus medos e inseguranças. Por me acolher em seus braços calorosos. Por ser a base do que sou. Por me ouvir me apoiar e me ajudar a fazer escolhas. Por sempre estarem presentes, mesmo que distantes fisicamente, e pelo esforço em me ajudar a concretizar meus objetivos. Obrigada por tudo, jamais chegaria aqui sem vocês.

Aos meus padrinhos Oldi e Gilda vocês fazem parte dessa conquista, palavras não expressam todo carinho e gratidão que sinto por vocês. Obrigada por me abrigarem em seu lar, pelo aconchego, por tornar essa trajetória possível. Obrigada por fazerem dos meus dias, durante esses cinco anos, leves e descontraídos com conversas e risadas. Obrigada por todo cuidado e proteção que sempre tiveram.

Alice e Patrícia entramos juntas nessa caminhada, cheias de sonhos, dúvidas, incertezas. Aprendemos muito juntas, sorrimos, choramos, crescemos, compartilhamos muito mais do que apenas a mesma sala de aula. Alice, admiro sua coragem e força por buscar seus ideais e sonhos. Por mais que não tenha seguido no curso sempre esteve conosco nos apoiando e fazendo sorrir. Patrícia minha dupla para quase todos os trabalhos acadêmicos. Sempre admirei a sintonia que tivemos em discutir e debater as questões, uma complementando a outra. Só tenho a agradecer a vocês duas por todos os momentos que estivemos juntas, pela amizade, pelo companheirismo. Muito obrigada por fazerem parte desta trajetória.

Elisa e Pammela vocês duas nem se conhecem, mas ambas tem a mesma importância para mim. Sempre estiveram disponíveis para me ouvir e aconselhar. Obrigada pela empatia recíproca. Pelo incentivo e apoio constantes. Por dedicar um tempo de suas vidas para me fazerem olhar por outros ângulos buscando pelo lado positivo. Obrigada por serem as pessoas extraordinárias que são, pela beleza de nossa amizade. Obrigada por nunca deixarem de acreditar em mim. Com vocês aprendi muito.

Aos meus amigos Angélica, Bruna, Geandro, Gustavo e Roberto agradeço pela amizade e companheirismo. Obrigada por todos os momentos de descontração que tivemos, pelas jantas de última hora, pelo “Vamos? Vamos!”. Pelas alegrias compartilhadas. Pela leveza dos sorrisos e seriedade dos conselhos.

Agradeço também a todos os professores que me acompanharam durante a graduação, em especial a professora Gladis por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional. Tenho grande admiração pela senhora. Obrigada por todos os ensinamentos, seja em aula no laboratório ou até mesmo no corredor. Obrigada pelos cafés, abraços e sorrisos, pelos conselhos e incentivo. Significa muito para mim nossa amizade e o quanto a senhora acredita em meu potencial.

Franciéle nos conhecemos há pouco, mas isso não limita a importância que tens na minha formação. Você me acolheu em sua pesquisa, me ensinou muito mais do que procedimentos laboratoriais. Obrigada pela confiança que tens em mim. É muito prazeroso e gratificante trabalhar com você.

Agradeço as meninas do laboratório do centro de pesquisas epidemiológicas por toda ajuda. Principalmente a Clarice, pelo apoio neste trabalho, pelos conselhos, pela paciência em me ouvir e ajudar no meu crescimento profissional e pelas risadas compartilhadas. E a Gabriela por deixar o ambiente leve e descontraído, pelas conversas e sorrisos.

Agradeço a minha orientadora, pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho. Pela paciência, pelo suporte e pelas correções. Muito obrigada pelo tempo destinado a me ajudar.

Manifesto meus agradecimentos à CNPq pelo fomento à pesquisa através da bolsa de iniciação científica a mim concedida.

Agradeço aos meus colegas e amigos Bruna, Lucas, Márcio, Pedro, Sthefáni e Yasmin, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Pelo crescimento conjunto. Pela amizade e lealdade. Agradeço também a todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos a mim, fazendo isso valer à pena. Muito obrigada.

*“O futuro pertence àqueles que acreditam na
beleza de seus sonhos.”
(Eleanor Roosevelt)*

Resumo

MILECH, Angelita. **Comparação entre diferentes métodos de coleta de saliva para obtenção de DNA em estudos epidemiológicos.** 2018. 41f. Trabalho de conclusão de curso- Graduação em Ciências Biológicas Bacharelado, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 2018.

Uma crescente busca por biomarcadores que possibilitem o desenvolvimento de linhas de pesquisa para identificação de fatores de risco, exposição, detecção precoce de doenças, diagnóstico, prognóstico e produtos terapêuticos em diferentes situações clínicas tem sido observada. Dessa forma, no campo da epidemiologia surge a necessidade da organização de biorrepositórios ou biobancos com grande número de amostras biológicas de alta qualidade e bem documentadas para que os estudos tenham poder estatístico significativo. Na formação do biorepositório de DNA do Centro de Pesquisas Epidemiológicas de Pelotas diferentes materiais biológicos têm sido usados, entre eles sangue e células bucais coletadas por meio da saliva ou de swabs. A vantagem da utilização das células bucais como fonte de DNA reside no fato de serem obtidas por métodos não invasivos. O objetivo deste trabalho foi comparar métodos de coleta de DNA bucal. Para este estudo foram utilizadas 742 amostras de saliva total de adultos (pais biológicos não participantes da coorte de 1993) coletadas utilizando o kit comercial Oragene • DNA® (OG-500) com volume total de 2 ml (solução do kit + saliva), além de 1162 amostras coletadas de crianças da segunda geração da coorte de 1993, que compareceram à clínica do CPE. Dessas, 173 foram coletadas como saliva total e 989 coletadas com auxílio de swab. Por fim comparamos dois kits comerciais para obtenção de amostras de saliva, sendo eles Oragene® e DNA.Sal™ coletadas de indivíduos adultos. A obtenção do DNA foi realizada pelo método de extração orgânica. A quantificação das concentrações de DNA foi feita em espectrofotômetro (Nanovue™), assim como a avaliação da pureza do DNA através da relação 260/280nm (RAT260/280). Os testes estatísticos foram realizados em software *STATA 12.0*. As amostras dos adultos foram capazes de gerar, aproximadamente, o dobro (60,6 ng/μl) de concentração de DNA comparado às amostras das crianças que coletaram pelo método de saliva total e o triplo em relação a crianças que coletaram com swab bucal. O volume médio de saliva coletada de crianças foi de 2,0 ml proporcionando um rendimento médio de 62 μg de DNA por indivíduo. Em contrapartida, através do método de coleta com swab a concentração média de DNA foi de 38 μg por amostra. O teste estatístico (Wilcoxon rank-sum test) indicou que os kits apresentaram diferenças na quantidade de concentração de DNA obtido ($p= 0,0350$). O kit Oragene® gerou uma média de 17,0 ng/μl enquanto o valor médio de concentração de DNA obtido com o kit DNA.Sal™ foi de 6,00 ng/μl. Em relação à pureza, novamente houve diferença significativa entre os kits ($p= 0,0088$) com uma média da RAT 260/280nm de 1,8 para o kit oragene® e de valor inferior ao esperado para o kit DNA.Sal™. Conclusão: Em crianças, a obtenção de DNA por meio de coleta de saliva apresentou melhores resultados de concentração e de qualidade em relação às amostras de swab. Sugere-se que sempre que possível, a coleta de saliva deva ser escolhida em detrimento à coleta com swab. Em adultos, a coleta de saliva apresentou bons resultados de qualidade e quantidade.

Palavras-chaves: biorrepositórios; saliva; DNA; Oragene®; DNA.Sal

Abstract

MILECH, Angelita. Comparison between different collection methods for obtaining buccal cell DNA in epidemiological studies. . 2018. 41f. Trabalho de conclusão de curso- Graduação em Ciências Biológicas Bacharelado, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 2018.

