

EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE PEÇAS ANATÔMICAS PATOLÓGICAS PARAFINIZADAS

Marília Pretto Chemin¹, Adriane Pozzobon²

Resumo: Muitas são as metodologias para extração de DNA de diferentes amostras, incluindo tecidos biológicos parafinizados, sendo o sucesso desses protocolos de grande importância para o posterior uso do DNA na análise de genes ou marcadores de interesse. O presente estudo avaliou três métodos de extração de DNA de material parafinado, visando à posterior amplificação do DNA genômico pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram utilizadas 26 amostras de variados tecidos humanos (rim, baço, intestino, bexiga, pele, próstata e apêndice cecal). O protocolo A inclui digestão com proteinase K seguida de calor; o protocolo B utiliza fenol/clorofórmio e o protocolo C utiliza o reagente DNAzol®. O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria e amplificado pela técnica da PCR. Dos três métodos testados, apenas com o protocolo B foi possível a visualização do DNA extraído, bem como uma qualidade considerável avaliada pela quantificação. Não foi possível a amplificação do gene MBL2 pela técnica de PCR provavelmente em virtude da interferência de impurezas no DNA e também pelo tamanho do fragmento do gene MBL2. Assim, conclui-se que a extração de DNA de tecidos parafinizados requer métodos complementares para purificação do DNA, bem como deve ser levado em consideração o processo de parafinização das amostras e tamanhos dos cortes.

Palavras-chave: Tecido parafinado. Extração de DNA e PCR.

1 INTRODUÇÃO

Rotineiramente, amostras de tecidos são removidas do corpo humano para análise visando ao diagnóstico de doenças, sendo os fragmentos desses materiais fixados em formol, incluídos em parafina e armazenados nos laboratórios. Esses espécimes representam importante fonte de material biológico para pesquisa. O aperfeiçoamento dos métodos de extração de ácido desoxirribonucleico (DNA) a partir de tecido parafinado, de forma a torná-los de execução simples e de menor custo, facilita enormemente a utilização desses materiais em estudos retrospectivos, trazendo grande contribuição para a investigação da etiologia e a epidemiologia das patologias.

De acordo com Perkins, Kjeldber (1993), a prática com tecidos parafinizados tem vantagem, por exemplo, sobre os congelados, pois os primeiros conservam uma qualidade morfológica maior e permitem análises retrospectivas, além de serem numerosos, facilmente disponíveis e permitirem a identificação de lesões precursoras de tumores invasivos. Para pesquisas envolvendo detecção ou diferenciação de micro-organismos patogênicos, a utilização desse material de arquivo elimina a necessidade de culturas (VAN DER ZANDER; HOENTJEN; HEILMAN, 1998).

Na busca de métodos mais rápidos e práticos para o isolamento de DNA amplificável, alguns passos no preparo da amostra e no isolamento devem ser observados. Primeiramente, a forma de obtenção dos cortes (CHEN; CLEJAN, 1993); a desparafinização, que, além de ser opcional, se for feita, pode ser realizada por meio de calor ou lavagens com solventes como o xilol (COOMBS;

1 Graduação em Biomedicina. Centro Universitário UNIVATES. E-mail: lilia.vibe@gmail.com

2 Bióloga- Doutora em Ciências Biológicas: Fisiologia - UFRGS – Professora Adjunta do Centro Universitário UNIVATES. E-mail: pozzobon@univates.br

GOUCH; PRIMROSE, 1999) e a digestão enzimática por proteinase K, sendo variáveis a sua concentração e o tempo de digestão, que pode variar de uma hora a cinco dias.

