

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CHAPECÓ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

MARCELO ZVIR DE OLIVEIRA

**PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS FIXADAS EM FORMALINA E
PRESERVADAS EM PARAFINA PARA USO DIAGNÓSTICO E
CARACTERIZAÇÃO DE DOENÇAS ATRAVÉS DE BIOLOGIA MOLECULAR**

CHAPECÓ

2022

MARCELO ZVIR DE OLIVEIRA

**PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS FIXADAS EM FORMALINA E
PRESERVADAS EM PARAFINA PARA USO DIAGNÓSTICO E
CARACTERIZAÇÃO DE DOENÇAS ATRAVÉS DE BIOLOGIA MOLECULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas, sob orientação da Professora Doutora Jossimara Polettini.

CHAPECÓ

2022

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Oliveira, Marcelo Zvir de
PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS FIXADAS EM FORMALINA E
PRESERVADAS EM PARAFINA PARA USO DIAGNÓSTICO E
CARACTERIZAÇÃO DE DOENÇAS ATRAVÉS DE BIOLOGIA MOLECULAR
/ Marcelo Zvir de Oliveira. -- 2022.
49 f.:il.

Orientadora: Doutora Jossimara Polettini
Co-orientadora: Mestre Daniela Augustin Silveira
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biomédicas, Chapecó, SC, 2022.

1. Biologia Molecular. 2. Processamento. 3.
Diagnóstico. 4. Amostras FFPE. 5. Formalina. I. ,
Jossimara Polettini, orient. II. Silveira, Daniela
Augustin, co-orient. III. Universidade Federal da
Fronteira Sul. IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

MARCELO ZVIR DE OLIVEIRA

**PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS FIXADAS EM FORMALINA E
PRESERVADAS EM PARAFINA PARA USO DIAGNÓSTICO E
CARACTERIZAÇÃO DE DOENÇAS ATRAVÉS DE BIOLOGIA MOLECULAR**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da
Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS para obtenção do título de Mestre em Ciências
Biomédicas, defendido em Banca examinadora em 13/10/2022.

Aprovado em: 13/10/2022

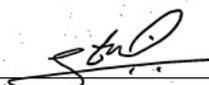
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Jossimara Polettini
Presidente da Banca/Orientador



Prof. Dr. Gustavo Olszanski Acrani - UFFS
Membro Titular Interno



Prof. Dr. Lucas Tadeu Bidinotto
Membro Titular Externo

Chapecó-SC, 13 de Outubro de 2022

Dedico este trabalho a minha família e a todos os pesquisadores que demandam seu tempo e dedicação para o desenvolvimento de estudos e novas descobertas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus por nos permitir, mesmo que de forma passageira neste mundo, a oportunidade em poder contribuir de forma singela à área da pesquisa laboratorial.

Agradecer a minha Família por estarem presentes neste momento, a todos os amigos e pessoas próximas que sempre me estimularam e deram forças nesta caminhada de estudo e realizações, em especial aos meus amigos da Coordenação Adjunta de Laboratórios do Campus Passo Fundo-RS (CLAB-PF).

À minha orientadora Professora Dr^a Jossimara Poletini que esteve juntamente a mim nesta caminhada me transmitindo conhecimento e apoio em todas as etapas do desenvolvimento desta pesquisa. A co-orientadora Prof^a. Me. Daniela Augustin Silveira, e a todos os demais Professores que participaram das etapas deste estudo nos momentos de qualificação e defesa desta pesquisa.

E por fim à UFFS, que já há algum tempo é minha segunda casa onde atuo como Servidor e tive o prazer de me tornar um discente na mesma.

Muito Obrigado.

“Você não tem que lutar para ser melhor que ninguém, você precisa lutar para ser melhor a cada dia consigo mesmo”.

Olavo de Carvalho

RESUMO

Os avanços científicos voltados ao diagnóstico clínico e o surgimento da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), fizeram com que amostras biológicas fixadas em formalina e preservadas em parafina, as chamadas FFPE (do inglês *formalin-fixed paraffin-embedded*) se tornassem fontes valiosíssimas de material genético para análises moleculares na complementação de diagnósticos clínicos. O grande desafio a partir de então, se dá frente à utilização de protocolos que sejam eficazes diante da recuperação e amplificação do DNA. O objetivo do estudo foi padronizar o uso de material (FFPE) proveniente de processos patológicos diversos, representativos das doenças humanas, para uso na investigação molecular. Trata-se de um estudo transversal retrospectivo, no qual foram incluídas amostras com tempo de preservação em parafina distintos, provenientes do Laboratório de Patologia do Hospital São Vicente de Paulo, Passo Fundo, RS e do Laboratório de Patologia da UNESP – Botucatu, SP. As amostras de diferentes tecidos (tumoral e não tumoral), distribuídas em dois grupos conforme fixador, Grupo 1 (G1 - formalina não tamponada, n=90) e Grupo 2 (G2 - formalina tamponada, n=68) foram seccionadas em micrótomo (3 e 6 cortes de 10 micrômetros (μm) – G1 e 6 cortes de 10 micrômetros (μm) – G2), e o período de preservação das amostras foi de 2, 5 e 10 anos. Posteriormente, as amostras seccionadas foram submetidas à desparafinização e extração de DNA total e analisadas por espectrofotometria para verificação da qualidade e quantidade do DNA recuperados de cada tecido. A eficiência da recuperação de DNA foi confirmada pela amplificação do gene endógeno beta globina por PCR, utilizando-se *primers* específicos. Os dados foram analisados seguindo os pressupostos estatísticos e o nível de significância adotado foi de 5%. Observou-se que a concentração de DNA Total isolada de amostras de períodos de 2, 5 ou 10 anos não foi diferente. A Concentração de DNA total foi inferior nas amostras de biópsias (G1 e G2) comparadas às peças cirúrgicas (G1 e G2) ($p < 0,0001$), no entanto esse resultado foi inverso quando considerado a concentração de DNA/área do fragmento (G1, $p = 0,003$ e G2, $p = 0,0005$). Em relação à qualidade do DNA observou-se melhor resultado nas amostras de biópsias (G1 e G2) em relação às peças. Considerando a relação $> 1,8$, o número de Biópsias e Peças do G2 foram superiores em relação ao G1. Quanto à positividade da PCR, a taxa de sucesso da amplificação do gene endógeno beta globina foi de cerca de 70% no G1 e 100% no G2. Para as amostras de Biópsias (G1) 6 cortes, observou-se maior positividade comparadas às de 3 cortes ($p = 0,04$). Conclui-se que o tempo de armazenamento de amostras FFPE não interfere na quantidade de DNA recuperada. O uso de formalina tamponada é preferível frente para a fixação dos tecidos. As biópsias FFPE para obtenção de DNA apresentam maior quantidade de DNA/área e melhor qualidade de DNA, sendo seu uso preferível em relação às peças, no entanto um número maior de cortes (material) se apresentou mais eficaz frente à recuperação e positividade diante as Biópsias conservadas em formalina comum. O protocolo de extração de DNA de fácil execução e econômico é factível para as análises moleculares de um grande número de amostras FFPE, mas faz-se necessário conhecer todas as variáveis que podem interferir na recuperação do material genético.

Palavras-chave: Processamento, Diagnóstico, Biologia Molecular

ABSTRACT

Scientific advances aimed at clinical diagnosis and the emergence of the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique have made biological samples fixed in formalin and preserved in paraffin, the so-called FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded), become valuable resources of genetic material for molecular analysis to complement clinical diagnoses. The great challenge from then on is faced with the use of protocols that are effective in the recovery and amplification of DNA. The aim of the study was to standardize the use of material (FFPE) from different pathological processes, representative of human diseases, for use in molecular investigation. This is a retrospective cross-sectional study, in which samples with different preservation times in paraffin were included, from the Pathology Laboratory of Hospital São Vicente de Paulo, Passo Fundo, RS and the Pathology Laboratory of UNESP – Botucatu, SP. Samples from different tissues (tumor and non-tumor), divided into two groups according to the fixative, Group 1 (G1 - unbuffered formalin, n=90) and Group 2 (G2 - buffered formalin, n=68). Were submitted to microtome sections (3 and 6 sections of 10 micrometers (μm) – G1 and 6 sections of 10 micrometers (μm) – G2), and the preservation period of the samples was 2, 5 and 10 years. Subsequently, the sectioned samples were submitted to deparaffinization and total DNA extraction and analyzed by spectrophotometry to verify the quality and quantity of DNA recovered from each tissue. The DNA recovery efficiency was confirmed by endogenous beta globin gene PCR amplification, using specific primers. Data were analyzed following statistical assumptions and the significance level adopted was 5%. It was observed that the concentration of Total DNA isolated from samples of periods of 2, 5 or 10 years was not different. Total DNA concentration was lower in biopsy samples (G1 and G2) compared to surgical specimens (G1 and G2) ($p < 0.0001$), however this result was inverse when considering the concentration of DNA/ fragment area (G1, $p = 0.003$ and G2, $p = 0.0005$). Regarding the DNA quality, a better result was observed in the biopsy samples (G1 and G2) in relation to the surgical specimens. Considering the ratio > 1.8 , the number of Biopsies and surgical specimens in G2 were higher than in G1. As for PCR positivity, the success rate of endogenous beta globin gene amplification was about 70% in G1 and 100% in G2. For Biopsy samples (G1) 6 cuts, greater positivity was observed compared to 3 cuts ($p = 0.04$). It is concluded that the storage time of FFPE samples does not interfere with the amount of DNA recovered. The use of buffered formalin is preferable in front of tissue fixation. FFPE biopsies for obtaining DNA have a greater amount of DNA/area and better DNA quality, its use being preferable in relation to the pieces, however a greater number of cuts (material) was more effective in the face of recovery and positivity in the face of biopsies preserved in common formalin. The easy and economical DNA extraction protocol is feasible for molecular analysis of a large number of FFPE samples, but it is necessary to know all the variables that can interfere in the recovery of genetic material.

Keywords: Processing, Diagnosis, Molecular Biology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

- Figura 1** - Grupos amostrais obtidos para a realização de extração de DNA. Grupo de amostras constituído por Biópsias (n=30) e Peças Cirúrgicas (n=60), as quais foram fixadas em formol não tamponado (Grupo 1). Grupo de amostras constituído por Biópsias (n=27) e Peças Cirúrgicas (n=41), as quais foram fixadas em formol tamponado (Grupo 2) Biópsias submetidas ao processo de Desparafinização em Lâmina (DL)..... 26
- Figura 2** - Dotblot representativo das medianas (mínimo-máximo) das concentrações de DNA total (ug/mL) e DNA/Área recuperado de amostras provenientes de biópsias e peças cirúrgicas fixadas em formalina tamponada e não tamponada e preservadas em parafina de diferentes tecidos. **A.** Concentração total Grupo 1. **B.** Concentração por área do fragmento no bloco de parafina Grupo 1. **C.** Concentração total Grupo 2. **D.** Concentração por área do fragmento no bloco de parafina Grupo 2. **E.** Concentração total Biópsias G1 x Biópsias G2. **F.** Concentração total Peças G1 x Peças G2. Teste de Mann-Whitney..... 32
- Figura 3** - Dotblot representativo das medianas (mínimo-máximo) das concentrações de DNA total (ug/mL) e DNA/Área recuperado de amostras provenientes de biópsias / biópsias DL (formalina comum – 2 anos). **A.** Concentração total. **B.** Concentração por área do fragmento no bloco de parafina. Teste de Mann-Whitney..... 33
- Figura 4** - Dotblot representativo das medianas (mínimo-máximo) da relação de leitura de espectrofotometria 260/280nm recuperado de amostras provenientes de biópsias e peças cirúrgicas fixadas em formalina tamponada e não tamponada e preservadas em parafina de diferentes tecidos. **A.** Concentração DNA total/Área – relação $\geq 1,4$ – G1. **B.** Concentração DNA total/Área – relação $\geq 1,8$ – G2. **C.** Relação 260/280 – G1 x G2. **D.** Concentração DNA total/Área – relação $\geq 1,8$ – Biópsias G1 x Biópsias G2. **E.** Concentração DNA total/Área – relação $\geq 1,8$ – Peças G1 x Peças G2. **F.** Relação 260/280 – Biópsias G1- 2 anos x Biópsias DL. Teste de Mann-Whitney..... 34

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo e visualização das bandas representativas da amplificação do gene endógeno da beta-globina, sob iluminação ultravioleta. As setas verdes indicam positividade para o gene avaliado, demonstrando efetividade na recuperação de DNA total das amostras, considerando fatias de tecido de 3 ou 6 um. A. Amostras 1-20, Biópsias Desparafinizadas em Lâmina (DL); B. Amostras 1-20 (13 e 14 ausentes no gel, ambas positivas) Biópsias Grupo 1; C. Amostras 141-160, Peças Grupo 1; D. Amostras 50-73, Biópsias e Peças Grupo 2. PM: peso molecular 100 pares de base (bp); tamanho esperado do produto amplificado = 268pb)..... 36

Figura 6. Principais achados do estudo e critérios recomendados de acordo com o material disponível para análise em cada serviço..... 42

QUADROS

Quadro 1. Exposição do grupo amostral obtido para a realização de extração de DNA. Grupo de amostras constituído por Biópsias (n=30) e Peças Cirúrgicas (Peças Médias e Grandes) (n=60), as quais foram fixadas em formol não tamponado, processadas, incluídas em parafina e estavam acondicionadas em arquivos, com períodos diferentes (2, 5 e 10 anos) de armazenamento..... 48

Quadro 2. Exposição do grupo amostral obtido para a realização de extração de DNA. Grupo de amostras constituído por Biópsias (n=27) e Peças Cirúrgicas (n=41), as quais foram fixadas em formol tamponado, processadas, incluídas em parafina e estavam acondicionadas em arquivos, com períodos diferentes (2, 5 e 10 anos) de armazenamento..... 49

LISTA DE TABELAS

TABELAS

- Tabela 1.** Representação dos grupos de amostras (Área do fragmento; DNA Total; DNA/Área; Qualidade; Positividade)..... 30
- Tabela 2 –** Positividade de PCR para b-globina nas amostras de FFPE – G1, G2 e Biópsias DL..... 37
- Tabela 3 –** Relação da concentração e positividade de DNA de amostras constituídos por Biópsias e Peças Cirúrgicas (G1), as quais foram fixadas em formalina não tamponada, processadas, incluídas em parafina e estavam acondicionadas em arquivos, com períodos diferentes (2, 5 e 10 anos) de armazenamento..... 38

LISTA DE SIGLAS

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos.