A growing search for biomarkers that allow the development of lines of research which aim to identify risk factors, exposure, early detection of diseases, diagnosis, prognosis and therapeutic products in different clinical situations has been observed. In the field of epidemiology, a necessity is arising for the organization of biorepository or biobanks with a high number of biological samples of high quality and well documented in order to allow studies with significant statistical power. In the organization of the DNA biorepository of the Pelotas Epidemiological Research Center (ERC) different biological materials have been used, among them blood and buccal cells collected through saliva or swabs. The advantage of using buccal cells as a source of DNA lies in the fact that they are obtained by non-invasive methods. Therefore, the present work aimed to compare methods of collection and extraction of buccal cell DNA. This study included 742 saliva samples from adults (non-cohort parents) that were collected using the Oragene • DNA® commercial kit (OG-250) with a final volume of 2 ml (kit solution plus saliva), in addition to 1162 samples collected from children attended in the ERC clinic. Of these, 173 were collected as total saliva and others 989 samples were collected with swabs. DNA extraction was performed using the organic extraction method. Quantification of DNA concentrations was done using a spectrophotometer (Nanovue™) as well as the quality by evaluation of 260/280nm ratio. Statistical tests were performed on STATA 12.0 software. The mean volume of saliva collected from children was 2.0 ml giving an average yield of 62 µg of DNA per individual. In contrast, through the swab collection method, the mean DNA concentration was 38 µg per sample. Since total saliva comprises higher concentration rates and DNA purity, we compared two commercial kits for obtaining saliva samples, such as Oragene® and DNA.Sal™. It was observed differences in the amount of DNA concentration obtained between the two kits ($p = 0.0350$). From the Oragene® kit it was obtained a mean of 17.0 ng / µl while the mean DNA concentration value obtained with the DNA.Sal™ kit was 6.00 ng / µl. Regarding DNA purity, there was again a significant difference between the kits ($p = 0.0088$). Whereas a 260/280nm RAT mean of 1.8 was found for the Oragene® kit, a value that not fall within the expected range for DNA purity was found for the DNA.Sal™. Saliva samples from adults were able to generate approximately two times higher DNA concentration (60.6 ng / µl) compared to saliva samples from children and a triple amount when compared to buccal cell sample collections with swab. Conclusion: in children, the DNA yield through saliva collection showed better concentration and quality results in relation to swab sample collection. It is suggested that whenever possible, the collection of saliva should be chosen in detriment to the swab collection. In adults, the saliva collection showed good results for quality and quantity.

Key words: biorepository, saliva, DNA, oragene® and DNA.Sal™

Lista de Tabelas

Tabela 1: Análise descritiva das amostras pertencentes à segunda geração da coorte de 1993 Pelotas, RS, e seus pais não coorte.....	27
Tabela 2: Análise comparativa sobre obtenção de DNA a partir de swab e de saliva total de crianças pertencentes a 2ª geração da coorte de 1993, Pelotas RS.	28
Tabela 3: Análise comparativa sobre a obtenção de DNA a partir dos distintos kits comerciais de coleta de saliva.....	29

SUMÁRIO

1 Introdução	12
1.1 Objetivo	14
1.1.1 Objetivo geral	14
1.1.2 Objetivos específicos.....	14
2 Revisão de literatura	15
2.1 Biobancos e biorrepositórios	15
2.2 Biobancos e biorrepositórios de DNA.....	17
2.3 Diferentes métodos de coleta de células bucais	17
2.4 Vantagens e desvantagens da saliva como fonte de DNA.....	19
2.5 Diferenças nas concentrações de DNA de acordo com a idade	21
2.6 Qualidade do DNA	21
3 Materiais e métodos	24
4 Resultados	27
5 Discussão.....	30
6 Conclusão	33
Referências	34
Anexos	42

1 Introdução

Nos últimos anos, as inovações tecnológicas na área da saúde têm permitido a análise de um grande número de dados obtidos através da investigação de diversos biomarcadores, simultâneos ou não, possibilitando o desenvolvimento de linhas de pesquisa para identificação de fatores de risco e de exposição, detecção precoce de doenças, diagnóstico, prognóstico e obtenção de produtos terapêuticos, em diferentes situações clínicas. Para a rápida progressão desses estudos, o acesso a materiais biológicos de alta qualidade, bem documentados e com informações clínicas, é um ponto crucial a ser considerado. Frente ao exposto, é de fundamental importância a implementação de biobancos (ASHTON-PROLLA et al., 2009). Estes podem abrigar uma gama de materiais biológicos, tais como: fluídos corporais (soro, plasma, papa de leucócitos, urina), células, moléculas (DNA, RNA e proteínas) e tecidos parafinados (CANAZZO et al., 2013).

Tomando-se em consideração, o estabelecimento de biobancos de DNA em estudos epidemiológicos, é fundamental que sejam coletadas amostras de uma porcentagem representativa da população-alvo, com o objetivo de aumentar o poder estatístico das análises de associação entre variantes genéticas e doenças. A pureza, a integridade, e a concentração de DNA isolados afetam diretamente as taxas de sucesso da genotipagem. Além disso, a quantidade de DNA genômico obtido é de importância para planejamento de estudos futuros. Amostras de sangue venoso periférico têm mostrado atender satisfatoriamente estes pré-requisitos (PEPLIES et al., 2010). No entanto, estudos epidemiológicos muitas vezes precisam de fontes alternativas, por exemplo, quando os indivíduos do estudo são relutantes em fornecer uma amostra de sangue, ou quando apenas um protocolo de coleta auto-administrado é logisticamente ou economicamente

viável, ou como fonte de back-up de DNA em estudos que coletam amostras de sangue. Essa necessidade tem alimentado pesquisas sobre técnicas para obtenção de DNA genômico de qualidade, de forma fácil, segura e menos custosa. Uma boa fonte alternativa de obtenção de DNA é através da coleta de células bucais. Essas podem ser obtidas através de coleta de saliva, swab ou enxague bucal. A saliva proporciona um grande número de células nucleadas, tais como células epiteliais, leucócitos e células de Langerhans. No entanto, também contém bactérias, vírus, fungos, sais e alimentos (SAFTLAS et al., 2004). A presença de bactérias na saliva representa uma desvantagem, porque estes microorganismos podem degradar o DNA humano. Além disso, se a amostra for mantida à temperatura ambiente, estes organismos podem facilmente crescer e proliferar (HARTY et al., 2000). Com isso diferentes métodos foram desenvolvidos para a obtenção de DNA da saliva a fim de aperfeiçoar esse procedimento.

As coortes de nascimentos ocorridos em Pelotas (RS-Brasil) nos anos de 1982, 1993, 2004 e 2015 correspondem a todos os nascidos vivos nos respectivos anos, cujas mães residiam na zona urbana da cidade no momento do parto. Essas coortes foram propostas por pesquisadores do Centro de Pesquisas Epidemiológicas da UFPEL. Os instrumentos iniciais nos estudos das coortes eram baseados em entrevistas e medidas antropométricas. Em 2010, a partir da inauguração da Clínica localizada no Centro de Pesquisa em Saúde Amilcar Gigante (UFPEL, Pelotas-RS), os participantes passaram a ser convidados a visitar a Clínica, onde o estudo de campo se desenvolve. Dessa forma, os participantes respondem às entrevistas, além de realizar diferentes exames clínicos, antropométricos, avaliação da espessura da camada íntima da carótida interna por ultrassonografia, densitometria óssea (DEXA), espirometria, avaliação da composição corporal (Bod-pod), e coleta de amostras biológicas (sangue, saliva). A coleta de sangue destina-se à obtenção de amostras de soro, plasma e extração de DNA; a coleta de saliva destina-se à extração de DNA. Assim, foi gerado o biorepositório das coortes (BARROS et al., 2008; VICTORA et al., 2008), com milhares de amostras biológicas coletadas em diferentes acompanhamentos e armazenadas no Laboratório de Processamento e Armazenamento de Material Biológico localizado no prédio da Clínica. Frente a

preocupação constante com o controle de qualidade e de quantidade das amostras obtidas e armazenadas nos acompanhamentos das coortes foi proposto o presente estudo.

Em 2015-16 foi realizado o acompanhamento dos 22 anos dos participantes da coorte de 1993 para coleta de dados de saúde por meio de entrevistas, avaliação clínica e coleta de material biológico. Nessa oportunidade, foram também obtidas informações e material biológico dos filhos dos participantes da coorte (2ª geração) e dos pais biológicos não pertencentes à coorte (GONÇALVES *et al.*, 2017).

1.1 Objetivo

1.1.1 Objetivo geral

Este trabalho tem o objetivo de comparar métodos de coleta e de extração de DNA de células bucais de amostras de adultos e de crianças envolvidas com a coorte de nascimento de Pelotas de 1993.

1.1.2 Objetivos específicos

- Descrever a concentração média de DNA e pureza, avaliada por espectrofotometria, obtida na coleta de DNA bucal no acompanhamento de 22-23 anos dos adultos (cônjuges dos participantes da coorte de 1993 ou pais biológicos das crianças) através da coleta de saliva e das crianças filhas dos participantes da coorte de 1993.

- Comparar os rendimentos de DNA das amostras coletadas da segunda geração da coorte de 1993, as quais foram obtidas através de swab ou de saliva total.

- Avaliar a relação da idade das crianças e o método de coleta na concentração de DNA.

- Comparar os rendimentos de DNA obtidos através da coleta de saliva por meio dos kits comerciais: kit Oragene®.DNA OG-250 e kit DNA.SAL™.