Após o isolamento do DNA de tecido parafinado, o mesmo pode ser utilizado para a análise de genes, marcadores tumorais, detecção de microorganismos, entre outros, por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Conforme Watson *et al.* (2006), a PCR consiste na imitação, *in vitro*, do processo de duplicação do DNA. Uma ou mais fitas de DNA servem como molde, e tem uma dada sequência gênica demarcada por meio de oligonucleotídeos (*primers* com cerca de 20 pares de bases), que se anelam às suas sequências complementares indicando o início e o fim do fragmento desejado, que passa a ser copiado, por meio do acréscimo, em ambas as fitas do DNA molde, de nucleotídeos complementares presentes na reação, sob a ação de uma enzima polimerase do DNA termorresistente, proveniente da bactéria *Thermus aquaticus*. Para a reação, além de se adicionar o molde de DNA, acrescentam-se os desoxirribonucleotídeos, os *primers*, uma solução-tampão, com condições adequadas de pH e salinidade, para que a reação ocorra e, por fim, a enzima DNA polimerase.

Utilizando um aparelho denominado termociclador, Manojkumar e Varanat (2006) explicam que ocorrem os ciclos de amplificação, que podem variar de 20 a 40 ciclos, dependendo da reação e de outros fatores. Esses ciclos compreendem oscilações de temperatura, que possibilitam que ocorram as seguintes fases da polimerização em cadeia do DNA molde: primeiro a desnaturação do DNA molde a 94°C por 30 segundos. Depois o anelamento dos *primers* com o molde de DNA em torno de 50°C por cerca de 30 segundos. Por fim, a extensão do DNA, por acréscimo de nucleotídeos e da enzima polimerase a 72°C, por 2-5 minutos. Esses ciclos podem ser precedidos por uma desnaturação inicial, a 94°C, por 5 a 7 minutos, e sucedidos por uma extensão final de 10 minutos, a 72°C.

Além de rápido, esse método requerer quantidades muito pequenas de DNA, mesmo que degradadas. Em vista disso, torna-se uma metodologia de escolha para a utilização em tecido fixado em formalina e incluído em blocos de parafina, além de outros materiais de arquivo e de fontes escassas de DNA, ampliando, assim, a possibilidade de utilização da técnica (MANOJKUMAR; VARANAT, 2006).

O DNA de tecido fixado e parafinado também pode servir para estudos de instabilidade de microssatélites, compreendendo uma vasta fonte de material para uma possível construção de bancos de dados para identificação de indivíduos ou determinação da constituição genética de uma dada população (KULLMANN *et al.*, 1998). Além do uso de PCR e outras técnicas de Biologia Molecular a partir desse material de arquivo, tem-se ainda a disponibilização de uma série de novas informações, como a correlação entre a morfologia, a expressão fenotípica e a alteração gênica.

Os procedimentos de fixação e inclusão em parafina podem dificultar a obtenção de DNA de qualidade para amplificação por PCR. Assim, as amostras requerem um protocolo especial para a extração do material genético. O protocolo mais utilizado para a extração de DNA de tecidos fixados e emblocados em parafina compreende desparafinização da amostra por calor ou solventes, tratamento proteolítico, que leva horas ou mesmo dias, sucedido, ou não, por purificação com solventes orgânicos (fenol/clorofórmio, principalmente) e precipitação com etanol (BAREA; PARDINI; GUSHIKEN, 2004). Além disso, a maioria dos estudos indica que o melhor método para obtenção do DNA deve utilizar kits comerciais de purificação, o que aumenta os custos para os procedimentos (SIMONATO, *et al.*, 2007; FERNADES, *et al.*, 2004).

Diante do exposto destaca-se a necessidade de se validar diferentes protocolos para extração de DNA de tecido parafinado de diferentes amostras biológicas. Portanto, este trabalho tem como objetivo comparar três protocolos de extração de DNA de tecidos parafinados, além de comparar a qualidade e quantidade de DNA obtida entre diferentes amostras de tecido humano.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados sete tipos de amostras com diferentes datas de armazenamento: baço, rim, intestino (porção do íleo), bexiga, pele, próstata e apêndice cecal. As amostras foram cedidas por um laboratório de patologia da cidade de Lajeado, Rio Grande do Sul. A pesquisa foi realizada no laboratório de Biologia Molecular no Centro Universitário UNIVATES, sendo aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Univates sob número 064/11.

As amostras foram cortadas em um micrótomo com espessura de 20 µm, independente do peso e da quantidade de tecido que se encontrava nos blocos de parafina.