DL - Desparafinização em lâmina.

DNA - Ácido Desoxirribonucleico.

FFPE - Formalin-fixed paraffin-embedded.

HSVP - Hospital São Vicente de Paulo.

IHC – Imunoistoquímica.

LCM - Microdissecções por Captura a Laser.

MLPA - Amplificação Multiplex de Sondas Dependentes de Ligação.

NBF - Formalina Tamponada Neutra.

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase.

Qpcr - Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real.

RNA - Ácido Ribonucleico.

µg - Migrograma.

µL - Microlitro.

UNESP – Universidade Estadual Paulista.

µm - Micrômetro.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	OBJETIVOS.....	16
1.1.1	OBJETIVO GERAL.....	16
1.1.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1	AMOSTRAS PARAFINIZADAS.....	17
2.2	FORMOL x FORMOL TAMPONADO (pré-processamento – fixação e corte..	19
2.3	ANÁLISES MOLECULARES.....	22
2.4	EXTRAÇÃO DNA x RNA x PROTEÍNAS x SEQUÊNCIAMENTO.....	23
3	METODOLOGIA.....	25
3.1	GRUPO AMOSTRAL.....	25
3.2	CORTES.....	27
3.3	DESPARAFINIZAÇÃO.....	28
3.4	DIGESTÃO E EXTRAÇÃO DO DNA.....	28
3.5	QUANTIDADE, QUALIDADE DE DNA E PCR.....	29
3.6	ANÁLISE DOS DADOS.....	30
4	RESULTADOS.....	30
4.1	CONCENTRAÇÃO DNA.....	31
4.2	QUALIDADE DNA.....	33
4.3	AMPLIFICAÇÃO DE GENE ENDÓGENO POR PCR.....	35
4.4	RELAÇÃO POSITIVIDADE x CONCENTRAÇÃO DNA.....	38
5	DISCUSSÃO.....	38
6	CONCLUSÃO.....	43
	REFERÊNCIAS.....	44
	MATERIAL SUPLEMENTAR.....	48

1 INTRODUÇÃO

Análises moleculares *post-mortem* vêm se tornando cada vez mais comuns em investigações retrospectivas de tecido humano com finalidade de identificação de alterações genéticas e patógenos em geral. Estas investigações são possíveis através da utilização de amostras fixadas em parafina, as chamadas FFPE (do inglês *formalin-fixed paraffin-embedded*). No entanto, a formalina utilizada para fixação destas amostras pode gerar certa degradação do DNA tecidual o que irá proporcionar rendimentos variáveis nas análises moleculares (REID et al., 2017).

O campo da ciência sobre pesquisas desenvolvidas para a recuperação e amplificação de ácidos nucleicos de amostras FFPE já é considerado o mais desenvolvido para estudos genéticos retrospectivos. A maioria das amostras arquivadas são fixadas em formalina e embebidas em parafina, o que proporciona uma melhora diante das propriedades de manuseio destes tecidos, e, em longo prazo, mantém-se o armazenamento de amostras com ótima qualidade histológica, quantidades substanciais e com um custo mínimo. Nas últimas décadas, a fisiopatologia das doenças tem sendo melhor compreendida devido à aplicação de técnicas moleculares, pois as alterações celulares a nível molecular precedem as alterações clínicas causadas pelas alterações patológicas (KHAN et al., 2022).

Este tipo de amostras provenientes de biópsias, procedimentos cirúrgicos, transplantes e autópsia são vistas como grandes fontes de recursos frente à identificação de alvos potenciais que auxiliarão diretamente em decisões clínicas, no que tange a diagnósticos e tratamento de doenças. Nas últimas décadas, o uso de bioespécimes aumentou consideravelmente na área biomédica com a finalidade de se avaliar novas terapias e novas hipóteses considerando as bases moleculares e genéticas das alterações patológicas existentes nos tecidos (ESTEVA-SOCIAIS et al., 2019).

A maioria das amostras clínicas provenientes das alterações patológicas é armazenada como tecido fixado em formalina e embebido em parafina (FFPE). No entanto, durante o processamento pode ocorrer fragmentação tecidual. Por outro lado, dados recentes ressaltam que a qualidade dos resultados derivados de análises genéticas pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) das amostras FFPE se relacionam diretamente ao modo como as amostras foram coletadas e preparadas desde a coleta até a forma de fixação (NAGAHASHI et al., 2018).

A PCR possui alta especificidade na busca de alterações genéticas e agentes infecciosos gerais, uma vez que, para realizar a identificação das amostras biológicas, utiliza-

se uma sequência de material genético (DNA ou RNA) específico e correspondente à região gênica que se deseja estudar (TSAKOGIANNIS et al., 2017).

Diante do exposto, espera-se definir uma padronização metodológica para recuperação de material genético de diferentes tecidos em um Serviço específico (local), visto que o grande desafio frente a estes tipos de amostra é a utilização de um protocolo que apresente eficiência na amplificação do DNA, utilizando-se reagentes e métodos de baixo custo a fim de viabilizar futuros estudos de investigação de possíveis alterações com fim de diagnóstico (como diagnóstico retrospectivo) e descobertas de mecanismos biológicos de doenças e de estratégias de atuação terapêutica, incluindo identificação de indivíduos, estudos populacionais e envios de amostras à distância.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Padronizar o processamento de amostras fixadas em formalina e armazenadas em parafina (FFPE), e montar um protocolo de processamento para uso deste material em técnicas de biologia molecular com intuito diagnóstico e de caracterização de doenças.

1.1.2 Objetivos Específicos

a) Correlacionar o período / tempo de fixação e armazenamento da amostra FFPE com a qualidade (degradação) e o quantitativo de DNA através da extração de DNA e PCR convencional de genes endógenos de cada tecido analisado;

b) Comparar os parâmetros de concentração e qualidade de DNA entre amostras fixadas em formalina não tamponada e formalina tamponada;

c) Determinar a concentração de DNA recuperado das amostras estudadas, considerando, número de cortes, qualidade e positividade da PCR.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Avanços científicos voltados ao diagnóstico clínico, acompanhado da descoberta do DNA, possibilitaram a compreensão dos mecanismos que norteiam os dispositivos fundamentais da vida dos organismos. Uma importante consequência foi a revolução no domínio da biologia e nos conhecimentos de métodos para análises do genoma, as quais permitem estudos, discussão e compreensão dos fenômenos da hereditariedade, da variabilidade inter e intra-específica, identificação de patógenos, erradicação e/ou controle de doenças (SCORSATO, 2010).

A ascensão do diagnóstico envolvendo tecnologias em sequenciamento, detecção genômica e ensaios de expressão gênica, se apresenta atualmente indispensável para os centros clínicos de diagnóstico e investigação de processos patológicos a nível molecular, a fim de contribuir para uma melhor abordagem quanto ao tratamento a ser adotado (SARNECKA et al, 2019).

Dessa forma, as amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina são consideradas uma rica fonte de material genético para a utilização de estudos retrospectivos na área da pesquisa clínica, uma vez que elas podem permanecer armazenadas por anos e já constituem uma rica fonte de materiais arquivados em centros de patologias. Adicionalmente, a área de pesquisa de análises genéticas vem em constante desenvolvimento com surgimento de novas tecnologias e equipamentos, e emerge a possibilidade de realização de análises que antes não eram possíveis, e amplia descobertas e entendimentos frente às caracterizações genéticas de diversas doenças na área de pesquisa.

2.1 AMOSTRAS PARAFINIZADAS

Amostras biológicas fixadas em formalina e preservadas em parafina FFPE provenientes de biópsias, procedimentos cirúrgicos, transplantes e autópsia são vistas como grandes fontes de recursos para identificação de alvos potenciais que auxiliarão diretamente em decisões clínicas, no que tange a diagnósticos e tratamento de doenças. Nas últimas décadas, o uso de bioespécimes aumentou consideravelmente na área biomédica com a finalidade de se avaliar novas terapias e novas hipóteses considerando as bases moleculares e genéticas das alterações patológicas existentes nos tecidos. (ESTEVA-SOCIAIS et al., 2019).

A maioria das amostras clínicas provenientes das alterações patológicas é armazenada como FFPE, o que representa importante fonte de estudo para entendimento da fisiopatologia das doenças. No entanto, durante o processamento pode ocorrer fragmentação tecidual. Por outro lado, dados recentes ressaltam que a qualidade dos resultados derivados de análises genéticas pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) das amostras FFPE se relacionam diretamente ao modo como as amostras foram coletadas e preparadas desde a coleta até a forma de fixação (NAGAHASHI et al., 2018).

Laboratórios clínicos e departamentos de patologia de hospitais contam com imensos arquivos de amostras FFPE, pois as mesmas podem ser armazenadas por períodos prolongados, se tornando hoje uma fonte inestimável de material para análises biomédicas. A qualidade das proteínas e ácido nucléicos destas amostras é primordial para resultados relevantes de análise molecular, assim como os métodos empregados à sua preparação, fixação e conservação irão refletir diretamente em um resultado de diagnóstico molecular. Dessa forma, fica evidente a importância de uma preparação eficaz destas amostras, principalmente após esta crescente no desenvolvimento tecnológico envolvendo a medicina clínica e de diagnóstico (KRESSE et al, 2018).

O congelamento de amostras com a utilização de nitrogênio líquido sem dúvidas é o método mais indicado para a realização de futuras análises moleculares, porém seu alto custo leva os laboratórios clínicos a adotarem o método de fixação em formalina e inclusão em parafina, proporcionando assim que haja um arquivamento a longo prazo. Além disso, para as análises morfológicas, essa é a forma de escolha por preservar a arquitetura histológica tecidual. Nesse contexto, os principais pontos positivos relacionam o uso de amostras FFPE em estudos retrospectivos, as secções destes tecidos permitem uma análise de alteração estrutural gerada pelo processo patológico, pode-se realizar Micro dissecções por Captura a Laser (LCM) para a identificação e captura de células alvo e por fim, a realização de Imunoistoquímica (IHC) e imunofluorescência para a análise de alterações genéticas e protéicas nas células (EINAGA et al, 2017).

No entanto, a formalina durante sua ação gera modificações químicas das bases do DNA, como a depurinação e desaminação de citosinas, além de modificações químicas celulares, as quais também podem ser relativas e se apresentarem em graus variáveis (ATANESYAN et al, 2017), e isso pode interferir no uso das amostras FFPE em técnicas moleculares. Atualmente não existe um protocolo padrão frente à fixação e preparação da amostra, e discute-se que quanto maior o tempo de acondicionamento maior será a

degradação do DNA. Outro fator importante principalmente voltado à quantificação e qualidade do DNA vai depender do método de extração de ácido nucléico escolhido (ATANESYAN et al, 2017).

O fator mais crítico da realização da pesquisa molecular se relaciona à preparação da amostra, pois atualmente não existe um padrão-ouro de padronização de preparação e conservação destes tecidos após sua coleta. O método frequentemente mais utilizado para a preservação destas amostras se baseia em fixação em formalina e posterior inclusão em parafina. Isto gera um imenso desafio aos laboratórios de diagnóstico, pois a heterogeneidade das amostras pode resultar diferenças consideráveis na quantidade e qualidade de DNA (SARNECKA et al, 2019).

Entretanto estudos recentes vêm demonstrando que mesmo as amostras estando armazenadas já há vários anos, e mesmo havendo a fragmentação do ácido nucléico, que tende a piorar em tecidos mais velhos, resultados de extração e análises de degradação do DNA ainda se apresentaram em níveis aceitáveis mesmo após mais de 10 anos das amostras estarem arquivadas (ONDRACEK et al., 2022).

2.2 FORMOL x FOLMOL TAMPONADO (Pré-processamento – fixação e cortes)

A Formalina é o fixador mais utilizado em estudos de práticas histopatológicas, devido ao fácil manuseio, toxicidade baixa, custo baixo, fornece uma boa qualidade de morfologia tecidual, além de permitir a aplicação de anticorpos para análises de imunohistoquímica (ZSIKLA, 2004).

Rotineiramente, espécimes de tecido são fixados com a utilização da formalina, que paralisa o metabolismo celular e conserva a estrutura tecidual e celular, permitindo uma análise histopatológica de qualidade, porém quanto à recuperação de DNA (qualidade e quantidade) apresenta certos desafios. Formalina sem tamponamento gera oxidação e degradação de ácidos nucleicos. Mesmo com um custo maior, a utilização de formol tamponado (constituído por diluição entre formol comercial, água destilada, fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico) para a fixação das amostras vem sendo mais indicada, pois gera menos degradação de DNA do tecido e conseqüentemente fornece

melhores resultados em análises futuras como as realizadas em PCR (MARASCHIN et al, 2017).