2 Revisão de literatura

2.1 Biobancos e biorrepositórios

Na literatura, os termos, biobanco e biorrepositório, confundem-se. Ambas as palavras, muitas vezes, são usadas como sinônimos de coleção organizada de material biológico humano e informações associadas armazenadas para propósitos de uma ou mais pesquisas (KAUFFMANN, 2008). Para a legislação Brasileira atual, biorrepositório difere de biobanco. A Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) no. 441/2011 define biorrepositório como “coleção de material biológico humano, coletado e armazenado ao longo da execução de um projeto de pesquisa específico, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré- definidas, sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais” (BRASIL, CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, 2011).

Os biobancos variam desde biobancos clínicos focados em determinadas doenças, biobancos populacionais e biobancos associados a pequenos e grandes estudos de investigação (ZIELHUIS, 2012). Variam também em relação à finalidade do recolhimento de amostras, dos fins clínicos, ou decorrentes de investigação científica ou judiciais (SHANKAR et al., 2011).

Biobancos/biorrepositórios propostos para estudos epidemiológicos têm sua natureza focada em biomarcadores de exposição e de desfecho, formados por um grande número de amostras biológicas. Tais bancos são geralmente propostos a partir de um projeto de corte/ou de caso-controle, exposto e não-exposto (saudável), com o objetivo de estudar marcadores biológicos (séricos, genéticos, urinários, etc) e sua associação com uma grande quantidade de

outras informações coletadas tais como: informações sociodemográficas, antropométricas, clínicas, comportamentais, etc...

Existem várias fontes de materiais biológicos a partir das quais se podem investigar biomarcadores. Destacamos, por exemplo, a saliva. O interesse da saliva como fluido de diagnóstico avançou exponencialmente nos últimos anos apresentando potencial para se tornar uma amostra de primeira escolha. A coleta de saliva apresenta diversas vantagens como, a facilidade de coleta, o processo de doação e o baixo custo, sendo eficaz na triagem de grandes populações. Apresenta um risco mínimo de contração de infecção durante a coleta, e pode ser usada em situações desafiadoras como a obtenção de amostras de crianças ou pacientes com deficiência ou idosos, nos quais a coleta de sangue pode ser difícil de realizar. A saliva é também um fluido "em tempo real", porque as glândulas salivares são glândulas exócrinas que produzem proteínas indicativas de saúde do indivíduo e do bem-estar no momento da coleta. Estas características tornam possível monitorar vários biomarcadores destes indivíduos (KAUFMAN et al., 2002).

Além disso, o avanço na praticidade, eficiência e sensibilidade das técnicas baseadas em ensaios biomoleculares, resultou na transição de bioindicadores específicos da saúde oral presentes na saliva, para biomarcadores sistêmicos com utilidade abrangente. Abordar a regulação do desenvolvimento e epigenética de processos fisiológicos é um próximo passo lógico na análise salivar porque esses biomarcadores estão na interseção entre herança genética e adaptação dependente do ambiente. A realização desse objetivo requer a identificação de marcadores epigenéticos salivares específicos e confiáveis que reflitam alterações fisiológicas ambientalmente responsivas, capazes de afetar a relação entre exposições ao longo da vida e desfechos de saúde não adaptados durante o desenvolvimento e envelhecimento (MEANEY et al., 2007; THEALL et al., 2013; MITCHELL et al., 2014).

2.2 Biobancos e biorrepositórios de DNA

A decodificação do genoma humano foi um avanço para a ciência no campo da genética, permitindo uma melhor compreensão por parte dos cientistas sobre a estrutura e o funcionamento do DNA e um aumento das aplicações oriundas do conhecimento genético. Com a identificação de grande número de genes humanos, passou a ser factível a existência de grandes bancos que armazenassem amostras humanas com as quais pudessem ser feitas análises de DNA e pesquisas no campo da genômica, sobretudo, estudos de população, ou seja, aqueles que têm por unidade de análise uma grande quantidade de indivíduos (CAMBON-THONSEN et al., 2003).

De modo geral é possível considerar que os biobancos/biorrepositórios de DNA concentram parte significativa dos materiais de pesquisa em Genética, administrando a guarda destes materiais, disponibilizando o acesso aos pesquisadores e realizando a intermediação entre doadores e cientistas, configurando-se em um dispositivo indispensável para a pesquisa em Genética humana. Há varias fontes de obtenção de DNA desde fluidos biológicos sendo mais comumente utilizado o sangue total ou periférico, células bucais, escarro e outros fluidos corpóreos que possam ser congelados e guardados. Também é possível extrair material genético de bulbos capilares e tecidos parafinados entre outros, que podem ser utilizados como fonte de DNA (DOLINSKY & PEREIRA, 2007). Aqui nos deteremos em focar em células bucais.

2.3 Diferentes métodos de coleta de células bucais

Os métodos de coleta de células bucais são de dois tipos: os procedimentos secos, que utilizam uma escova citológica ou outros implementos para raspagem da mucosa oral, e procedimentos molhados que envolvem bochechos com soluções anti-sépticas e expectoração em um recipiente de coleta, além da coleta de saliva propriamente dita. Há vantagens e desvantagens associadas a cada tipo de coleta. As vantagens da coleta através de procedimentos secos, como o método cytobrush, são de logística simples para envios em grande escala e processamento eficiente e econômico para

arquivamento de longo prazo. As vantagens do método de expectoração parecem corresponder a uma média mais alta de rendimentos de DNA, fragmentos de DNA mais longos e possivelmente porcentagens mais altas de DNA humano (HEARTH et al., 2001, FEIGELSON et al., 2001).

Os primeiros estudos usando líquido enxaguante bucal, para coleta de DNA para ensaios baseados em PCR, usaram produtos salinos que foram processados ou congelados imediatamente após a coleta (TOBAL, 1989; HAYNEY, 1995). Hayney *et al.*, (1995) avaliaram a estabilidade das amostras de solução bucal salina armazenadas por 7 dias em temperaturas às quais as amostras são susceptíveis de serem expostas se coletadas e enviadas por correio. Este estudo indicou que as amostras armazenadas a 25°C e a 37°C tendiam a ter maiores quantidades de DNA de alto peso molecular do que as amostras armazenadas a temperaturas inferiores a -20°C e a 4°C, sugerindo a presença de DNA de origem bacteriana. Similarmente, um estudo conduzido por Walsh *et al.*, (1991) sugeriu a presença de DNA de origem predominantemente bacteriana em cotonetes armazenados durante 4 dias a 37 °C. Lum e Le Marchand (1998) propuseram o uso de um enxaguante bucal contendo álcool, de marca familiar, que seria mais apropriado para a auto coleta de amostras e envio por correio em estudos epidemiológicos porque o teor de álcool provavelmente reduziria o crescimento bacteriano durante o envio. De fato, estes autores descobriram que o armazenamento do produto do enxaguante bucal com álcool à temperatura ambiente ou a 37°C durante 7 dias não afetou os rendimentos de DNA ou a capacidade de amplificar as amostras por PCR quando comparadas com as amostras armazenadas a -20°C. Este protocolo foi usado com sucesso em um estudo de coorte no Havaí, que incluiu indivíduos de origem japonesa, caucasiana e havaiana, com taxas de participação variando de 59-76% (LE MARCHAND, 2001).

Em adição, estudos pioneiros avaliando diferentes protocolos para a obtenção de DNA genômico descobriram que as células epiteliais bucais esfoliadas são promissoras fontes alternativas de DNA (RICHARDS et al., 1993; MEULENBELT et al., 1995; HARTY et al., 2000).

Frente aos diferentes métodos, entretanto, estudos recentes (RYLANDER- RUDQVIST et al., 2006; KONI et al., 2011; YOSHIZAWA et al., 2013) mostraram que a coleta usando bochechos permite maior rendimento médio de DNA, fragmentos de DNA mais longos, e, possivelmente, porcentagens mais elevadas de DNA humano em comparação a outros métodos de coleta, além de ser viável para uso em estudos de grande escala. Corroborando com isso estudos comparativos entre amostras de lavagem bucal e amostras utilizando escovas citológicas demonstraram que as amostras resultantes de bochechos são superiores àquelas provenientes de escovas citológicas, na obtenção de DNA de alto peso molecular (HANSEN et al., 2007; ROGERS et al., 2007). No entanto, este método requer manuseio de líquidos e etapas adicionais de centrifugação durante o processamento da amostra, o que resulta em custos acrescidos de materiais e processamento antes de congelar as amostras.

2.4 Vantagens e desvantagens da saliva como fonte de DNA

Além de ser menos invasiva, a coleta de saliva tem menor custo geral, menor risco de infecção e é mais simples logisticamente. As amostras de saliva estabilizadas podem permanecer em temperatura ambiente durante meses até que ocorra a extração, enquanto o sangue deve permanecer congelado para armazenamento a longo prazo e protegido de ciclos de congelamento/descongelamento (ABRAHAM et al., 2012; SUN et al., 2014). Ao contrário da coleta de sangue, a saliva não requer um profissional treinado; apenas devem ser fornecidas algumas orientações simples para a auto coleta, sendo que a amostra pode ser enviada por correio. Essas características reduzem os custos de treinamento profissional, e eliminam as complexidades logísticas associadas ao transporte e armazenamento de amostras de sangue.