O primeiro protocolo testado, segundo Vilanova-Costa, Nobrega e Cruz (2008) (protocolo A) foi feito, colocando-se o corte da amostra juntamente com 600 µL de xileno absoluto em um *eppendorf*. Os tubos foram pré-aquecidos em banho-maria por 10 minutos a 65°C e aquecidos por 45 minutos a 67°C. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 5 minutos, em uma temperatura de 25°C. Foi desprezado o sobrenadante e adicionados 600 µL de etanol a 95°. Novamente os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos a 25°C. O sobrenadante foi desprezado e ao *pellet* obtido foi adicionado 1 mL de água destilada mais 200 µL de solução de proteinase K na concentração de 10mg/mL. O material foi incubado por 3 horas a 55°C. Após, foram adicionados 100 µL de solução de proteinase K na concentração de 10 µg/mL e o material foi colocado novamente em banho-maria por 9 horas à temperatura de 60°C. As amostras foram, então, transferidas para tubos novos, aos quais foram acrescentados 600 µL de álcool isopropílico PA, homogeneizadas por 1 minuto e centrifugadas a 14.000 rpm durante 6 minutos à temperatura de 25°C. Desprezou-se o sobrenadante e o *pellet* foi submetido à secagem. Finalmente, adicionou-se 50 µL de água ultrapura e as amostras foram incubadas a 65°C por 15 minutos e estocadas a -20°C

O segundo protocolo (protocolo B) consistiu em colocar uma seção de 20 µm de tecido em um microtubo e fazer duas lavagens, conforme Shang-Rong Shi *et al* (2002), seguidas de 1 mL de xilol, duas de álcool absoluto e duas com álcool 75%. Após as lavagens, foi adicionado 1 mL de tampão PBS 1X (*Phosphate buffered saline*) durante 15 minutos, sendo removido e repetida a operação. A extração do DNA foi feita segundo Coura, *et al.* (2004), onde as amostras foram incubadas a 52°C durante 12 horas em solução de lise (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0) que foi adicionada às amostras junto com SDS 1% (*Sodium dodecyl sulfate*) e 25 µL da enzima proteinase K (20 mg/mL). Depois da incubação, foram adicionados 500 µL de solução fenol-clorofórmio-isopropanol, centrifugado, retirado o sobrenadante e transferido para um tubo novo, ao qual foram adicionados 500 µL de clorofórmio PA submetido a agitação. O material foi centrifugado novamente e o novo sobrenadante foi colocado, novamente, em um *eppendorf* novo juntamente com 50 µL de acetato de sódio 3M e agitado no vórtex. Após esse passo, foram adicionadas às amostras 500 µL de isopropanol PA e as mesmas foram incubadas a -20°C durante 12 horas. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas em uma temperatura de 4°C. Foi descartado o sobrenadante e o precipitado foi lavado com álcool 75%. Foi centrifugado novamente e descartado o sobrenadante. O *pellet* foi dissolvido em 50 µL de água ultrapura, permanecendo 10 minutos em banhomaria a 65°C e posteriormente estocado a -20°C.

O terceiro protocolo (protocolo C) seguiu as orientações do fabricante (LIFE TECHNOLOGIES®) e consistiu na mesma ordem de lavagem que o protocolo B. Após a segunda lavagem com tampão PBS, as amostras foram homogeneizadas em 1 mL do reagente DNazol®. Elas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubos novos e precipitado com 0,5 mL de álcool absoluto e agitado no vórtex. As amostras foram deixadas em temperatura ambiente por 3 minutos e depois centrifugadas a 4.000 rpm por 2 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado com 1 mL de álcool 75% e invertidas de 3 a 6 vezes. Novamente as

amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 2 minutos a 4°C, sendo descartado o sobrenadante e ressuspensando o *pellet* em 20 µL de água ultrapura.

A qualidade e a quantidade do DNA obtidas pelos diferentes protocolos foram avaliadas por meio da espectrofotometria nos comprimentos de onda 260 e 280 nm em cubeta de quartzo. A proporção de 260/280 nm refere-se a qualidade de DNA existente na amostra, que seria o valor de 260 nm, e a proporção de proteínas referente ao valor de 280 nm.