Segundo Zsikla (2004) diversos fatores irão influenciar a degradação do DNA, corroborando com outros autores a questão de quanto tempo o tecido permanece na formalina para a fixação, além de fatores como o pH, sal, concentração e temperaturas, mas reforça a importância destes materiais de arquivo para a realização de análises moleculares. Esses autores demonstraram em estudo que a extração de DNA em amostras fixadas em formalina tamponada apresentaram cerca de 50 vezes mais moléculas de DNA em comparação a fixadas em formol não tamponado. No entanto, seu custo em relação ao formol comum se apresenta elevado, evidenciando a grande diferença em relação ao tipo de formol utilizado pelos laboratórios para a fixação de tecidos.

O tempo de fixação do tecido em formalina ou formalina tamponada antes de sua inclusão em parafina se demonstra fundamental para minimizar a degradação e perda de alelos da cadeia genética do tecido. Estudos mostram que a fixação utilizando formalina não tamponada é maior de que em tecidos fixados em formol tamponado, o que muitas vezes torna o uso do primeiro preferível, em adição ao menor custo. Um agravante de importância relacionado à degradação é o tempo que o tecido permanece em contato com a solução de formol, sendo que períodos inferiores a 3 dias apresentam menos degradação. No entanto, mesmo com o possível comprometimento genético do tecido, o DNA danificado por formalina apresenta resultados satisfatórios na amplificação de pequenos fragmentos específicos de genes de interesse, devido à especificidade de técnicas como a PCR (LIU et al, 2018).

Pode-se concluir frente a esta questão conforme demonstrado em estudos, que o mais recomendado é a fixação do tecido é com a utilização de formol 10% tamponado, pois amostras FFPE conservadas nestes moldes apresentam resultados satisfatórios de extração de DNA e para procedimentos de sequenciamento. Observa-se que a maior parte dos centros de patologia não utiliza a formalina tamponada, sendo de primordial importância a adoção de protocolos de fixação tecidual com a utilização de formol tamponado, pois a fase pré-analítica é primordial para a manutenção do DNA da amostra (AMEMIYA et al, 2019)..

Ressalta-se, ainda, que as amostras coletadas principalmente em biópsias, possuem um tamanho mínimo, e que certamente o processo de fixação adequada dos tecidos é fundamental para obtenção de resultados satisfatórios em análises moleculares. Nesse sentido,

constata-se que espécimes derivados de procedimentos cirúrgicos ou biópsias fixadas em Formalina Tamponada Neutra (NBF) apresentam resultados mais efetivos em relação a qualidade de DNA em comparação a tecidos fixados em formalina não tamponada, a qual apresenta maior degradação da cadeia de DNA (NAGAHASHI et al., 2018).

Nesse contexto, é importante considerar que existem diferenças em relação ao processamento das amostras nos Laboratórios de Patologia. Por exemplo, o uso de formalina tamponada que favorece a preservação do DNA/RNA, no entanto, nem todos os Serviços adotam esse fixador como protocolo. Adicionalmente, o tempo de preservação pode influenciar na recuperação do material genético de FFPEs. Sendo assim, é de suma importância a definição e padronização de um método para a coleta do tecido em parafina em Serviços de Patologia específicos, a fim de fornecer amostras satisfatórias para análises moleculares (ENGEL; MOORE, 2011).

Pode-se destacar ainda que a digestão de proteínas realizada com a utilização de enzima proteinase K (no processo de extração fenol-clorofórmio) é considerada extremamente crucial no isolamento do DNA, pois esta digestão da superfície celular levará à ruptura da membrana celular, causando a liberação do conteúdo citoplasmático juntamente com a quebra do núcleo contendo alvo de DNA genômico. E, se tratando de amostras fixadas com formalina, a digestão com a utilização de proteases também é considerada muito importante, pois ajudará na quebra de ligações cruzadas originadas pela formalina e removerá resíduos de sais de formalina que levam à degradação do DNA (KHAN et al., 2022).

O processamento destas amostras parafinizadas, mesmo apresentando redução da qualidade de recuperação de DNA conforme o tempo de armazenamento, ainda são bem proveitosas e apresentam resultados satisfatórios. Estudos demonstram que uma secção padrão de 5 μ m apresentam sucesso em resultados de análise de recuperação de DNA. Frente a utilização de secções para outros fins como análise proteica e realização de imunocoloração, espessuras mais finas de 2 μ m a 4 μ m foram mais eficientes. Nesta mesma lógica, para análises morfológicas espessuras de corte em 4 μ m se apresentaram mais eficientes frente a cortes mais espessos, pois em maiores espessuras pode ocorrer desparafinização incompleta (BAAS et al, 2014). Já para estudos moleculares, como o de Van der Linden e colaboradores, que realizaram sequenciamento genômico em tecidos tumorais de linfonodo, cólon, apêndice, ureter, amígdala, pele, estômago, pulmão e tecido cerebral, cortes de 10 μ m foi eficiente para realização de extração de DNA utilizando-se kit comerciais (VAN DER LINDEN et al, 2019).

Dessa forma, observa-se que os protocolos escolhidos dependem da técnica a ser utilizada e material a ser analisado.

2.3 ANÁLISES MOLECULARES

Com os avanços tecnológicos voltados à área molecular, a PCR possui alta especificidade na busca de alterações genéticas e agentes infecciosos gerais, uma vez que, para realizar a identificação das amostras biológicas, utiliza-se uma sequência de material genético (DNA ou RNA) específico e correspondente à região gênica que se deseja estudar (TSAKOGIANNIS et al, 2017). Considerando a complexidade que envolve a molécula de DNA, seu estudo se tornou na área da medicina um fator determinante frente a questões clínicas e a meios diagnósticos eficientes e consideravelmente rápidos (CAMARGO; SILVA, 2011).

A quantidade e qualidade de DNA extraído é fundamental para uma obtenção satisfatória de resultados das análises a serem realizadas. Para tal, utiliza-se a absorbância feita em espectrofotômetro, onde ocorre a absorvância de todas as moléculas na amostra que absorvem no comprimento de onda de interesse (nucleotídeos, RNAs e DNAs absorvem em 260nm). Sua análise se dá através da intensidade de luz ultravioleta que passa através da amostra comparando-a com a intensidade antes da passagem da luz através da mesma. A razão de absorbância de 260nm / 280nm é utilizada na avaliação da pureza do DNA e RNA, e a razão 260nm / 230nm é uma medida secundária e apresentam resultados superiores à razão 260/280, com isso é possível avaliar o grau de contaminação e pureza das amostras, onde resultados com valores iguais ou superiores a 1,8 é geralmente aceito para o DNA puro e livre de contaminantes (DINIZ et al., 2011).

A técnica de PCR consiste no processo de duplicação do DNA, cuja sequência-alvo é demarcada através de oligonucleotídeos, que se ligam por hibridização às sequências complementares, possibilitando suas análises de acordo com o interesse do pesquisador. Recentemente, melhorias dessa técnica permitem a visualização da amplificação em tempo real, através da inclusão de fluoróforos à reação, sendo a técnica denominada de PCR em tempo real (qPCR), a qual apresenta maior sensibilidade e especificidade se comparada à PCR convencional. Ademais, técnicas de sequenciamento gênico também permitem melhor

caracterização de alterações do gene e presença de patógenos nas diferentes doenças (BAREA, 2001).

Frente a esta nova perspectiva de análise genética baseada na extração do DNA, vem-se possibilitando a utilização de diversos tipos de amostras teciduais na área de patologia para fins de diagnóstico. Diariamente, amostras de tecidos são coletadas de pacientes, sendo fixados em formol, processadas e incluídas em parafina (FFPE), sendo este procedimento de importância primária para definição diagnóstica, como graduação de tumores, através da análise histopatológica (SIMONATO et al., 2007).

A utilização da biblioteca de DNA e RNA (principalmente RNA) para o sequenciamento já apresentam um desafio maior que se ligam diretamente ao principal fator de dificuldade frente às amostras FFPE que é em relação a degradação dos ácidos nucleicos causados pela ação da formalina no período de fixação das amostras. Recentes tecnologias de sequenciamento enfatizam um vasto potencial frente as amostras FFPE na caracterização de vias moleculares, e a aplicação de protocolos de desmodificação para suavizar os danos de RNA com a utilização de incubação overnight aquecida com um organocatalisador apresentaram melhores rendimentos, mas, evidenciam a necessidade de maiores estudos frente a determinação de perfis de RNA-seq (WEHMAS et al, 2018).

Mesmo com os danos no DNA causados pela fixação da formalina, pesquisas envolvendo a utilização do MLPA (Amplificação Multiplex de Sondas Dependentes de Ligação) apresentam resultados confiantes, pois ela hibridiza um trecho relativamente curto (< 100 pares de bases) de DNA de amostras de fita simples mostrando que estas amostras não representam um grande problema para a utilização desta técnica ATANESYAN et al, 2017).

2.4 EXTRAÇÃO DNA x RNA x PROTEINAS x SEQUENCIAMENTO

Os recentes aprimoramentos dos kits para extração de DNA estão permitindo uma maior eficiência frente à preparação e aquisição de bibliotecas de sequenciamento derivado de amostras FFPE, levando à possibilidade de realização de sequenciamento completo, de capturas, de RNA e sequenciamento de todo o exoma (OHMOMO et al, 2021).

O sequenciamento já se apresenta fortemente estabelecido na clínica, principalmente nas investigações das áreas oncológicas, evidenciando a importância de se obter a atingir

técnicas que sejam cada vez mais eficazes frente a extração de DNA e RNA derivadas de amostras FFPE perante sua qualidade, o que será determinante para posterior sequenciamento genômico (MCDONOUGH et al, 2019).

Os procedimentos de extração de DNA e RNA de amostras FFPE já apresentam mais estabelecidos e com estudos utilizando diversos kits de extração e a posterior análise de PCR em tempo real, onde é possível a aquisição de resultados satisfatórios frente à recuperação e aquisição de quantidade e qualidade de DNA / RNA. Estudos vêm demonstrando resultados extremamente positivos na extração simultânea de DNA e RNA utilizando o kit truEXTRAC, que se demonstraram superiores às análises individuais, e elencam um ponto bastante pertinente frente a escolha do método de extração, onde se observa que para DNA já se possuiu procedimentos mais concretos, demonstrando que a escolha do método de extração é mais crucial frente as análises de RNA (KRESSE et al, 2018).

Diversos estudos realizam estudos comparativos com a utilização de tecido fresco e amostras FFPE para a realização de sequenciamento. Obviamente que as amostras frescas sempre apresentam resultados melhores, porém com a melhoria da eficácia dos kits de extração, os resultados frente as amostras FFPE vem apresentando evoluções consideráveis, e isso é de grande valia, pois a aquisição e conservação de tecido fresco é mais complexa e de alto custo em relação aos tecidos fixados em formol e incluídos em parafina (OHMOMO et al, 2021).

Importante salientar que a celularidade difere entre os tecidos, e, portanto, o quantitativo de DNA recuperado é diferente se os protocolos forem aplicados da mesma maneira. Os tecidos animais são constituídos de parênquima (unidade funcional) e estroma, que é o espaço extracelular frequentemente preenchido por um complexo de componentes fibrosos e raras células. O quantitativo desse material apresenta-se em proporções variáveis nos diferentes tecidos, o que confere a diversidade morfológica, funcional e patológica dos mesmos. Dessa forma, tecidos como cartilagem e ossos são ricos em matriz extracelular, enquanto esta é mais escassa no tecido nervoso e epitelial (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000).

Muitas pesquisas vêm demonstrando que aprimoramento de técnicas principalmente na preparação e fixação dos tecidos após serem coletados vem se demonstrando essenciais, e com base em resultados de diversos estudos observa-se que com o passar dos anos, aprimoramento de técnicas, desenvolvimentos de novos kits de extração, estão possibilitando

maior índice de desenvolvimento de estudos moleculares para o melhor entendimento das patologias e seus processos celulares (OHMOMO et al, 2021).

Adequações e testes para melhor recuperação do DNA são essenciais para essas pesquisas envolvendo amostras FFPE. Estudos demonstram que uma otimização na etapa de digestão com proteinase K, onde se dobrou a quantidade de proteinase K, resultou em um aumento médio no rendimento de 96% na recuperação de DNA destas amostras, deixando clara a importância de adequações e buscas por novos protocolos e adequações técnicas frente ao que já se conhece sobre os procedimentos práticos que envolvem a extração de DNA (FRAZER et al., 2020).

3 METODOLOGIA

3.1 GRUPO AMOSTRAL

Trata-se de um estudo transversal, realizado com dois grupos de amostras. Grupo 1, proveniente de biópsias e peças cirúrgicas (médias e grandes) que foram fixadas em formalina não tamponada e preservadas em parafina para análise histopatológica, armazenadas no Laboratório de Patologia do Hospital São Vicente de Paulo (HSVP), Passo Fundo, RS. O estudo foi aprovado pela Comissão de Pesquisa e Pós-Graduação do HSVP e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, parecer: 5.154.540. Grupo 2, provenientes de biópsias e peças que foram fixadas em formalina tamponada e preservadas em parafina, armazenadas no Laboratório de Patologia da UNESP – Botucatu. Os grupos de amostras foram selecionados de acordo com o período de armazenamento: 2, 5 e 10 anos. Dentro do Grupo 1, foi separado um subgrupo amostral de 10 biópsias período de preservação de 2 anos (DL – Desparafinização em Lâmina) (Figura1).