A coleta de saliva também resulta em maiores taxas de participação nos estudos, como demonstrado pelos dados de um estudo que obteve uma taxa de resposta de 72% para a coleta de saliva versus 31% para coleta de sangue (HANSEN et al., 2007). Outra vantagem é que o DNA da saliva tem potencial para fornecer informações sobre o microbioma oral, uma vez que, a cavidade

oral é a primeira parte do sistema gastrointestinal e, portanto, fornece uma oportunidade única para examinar a relação simbiótica entre os indivíduos e sua microbiota colonizadora (HUMAN MICROBIOME PROJECT, 2012). Apesar de todas as vantagens descritas, ainda há relutância entre a comunidade científica em adotar protocolos a base de amostras de saliva, que em grande parte decorrem de redução do rendimento e qualidade do DNA (FREEMAN et al., 1997).

É estimado que o sangue periférico, preferencialmente utilizado para obtenção de DNA, geralmente contém $4,5-11 \times 10^3$ células nucleadas produzindo de 10-18 ug de DNA/ ml de sangue (PHILIBERT et al., 2008). A qualidade do DNA genômico de sangue é elevada e sem contaminação com DNA exógeno. Em contrapartida, a saliva contém aproximadamente $4,3 \times 10^5$ células por mililitro (DAWES, 2003). Os tipos de células encontradas na saliva são células epiteliais ou leucócitos (THIEDE et al., 2000). O volume de células epiteliais é bastante extenso na boca, pois a camada superficial de células epiteliais é substituída, em média, a cada 2,7 h (QUINQUE et al., 2006), sugerindo que é provável que haja DNA genômico intacto em amostras de saliva.

A maioria dos estudos concorda que os espécimes orais fornecem quantidades inferiores de DNA em relação ao sangue (ABRAHAM et al., 2012; NUNES et al., 2012; SUN et al., 2014; HU et al., 2012). A justificativa principal está baseada no fato de que o DNA isolado das amostras de saliva é forma frequente contaminado por DNA exógeno proveniente de bactérias, fungos e resíduos de alimentos (SUN et al., 2014; HU et al., 2012; DURDIAKOVA et al., 2012). A taxa de DNA não humano a partir de amostras de saliva varia muito entre os indivíduos, segundo estudo de Nishita *et al.*, (2009) que relatou concentrações de DNA não humano variando de 23 a 63% do total de DNA em seu estudo. Apesar das preocupações com baixa produtividade e variabilidade entre as amostras, estudos recentes relatam que a coleta de saliva ainda fornece DNA suficiente para a genotipagem e avaliação em escala genômica (ABRAHAM et al., 2012; SUN et al., 2014; DURDIAKOVA et al., 2012; BAHLO et al., 2010).

2.5 Diferenças nas concentrações de DNA de acordo com a idade

Vários estudos estimaram a qualidade e a quantidade de DNA de saliva integral para realização de estudos genéticos (HANSEN et al., 2007; NUNES et al., 2012; PHILIBERT et al., 2008; PULFORD et al., 2013; ROGERS et al., 2007; RYLANDER- RUDQVIST et al., 2006). No entanto, a literatura sobre estes parâmetros, quando se utilizam amostras de saliva inteiras coletadas de crianças, é limitado (ABRAHAM et al., 2012; KONI et al., 2011). Sugeriu-se que a coleta de células bucais nas crianças pode fornecer menores quantidades de DNA do que em adultos (SAFTLAS et al., 2004; ZHENG et al., 2001). Uma justificativa seria o fato da descamação epitelial da mucosa oral aumentar com a idade. Em consequência, isso pode significar que amostras de saliva de indivíduos mais jovens contém menos células, e pode ser um dos motivos para o fato destas amostras produzirem menos DNA do que as amostras adultas (GASSO et al., 2014). Apesar de existir outros tipos de células na saliva, como linfócitos, as células epiteliais são as mais frequentes.

2.6 Qualidade do DNA

A qualidade do DNA bucal varia de pessoa para pessoa. Em alguns casos, o DNA é mais propenso à degradação precoce. Estima-se que cerca de 30% das células coletadas de indivíduos saudáveis são apoptóticas (RUDNEY, 2006). Os hábitos e estilo de vida levam a diferenças na descamação da mucosa oral (KING et al 2002). A dieta, por exemplo, desempenha um papel importante na definição da flora oral individual que por conseguinte está diretamente relacionada com a degradação do DNA. A flora oral é extremamente diversificada e específica com base em hábitos individuais, como dieta, hábitos alimentares, hábitos de escovação, hábitos de fumar etc. (PASTER et al., 2001). O tabagismo tem várias influências sobre a mucosa oral. Podendo causar anormalidades na cavidade oral, como na língua, nas gengivas, na mucosa da boca, nos dentes e no palato sob a forma de estomatite decorrentes ao uso de nicotina e de infecções fúngicas (HAFFAJEE, 2001; SHILOAH, 2000). Todos esses fatores podem causar danos ao DNA (GLEI et al, 2005; KONIG, 2000). Adultos são mais passíveis de ser influenciados por tais fatores, principalmente pelo hábito de fumar.

Os métodos de avaliação de qualidade do DNA incluem a espectrofotometria ultravioleta (UV) para determinar a concentração de DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e a razão $A_{260}/A_{280\text{nm}}$, indicando o grau de pureza do DNA isolado. Nesta metodologia, a amostra de DNA é exposta a luz UV num comprimento de onda de 260nm e um foto-detector mede a luz que atravessa a amostra. Quanto mais luz for absorvida, maior é a concentração de ácidos nucléicos na amostra. A lei de Lambert-Beer permite relacionar a quantidade de luz absorvida com a concentração da molécula que a absorve. A um comprimento de onda de 260nm o coeficiente de extinção do DNA de cadeia dupla é $0.020 (\mu\text{g}/\text{ml})^{-1} \text{cm}^{-1}$. Assim, uma densidade ótica de 1 corresponde à concentração de 50ng/ml de DNA em cadeia dupla (PALTIEL, 2012; WAHLBERG, 2012). É ainda importante medir a absorbância a 230nm e a 280nm uma vez que é comum as amostras de ácidos nucléicos estarem contaminadas com outras moléculas. Assim, ácidos nucléicos apresentam uma absorbância máxima a um comprimento de onda de 260nm, enquanto que as proteínas absorvem luz a 280nm e outros contaminantes orgânicos a 230nm. Com base nestas leituras, é calculada a razão A_{260}/A_{280} é para indicar a pureza das amostras de DNA. O DNA puro deverá apresentar uma razão A_{260}/A_{280} que se situa entre 1,8 e 2,0.

A eletroforese é um método usado em biologia molecular para separar macromoléculas tais como proteínas ou ácidos nucléicos, baseado em propriedades físicas como o tamanho, forma e carga elétrica. A técnica apresenta basicamente um sistema de suporte (gel de agarose, por exemplo), um tampão no qual está imerso o gel e os eletrodos nas extremidades da cuba onde estão contidos o tampão e o gel. Sob a influência de um campo elétrico, moléculas carregadas e partículas migram em direção ao pólo oposto. A carga e a massa das moléculas fazem com que elas migrem em velocidades diferentes e, portanto, propiciam a separação destas (WESTERMEIER, 2005). Como os ácidos nucléicos (DNA e RNA) possuem carga elétrica negativa (devido ao grupamento fosfato) eles sempre migrarão em direção ao pólo positivo. Então, o fator determinante da taxa de migração será a massa da molécula (quando se fala em ácidos nucléicos, a massa é diretamente proporcional ao tamanho da molécula).