Para a avaliação da integridade do DNA, foi feita a eletroforese em gel de agarose a 0.8%. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal utilizando tampão de corrida TBE (Tris-Ácido bórico-EDTA), agarose e brometo de etídio. Após a eletroforese, as bandas de DNA foram visualizadas por meio da exposição ultravioleta no equipamento GEL-LOGIC (Kodak®).

Posteriormente foi feita a amplificação por PCR do gene Mannose-Binding Lectin 2 (MBL2) que codifica um polimorfismo do gene da lecitina ligadora de manose.

As reações de PCR foram realizadas com um volume final de 25 µl. Um µl de DNA genômico foi desnaturado a 96°C por 5 minutos na presença de 20 mM de Tris HCL pH 8,4 com 50mM de KCL e 1,5 mM de MgCl₂. Após este preaquecimento, 1,25 U de Taq DNA polimerase foi adicionada com o mesmo tampão Tris-HCL, 1,5 mM MgCl₂ 0,4 µM de primers sense e antisense e 0,2 mM de dNTP mix. As reações de PCR foram realizadas utilizando primers específicos: sense 5' ACCCAGATTGTAGGACAGAG 3' e antisense 5'CAGGCAGTTTCCTCTGGAAGG 3'. As amplificações foram realizadas utilizando termociclador automático TECHNE-TC512 nas seguintes condições: 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos, e 72°C por 30 segundos foram precedidos por um ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos e seguidos por um passo de extensão final de 72°C por 5 minutos (MONTICIELO, *et al.* 2009). Para visualização do fragmento de 349 pares de bases (pb) MBL2 foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 1 % .

3 RESULTADOS

O protocolo A, que consistia em apenas uma lavagem com xileno e uma com álcool 95° não obteve sucesso. A parafina que se encontrava no tecido não foi dissolvida, prejudicando os demais passos para a extração do DNA. O material foi descartado e não foi utilizado para PCR e também não pôde ser submetido à eletroforese em gel de agarose pela alta concentração de parafina agregada aos tecidos (resultados não mostrados).

Já o protocolo B, que tinha como início várias lavagens com xileno e graduações de alcoóis diferentes, obteve sucesso em relação à retirada total da parafina existente nas amostras. Não só retirou a parafina, mas também os corantes que nelas foram fixados para análise no laboratório de patologia. As amostras ficaram praticamente translúcidas.

Com relação ao protocolo C, assim como no protocolo B, a parafina que se encontrava nos tecido foi totalmente removida, obtendo-se sucesso nessa etapa de lavagens.

Depois de retirada da parafina, e congelado por 24 horas, o material foi submetido à eletroforese em gel de agarose com concentração de 0,8% juntamente com marcador de 100 pares de base (FIGURAS 1 e 2).

Figura 1: Gel de agarose 0,8% com as amostras de DNA em triplicatas. 1 a 3 apêndice cecal, 4 a 6 próstata jan 2011, 7 a 9 próstata abr 2011, 10 a 12 próstata out 2011, 13 a 15 pele jan 2011, 16 a 18 pele abr 2011 e 19 a 21 pele out 2011. M= marcador de peso molecular 100pb. Fonte: Da autora, conforme dados da pesquisa