Para a obtenção dos dados e amostras que foram utilizados na pesquisa, foi realizada uma busca no histórico de biópsias e peças dos referidos Laboratórios. A seleção das amostras estudadas dependeu da disponibilidade quantitativa de tecido presente no bloco de parafina, a fim de não se utilizar todo o material armazenado, ou seja, amostras com pouco tecido não foram submetidas ao corte no micrótomo. Tal análise foi realizada visualmente pela equipe de pesquisa. As amostras foram fornecidas à equipe de pesquisa sem qualquer identificação ou informação pessoal dos pacientes, constando apenas o tempo de armazenamento e número de

registro do cassete com o tecido em parafina. Dados sociodemográficos e clínicos não foram coletados, pois não interferem na obtenção dos objetivos propostos.

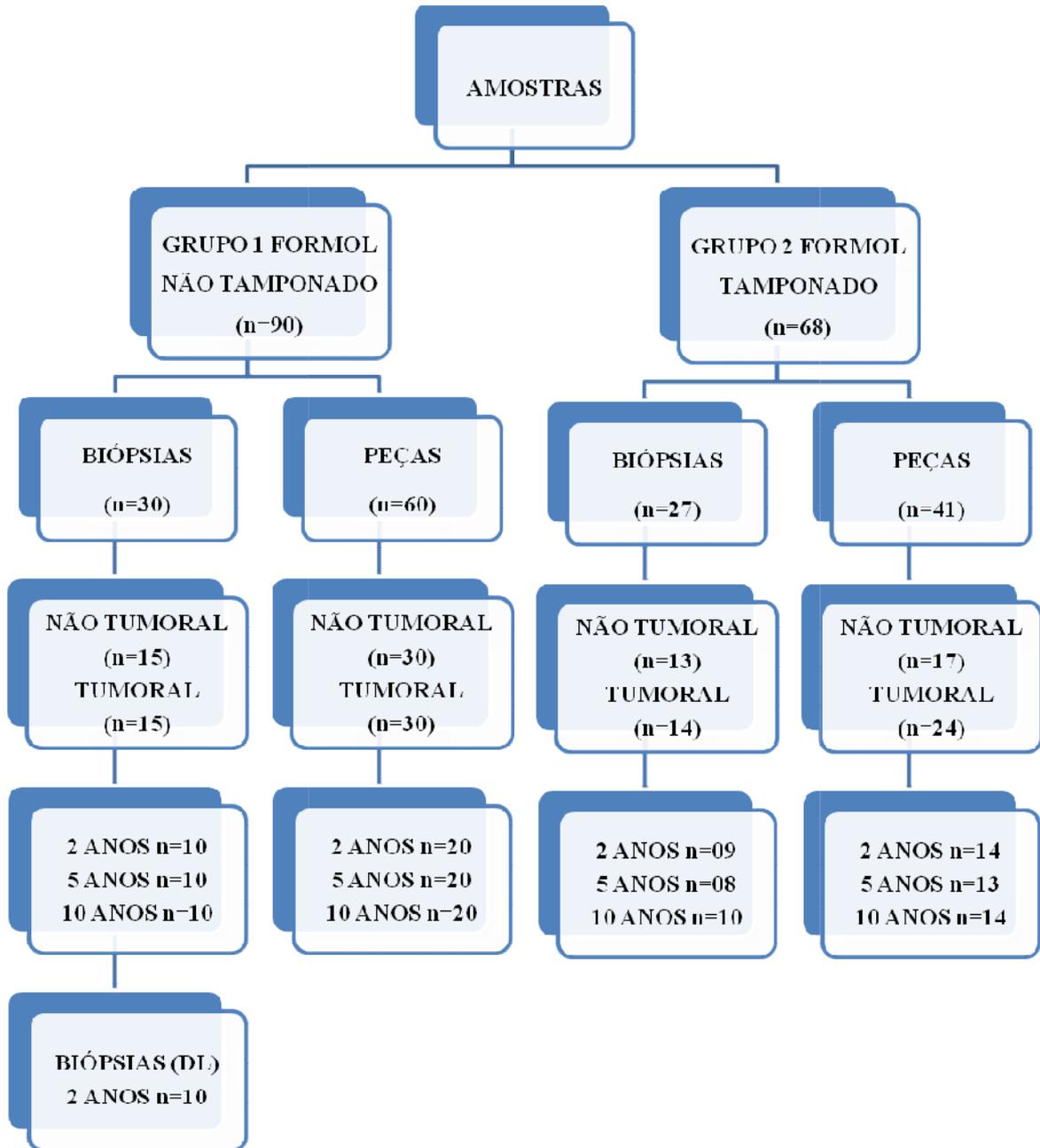


Figura 1. Grupos amostrais obtidos para a realização de extração de DNA. Grupo de amostras constituído por Biópsias (n=30) e Peças Cirúrgicas (n=60), as quais foram fixadas em formol não tamponado (Grupo 1). Grupo de amostras constituído por Biópsias (n=27) e Peças Cirúrgicas (n=41), as quais foram fixadas em formol tamponado (Grupo 2). Biópsias submetidas ao processo de Desparafinização em Lâmina (DL).

Foram estudadas amostras de diferentes tecidos não tumoral (saudável ou com processo inflamatório) e tumoral, incluindo biópsias e peças cirúrgicas (médias e grandes - material suplementar – Quadro 1 e 2). Frente aos Grupos de estudo, seguindo informação do serviço local, as amostras foram fixadas em solução de formalina não tamponada (G1) e formalina tamponada (G2) com os seguintes tempos de fixação: biópsias até 24h, peças cirúrgicas de 3 a mais de 5 dias.

Os grupos de amostras foram constituídos por 90 amostras fixadas em formalina não tamponada, 10 amostras (DL) e 68 amostras fixadas em formalina tamponada considerando o tipo de tecido, tempo de armazenamento e quantidade de cortes estudados de cada amostra.

3.2 CORTES

Para o Grupo 1 foram realizados cortes de 10 µm de espessura, com 3 cortes ou 6 cortes isolados em microtubos separados, totalizando assim para o Grupo 1, 180 amostras a serem analisadas. Para o Grupo 2 foram retiradas e separadas 6 cortes de 10µm de cada amostra, mantendo o quantitativo de 68 amostras a serem analisadas. Para o subgrupo das 10 biópsias (DL) foi coletado 3 e 6 fatias de 10µm, totalizando mais 20 amostras a serem analisadas.

Os blocos de parafina contendo segmentos de tecidos que foram selecionados (biópsias e peças de ressecção cirúrgica), já passaram pelos processos de fixação, desidratação e inclusão em parafina que constituem todo o procedimento de preparo de amostras para sua utilização no diagnóstico histopatológico.

Em sequência a isto, as etapas realizadas no estudo foram de realização de cortes / secção em micrótomo semi-automático (Lupetec – MRPSA2016 – n. série: 190045), utilizando-se navalhas de baixo e alto perfil, as quais foram utilizadas uma vez/amostra.

Após a realização de cada corte, a navalha de corte foi removida, acondicionada em Xilol para eliminar resquícios de parafina e após, submersa em hipoclorito, seca com gaze estéril (sempre tomando o devido cuidado para não afetar o fio de corte da navalha), após podiam ser utilizadas novamente para outros cortes. Juntamente a isto, todos os componentes do micrótomo que entraram em contato com a amostra (porta-blocos, suporte de navalha e pedestal) foram higienizados da mesma maneira, sendo o excesso de parafina varrido com o auxílio de um pincel para a bandeja de coleta de resíduos, e posteriormente com o auxílio de

uma gaze os resquícios de parafina foram retirados com xilol e sequencialmente o hipoclorito a 1% foi utilizado para degradação de possível contaminante de DNA da amostra anterior.

3.3 DESPARAFINIZAÇÃO

Os fragmentos provindos dos cortes foram acondicionados em microtubos estéreis para posterior desparafinização em xilol (adição de 1ml de xilol, agitação por 30 minutos e 5 minutos de centrifugação a 13.000rpm – 3 repetições) e subsequente extração de DNA total pelo método CTAB/NaCl. Este protocolo baseado no uso de fenol/clorofórmio apresenta baixo custo e tem demonstrado boa eficiência na recuperação de DNA de amostras parafinizadas em relação à qualidade e quantidade do DNA obtido (NGUYEN et al, 2021)

Frente ao subgrupo de Biópsias DL (20 amostras), foi aplicado um método de desparafinização diferente da realizada com os Grupo 1 e Grupo 2. Foi realizado para estas 20 amostras uma desparafinização em lâmina (DL) histológica, onde após os cortes no micrótomo as fatias eram acondicionadas em banho-maria a 50°C contendo água de osmose reversa, assim que as fatias esticavam, eram “pescadas/coletadas” com a lâmina, posteriormente acondicionadas na estufa a 80°C por 20 minutos, em sequência foram realizados os banhos em xilol, álcool e água seguindo a sequência de banho de Xilol I por 5 minutos, Xilol II por 5 minutos, banho etanol 100% por 1 minuto, banho etanol 70% por 1 minuto, banho etanol 50% por 1 minuto, banho água de osmose reversa por 1 minuto. Ao final, com o auxílio de agulhas estéreis os tecidos das lâminas eram coletados e acondicionados em microtubos, posteriormente foi adicionado tampão TE, procedendo com digestão com Proteinase K e prosseguindo com o protocolo de CTAB/NaCl conforme aplicado nos Grupos 1 e 2.

3.4 DIGESTÃO E EXTRAÇÃO DO DNA

Após a desparafinização e acondicionamento dos fragmentos em tampão TET (Tris-EDTA-Tween), foi adicionado 10µL de proteinase K em uma concentração final de 250 µg/ul. As amostras foram incubadas a 56°C por 12h para a digestão do material e, após esse período, a proteinase K foi inativada por aquecimento a 96°C durante 7 minutos. Em seguida, foram adicionados 100 µl de uma solução de NaCl 5M e 100µl da solução CTAB/NaCl pré-aquecida a 65°C, com posterior incubação por 10 minutos a 65°C. Após a incubação foi

acrescentado 750µl de clorofórmio – álcool isoamílico 24:1 e centrifugação por 5 minutos 13.000rpm à temperatura ambiente (TA).

O sobrenadante foi então transferido para novo tubo e adicionado 450µl de etanol absoluto a -20°C com posterior incubação por 10 minutos à -20°C. Após centrifugação por 15 minutos, 13.000rpm a 4°C, posteriormente 450µl de etanol 70% foi adicionado ao *pellet* de DNA. Após centrifugação por 20 minutos, 13.000rpm a 4°C, o etanol 70% foram removidos, e após secagem do DNA extraído, este foi ressuspensionado em 40µl de tampão TRIS/EDTA (TE) estéril para posterior utilização na detecção do DNA através da técnica de PCR.

3.5 QUANTIDADE, QUALIDADE DE DNA E PCR

Para avaliar a quantidade e a qualidade do DNA extraído, a absorbância em leitura a 260nm de todas as amostras foi realizada em duplicata em espectrofotômetro Multiskan Go (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A razão de absorbância 260/280 para DNA puro livre de proteína é estimada em ~ 1,8-2,1 (GLASEL, 1995).

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 20µL, composto por 10µL de Go Taq Green Master Mix 2X (cód. M 7122- Promega, Madison, Wisconsin, EUA); 0,6µL de cada iniciador (primer) na concentração de 10µM; 4,8 µL de água estéril e 3µL de cada amostra pesquisada. Os primers utilizados foram específicos para o gene constitutivo endógeno dos tecidos beta globina (BAUER et al, 1991) a fim de verificar a presença do DNA. As incubações foram realizadas em termociclador com os parâmetros de 95°C durante 5 minutos e 95°C durante 45 segundos para desnaturação, temperatura e tempo específicos de cada primer para seu anelamento e 72°C durante 1 minuto para polimerização, seguido de mais 40 ciclos idênticos ao descrito. Finalizando, a temperatura de extensão final foi de 72°C por 7 minutos e resfriamento a 4°C. Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, através da substituição do ácido nucléico por água estéril, e um controle positivo contendo DNA comercial Humangenomic DNA (Promega).

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 1,5%, preparado em tampão 1X TBE (Tris/Ácido Bórico/EDTA) e corada com Brometo de Etídio. O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão de 100pb e posteriormente fotografados sob transiluminação ultra-violeta.

3.6 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados referentes aos tipos de amostras, tempo de armazenamento e resultados da análise de DNA foram duplamente digitados em planilha Excel. A comparação da concentração de DNA em relação ao tipo de amostra, tempo de armazenamento e quantidade de cortes foi verificada pelo teste t ou de Mann-Whitney considerando os grupos de estudo: biópsias e peças cirúrgicas (médias e grandes) e a forma de fixação (formalina tamponada e não tamponada). Para avaliação da relação de concentração de DNA e positividade de amplificação pela PCR foi utilizado o teste de Qui-quadrado ou Teste exato de Fisher. O programa utilizado para a realização das análises e comparações estatísticas foi o GraphPad PRISM 6, adotando-se o nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

Foram analisadas 180 amostras (Grupo 1 – formalina não tamponada) distribuídas entre Biópsias (n=60) e Peças Anatômicas (n=120). Dentre as biópsias estudadas a mediana de tamanho da área do fragmento foi de 13,5mm² (2,0-306,0mm²), e das peças anatômicas foi de 196,00mm² (30,0-550,0mm²).