O tamanho do fragmento gerado pode ser estimado por comparação com a mobilidade eletroforética (distância percorrida através do gel por unidade de

tempo) de uma amostra de DNA com tamanhos conhecidos (VINOD, 2004; LEE. et al., 2012). No caso do controle de qualidade após extração, DNA de alto peso molecular íntegro surgirá como uma banda bem definida correspondente a um tamanho acima de 12kb, enquanto que o aparecimento de arrastamento indicará degradação do material genético (VINOD, 2004).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) permite que fragmentos de DNA sejam amplificados de forma específica e exponencial em poucas horas. A base desta técnica consiste na replicação do DNA, catalisada pela DNA polimerase. Para que a DNA polimerase inicie o processo de replicação são utilizados dois pequenos fragmentos de DNA (18- 28 nucleótidos), designados por *primers*, complementares à sequência-alvo. Outros componentes necessários à reação são os nucleotídeos (substratos da polimerase) e sais para permitir a ação da enzima (PIERCE et al., 2008). Após o preparo da mistura para a reação, a amostra é colocada em um termociclador, onde será submetida a ciclos térmicos que se alternam entre temperaturas elevadas e temperaturas mais baixas. A alta temperatura causa a desnaturação da molécula de DNA, desfazendo as pontes de hidrogênio e separando as duas fitas complementares. Por outra parte, a diminuição da temperatura permite a hibridação das extremidades do fragmento de DNA com os oligonucleotídeos complementares (*primers*). A enzima Taq polimerase utiliza os nucleotídeos para polimerizar uma nova sequência de DNA complementar ao fragmento de interesse. O DNA original é utilizado como molde para a construção da nova sequência – o molde é chamado de *template*. Um novo ciclo é iniciado com a desnaturação dos fragmentos e a síntese de novos fragmentos em temperaturas baixas. Dessa maneira, a cada novo ciclo, aumenta-se a quantidade de cópias do fragmento de DNA a ser amplificado. Ao final da reação, o produto apresenta grande quantidade de DNA amplificado junto com o DNA original do início.

3 Materiais e métodos

O presente projeto é derivado do projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas e registrado no COCEPE sob o número 6898: Determinantes da obesidade, doenças crônicas, saúde mental e capital humano ao longo do ciclo vital Acompanhamento dos 22-23 anos da coorte de nascimentos de 1993, Pelotas, RS.

Este estudo foi realizado no laboratório do Centro de Pesquisas Epidemiológicas (CPE) da Universidade Federal de Pelotas – UFPel. A população alvo faz parte da segunda geração dos participantes da coorte de 1993 de Pelotas RS, ou seja, descendentes dos integrantes da coorte e seus pais que não fazem parte da coorte (pais não coorte). No período de coleta das amostras as crianças acompanhadas de seus pais ou responsáveis foram convidadas a comparecer à clínica do CPE, onde foram informados do propósito do estudo e convidados a assinar um termo de consentimento livre e esclarecido.

O presente estudo incluiu 742 amostras de saliva total de adultos (pais biológicos não coorte) coletadas utilizando o kit comercial Oragene • DNA® (OG-500), com volume total de 4 ml (solução do kit + saliva); 1162 amostras de crianças que compareceram à clínica do CPE, sendo que destas, 173 coletaram saliva total e 989 coletaram material com auxílio de um swab. No primeiro grupo de amostras das crianças foi utilizado o kit comercial Oragene • DNA® (OG-500) de auto coleta indicado para crianças acima de 4 anos e adultos, tendo sido obtido um volume total de aproximadamente 2 ml de amostra. No segundo grupo, a coleta foi realizada com o auxílio de um swab bucal com kit comercial

Oragene • DNA® (OG-500) para coleta assistida, recomendado para crianças menores de 4 anos de idade.

Na avaliação do melhor método de obtenção de DNA bucal através de coleta com swab ou saliva total, foi utilizada uma sub-amostra de 351 coletas do total de 1162 crianças que compareceram à clínica do CPE. Dessas, 173 amostras correspondiam à saliva total e 178 (18 %) a amostras coletadas com swab bucal. O sorteio das 178 amostras coletadas com swab, do total de 989, foi realizado através do programa estatístico *Stata* versão 12.0. Para comparação dos dispositivos de coleta/kits, foi coletada uma amostra de 7 indivíduos adultos com o kit oragene® OG 250 e a extração foi feita pelo o método de extração orgânica recomendado pelo fabricante, além de 7 amostras coletadas com o kit DNA. Sal™ pelos mesmos indivíduos. Foi utilizado o mesmo protocolo de extração para ambos (anexo A). Os indivíduos receberam os diferentes kits e instruções para a coleta, a qual foi realizada preferencialmente no meio da manhã, e com um intervalo de coleta entre as amostras estipulado de um dia, a fim de permitir a re-epitelização da mucosa oral. Após realização da coleta, as amostras foram trazidas para o laboratório onde ocorreu a extração do DNA.

A obtenção do DNA foi realizada pelo método de extração orgânica, o qual consiste em três etapas principais. Primeiramente as amostras foram incubadas em banho- maria por 1h e 30 min a 50°C, tendo sido adicionado o purificador (reagente PT-L2P) fornecido pelo kit para ocorrer a lise celular e remoção de lipídeos. Em seguida, com a adição de proteinase K foi promovida a degradação de proteínas, removendo-as do extrato celular. Após, foi adicionado álcool absoluto gelado para purificação da amostra. Como o DNA não é solúvel em álcool, há o agrupamento dos filamentos tornando-os visíveis, precipitando-os. Após, foi realizada uma centrifugação na velocidade de 12.500 rpm. O sobrenadante foi descartado, sendo posteriormente realizada lavagem com álcool 70%. Por fim, o álcool foi desprezado e o pellet foi deixado secando à temperatura ambiente. O protocolo padronizado e utilizado no laboratório do CPE para a extração de DNA encontra-se em anexo.

Após o processo de extração de DNA, este foi reidratado com 100µl de tampão Tris-EDTA (TE) incubado em banho Maria por 1 hora a 50°C e armazenado na geladeira por um período de 5 dias para que ocorresse a eluição

total. A quantificação das concentrações de DNA foi feita em espectrofotômetro (Nanovue™) com leituras de absorvâncias individuais e na proporção 260/280nm (RAT 260/280), além de correção de background com leitura em 230nm.

Na análise estatística do estudo foi verificado que as amostras não apresentam distribuição normal, portanto, foi utilizado o teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis para comparar os três grupos de amostras independentes sendo eles, adultos (pais biológicos não participantes da coorte), crianças saliva e crianças swab. O teste não paramétrico Wilcoxon- Mann-Whitney que testa a igualdade das medianas foi utilizado para comparar os métodos de coleta e também para comparar os kits. O teste de correlação de Spearman foi utilizado para avaliar se existe correlação entre idade e método de coleta nas crianças. As análises foram realizadas em software *STATA 12.0*.

4 Resultados

Na tabela abaixo é apresentada uma análise descritiva dos dados existentes quanto à extração de DNA da segunda geração da coorte de 93 e de seus pais biológicos não pertencentes à coorte de 1993. É possível notar que a grande maioria das crianças pertencentes à segunda geração da coorte de 1993, que compareceram à clínica do CPE, realizaram a coleta de células bucais com swab.

Tabela 1: Análise descritiva das amostras pertencentes à segunda geração da coorte de 1993 Pelotas, RS, e seus pais não coorte.

Conc. DNA	N	Média ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Erro padrão	IC95%
Saliva	173	0,31	0,20	(0,27; 0,34)
Swab	989	0,19	0,10	(0,18; 0,21)
Pais não coorte	742	0,60	0,18	(0,57; 0,64)
<hr/>				
RAT260/280				
Saliva	173	1,77	0,01	(1,75; 1,79)
Swab	989	2,25	0,07	(2,12; 2,38)
Pais não coorte	742	2,05	0,04	(1,97; 2,13)

Conc. DNA= concentração de DNA, N= número de amostras, IC95%= intervalo de confiança 95%

As 173 crianças que fizeram a coleta de saliva total tinham idade média de 6 anos e 2 meses, já as crianças que realizaram a coleta através de swab bucal tinham idade média de 2 anos e 4 meses. Através de teste de correlação de Spearman não foi observada uma correlação entre a idade da criança e a concentração de DNA obtido, seja por swab, seja por saliva ($r = 0,18$; $p < 0,001$).

Na tabela 2 abaixo, é apresentada a análise comparativa referente à quantidade e à qualidade de DNA obtido pelos distintos métodos.

Tabela 2: Análise comparativa sobre obtenção de DNA a partir de swab e de saliva total de crianças pertencentes a 2ª geração da coorte de 1993, Pelotas RS.

Conc DNA	N	Média ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Erro padrão	IC95%	Valor de p
Saliva	173	0,31	0,02	(0,27; 0,34)	< 0,001
Swab	178	0,19	0,01	(0,16; 0,22)	
RAT260/280					
Saliva	173	1,77	0,01	(1,75;1,79)	0,001
Swab	178	2,24	0,12	(2,01; 2,48)	

Conc DNA= concentração de DNA, N= número de amostras, IC95%= intervalo de confiança 95%

O volume médio de saliva coletada de crianças foi de 2,0 ml proporcionando um rendimento médio de 62 μg de DNA por indivíduo. Em contrapartida através do método de coleta com swab a concentração média de DNA obtida foi de 38 μg por amostra. Visto que a saliva total compreende maiores taxas de concentração e pureza de DNA, comparamos dois kits comerciais para obtenção de amostras de saliva, sendo eles Oragene® e DNA.Sal™. Em ambos existe uma solução estabilizadora em sua composição, a fim de permitir armazenamento à temperatura ambiente das amostras coletadas. Após a coleta de saliva e extração do DNA, foram realizadas leituras das absorbâncias em espectrofotômetro na proporção 260/280 nm. Os resultados tanto para os valores médios de concentração quanto para pureza das amostras obtidas com os diferentes kits encontram-se abaixo.