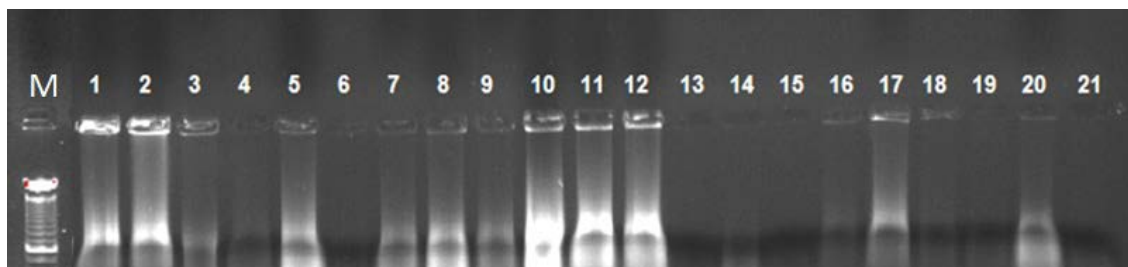
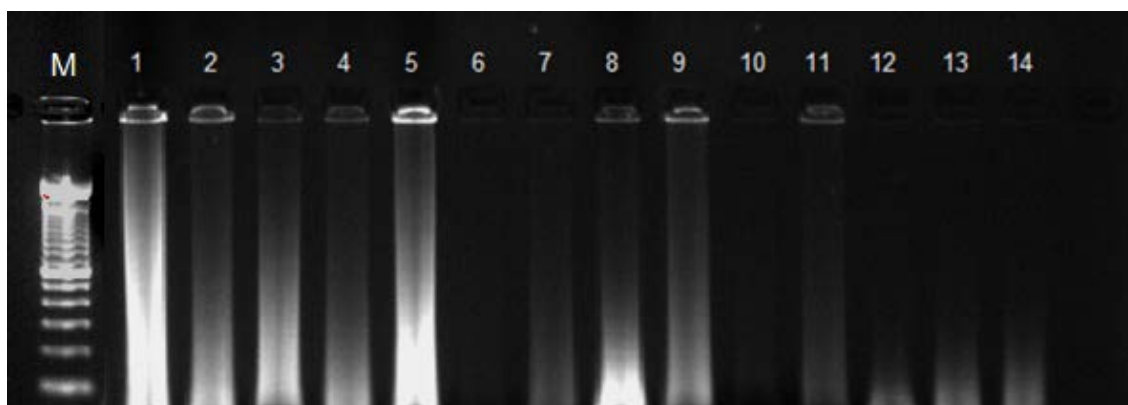


Figura 2: Gel de agarose 0,8% com as amostras de DNA. 1- rim 2008, 2- rim 2011, 3-baço 2008, 4-baço 2011, 5-intestino 2008, 6-intestino 2011, 7-bexiga 2008, 8-bexiga 2009, 9 a 11- apêndice cecal jan 2011, 12 a 14- apêndice cecal abr 2011. M= marcador de peso molecular 100pb. Fonte: Da autora, conforme dados da pesquisa



Em relação à quantidade e qualidade do DNA extraído das amostras a Tabela 1 apresenta os resultados da quantificação do DNA obtidos de diferentes tecidos pelo protocolo B. A quantificação foi feita em triplicata e os valores mostram que existiu grande variação entre as amostras, provavelmente, devido ao fato de a quantidade de tecido nos blocos de parafina ser desigual. Na tabela também se percebe que poucas amostras atingem a qualidade ideal do DNA fornecida pela proporção dos comprimentos de onda 260/280 nm, indicam o *ratio*, que deve ser igual ou superior a 1,6. Desses tecidos testados, as amostras que apresentaram qualidade um pouco superior foram: apêndice cecal, próstata, rim e baço. Também se observa que o tempo de armazenamento parece não interferir entre os resultados, visto que para alguns tecidos as amostras mais antigas tiveram melhor *ratio* (rim, baço) e no caso do íleo e bexiga, as amostras atuais tiveram melhor resultado.

Tabela 1: Quantificação do DNA em diferentes amostras de tecido parafinizado.

Amostra	Data	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	ratio
AC	Abr 2011	0,85	1,7
AC	Abr 2011	2,85	1,5
AC	Abr 2011	1,05	1,61
AC	Jan 2011	2,45	1,5
AC	Jan 2011	1,85	1,33
AC	Jan 2011	1,6	1,4
AC	Out 2010	2,4	1,5
AC	Out 2010	2,6	1,45
AC	Out 2010	3,2	1,5
Próstata	Abr 2011	1,0	1,35
Próstata	Abr 2011	2,1	1,35
Próstata	Abr 2011	0,45	1,75
Próstata	Jan 2011	6,95	1,1
Próstata	Jan 2011	1,3	1,55
Próstata	Jan 2011	0,85	1,33
Próstata	Out 2010	3,55	1,42
Próstata	Out 2010	3,05	1,4
Próstata	Out 2010	7,95	1,1
Pele	Abr 2011	0,9	1,5
Pele	Abr 2011	9,35	1,2
Pele	Jan 2011	0,73	1,25
Pele	Jan 2011	0,5	1,5
Pele	Jan 2011	0,73	1,15
Pele	Out 2010	0,38	1,5
Pele	Out 2010	0,55	1,6
Pele	2010	4,5	1,12
Rim	2008	3,5	1,5
Rim	2011	6,8	1,4
Baço	2008	6,6	1,4
Baço	2011	6,3	1,4
Íleo	2008	5,3	1,3
íleo	2011	5,4	1,4
Bexiga	2008	5,64	1,4
Bexiga	2011	3,8	1,5