Além do Grupo 1, foram analisadas 68 amostras (Grupo 2 – formalina tamponada), distribuídas entre Biópsias (n=27) e Peças Anatômicas (n=41). Dentre as biópsias estudadas a mediana de tamanho da área do fragmento foi de 42,0mm² (2,0-336,0mm²), e das peças anatômicas foi de 552,0mm² (48,0-693,0mm²) (Tabela 1).

Tabela 1. Representação dos grupos de amostras (Área do fragmento; DNA Total; DNA/Área; Qualidade; Positividade).

	Área do fragmento (mm ²) *	DNA Total (ug/ML) *	DNA/Área (ug/ML) *	Qualidade (1,8 – 2,1) n (%)	Positivo PCR n (%)	
	Biópsias	13,5 (2,0-306,0)	14,52 (1,63-408,4)	0,99 (0,18-4,41)	5 (16,67%)	31 (51,67%)
GRUPO 1	Biópsias (DL)	20,0 (4,0-110,0)	6,39 (0,0-214,0)	0,38 (0,0-1,94)	5 (25,0%)	14 (70,0%)
	Peças	196,00 (30,0-550,0)	103,8 (1,64-2929,0)	0,58 (0,006-12,28)	37 (61,67%)	93 (77,5%)
GRUPO 2	Biópsias	42,0 (2,0-336,0)	46,92 (1,87-925,92)	1,16 (0,02-12,27)	22 (81,48%)	27 (100,0%)
	Peças	552,0 (48,0-693,0)	101,6 (6,05-1694,0)	0,18 (0,01-2,82)	30 (73,17%)	41 (100,0%)

* Mediana (min – max). **DL** – Desparafinação em Lâmina.

A concentração Total de DNA recuperada das amostras em relação ao tempo de armazenamento (2, 5 e 10 anos) não foi estatisticamente diferente. Portanto as análises subsequentes apresentam dados dos três períodos conjuntamente.

4.1 CONCENTRAÇÃO DE DNA

A Concentração de DNA (ug/ml) recuperada do Grupo 1 está apresentada na Figura 2. Observa-se que a Concentração de DNA Total foi inferior nas amostras de biópsias (mediana 14,52; 1,63 – 408,4) comparadas às peças anatômicas (mediana 103,8; 1,64 – 2929,0) ($p < 0,0001$) (Figura 2A). No entanto ao ser considerada a área do fragmento preservado, observa-se que a concentração de DNA Total / Área é superior nas amostras de biópsias (mediana 0,99; 0,18 – 4,41), em relação às peças (mediana 0,58; 0,006 – 12,28) ($p = 0,003$) como está representado na Figura 2B.

A Concentração de DNA (ug/ml) recuperada do Grupo 2 está apresentada na Figura 2C. Observa-se que a Concentração de DNA Total foi inferior nas amostras de biópsias (mediana 46,92; 1,87 – 925,92) comparadas às peças anatômicas (mediana 101,6; 6,05 – 1694,0) ($p = 0,026$). No entanto ao ser considerada a área do fragmento preservado, observa-se que a concentração de DNA Total / Área é superior nas amostras de biópsias (mediana 1,16; 0,02 – 12,27), em relação às peças (mediana 0,18; 0,01 – 2,82) ($p = 0,0005$) como está representado na Figura 2D.

Ao comparar a Concentração de DNA Total das Biópsias (6 cortes) do Grupo 1 com as do Grupo 2 (6 cortes), observamos valores inferiores nas biópsias do G1 (mediana 17,33; 3,5 – 408,4) comparados às biópsias do G2 (mediana 46,92; 1,87 – 925,92) ($p = 0,008$) (Figura 2E).

Ao comparar a Concentração de DNA Total das Peças (6 cortes) do Grupo 1 com as do Grupo 2, a diferença não foi estatisticamente significativa (G1: mediana 165,3; 4,27 – 2760,0 e G2: mediana 101,6; 6,05 – 1694,0) ($p = 0,80$) (Figura 2F).

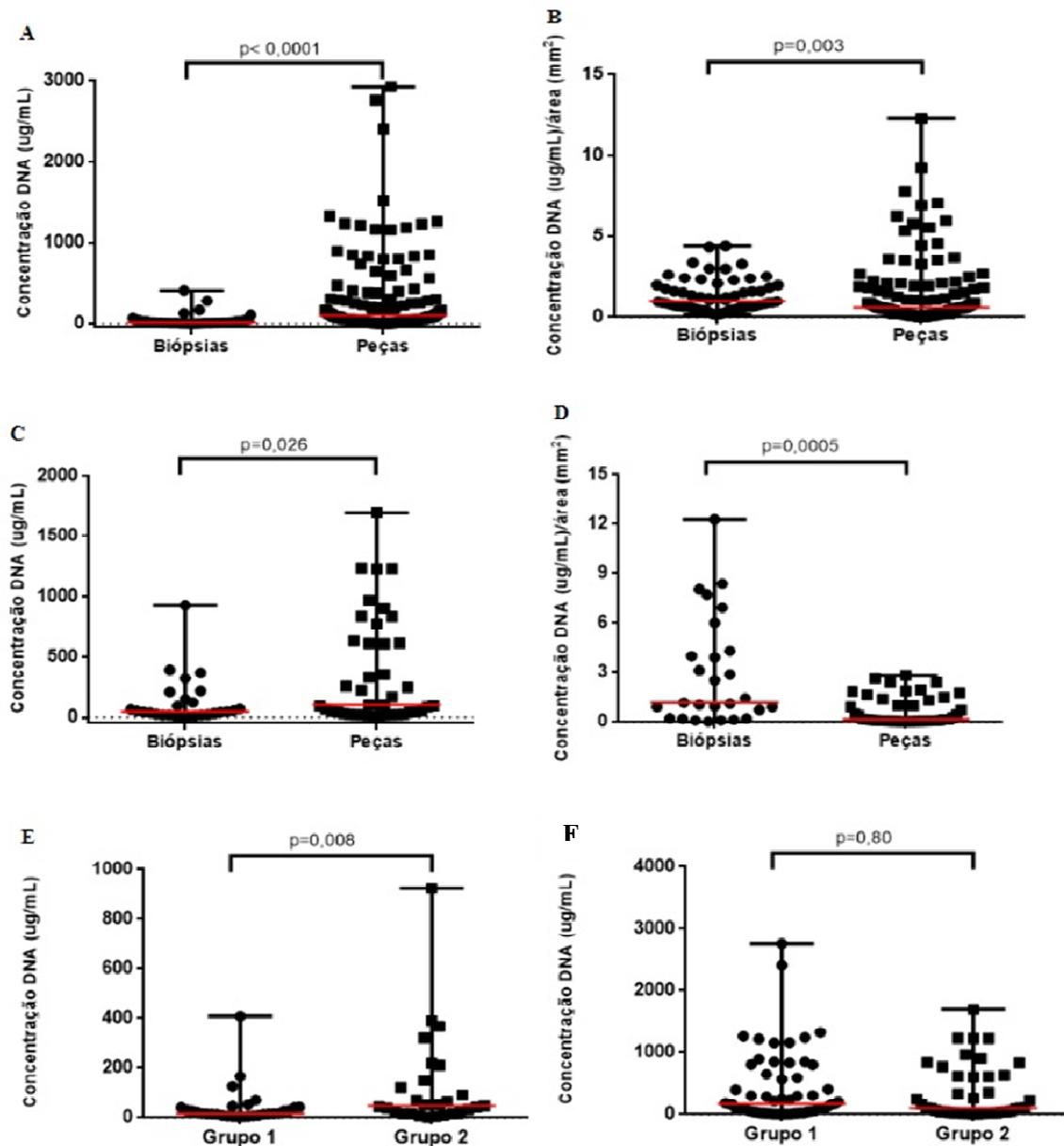


Figura 2. Dotblot representativo das medianas (mínimo-máximo) das concentrações de DNA total (ug/ML) e DNA/Área recuperado de amostras provenientes de biópsias e peças cirúrgicas fixadas em formalina tamponada e não tamponada e preservadas em parafina de diferentes tecidos. **A.** Concentração total Grupo 1. **B.** Concentração por área do fragmento no bloco de parafina Grupo 1. **C.** Concentração total Grupo 2. **D.** Concentração por área do fragmento no bloco de parafina Grupo 2. **E.** Concentração total Biópsias G1 x Biópsias G2. **F.** Concentração total Peças G1 x Peças G2. Teste de Mann-Whitney.

A Concentração de DNA Total das Biópsias (2 anos) que foram desparafinizadas em lâmina (DL) foi inferior (mediana 6,39; 0,0 – 214,0) comparado com as Biópsias (2 anos) do Grupo 1 (mediana 14,09; 5,81 – 166,1) ($p=0,04$) (Figura 3A). Considerando a área do fragmento preservado, observa-se que a concentração de DNA Total / Área é inferior nas

amostras de Biópsias (DL) (mediana 0,38; 0,0 – 1,94) comparadas às biópsias (G1) (mediana 0,88; 0,2 – 4,35) ($p=0,01$) como está representado na Figura 3B.

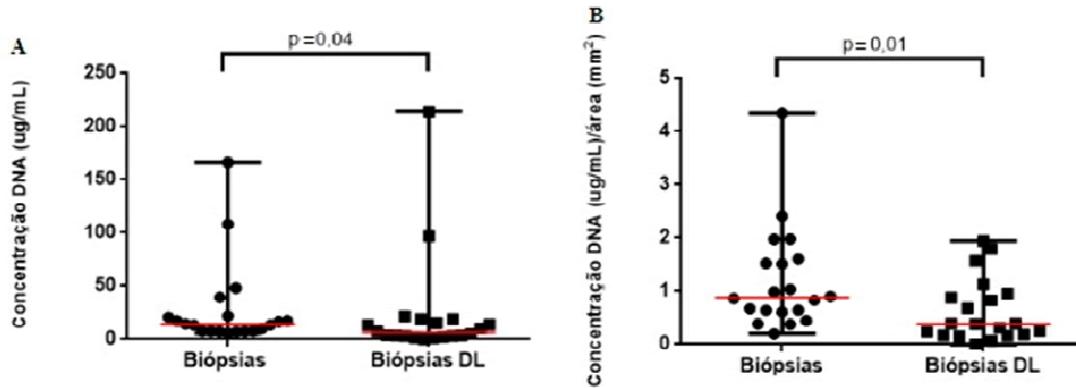


Figura 3. Dotblot representativo das medianas (mínimo-máximo) das concentrações de DNA total (ug/ml) e DNA/Área recuperado de amostras provenientes de biópsias / biópsias DL (formalina comum – 2 anos). **A.** Concentração total. **B.** Concentração por área do fragmento no bloco de parafina. Teste de Mann-Whitney.

4.2 QUALIDADE DE DNA

Em uma análise subsequente foi verificado a relação de leitura de espectrofotometria 260/280nm, que deve ser considerada para verificação da qualidade e pureza do DNA, e a partir dos dados obtidos observou-se que 75% das amostras do Grupo 1 apresentou tal relação igual e maior que 1,4, desta forma este parâmetro foi utilizado para as análises das concentrações de DNA.

Neste contexto, considerando somente as amostras com relação $\geq 1,4$, verificou-se que a Concentração Total de DNA/área foi estatisticamente superior nas Biópsias (mediana 1,08; 0,24 – 4,4) em comparação as peças cirúrgicas (mediana 0,64; 0,006 – 9,2) ($p=0,04$) (Figura 4A).

Para as amostras do Grupo 2 a relação de leitura de espectrofotometria 260/280nm foi superior a 1,8 em 75% das amostras (mediana 1,89; 0,7 – 2,63). Da mesma forma, em relação à concentração de DNA/área considerando este parâmetro, foi estatisticamente superior no grupo das Biópsias (mediana 1,97; 0,09 – 12,27) em comparação as Peças Cirúrgicas (mediana 0,46; 0,01 – 2,82) ($p=0,0024$) (Figura 4B). Os valores da relação 260/280 foram superiores no Grupo 2 (mediana 1,89; 0,7 – 2,63) comparados aos do Grupo 1 (mediana 1,7; 0,69 – 2,0) ($p<0,0001$) (Figura 4C).