Tabela 3: Análise comparativa sobre a obtenção de DNA a partir dos distintos kits comerciais de coleta de saliva.

Conc.DNA	N	Média($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Mediana	Erro padrão	IC95%	Valor de P
Oragene®	7	0,017	0,014	0,05	(0,006; 0,030)	0,035
Dna. Sal™	7	0,006	0,003	0,02	(0,001; 0,011)	
RAT260/280						
Oragene®	7	1,80	1,86	0,08	(1,60; 2,01)	0,008
Dna.sal™	7	1,33	1,37	0,09	(1,11; 1,55)	

Conc DNA= concentração de DNA, N= número de amostras, IC95%= intervalo de confiança 95%

O teste estatístico não paramétrico Wilcoxon- Mann- Whitney indicou que os kits apresentaram diferenças na quantidade de concentração de DNA obtido ($p= 0,0350$). O kit oragene® gerou uma média de $0,017 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ enquanto o valor médio de concentração de DNA obtido com o kit DNA.Sal™ foi de $0,006 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Em relação à pureza, novamente foi demonstrada uma diferença ($p= 0,0088$). A média da RAT 260/280nm para o kit Oragene® foi de 1,80, ficando dentro do intervalo recomendado para a caracterização de grau de pureza (1,8-2,0). Já o kit DNA.Sal™ apresentou valor inferior ao esperado (1,37).

5 Discussão

A idade do indivíduo determina, em parte, o número de células epiteliais encontradas na saliva (GASSÓ et al., 2014; EL-MOGY 2012). Alguns autores sugerem que a coleta de células bucais nas crianças pode fornecer menores quantidades de DNA do que em adultos (SAFTLAS et al., 2004; ZHENG et al., 2001). Este estudo vai de acordo com esta ideia. Na tabela 1 é possível observar que amostras dos pais não coorte foram capazes de gerar, aproximadamente, o dobro (0,60 µg/µl) de concentração de DNA comparado a crianças que coletaram pelo método de saliva total (0,31 µg/µl) e o triplo em relação a crianças que coletaram com swab bucal (0,19 µg/µl).

A coleta de DNA da saliva total representa uma das melhores alternativas para uso em estudos genéticos em grande escala (ABRAHAM et al., 2012; HANSEN et al., 2007; KONI et al., 2011; ROGERS et al., 2007) porque a amostra de saliva é obtida por auto coleta usando um procedimento não invasivo e indolor que é ideal, especialmente, quando a população alvo de estudo é de crianças. Em adultos, também se observam taxas de participação mais altas em comparação com a coleta de métodos que utilizam sangue venoso (HANSEN et al., 2007; PEPLIES et al., 2010). Os resultados apresentados na Tabela 2 demonstram que o rendimento de DNA diferiu estatisticamente ($p= 0,001$) entre os dois métodos de coleta, confirmando também as observações de estudos anteriores de menor rendimento de DNA obtidos de swabs bucais comparados à saliva total de crianças (KONI et al., 2011; ZHENG et al., 2001). Também é importante destacar o fato da descamação epitelial da mucosa oral aumentar com a idade, significando que amostras de saliva de indivíduos mais jovens contêm menos células (GASSO et al., 2014). Em nossa análise através do teste de correlação Spearman, no entanto, constatamos que não houve correlação entre idade e concentração de DNA obtido. Isso possivelmente se deve ao fato dos

indivíduos pertencerem a faixa etária próxima, sendo todos crianças, produzindo níveis de salivacção e descamação epitelial da mucosa oral parecidos.

A pureza do DNA, principalmente avaliada pela contaminação protéica, e a integridade são afetadas pelo método de coleta. A integridade, juntamente com a contaminação orgânica e com álcool, são influenciadas pelo método de purificação empregado na obtenção do DNA. Amostras com RAT A 260/280nm na faixa de 1,80 a 2,00 são referenciadas como relativamente livres de contaminantes e valores mais elevados para a RAT A260/230nm indicam menor contaminação por fenóis, peptídeos ou outros compostos aromáticos (HANSEN et al., 2007). Observando os valores de quantidade e qualidade de DNA na tabela 2, para ambos os métodos, fica claro que as amostras com baixa concentração média de DNA tendem a ter níveis elevados de RAT A260/280nm e foram coletadas com swab, provavelmente refletindo baixas concentrações de material celular humano e altos níveis de contaminação no material coletado. Em contraste, amostras de saliva total tiveram índice próximo ao aceitável para a RAT A260/280 nm e maior concentração de DNA. Em relação à RAT A 260/230 nm os métodos não diferem estatisticamente ($p= 0,881$) porém, os valores são inferiores ao recomendado, sugerindo possível contaminação com resíduos de álcool e/ou reagentes dos kits. Estes resultados estão de acordo com o estudo de ROGERS *et al.*, (2007) que compararam rendimento e a qualidade de saliva total usando os diferentes kits de coleta Oragene®, cytobrush e swab bucal.

Outros componentes da saliva como enzimas, hormônios, imunoglobulinas e outras biomoléculas também podem interferir com a qualidade e quantidade do DNA genômico extraído (NG et al., 2006). Atualmente, vários kits de extração de DNA estão comercialmente disponíveis, o que padroniza métodos eficientes e convenientes para a obtenção de DNA genômico da saliva (NG et al., 2006). No entanto, diferentes métodos de coleta e extração podem produzir diferentes quantidades de DNA com diferentes níveis de pureza (VILTROP et al., 2010). Analisando e comparando o desempenho na obtenção de DNA de dois kits comerciais, Oragene® e DNA.Sal™, observamos que, neste estudo, produziram quantidade e qualidade diferentes estatisticamente. Ambos possuem uma solução que contém produtos químicos capazes de prevenir a degradação do DNA e o crescimento bacteriano. O kit Oragene® demonstrou ser superior nos

parâmetros avaliados, produzindo em média 34 µg/ 2ml de amostra. Esse resultado está de acordo com um estudo de Ng. et al (2006) que obteve rendimento médio de 35 µg de DNA a partir de uma amostra de 2ml, com a maioria das amostras dentro do limiar de pureza com base em espectrofotometria. Além disso o fabricante do kit Oragene® propõe que as amostras podem ser armazenadas em temperatura ambiente por pelo menos um ano e ainda ser capaz de gerar uma quantidade razoável de DNA não degradado (BIRNBOIM, 2004; IWASIOW et al., 2011). Esta característica é particularmente importante por que em estudos epidemiológicos em larga escala, não é logisticamente possível processar a amostra imediatamente. Em vez disso, as amostras podem ser armazenadas por um longo período de tempo sob condições variáveis de temperatura antes do isolamento do DNA.

É importante notar que, em decorrência da presença de vários microorganismos dentro da cavidade oral, uma proporção substancial do DNA pode não ser humano (QUINQUE et al., 2006), então seria de esperar uma abordagem diferente com métodos de quantificação específica como análise de PCR capaz de amplificar genes específicos, ou ainda avaliar a integridade do DNA através de eletroforese em gel de agarose (FEIGELSON et al., 1997). O que pode ser um limitante deste estudo. Por outro lado, vários estudos demonstraram que não só a proporção de DNA humano extraído da saliva é maior se comparado a outros métodos não-invasivos (KRIPPL et al., 2003) mas também o DNA não-humano não interferirá em análises visando o DNA humano (DOWNWARD, 2003). Outros estudos concluíram que o DNA de saliva, extraído usando principalmente kits comerciais, provou ser de boa qualidade podendo ser usado inclusive para o seqüenciamento do DNA (QUINQUE et al., 2006; ABRAHAM et al., 2012).

Este estudo apresentou limitações quanto ao número de amostras utilizadas para comparação dos kits, uma amostragem maior e mais homogênea garantiria melhores resultados. Portanto, para uma próxima análise seria interessante repetir esta comparação com um número maior de amostras. Seria importante também, avaliar a interação ambiental sobre a qualidade e quantidade do DNA obtido, assim como a expressão gênica por reação em cadeia da polimerase.

6 Conclusão

Tendo em vista os aspectos observados, podemos inferir que a saliva total é o melhor método de obtenção de DNA de origem bucal, devendo sempre ser o primeiro método a ser oferecido para obtenção de amostras em crianças. Entretanto, a idade da criança é um fator limitante, pois muitas vezes o uso do swab bucal é o único método aplicável.

Concluimos que a saliva coletada de adultos ou crianças é uma fonte alternativa viável de DNA genômico humano para estudos epidemiológicos genéticos e que o kit Oragene® fornece rendimentos de DNA e qualidade, avaliados por espectrofotometria, suficientemente elevados, suportando sua escolha.