Data: dia da inclusão dos tecidos em parafina, $\mu\text{g}/\mu\text{L}$: quantidade de DNA, ratio (260/280 nm): qualidade do DNA. AC= apêndice cecal.

Fonte: Da autora, com base na pesquisa.

Com relação ao protocolo C, os dados da quantificação das amostras estão representados na Tabela 2, onde pode se observar pelo ratio que a qualidade do DNA extraído foi inferior ao protocolo B.

Tabela 2: Quantificação do DNA em diferentes amostras de tecido parafinizado.

Amostra	Data	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	ratio
Rim	2008	0,25	1,6
Rim	2011	2,15	1
Baço	2008	0,1	2
Baço	2011	0,4	1,33
Íleo	2008	5,0	1,06
íleo	2011	1,1	1,04
Bexiga	2008	2,2	1,1
Bexiga	2011	1,9	1,05
Próstata	Mai 2009	9,75	1,1
Próstata	Abr 2009	1,7	1,15
Próstata	Ago 2009	1,2	1,2
Pele	Abr 2010	1,4	1,2
Pele	Jul 2010	1,2	1,25
Pele	Nov 2010	2,3	1,1
AC	2009	0,95	1,2
AC	Abr 2010	8,25	1,03
AC	Jan 2010	1,1	1,1

Data: dia da inclusão dos tecidos em parafina, $\mu\text{g}/\mu\text{L}$: quantidade de DNA, ratio (260/280 nm): qualidade do DNA. AC= Apêndice Cecal.

Fonte: Da autora, com base na pesquisa.

A partir dos resultados da quantificação e do gel de DNA, optou-se por fazer a PCR utilizando apenas amostras do protocolo B. Não houve amplificação do gene MBL2 nas amostras de tecido; entretanto, nos controles positivos feitos com DNA genômico isolado de sangue humano funcionaram, indicando que não houve problemas na reação da PCR, e sim com o DNA dos tecidos.

4 DISCUSSÃO

Devido à dificuldade de obtenção de amostras de tecido humano fresco, as amostras em parafina se tornam a escolha mais próxima e mais acessível. A importância da extração de DNA desses tecidos emblocados em parafina está relacionada à biologia molecular, pois com os avanços nessa área é possível empregar essas técnicas para estudos retrospectivos, utilização em genética forense entre outros.

Para a preservação de tecidos de biópsia, fixação com formol é um método prático e eficiente, sendo amplamente utilizados em laboratórios de anatomia patológica. Simonato, *et al.* (2007) mencionam que esse método resulta no envelhecimento de proteínas nucleares, na formação de ligações entre proteínas e DNA e na sua fragmentação, o que gera uma dificuldade na extração de tecidos fixados em parafina.

Segundo Coombs *et al.* (1999), os principais obstáculos para obtenção de DNA de material parafinizado para amplificação por PCR são a remoção da parafina e a purificação do DNA. No presente estudo, o protocolo A não foi bem-sucedido na extração do DNA; entretanto, Vilanova-Costa, Nobrega e Cruz (2008) utilizaram o mesmo protocolo para cortes de espessura menores (5

µm) que os utilizados neste trabalho e eles obtiveram sucesso na extração e qualidade do DNA. Esta divergência pode ser devido à diferença na espessura dos cortes utilizados.