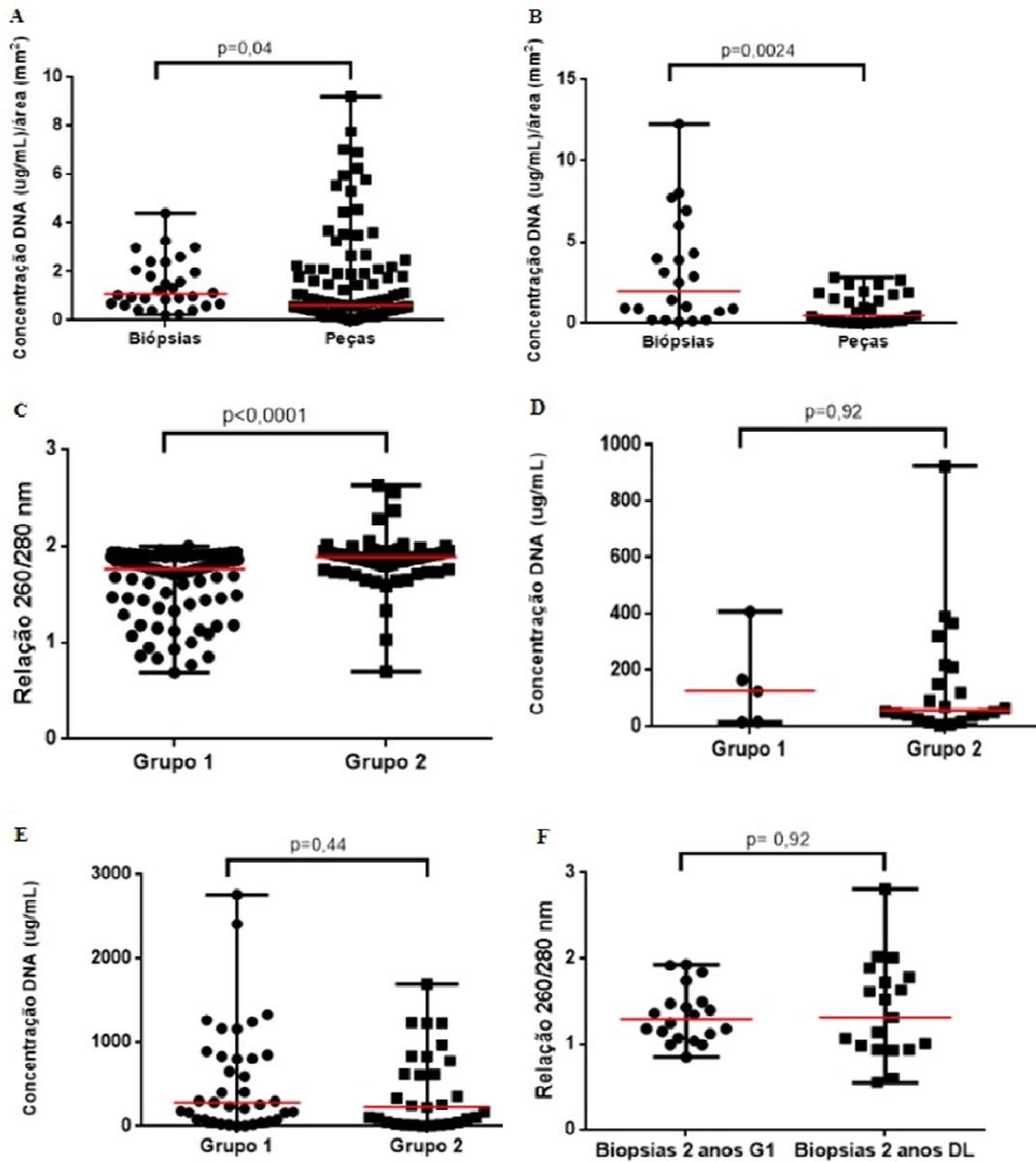


Figura 4. Dotblot representativo das medianas (mínimo-máximo) da relação de leitura de espectrofotometria 260/280nm recuperado de amostras provenientes de biópsias e peças cirúrgicas fixadas em formalina tamponada e não tamponada e preservadas em parafina de diferentes tecidos. **A.** Concentração DNA total/Área – relação $\geq 1,4$ – G1. **B.** Concentração DNA total/Área – relação $\geq 1,8$ – G2. **C.** Relação 260/280 – G1 x G2. **D.** Concentração DNA total/Área – relação $\geq 1,8$ – Biópsias G1 x Biópsias G2. **E.** Concentração DNA total/Área – relação $\geq 1,8$ – Peças G1 x Peças G2. **F.** Relação 260/280 – Biópsias G1- 2 anos x Biópsias DL. Teste de Mann-Whitney.

Considerando a relação ideal de 1,8, a concentração de DNA Total dos dois grupos de estudo foi comparada nas amostras que apresentaram tal parâmetro. Dentre as Biópsias o G1 (mediana 126,0; 15,3 – 408,4) não houve diferença estatisticamente significante (mediana 58,3; 5,4 – 925,6) ($p=0,92$) (Figura 4D). No entanto ao verificarmos o número de amostras,

das 30 Biópsias (G1 – 6 cortes) apenas 5 (16,67%) apresentaram relação ideal maior ou igual a 1,8, já frente as Biópsias (G2) de um total de 27 amostras, 22 (81,48%) apresentaram relação ideal maior ou igual a 1,8 (Teste Exato de Fisher, $p < 0,0001$).

Em relação às Peças (G1 e G2) considerando a relação ideal de 1,8, comparou-se a concentração DNA Total. Dentre as Peças do Grupo 1 (mediana 284,0; 4,4 – 2760) não houve diferença estatisticamente significativa frente as Peças G2 (mediana 234,9; 6,05 – 1694) ($p=0,44$) (Figura 4E). Da mesma forma, não houve diferença em relação ao número de amostras em cada grupo considerando tal parâmetro, ou seja, das 60 Peças (G1 – 6 cortes) 37 (61,67%) apresentaram relação ideal maior ou igual a 1,8, já em relação às Peças (G2 – 6 cortes) de um total de 41 amostras, 30 (73,17%) apresentaram relação ideal maior ou igual a 1,8 (Teste Exato de Fisher, $p=0,28$).

Considerando a relação de leitura de espectrofotometria 260/280nm, comparou-se a qualidade e pureza do DNA das Biópsias G1 (2 anos) (mediana 1,29; 0,85 – 1,93) com às Biópsias (DL) (mediana 1,31; 0,55 – 2,8) ($p=0,92$) (Figura 4F) observando-se assim que não houve diferente estatisticamente significativa.

4.3 AMPLIFICAÇÃO DE GENE ENDÓGENO POR PCR

As análises moleculares de PCR nas amostras estudadas (G1) demonstraram que 124 amostras foram positivas (68,89%) sendo destas 31 Biópsias (51,67%) e 93 Peças Cirúrgicas (77,5%). Frente ao Grupo 2, houve positividade em 100% das amostras ($n=68$), sendo 27 Biópsias e 41 Peças Cirúrgicas.

Considerando apenas as 20 Biópsias (2 anos – formol não tamponado) houve uma positividade de 30% ($n=6$), e nas biópsias (DL) houve uma recuperação de 70% ($n=14$) (Teste Exato de Fisher $p=0,025$). A Figura 5 representa a eletroforese de parte das amostras estudadas.

Na Tabela 2 podemos observar a relação de positividade entre os grupos de amostras analisadas G1, G2 e Biópsias DL e as variações frente à quantidade de amostra coletada (3 cortes e 6 cortes).

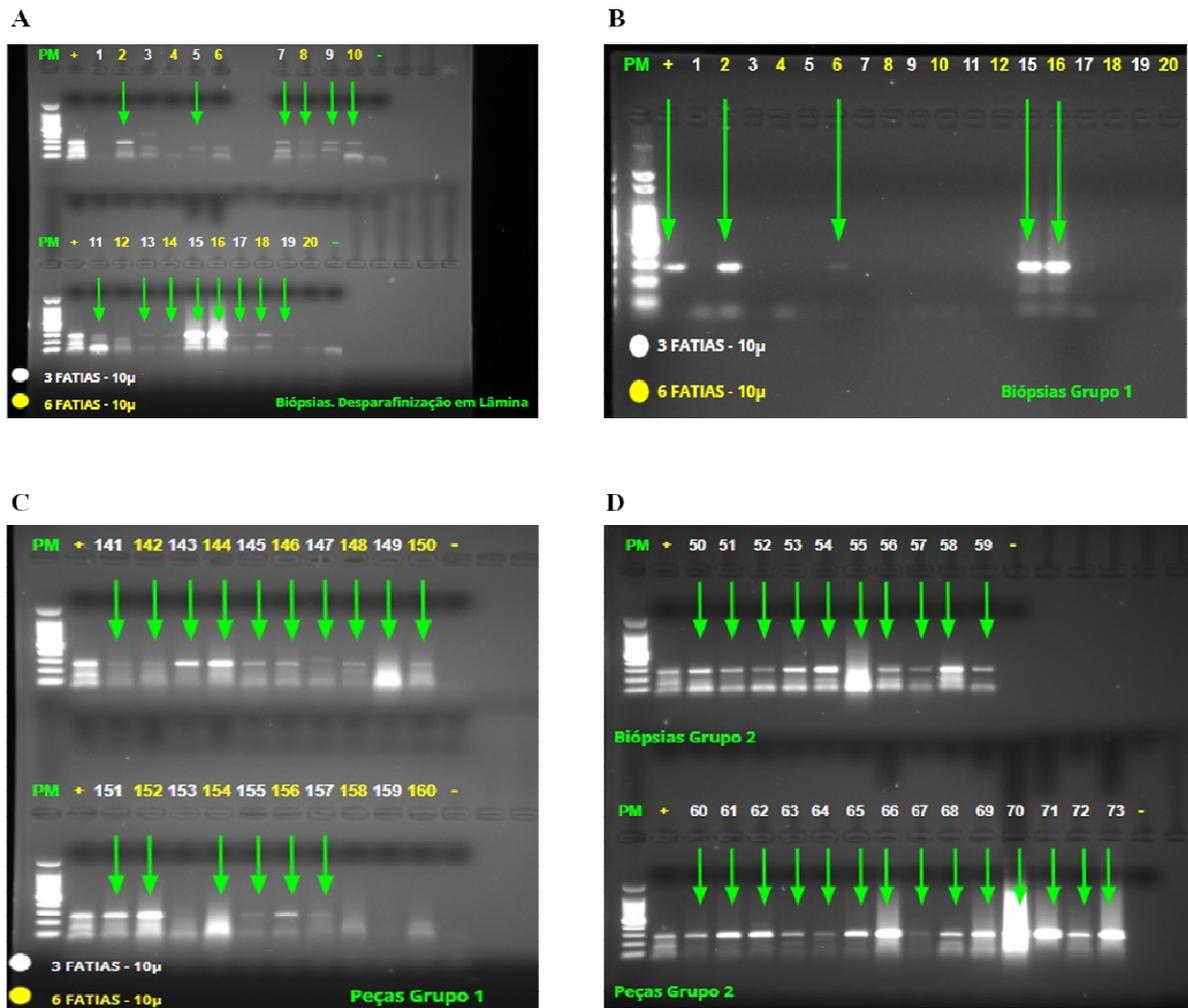


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo e visualização das bandas representativas da amplificação do gene endógeno da beta-globina, sob iluminação ultravioleta. As setas verdes indicam positividade para o gene avaliado, demonstrando efetividade na recuperação de DNA total das amostras, considerando 3 ou 6 cortes de 10 µm. **A.** Amostras 1-20, Biópsias Desparafinizadas em Lâmina (DL); **B.** Amostras 1-20 (13 e 14 ausentes no gel, ambas positivas) Biópsias Grupo 1; **C.** Amostras 141-160, Peças Grupo 1; **D.** Amostras 50-73, Biópsias e Peças Grupo 2. **PM:** peso molecular 100 pares de base (N); tamanho esperado do produto amplificado = 268pb).

Dentre as Biópsias (G1) a positividade de DNA a partir de 6 cortes foi observada em maior número (n=20 – 66,6%) de amostras quando comparada às de 3 cortes (n=11 – 36,6%), demonstrando significância estatística (p=0,04). Em relação às Peças Cirúrgicas (G1) não houve diferença entre a positividade de DNA recuperado em cada amostra, considerando 3 e 6 cortes (p=0,38).

Tabela 2. Positividade de PCR para b-globina nas amostras de FFPE – G1, G2 e Biópsias DL.

	PCR + n. %	p ^α	PCR + n. %	p ^β	PCR + n. %	p ^γ	P [£] G1 Biópsias 2 anos x Biopsias DL
Grupo 1							
Biópsias 3 cortes (n=30)	11 (36,7%)		-		Biópsias 3 cortes (n=10)		0,0123*
Biópsias 6 cortes (n=30)	20 (66,7%)	0,04*	Biópsias 6 cortes (n=27)	27 (100,0%)	Biópsias 6 cortes (n=10)	0,6285	0,4543
Peças 3 cortes (n=60)	44 (73,3%)		-		Biópsias (DL)		
Peças 6 cortes (n=60)	49 (81,7%)	0,38	Peças 6 cortes (n=41)	41 (100,0%)			

α – Comparação entre 3 x 6 cortes (G1); **β** – Comparação entre Grupos 1 e 2; **γ** – Comparação entre biópsias desparafinizadas em lâminas entre 3 e 6 cortes; **£** - Comparação entre biópsias de 2 anos do Grupo 1 e das amostras desparafinizadas em lâminas. * Teste exato de Fisher, p<0,05.

Quando comparado as Biópsias (G1) com a Biópsias (G2), considerando as amostras com 6 cortes, observamos superioridade para as amostras do Grupo 2, visto que houve 100% de positividade para as mesmas, demonstrando significância estatística (p=0,0009), repetindo-se o mesmo resultado quando comparado a positividade das Peças do Grupo 1 com as Peças do Grupo 2 (100%) p=0,0026.

Ao comparar a positividade das Biópsias desparafinizadas em lâmina (DL – 3 cortes – 2 anos – n=10) com as Biópsias (G1 – 3 cortes – 2 anos – n=10) a positividade de DNA nas Biópsias DL se apresentou em maior número (n=8 – 80%) comparadas às Biópsias G1 (n=2 – 20%) demonstrando significância estatística (p=0,0123).

Já em relação à positividade das Biópsias (G1 – 6 cortes – 2anos – n=10) e as Biópsias (DL – 6 cortes – 2 anos – n=10) a positividade de DNA nas Biópsias DL se apresentou semelhante (n=6 – 60%) comparadas às Biópsias G1 (n=4 – 40%) não havendo assim diferença estatisticamente significativa (p=0,45).