Referências

ABD EL-AAL A.A, ABD ELGHANY N.A, MOHAMADIN AM, EL-BADRY A.A
Comparative study of five methods for DNA extraction from whole blood samples. **International Journal of Health Sciences** 2010; 3(1):285–287.

ABRAHAM J.E, MARANIAN M.J, SPITERI I, RUSSELL R, INGLE S, LUCCARINI C, EARL H.M, PHAROAH P.P, DUNNING A.M, CALDAS C. Saliva samples are a viable alternative to blood samples as a source of DNA for high throughput genotyping. **BMC Med Genomics** 2012. 5:19.

ASHTON-PROLLA P, CLAUSELL N, FERNANDES M.S, MATTE U, BITTELBRUNN A.C, MELISSA PRADE HEMESATH M.P, et al. Biobanco do Hospital de Clínicas de Porto Alegre: aspectos técnicos, éticos, jurídicos e sociais. **Revista HCPA**. 2009;29(1):74-9.

BAHLO M, STANKOVICH J, DANOY P, et al. Saliva-derived DNA performs well in large-scale, high-density single-nucleotide polymorphism microarray studies. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 2010;19(3):794–8.

BARROS FC, VICTORA CG, HORTA BL, GIGANTE DP. Methodology of the Pelotas birth cohort study from 1982 to 2004-5, Southern Brazil. **Rev Saude Publica**. 2008 Dec;42 Suppl 2:7-15.

BIRNBOIM HC. DNA Yield with OrageneW DNA. Ottawa: DNA Genotek, Inc.; 2004.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 441, de 12 de maio de 2011. Diretrizes para análise ética de projetos de pesquisas que envolvam armazenamento de material biológico humano ou uso de material armazenado em pesquisas anteriores. **Diário Oficial União**. 18 de julho de 2011; Seção 1:60-61. Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2011/Reso441.pdf>.

CANAZZO L, TOZZO P, PEGORARO R. Biobank research on oncological residual material: a framework between the rights of the individual and the interest of society. **BMC Medical Ethics**. 2013;14(17):3-7.

CAMBON-THONSEN, A.; DUCOURNAU, P.; GOURRARD, PONTILLE D. Biobanks for genomics and genomics for biobanks. **Comp Funct Genomics**, v.4, n.6, p. 628-634, 2003.

CLEMENTS D.N., WOOD S., CARTER S.D. & OLLIER W.E.R.. Assessment of the quality and quantity of genomic DNA recovered from canine blood samples by three different extraction methods. **Research in Veterinary Science**. 2008; 85(1): 74-79.

DAWES C. Estimates, from salivary analyses, of the turnover time of the oral mucosal epithelium in humans and the number of bacteria in an edentulous mouth. **Archives of Oral Biology**. 2003, 48: 329-336.

DOLINSKY, L.C., PEREIRA, L.M.C.V. DNA Forense Artigo de Revisão. **Saúde & Ambiente**, Duque de Caxias, v. 2, n. 2, p.11-22, 2007.

DOWNWARD J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**. 2003 Jan;3(1):11-22.

DURDIAKOVA J, KAMODYOVA N, OSTATNIKOVA D, VLKOVA B, CELEC P. Comparison of different collection procedures and two methods for DNA isolation from saliva. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. 2012;50(4):643–7.

EL-MOGY M, SIMKIN M, HAJ-AHMAD Y. Comparative study of DNA isolated from saliva preserved in norgen's preservative using norgen's saliva DNA isolation kit versus qiagen's QIAamp DNA blood mini kit. **Norgen Biotek Corporation**. 2012 (Application Note 56).

FEIGELSON, H. S., CALLE, E. E., RODRIQUEZ, C., JACOBS, E. J., ROBERTSON, A. S., AND THUN, M. J. Determinants of DNA yield from buccal cell samples collected with mouthwash. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.**, 10: 1005–1008, 2001.

FEIGELSON HS, COETZEE GA, KOLONEL LN, ROSS RK, HENDERSON BE. A polymorphism in the CYP17 gene increases the risk of breast cancer. **Cancer Research**. 1997 Mar;57(6):1063-5.

FREEMAN B, POWELL J, BALL D, HILL L, CRAIG I, PLOMIN R. DNA by mail: An inexpensive and noninvasive method for collecting DNA samples from widely dispersed populations. **Behavior Genetics**. 1997;27(3):251–7.

GASSO P, PAGEROLS M, FLAMARIQUE I, et al. The effect of age on DNA concentration from whole saliva: Implications for the standard isolation method. **American journal of human biology**. 2014;26(6):859–62.

GONÇALVES H, WEHRMEISTER FC, ASSUNÇÃO MCF, TOVO-RODRIGUES L, OLIVEIRA IO, MURRAY J, ANSEMI L, BARROS FC, VICTORA CG, MENEZES AMB. Cohort Profile Update: The 1993 Pelotas (Brazil) Birth Cohort follow-up at 22 years. **International Journal of Epidemiology**. 2017 Dec 11. doi: 10.1093/ije/dyx249.

GLEI M, HABERMANN N, OSSWALD K, SEIDEL C, PERSIN C, JAHREIS G, et al. Assessment of DNA damage and its modulation by dietary and genetic factors in smokers using the Comet assay: a biomarker model. **Biomarkers**. 2005;10(2–3):203–17.

HAFFAJEAD, SOCRANSKY SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. **Journal of Clinical Periodontology**. 2001;28(5):377–88.

HANSEN TV, SIMONSEN MK, NIELSEN FC, HUNDRUP YA. Collection of blood, saliva, and buccal cell samples in a pilot study on the Danish nurse cohort: comparison of the response rate and quality of genomic DNA. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2007;16:2072–2076.

HARTY L. C., SHIELDS P. G., WINN D. M., CAPORASO N. E., HAYES R. B. Self-collection of oral epithelial cell DNA under instruction from epidemiologic interviewers. **American Journal of Epidemiology**., 151: 199-205, 2000.

HAYNEY M.S., DIMANLIG P., LIPSKY J.J., POLAND G.A. Utility of a "swish and spit" technique for the collection of buccal cells for TAP haplotype determination. **Mayo Clinic Proceedings**. 1995 Oct;70(10):951-4

HEATH, E. M., MORKEN, N. W., CAMPBELL, K. A., TKACH, D., BOYD, E. A., ANDSTROM, D. A. Use of buccal cells collected in a mouthwash as a source of DNA for clinical testing. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**. 125: 127–133, 2001.

HUMAN MICROBIOME PROJECT, C. A framework for human microbiome research. **Nature**. 2012;486:215–221

HU Y, EHLLI EA, NELSON K, et al. Genotyping performance between saliva and blood-derived genomic DNAs on the DMET array: A comparison. **PLoS ONE**. 2012;7(3):e33968.

IWASLOW RM, DESBOIS A, BIRNBOIM HC. Long-term stability of DNA from saliva samples stored in Oragene(R) DNA Genotek, **Inc, Ottawa, Ontario, Canada**; 2011

KAUFMAN E, LAMSTER IB. The diagnostic applications of saliva: a review. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**.2002;13(2):197–212.

KAUFFMANN, F. Tracing biological collections: between books and clinical trials. **Journal of the American Medical Association**, London, v.19, n.299, p.2316-2318,May, 2008.

KING IB, SATIA-ABOUTA J, 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 Epidemiol Biomarkers Prev**. 2002;11(10 Pt 1):1130–3.

KONI AC, SCOTT RA, WANG G, BAILEY ME, PEPLIES J, BAMMANN K, PITSILADIS YP. 2011. DNA yield and quality of saliva samples and suitability for large-scale epidemiological studies in children. **International Journal of Obesity** 35: S113–S118.

KONIG KG. Diet and oral health. **International Dental Journal**. 2000;50(3):162–74.

KRIPPL P, LANGSENLEHNER U, RENNER W, YAZDANI-BIUKI B, WOLF G, WASCHER TC, et al. A common 936 C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk. **International Journal Cancer**. 2003;106(4):468-71.

LEE, P. Y., COSTUMBRADO, J., HSU, C.-Y., & KIM, Y. H. (2012) Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments, **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, (62), 1–5.

LE MARCHAND L., LUM-JONES A., SALTZMAN B., VISAYA V., NOMURA A. M. Y., KOLONEL L. N. Feasibility of collecting buccal DNA by mail in a cohort study. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, 10: 701-703, 2001.

LUM A., LE MARCHAND L. A simple mouthwash method for obtaining genomic DNA in molecular epidemiological studies. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, 7: 719-724, 1998.

MEANEY MJ, SZYF M, SECKL JR. Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health. **Trends in Molecular Medicine**. 2007;13:269–277.