Além disso, devem ser levadas em consideração as etapas de lavagens dos cortes parafinizados, que neste protocolo eram deficientes, e que estão mais presentes nos outros dois protocolos.

Em relação ao protocolo B, observou-se um rastro nas raias das amostras, indicando a presença de DNA, mas conforme a quantificação observa-se a baixa qualidade do DNA obtido. Este fato pode ser devido à presença de proteínas associadas, contudo, a hipótese de contaminação proteica é pouco provável por causa da intensa digestão por proteinase K (pK), que apresenta grande espectro de clivagem. Nesse caso, as proteínas mais resistentes foram completamente clivadas durante o processo ativo da pK. Assim, conclui-se que proteínas mais sensíveis, como as histonas, também sofreram intensa ação proteolítica. A presença ou ação de lipídeos no material a ser amplificado é pouco provável, pois o reagente aromático dimetilbenzeno (xilol) tem ação em sua total degradação nas etapas iniciais do processo de extração. (PEREIRA, SOUZA e BAPTISTA, 2008). Já o protocolo C, que consistia na mesma sequência de lavagens do protocolo B, apenas sendo diferente pela extração de DNA com o reagente DNAzol®, obteve menor quantidade de material genético.

O sucesso da amplificação do DNA pela técnica de PCR depende não só da qualidade do DNA e sim do tamanho dos *primers* utilizados para a PCR. Pereira, Souza e Baptista (2008) demonstraram em seu estudo que o DNA das amostras de tecidos parafinizados é degradado, e que o emprego de *primers* com mais do que 246 pb não obtém sucesso na amplificação por PCR, devido a essa degradação de DNA.

Sepp *et al.* (1994) correlacionaram o método de extração de DNA utilizado, o tamanho do fragmento gênico obtido e o número de falhas na amplificação. Segundo seus estudos, na comparação entre os métodos de fervura da amostra em água, fervura em resina quelante e o método clássico, seguido de resina quelante, destes, apenas o último foi bem-sucedido na obtenção de DNA amplificável por PCR e, também, na amplificação de fragmentos maiores de DNA (984 pb). Entretanto, Liu *et al.* (1993), concluíram que, embora utilizassem o mesmo método de extração para tecidos fixados e emblocados em parafina, há variação no sucesso de amplificação de fragmentos gênicos cada vez maiores, ou seja, quanto maior o fragmento gênico a ser amplificado, menores as chances de sucesso de amplificação.

Existem poucos estudos e metodologias novas para a extração de DNA de amostras parafinizadas, além disso, os poucos trabalhos apresentam dados contraditórios com relação ao tamanho do fragmento amplificado a partir do DNA obtido de material parafinado. Pavelic, Gall e Bosnar (1996) concluíram que tecidos fixados podem ser usados, com sucesso, para fragmentos de DNA menores que 318 pb, sempre que tiverem menos de 39 anos de arquivo e que fragmentos maiores (720 pb) são amplificáveis, quando as amostras têm arquivo de 1 a 10 anos.

5 CONCLUSÃO

Com o presente estudo conclui-se que há dados divergentes e pouco reprodutíveis com relação ao sucesso na obtenção de métodos de isolamento de DNA de tecidos parafinizados, bem como o seu uso na amplificação de fragmentos gênicos específicos. Estudos posteriores que comparem outros métodos de isolamento com diferentes amostras e levando em consideração a forma de preparo do material, o tamanho dos cortes, o tempo de armazenagem e o tamanho dos fragmentos gênicos, são necessários para se obter o melhor método de isolamento de DNA deste tipo de amostra.