4.4 RELAÇÃO POSITIVIDADE x CONCENTRAÇÃO DE DNA

Para tal comparação consideramos como padrão a concentração de DNA Total >10,0ug/ml. Considerando o Grupo 1, observou-se relação entre a positividade da PCR e Concentração de DNA Total >10,0ug/ml (OR 4,7 (2,2 – 9,9); $p < 0,0001$) como demonstrado na Tabela 3. Já para o Grupo 2 todas as amostras foram positivas independente da concentração.

Tabela 3. Relação da concentração e positividade de DNA de amostras constituídos por Biópsias e Peças Cirúrgicas (G1), as quais foram fixadas em formalina não tamponada, processadas, incluídas em parafina e estavam acondicionadas em arquivos, com períodos diferentes (2, 5 e 10 anos) de armazenamento.

	PCR+	PCR-
Concentração > 10ug/mL	108 (60%)	33 (18,33%)
Concentração < 10ug/mL	16 (8,89%)	23 (12,78%)
Total	124	56

Teste exato de Fisher, $p < 0,0001$.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou mais evidências de que tecidos fixados em formalina e preservados em parafina, primariamente destinados à análise histopatológica, são importantes fontes de material genético para estudos moleculares para entendimento da fisiopatologia das doenças (AMEMIYA et al., 2019; NGUYEN et al., 2021). Considerando diferentes fontes de tecidos dessa análise, estudaram-se amostras de biópsias e peças cirúrgicas, as quais requerem diferentes protocolos de preservação.

A princípio hipotetizou-se que o tempo de armazenamento das amostras poderiam influenciar a recuperação do material genético, no entanto, a concentração de DNA total isolada de amostras de períodos de 2, 5 ou 10 anos não foi diferente. Estudos recentes demonstram que mesmo as amostras estando armazenadas já há vários anos, e mesmo havendo certo grau de fragmentação do ácido nucléico, resultados frente à extração e análises de degradação do DNA ainda se apresentaram em níveis aceitáveis após mais de 10 anos das

amostras estarem arquivados (ONDRACEK et al., 2022). Em particular, para as amostras do G1 que foram analisadas no presente estudo, o uso de formalina não tamponada utilizada no Serviço pode ter causado o mesmo grau de degradação do material genético, independente do tempo, uma vez que a degradação parece ocorrer durante o período de fixação em formalina (KHAN et al., 2022). Nesse contexto, estudo recente de Viljoen e colaboradores demonstraram que em tecidos obtidos de autópsias, não houve correlação significativa ($r = 0,2736$, $p = 0,2879$) entre armazenamento tempo (dias) e concentração de DNA obtido, embora os autores não tenham especificado o tipo de fixação utilizado (VILJOEN et al., 2022). Sugere-se, portanto, que no grupo de amostras estudado o tempo de armazenamento não influenciou a recuperação do DNA. Em concordância, Vitosevic e colaboradores obtiveram recuperação de DNA e amplificação de fragmento de 150bp em amostras FFPE de coração, fígado e cérebro obtidos de autópsia e arquivados por até 30 anos de armazenamento. Esses autores ainda discutem que o tecido cerebral foi o que apresentou integridade do DNA mais preservada (VITOŠEVIĆ et al., 2021). No presente estudo, as análises não consideraram o tipo tecidual representado devido ao baixo n disponível, mas sem dúvida essa análise poderia fortalecer nossos resultados.

Nossos dados demonstraram que a concentração de DNA total ($\mu\text{g/ml}$) recuperada das amostras analisadas em ambos os grupos foi superior nas peças cirúrgicas em relação às biópsias, o que pode ser esperado devido ao tamanho da sua amostra no bloco de parafina ser maior do que das biópsias. Em contrapartida, a concentração de DNA recuperada/área do tecido apresentou resultado inverso, e uma possível explicação pode ser o tempo de fixação deste tecido na formalina. Para as biópsias, utiliza-se fixação por até 24h, e as peças cirúrgicas permanecem por um período que varia de 3 a mais de 5 dias, o que infere que as biópsias tendem a ter menor degradação do DNA tecidual. Em concordância, Khan e colaboradores descreveram recentemente a comparação entre a qualidade e quantidade de DNA obtidas de amostras de carcinoma oral com fixação *overnight* foi superior às amostras de longa duração fixadas em formalina (KHAN et al, 2022).

Nesse mesmo sentido, discute-se que a qualidade de DNA, obtida pela relação da espectrofotometria de 260/280 entre 1,8 e 2,1 deve ser considerada para uma análise confiante de pureza e qualidade do DNA produto provindo da extração das amostras (GLASEL, 1995). Assim, observou-se melhor qualidade nas amostras de biópsias em relação às peças. Além disso, tal relação foi superior no Grupo 2, e o número de amostras com relação $>1,8$ foi superior em comparação às amostras do Grupo 1, o que ressalta que o uso do formol tamponado preserva melhor a qualidade do DNA (ZSIKLA, 2004).

Importante lembrar que o objetivo maior da recuperação de DNA com boa qualidade a partir de amostras FFPE é seu potencial uso na análise genética, e, portanto, a taxa de sucesso da amplificação do gene endógeno beta globina foi de cerca de 70% no G1 e 100% no G2, estatisticamente superior tanto nas biópsias quanto nas peças desse grupo, destacando novamente que a qualidade do DNA está diretamente relacionada à possibilidade de seu uso em técnicas de biologia molecular.

É relevante destacar que o presente estudo apresenta a limitação de ter analisado apenas a amplificação de um gene, cujo produto de PCR é de 268bp, considerado um fragmento pequeno, e, portanto, não há evidências de que as amostras analisadas seriam viáveis para amplificação de fragmentos maiores. No entanto, outros estudos demonstram que fragmentos de até 550pb podem ser amplificados a partir de amostras FFPE (OHMOMO et al., 2021). Dessa forma, observa-se que o uso de tais amostras é viável desde que o fragmento do gene pesquisado seja de menor tamanho, e a técnica molecular a ser utilizada deve ser considerada, uma vez que para algumas, como análise epigenética, alguns métodos de isolamento de DNA não são adequados (OHMOMO et al., 2021).

No grupo das biópsias, a concentração de DNA Total no G1 (6 cortes – formalina comum) apresentou-se inferior em relação ao G2 (6 cortes – formalina tamponada), e, portanto, nesses casos, o tipo de formalina parece influenciar positivamente nesta preservação. Estudos demonstram que a fixação do tecido com a utilização de formol 10% tamponado apresenta resultados satisfatórios quando comparadas a amostras fixadas em formol não tamponado, o que permitem a extração de DNA para o desenvolvimento de diversos estudos utilizando-se desta fonte de material (AMEMIYA et al, 2019). Já em relação às peças cirúrgicas não houve diferença frente a esta análise, o que pode ser devido novamente ao tempo de exposição à formalina, independente do seu tamponamento, uma vez que nessas amostras o uso de formalina tamponada não apresentou influência positiva na preservação do DNA (KHAN et al, 2022). No entanto, mesmo com o possível comprometimento genético do tecido, o DNA danificado por formalina apresenta resultados satisfatórios na amplificação de fragmentos pequenos específicos de genes de interesse, devido à especificidade de técnicas como a PCR (LIU et al, 2018).

Considerando que as amostras de biópsias inicialmente apresentaram menor recuperação de DNA, prosseguiu-se a análise do potencial de diferenças nas técnicas de desparafinização, o que demonstrou que o protocolo realizado em lâmina apresentou resultados inferiores de concentração de DNA total e concentração/área às amostras desparafinizadas diretamente nos microtubos com xilol, sugerindo que o método de xileno é

mais adequado para um alto rendimento de DNA, e nenhuma significância foi alcançada na pureza do DNA entre os métodos, considerando a relação 260/280nm. Resultados semelhantes foram observados em estudo prévio (KHAN et al, 2022). Por outro lado, a possibilidade de haver remanescente de parafina nas amostras pode influenciar no uso do DNA recuperado (FRAZER et al., 2020). Nesse sentido, o resultado das análises de PCR foram superiores no grupo das amostras desparafinizadas em lâmina, e tal resultado podem estar relacionados à possível presença de contaminantes no primeiro método utilizado. Frazer et al. destacam que alterações do protocolo de desparafinização de tubos para lâminas, juntamente com um aumento de volume de proteinase K, gerou um aumento no rendimento de DNA ($p < 0,001$) quando a celularidade da amostra se apresentava > 50.000 células, deixando exposto assim, uma possível reflexão frente a aplicação de novos métodos de desparafinização e sua correlação com uma ação mais eficiente no processo de digestão das amostras. No entanto, o número de amostras em cada grupo estudado com essa aplicação de desparafinização em lâmina foi pequeno, e uma análise mais detalhada se faz necessária.

As recuperações de DNA provindas de amostras fixadas em formalina e parafinizadas ainda apresentam grandes desafios, estes relacionados aos diferentes protocolos existentes voltados à extração de DNA, baixo número de trabalhos que apresentam detalhadamente os protocolos utilizados, tecidos utilizados, número de cortes utilizados, pois a maior parte das bibliografias apresenta resultados de eficiência de comparação de métodos de extração (UWIRINGIYEYUZU et al., 2022; SARNECKA et al., 2019; RIBEIRO-SILVA et al, 2008).

Outro grande desafio é a não padronização da fixação e processamento destas amostras nos centros de serviços de patologias, a se considerar a confiabilidade de tempo de fixação na formalina, se há utilização de formalina tamponada ou não tamponada. Em protocolo recente proposto para esse fim, outras abordagens de maiores números de cortes com menores espessuras demonstraram maior quantidade e qualidade de DNA, porém com integridade prejudicada (VILJOEN et al., 2022). No presente estudo, a recuperação de DNA foi maior nas biópsias com a utilização de 6 cortes, demonstrando que o fato dessas amostras serem pequenas, uma maior quantia de material aparentemente foi essencial para a recuperação e positividade. A Figura 6 sumariza os principais achados do presente estudo, e sugere os critérios recomendados de acordo com o material disponível para análise em cada serviço.

Enfatiza-se a importância da realização de mais estudos de protocolos de aplicação para recuperação de DNA de amostras parafinizadas, principalmente com realização de estudos retrospectivos em Centros específicos, para padronização mais direcionada às variáveis de preservação dos materiais. Mesmo não realizando a comparação com outros métodos de extração, foi possível demonstrar que o método de extração fenol/clorofórmio se mostrou eficiente, apresenta baixo custo e acessibilidade frente sua aplicação, indo em direção a pesquisas nas quais se demonstrou que a concentração de DNA Total recuperada neste método foi superior comparando-se a kits comerciais de extração (NGUYEN et al., 2021).

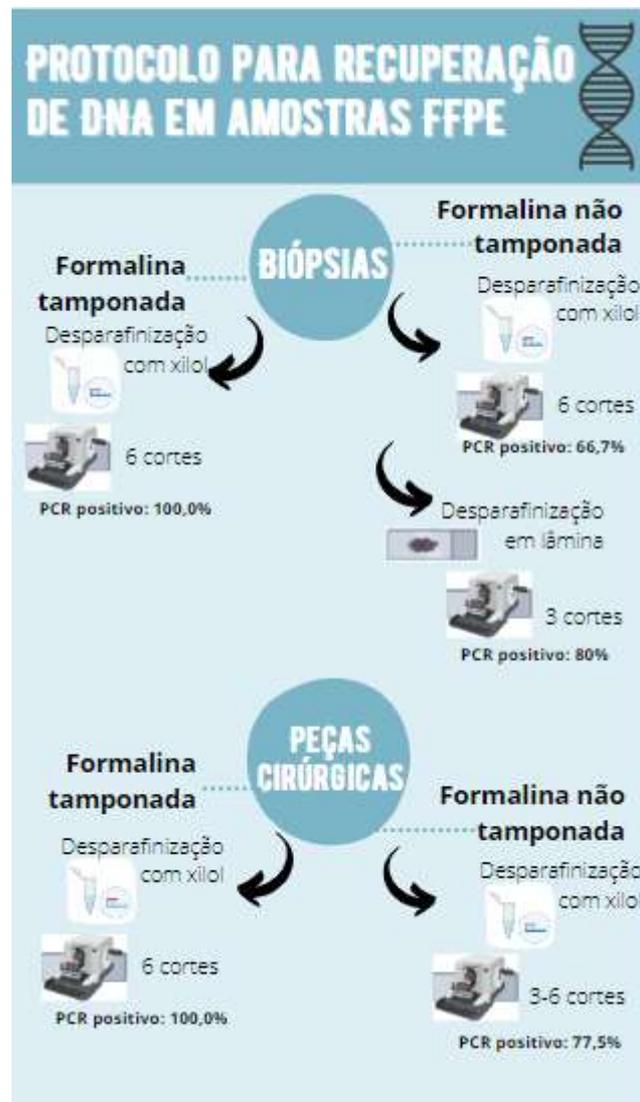


Figura 6. Principais achados do estudo e critérios recomendados de acordo com o material disponível para análise em cada serviço.