MEULENBELT, I., DROOG. S., TRAMMELEN, G. J. M., BAOMSMA, D. I., and SLAGBOOM, P. E. High-yield noninvasive human genomic DNA isolation method for genetic studies in geographically dispersed families and populations. **American Journal of Human Genetics.**, 57: 1252-1254, 1995.

MITCHELL C, et al. Social disadvantage, genetic sensitivity, and children's telomere length. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 2014;111:5944–5949.

MOORE E, ARNSCHEIDT A, KRUGER A, STROMPL C, MAU M. Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures. **Molecular Microbial Ecology Manual**, Second Edition 1. 2004;01:3-18.

NISHITA DM, JACK LM, MCELROY M, et al. Clinical trial participant characteristics and saliva and DNA metrics.. **BMC Medical Research Methodology**. 2009;9:71-2288-9-71.

NUNES AP, OLIVEIRA IO, SANTOS BR, MILLECH C, SILVA LP, GONZALEZ DA, HALLAL PC, MENEZES AM, ARAUJO CL, BARROS FC. Quality of DNA extracted from saliva samples collected with the Oragene™ DNA selfcollection kit. **BMC Medical Research Methodology**. 2012;12:65–69.

NG DP, KOH D, CHOO S, CHIA KS. Saliva as a viable alternative source of human genomic DNA in genetic epidemiology. **Clinica Chimica Acta** . 2006;367(1-2):81-5.

PASTER BJ, BOCHES SK, GALVIN JL, ERICSON RE, LAU CN, LEVANOS VA, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. **Journal of Bacteriology**. 2001;183(12):3770–83.

PALTIEL, L., AAREM, J., BÆKKEN, S., STENSRUD, N. K., HARBAK, K. “Biospecimen quality program in the biobank of the Norwegian Institute of Public Health”, **Norsk Epidemiologi**. 2012, pp. 225–229.

PEPLIES J, FRATERMAN A, SCOTT R, RUSSO P, BAMMANN K. Quality management for the collection of biological samples in multicentre studies. **European Journal of Epidemiology**. 2010;25(9):607–17.

PIERCE, B. A. “Genetics - A Conceptual Approach” W. H. **Freeman and Company**, New York, EUA. 2008 4.ed.

PULFORD DJ, MOSTELLER M, BRILEY JD, JOHANSSON KW, NELSEN AJ. Saliva sampling in global clinical studies: the impact of low sampling volume on performance of DNA in downstream genotyping experiments. **BMC Medical Genomics**. 2013.6:20.

PHILIBERT RA, ZADOROZHNYAYA O, BEACH SR, BRODY GH. Comparison of the genotyping results using DNA obtained from blood and saliva. **Psychiatric Genetics**. 2008.18:275–281.

QUINQUE D, KITTLER R, KAYSER M, STONEKING M, NASIDZE I. Evaluation of saliva as a source of human DNA for population and association studies. **Analytical Biochemistry**. 2006, 353: 272-277.

RUDNEY JD, CHEN R. The vital status of human buccal epithelial cells and the bacteria associated with them. **Archives of Oral Biology**. 2006;51(4):291–8.

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

ROGERS NL, COLE SA, LAN HC, CROSSA A, DEMERATH EW. New saliva DNA collection method compared to buccal cell collection techniques for

epidemiological studies. **American Journal of Human Biology**. 2007.19:319–326.

RYLANDER-RUDQVIST T, HA°KANSSON N, TYBRING G, WOLK A. Quality and quantity of saliva DNA obtained from the self-administrated Oragene method—a pilot study on the cohort of Swedish men. **Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention**. 2006.15:1742–1745.

SAFTLAS AF, WALDSCHMIDT M, LOGSDEN-SACKETT N, TRICHE E, FIELD E. Optimizing buccal cell DNA yields in mothers and infants for human leukocyte antigen genotyping. **American Journal of Human Biology**,160:77– 84. 2004.

SUN F, REICHENBERGER EJ. Saliva as a source of genomic DNA for genetic studies: Review of current methods and applications. **Oral Health and Dental Management**. 2014;13(2):217–22.

SHANKAR, S., UDAY, Y., Biobanking: Basic concepts and role in rheumatology. **Indian Journal of Rheumatology**, 2011. 6(3): p. 129-137.

SHILOAH J, PATTERS MR, WARING MB. The prevalence of pathogenic periodontal microflora in healthy young adult smokers. **Journal Periodontology**. 2000;71(4):562–7.

TOBAL K., LAYTON D. M., MUFTI G. J. Non-invasive isolation of constitutional DNA for genetic analysis. **Lancet**, 2: 1281-1282, 1989.

THEALL KP, et al. Early hits and long-term consequences: tracking the lasting impact of prenatal smoke exposure on telomere length in children. **American Journal of Public Health**. 2013;103 (Suppl 1):S133–S135.

THIEDE C, PRANGE-KREX G, FREIBERG-RICHTER J, BORNHAEUSER M, EHNINGER G. Buccal swabs but not mouthwash samples can be used to obtain pretransplant DNA fingerprints from recipients of allogeneic bone marrow transplants. **Bone Marrow Transplantation**. 2000, 25: 575-577.

VICTORA CG, HALLAL PC, ARAUJO CL, MENEZES AM, WELLS JC, BARROS FC. Cohort profile: the 1993 Pelotas (Brazil) birth cohort study. **International Journal of Epidemiology**. 2008 Aug;37(4):704-9.

VILTROP T, KRJUTSKOV K, PALTA P, METSPALU A. Comparison of DNA extraction methods for multiplex polymerase chain reaction. **Anal Biochem.** 2010;398(2):260-2.

VINOD K. K. (2004) "Total genomic DNA extraction, quality check and quantitation. In: **Proceedings of the training programme on Classical and modern plant breeding techniques – A hands on training**, pp. 109-121, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, India

WAHLBERG, K., HUGGETT, J., SANDERS, R., WHALE, A. S., BUSHELL, C., ELASWARAPU, R., FOY, C. "Quality Assessment of Biobanked Nucleic Acid Extracts for Downstream Molecular Analysis", **Biopreservation and Biobanking**, 2012; 10(3), pp. 266–275.

WALSH PS, METZGER DA, HIGUCHI R. Chelex®100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **Biotechniques.** 1991;10:506–513.

WESTERMEIER, R. Electrophoresis in practice: a guide to theory and practice. **John Wiley**, 2005.

YOSHIZAWA, J.M. *et al.* Salivary Biomarkers: Toward Future Clinical and Diagnostic Utilities. **Clinical Microbiology Reviews**, v.26, n.4, p.781-91, 2013.

ZHENG S, MA X, BUFFLER PA, SMITH MT, WIENCKE JK. Whole genome amplification increases the efficiency and validity of buccal cell genotyping in pediatric populations. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention.** 2001.10:697–700.

ZIELHUIS, G.A., Biobanking for epidemiology. **Public Health**, 2012. 126(3): p. 214-6.

Anexos

Anexo A- Protocolo extração de DNA de saliva

Protocolo Extração de DNA de saliva

- 1-- Inverter os frascos suavemente (5x)
- 2- Transferir o volume total da amostra para um tubo eppendorf de 1,5 ml.
Observar o volume (500 µL amostra).
- 3 - Incubar as amostras em banho-maria por 1h30min a 50°C
- 4 - Adicionar purificador (PT-L2P); 20 µL ↔ (500 µL amostra)
- 5 - Agitar no vórtex por alguns segundos
- 6 - Incubar no gelo por 15 minutos
- 7 - Centrifugar a temperatura (4°C) por 15 minutos; mínimo de 12.500 rpm
Obs: Observar a formação do pellet protéico, deve ser branco e firme. As proteínas devem estar ausentes no sobrenadante, caso contrário, repetir o vórtex e a centrifugação.
- 8 - Transferir material para outro tubo eppendorf 1,5 ml
- 9 - Adicionar de etanol absoluto; (500 µL AMOSTRA ↔ 600 µL ABSOLUTO)
- 10 - Misturar por inversão gentilmente 10x. A partir dessa etapa nunca utilizar agitação mecânica.
- 11 - Deixar as amostras em temperatura ambiente por 10 minutos para permitir a precipitação completa do DNA.
- 12 - Centrifugar (4°C) por 10 minutos na maior velocidade possível. Mínimo de 3.500 rpm.
- 13 - Remover cuidadosamente o sobrenadante, tendo cuidado para não descolar o pellet.
- 14 - Lavagem com etanol 70% : Adicionar etanol 70% (250 µL↔ 1 min)
- 15 - Centrifugar 5 minutos (4°C), 12.500 rpm.
- 16 - Remova completamente o etanol 70% (aguardar a evaporação total)
- 17 - Reidratar com 100 µL de TE
- 18 - Vórtex 5 segundos
- 19 - Incubar em banho-maria por 1h a 50°C
- 20 - Aguardar 5 dias de eluição para transferência, deixar as amostras na geladeira.