REFERÊNCIAS

- BAREA, J.A; PARDINI, M. I. M. C.; GUSHIKEN, T. Extração de DNA de Materiais de Arquivo e Fontes Escassas: revisão e apontamentos sobre as possíveis aplicações. **NewsLab**, Botucatu,SP. ed. 63, p. 274-281, 2004.
- CHEN, B. F; CLEJAN, S. Rapid preparation of tissue DNA from paraffinembedded blocks and analysis by polymerase chain reaction. **J. Histochem. Cytochem.** Thousand Oaks, CA, v. 41, p. 765, 1993.
- COOMBS, N. J; GOUCH, A. C; PRIMROSE, J. N. Optimization of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. **Nucleic Acids Res.** Seattle, v. 27, p. 12, 1999.
- COURA, R.; PROLLA, J. C.; MEURER, L.; ASHTON-PROLLA, P. Na alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. **J Clin Pathol.** London. v.58, p. 894-895, 2005.
- FERNANDES, J. V.; MEISSNER, R.V.; FERNANDES, T.A.A.M.; ROCHA, L.R.M.; CABRAL, M.C.; VILLA,L.L. Comparação de três protocolos de extração de DNA a partir de tecido fixado em formol e incluído em parafina. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** Rio de Janeiro. v. 40, n. 3, p. 141-146, 2004.
- KULLMANN, F; BOCKER, T; SCHOELMEURICH, J; RUESCHOFF, J. A comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissue for microsatellite instability analysis by PCR. **Acta. Biotechnol.** Malden, v. 18, p. 77-83, 1998.
- LIU, L. JOHNSON, R. M.; TRAWEEK, S. T Rearrangement of the BCL-2 gene in follicular lymphoma. Detection by PCR in both fresh and fixed tissue samples. **Diagn Mol Pathol**, Charlottesville, v. 2, n. 4, p. 241-247, 1993.
- MANOJKUMAR, R.; VARANAT, M. Polymerase chain reaction: types and its applications in the field. **International Journal of Tropical Medicine**, Medwell Publishing. v. 1, n. 4, p. 156-161, 2006.
- MONTICIELO, O. A; CHIES, J.A.; MUCENIC, T.; RUCATTI, G.G.; JUNIOR, J.M.; da SILVA, G.K.; GLESE,N.; dos SANTOS, B.P.; BRENOL, J.C.; XAVIER,R.M. Mannose-binding lectin gene polymorphisms in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus.** Thousand Oaks, v. 19, p. 280-87, 2010.
- PAVELIC, J; GALL, T. K; BOSNAR, M. H; PCR amplification of DNA from archival specimens. A methodological approach. **Neoplasma**, Bratislava. v. 43, p. 75-81, 1996.
- PEREIRA A. C, SOUZA V. B, DIAS-BAPTISTA I. M. F. Extração de DNA de biópsias de pele fixadas em formalina tamponada e embebidas em parafina e amplificação por PCR. **Hansen Int.** v. 33, n. 2, p. 25-30, 2008.
- PERKINS, S. L; KJELDSBERG, C. R. Immunophenotyping of lymphomas and leukemias in paraffin-embedded tissues. **Am. J. Clin. Pathol.** Chicago, v. 99, p. 362, 1993;
- SHANG-RONG S.; COTEL, R.J; WU, L.; LIU, C.; DATAR, R.; SHI, Y.; LIU, D.; LIM,H.; TAYLOR, C.R. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue section based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. **The Journal of Histochemistry e Cytochemistry.** Thousand Oaks, CA, v. 50, n. 8, p. 1005-1011, 2002.
- SEPP, S.; SZABÓ, I.; UDA, H.; SAKAMOTO, H. Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. **J. Clin. Pathol.** London, v. 47, p. 318-323, 1994.

SIMONATO, L. E; GACIA, J. F.; NUNES, C.M.; MIYAHARA, G.I. Avaliação de dois métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação em PCR. **Jornal Brasileiro de Patologia Médico Laboratorial**, Rio de Janeiro. v. 43, n. 2, p. 121-127, 2007.

VAN DER ZANDEN, A.G.M; HOENTJEN, A.H; HEILMAN, F.G.C. Simultaneous detection and strain differentiation on *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and in stained microscopic preparations. **Mol. Pathol.** Jackson, MS, v. 51, p. 209-214, 1998.

VILANOVA-COSTA, A.; NÓBREGA, J.; CRUZ, R. Extração e purificação de DNA em material biológico parafinado. **Estudos**, Goiânia, v. 35, n. 1/2, p. 143-152, jan./fev. 2008.

WATSON, James D. et al. **Biologia Molecular do Gene**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.