6 CONCLUSÃO

Considerando as amostras e protocolos estudados, conclui-se que o tempo de armazenamento de amostras FFPE não interfere na quantidade de DNA recuperada, no entanto o uso de formalina tamponada é preferível e recomendado uma vez que gera melhor qualidade e maiores quantidades de DNA. As biópsias FFPE para obtenção de DNA apresentam maior quantidade de DNA/área e melhor qualidade de DNA, sendo seu uso preferível às amostras provenientes de peças cirúrgicas. Por outro lado, para Biópsias conservadas em formalina não tamponada, um maior número de cortes (material) se apresentou mais eficaz na recuperação e positividade. Além disso, o uso do protocolo de extração de DNA foi satisfatório, de fácil execução e econômico, facilitando assim as análises moleculares de um grande número de amostras FFPE, mas que, é necessário conhecer todas as variáveis que podem interferir na recuperação do material genético.

REFERÊNCIAS

AMEMIYA, K. et al. Relationship between formalin reagent and success rate of targeted sequencing analysis using formalin fixed paraffin embedded tissues. **Clínica Chimica Acta**, v. 488, p. 129-134, jan. 2019.

ATANESYAN, L. et al. Optimal Fixation Conditions and DNA Extraction Methods for MLPA Analysis on FFPE Tissue-Derived DNA. **American Journal of Clinical Pathology**, p. 60-68, 24 jan. 2017.

BAREA, J. A. Extração de DNA de material de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (44NA). Orientador: Prof^ª. Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini. 2001. 126 f. Dissertação (Dissertação do Departamento de Clínica Médica) – **Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista**, 2001.

BAUER, H.M;TING Y, GREER, C.E;CHAMBERS J.C;TASHIRO C.J;CHIMERA J, et al. Genital human papilloma virus infection in female university students as determined by a PCR-based method. **JAMA**, v.265, p.472-477, 1991.

CAMARGO, C. F.; SILVA, P. R. Q. Aplicação das técnicas de 44NA e suas técnicas derivadas em diagnóstico molecular. **6º Mostra de Produção Científica da Pós Graduação Lato Sensu da PUC Goiás**, [S. l.], out. 2011.

DINIZ, W. J. S. et al. Avaliação experimental da pureza de ácidos nucleicos, EDTA e Tris-HCl por espectrofotometria. **XI Jornada de ensino, pesquisa e extensão – JEPEX – UFRPE**. Recife, 18 a 22 de outubro, 2011.

EINAGA, N. et al. Assessment of the quality of DNA from various formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue and the use of this DNA for next-generation sequencing (NGS) with no artifactual mutation. **PLOS ONE**, v. 12, n. 5, p. 01-18, 12 maio 2017.

ENGEL, K. B; MOORE, H. M. Effects of Preanalytical Variables on the Detection of Proteins by Immunohistochemistry in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue. **Arch Pathol Lab Med**, [S. l.], v.135, p.537-543, May 2011.

ESTEVA-SOCIAS, M. et al. In search of an evidence-based strategy for quality assessment of human tissue samples: 45NA45 of the tissue Biospecimen Research Working Group of the Spanish Biobank Network. **Journal of Translational Medicine**, v. 17, n. 1, p. 370, dez. 2019.

FRAZER, Zoe; YOO, Changyoung; SROYA, Manveer; et al. Effect of Different Proteinase K Digest Protocols and Deparaffinization Methods on Yield and Integrity of DNA Extracted From Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 68, n. 3, p. 171-184, 2020.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Biologia celular e molecular*. 7ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2000 – capítulo 12.

KHAN, S. S. et al. Evaluation and Comparison of Genomic DNA Extraction Methods and PCR Optimization on Archival Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues of Oral Squamous Cell Carcinoma. **Diagnostics**, v. 12, n. 5, p. 1219, 2022.

KRESSE, S. H.; NAML, H. M. Evaluation of commercial DNA and RNA extraction methods for high-throughput sequencing of FFPE samples. **PLOS ONE**, v. 13, n. 5, p. 1-12, May 2018.

LIU, Y. et al. Comparison of different methods for repairing damaged DNA from buffered and unbuffered formalin-fixed tissues. **International Journal of Legal Medicine**, v. 132, n. 3, p. 675-681, maio 2018.

MARASCHIN, B. J. et al. Optimizing Fixation Protocols to Improve Molecular Analysis from FFPE Tissues. **Brazilian Dental Journal**, v. 28, n. 1, p. 82-84, fev. 2017.

MCDONOUGH, S. J. et al. Use of FFPE-derived DNA in next generation sequencing: DNA extraction methods. **PLOS ONE**, v. 14, n. 4, p. 1-15, 11 abr. 2019.

NAGAHASHI, M. et al. Formalin-fixed paraffin-embedded sample conditions for deep next generation sequencing. **Journal of Surgical Research**, v. 220, p. 125-132, dez. 2017.

NGUYEN, H. T. et al. Retrieving high-quality genomic DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues for multiple molecular analyses. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 52, n. 1, p. 48-55, 2 jan. 2022.

OHMOMO, H. et al. Evaluation of clinical formalin-fixed paraffin-embedded tissue quality for targeted-bisulfite sequencing. **Pathology International**, v. 71, n. 2, p. 135-140, fev. 2021.

ONDRACEK, R. P. et al. Results and lessons from dual extraction of DNA and RNA from formalin-fixed paraffin-embedded breast tumor tissues for a large Cancer epidemiologic study. **BMC Genomics**, v. 23, n. 1, p. 614, 2022.

REID, K. M. et al. A review of the optimisation of the use of formalin fixed paraffin embedded tissue for molecular analysis in a forensic post-mortem setting. **Forensic Science International**, v. 280, p. 181-187, 46NA. 2017.

RIBEIRO-SILVA, A; GARCIA, S. B. Estudo comparativo de três diferentes procedimentos para extração de RNA a partir de amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina. **Bras Patol Med Lab**, [S. l.], v. 44, n. 2, p. 123-130, 20 abril 2008.

SARNECKA, A. K. et al. DNA extraction from FFPE tissue samples – a comparison of three procedures. **Współczesna Onkologia**, v. 23, n. 1, p. 52-58, 2019.

SCORSATO, A. P. Estudo quantitativo e qualitativo do 46NA obtido da medula óssea armazenada em blocos de parafina de pacientes portadores de anemia aplásica. Orientador: Prof. Dr. José EDERALDO, Q. T. 2010. 78 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – **Universidade Federal do Paraná (UFPR)**, 2010.

SIMONATO, L. E. et al. Avaliação de dois métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação em PCR. **Bras Patol Med Lab**, [S. l.], v. 43, n. 2, p. 121-127, 20 abr. 2007.

TSAKOGIANNIS, D. et al. Molecular approaches for HPV genotyping and HPV-DNA physical status. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 19, n. 1, p. 1-20, fev. 2017.

UWIRINGIYEYEZU, T. et al. Comparability of CMV DNA Extraction Methods and Validation of Viral Load. **Methods and Protocols**, v. 5, n. 1, p. 6, 4 jan. 2022.

VAN DER LINDEN, M. et al. Detection of Copy Number Alterations by Shallow Whole-Genome Sequencing of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tumor Tissue. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, 17 dez. 2019.

VILJOEN, R. et al. Towards molecular autopsies: Development of a FFPE tissue DNA extraction workflow. **Science & Justice**, v. 62, n. 2, p. 137-144, mar. 2022.

VITOŠEVIĆ, Katarina; TODOROVIĆ, Miloš; SLOVIĆ, Živana; et al. DNA isolated from formalin-fixed paraffin-embedded healthy tissue after 30 years of storage can be used for forensic studies. **Forensic Science, Medicine and Pathology**, v. 17, n. 1, p. 47-57, 2021.

ZSIKLA, V. Effect of buffered formalin on amplification of DNA from paraffin wax embedded small biopsies using real-time PCR. **Journal of Clinical Pathology**, v. 57, n. 6, p. 654-656, 1 jun. 2004.

WEHMAS, L. C. et al. Demodifying RNA for Transcriptomic Analyses of Archival Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Samples. **Toxicological Sciences**, v. 162, n. 2, p. 535-547, 1 abr. 2018.

YI, QING-QING et al. Effect of preservation time of formalin-fixed paraffin-embedded tissues on extractable DNA and RNA quantity. **Journal of international medical research**, [S. l.], p. 1-10, 12 maio 2020.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Quadro 1. Exposição do grupo amostral obtido para a realização de extração de DNA. Grupo de amostras constituídos por Biópsias (n=30) e Peças Cirúrgicas (Peças Médias e Grandes) (n=60), as quais foram fixadas em formol não tamponado, processadas, incluídas em parafina e estavam acondicionadas em arquivos, com períodos diferentes (2, 5 e 10 anos) de armazenamento.

Período de armazenamento	Tipo da amostra / Tipo do tecido			Número e espessura de cortes
	Biópsia	Peça Média	Peça Grande	
2 anos	Não Tumoral (n=5) <i>*Mucosa Gástrica (n=5).</i>	Não Tumoral (n=5) <i>*Ves. Biliar (n=3). *Ves. Biliar/Fígado (n=1). * Apêndice Cecal (n=1).</i>	Não Tumoral (n=5) <i>*Pulmão (n=4). *Hilo Renal (n=1).</i>	3 cortes de 10 micra
				6 cortes de 10 micra
	Tumoral (n=5) <i>*Mucosa Cólon (n=4). *Mucosa Escamosa de Glande (n=1).</i>	Tumoral (n=5) <i>*Pele de Face (n=1). *Retalho de Pele (n=1). *Pele Pavilhão Auricular (n=1). *Pele Braço (n=1). *Pele Lábio e Face (n=1).</i>	Tumoral (n=5) <i>*Pulmão (n=4). *Rim (n=1).</i>	3 cortes de 10 micra
				6 cortes de 10 micra
5 anos	Não Tumoral (n=5) <i>*Mucosa Gástrica (n=5).</i>	Não Tumoral (n=5) <i>*Apêndice Cecal (n=3). *Vesícula Biliar (n=2).</i>	Não Tumoral (n=5) <i>*Intestino Grosso (n=4). *Vesícula Seminal (n=1).</i>	3 cortes de 10 micra
				6 cortes de 10 micra
	Tumoral (n=5) <i>*Mucosa Cólon (n=3). *Mucosa Rinofaringe (n=1). *Mucosa Gástrica (n=1).</i>	Tumoral (n=5) <i>*Pele Nasolabial (n=1). *Fígado (n=1). *Pele de dorso (n=1). *Pele de Face (n=2).</i>	Tumoral (n=5) <i>*Intestino Grosso (n=4). *Próstata (n=1).</i>	3 cortes de 10 micra
				6 cortes de 10 micra
10 anos	Não Tumoral (n=5) <i>*Mucosa Gástrica (n=5).</i>	Não Tumoral (n=5) <i>*Vesícula Biliar (n=5).</i>	Não Tumoral (n=5) <i>*Ovário (n=1). *Linfonodo (n=1). *Intestino grosso (n=2). *Margem Brônquica (n=1).</i>	3 cortes de 10 micra
				6 cortes de 10 micra
	Tumoral (n=5) <i>*Mucosa de Cólon (n=5).</i>	Tumoral (n=5) <i>*Pele de Face (n=4). *Pele (n=1).</i>	Tumoral (n=5) <i>*Intestino Grosso (n=4). *Pulmão (n=1).</i>	3 cortes de 10 micra
				6 cortes de 10 micra

Quadro 2. Exposição do grupo amostral obtido para a realização de extração de DNA. Grupo de amostras constituídos por Biópsias (n=27) e Peças Cirúrgicas (n=41), as quais foram fixadas em formol tamponado, processadas, incluídas em parafina e estavam acondicionadas em arquivos, com períodos diferentes (2, 5 e 10 anos) de armazenamento.

Período de armazenamento	Tipo da amostra / Tipo do tecido		Número e espessura de cortes
	Biópsia	Peça	
2 anos	Não Tumoral (n=4) <i>*Mucosa Gástrica (n=4).</i>	Não Tumoral (n=5) <i>*Ves. Biliar (n=3).</i> <i>* Apêndice (n=2).</i>	6 cortes de 10 micra
	Tumoral (n=5) <i>*Mucosa Cólon (n=3).</i> <i>*Brônquio / Pulmão (n=2).</i>	Tumoral (n=9) <i>*Colon (n=2).</i> <i>*Rim (n=2).</i> <i>*Pele (n=2).</i> <i>*Reto (n=1).</i> <i>*Pulmão (n=1).</i> <i>*Glande (n=1).</i>	6 cortes de 10 micra
5 anos	Não Tumoral (n=4) <i>*Mucosa Gástrica (n=4).</i>	Não Tumoral (n=6) <i>*ApênceCécal (n=3).</i> <i>*Vesícula Biliar (n=3).</i>	6 cortes de 10 micra
	Tumoral (n=4) <i>*Mucosa Cólon (n=2).</i> <i>*Reto (n=1).</i> <i>*Pele (n=1).</i>	Tumoral (n=7) <i>*Reto (n=2).</i> <i>*Íleo (n=1).</i> <i>*Colon (n=1).</i> <i>*Esôfago (n=1).</i> <i>*Próstata (n=1).</i> <i>*Gastrico (n=1).</i>	6 cortes de 10 micra
10 anos	Não Tumoral (n=5) <i>*Mucosa Gástrica (n=4).</i> <i>*Apêndice (n=1).</i>	Não Tumoral (n=6) <i>*Vesícula Biliar (n=6).</i>	6 cortes de 10 micra
	Tumoral (n=5) <i>*Pulmão (n=2).</i> <i>*Reto (n=1).</i> <i>*Pele (n=1).</i> <i>*Íleo (n=1).</i>	Tumoral (n=8) <i>*Colon (n=5).</i> <i>*Pele (n=2)</i> <i>*Reto (n=1).</i>	6 cortes de 10 micra