

## Extração de DNA para análise da amelogenina em amostras fixadas em formalina, incluídas em parafina e armazenadas por 1 e 5 anos no Departamento de Patologia da Universidade Federal de São Paulo

### Extraction of DNA for analysis of amelogenin in samples fixed in formalin, embedded in paraffin stored for 1 and 5 years in the Department of Pathology - Federal University of Sao Paulo

Funabashi, KS<sup>1</sup>; Iwamura, ESM<sup>1</sup>

---

Funabashi, KS; Iwamura, ESM. Extração de DNA para análise da amelogenina em amostras fixadas em formalina, incluídas em parafina e armazenadas por 1 e 5 anos no Departamento de Patologia da Universidade Federal de São Paulo. *Saúde, Ética & Justiça*. 2013;18(Ed. Especial):39-44.

**RESUMO:** O uso da biologia molecular em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina (FFPE) vem crescendo, e a melhoria nos métodos de obtenção do DNA para sua análise é necessária. O objetivo deste estudo foi avaliar o DNA extraído de blocos de tecidos FFPE (fígado, baço e cérebro não tumorais), obtidos de necropsia, 8 a 24 horas *post mortem*, utilizando três métodos de extração de DNA (kit comercial, fenol-clorofórmio e *Salting-Out*). Foram realizadas as PCRs dos genes da  $\beta$ -actina (136pb), amelogenina humana (AMEL 212-218pb) e STRs (100-400pb) para avaliar a eficácia do método de extração de DNA e determinar o sexo dos indivíduos. Foram utilizados 28 casos arquivados (1 e 5 anos) e 12 recentes, sendo analisadas 10 amostras de cada um dos tecidos. O kit comercial apresentou maior grau de pureza, resultados reprodutíveis e consistentes na amplificação por PCR nos genes da  $\beta$ -actina e AMEL e na análise por STR. Este estudo fornece uma compreensão dos desafios envolvendo amostras FFPE, e esclareceu novas estratégias para análises moleculares neste tipo de material.

**PALAVRAS-CHAVE:** PCR, STR; Autópsia; Patologia Molecular; FFPE.

---

---

Este trabalho resumido faz parte da Dissertação de Mestrado de Karina S. Funabashi. O artigo completo foi publicado: Funabashi et al. DNA extraction and molecular analysis of non-tumoral liver, spleen, and brain from autopsy samples: The effect of formalin fixation and paraffin embedding. *Pathology, Research and Practice*, v. 208, p. 584-591, 2012. doi: 10.1016/j.prp.2012.07.001.

<sup>1</sup>. Departamento de Patologia – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo - EPM/UNIFESP, São Paulo, SP

**Endereço para correspondência:** Departamento de Patologia- EPM/ UNIFESP. Rua Botucatu, 740. CEP 04023-062 - São Paulo, SP Brasil. Email: ksfunabashi@gmail.com

## INTRODUÇÃO

O processo de fixação em formalina e inclusão em parafina (FFPE) é considerado um método padrão de preservação de amostras biológicas por longos períodos. Este tipo de amostra é importante para diagnósticos médicos, estudos genéticos retrospectivos e epidemiológicos<sup>2</sup>, uso em investigação forense<sup>3-6</sup> e são uma excelente fonte de DNA,<sup>7,8</sup> embora sua recuperação para análise molecular ainda seja um desafio<sup>9</sup>.

O processamento de amostras parafinadas, apesar de ser padronizado, pode variar de acordo com cada rotina laboratorial<sup>10</sup>. Extensas ligações cruzadas entre proteínas nos tecidos e fragmentação do DNA podem ser encontradas e, portanto, uma baixa qualidade de DNA pode ser obtida<sup>11</sup>.

Existem diversos protocolos descritos para a extração de DNA em diferentes amostras. Entretanto, a extração de DNA em tecidos parafinados requer protocolos especiais, pois este tipo de material geralmente é escasso, degradado, e pode conter substâncias que inibem os procedimentos moleculares<sup>12</sup>. Desta maneira, é importante compreender e analisar cada etapa do procedimento de amostras parafinadas: desde a fixação até a análise molecular.

## OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar o DNA extraído de fragmentos não tumorais de fígado, baço e cérebro normais FFPE obtidos de necropsia de 8 a 24 horas *post mortem*, recentes, arquivados por 1 e 5 anos e em amostras congeladas, utilizando três métodos de extração de DNA. Além disso, a amplificação do gene da  $\beta$ -actina (136pb) e da amelogenina humana (212pb-218pb/106pb-112pb) foi realizada com o propósito de, respectivamente, avaliar a eficácia do método de extração de DNA e determinar o sexo dos indivíduos neste tipo de amostra.

## MATERIAIS E MÉTODO

### Amostras FFPE: recentes, armazenadas por 1 e por 5 anos

Nosso estudo envolveu 12 casos de necropsia recentes, dos quais foram coletadas amostras normais de fígado (n=10), baço (n=10) e cérebro (n=10) em duplicata, sendo que uma parte FFPE de acordo com a rotina de patologia e o outro grupo foi congelado para ser utilizado como controle. Além disso, utilizamos blocos de parafina

contendo fragmentos normais de fígado, baço e cérebro (n=10 cada tecido) armazenados por 1 (13 casos) e 5 anos (15 casos), todos obtidos de exames de necropsia, de 8 a 24 horas *post mortem*.

### Extração de DNA

Das amostras congeladas, foram utilizadas aproximadamente 25mg; dos blocos de parafina, foram utilizados 2 cortes de 10  $\mu$ m com 1 cm<sup>2</sup> de tecido. Para a remoção da parafina, foram realizadas 2 lavagens com xilol e etanol a 100%. Métodos de extração: a) Fenol-clorofórmio (25:24:1): foram adicionadas às amostras 500 $\mu$ l de tampão de digestão (Tris-HCl 1mM pH 8.0; EDTA 0.5mM e Tween 20, 0.5%) com 20mg/ml de proteinase K. As amostras foram incubadas com o tampão em *overnight* a 56° C. Em seguida, 500 $\mu$ l de fenol-clorofórmio foram adicionados. As amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 16000xg e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5ml. O fenol-clorofórmio foi adicionado novamente no volume de 500 $\mu$ l e os tubos foram centrifugados a 16000xg por 4 minutos. O DNA foi precipitado com 4 $\mu$ l de acetato de sódio a 3M pH4.8 e 1ml de etanol 100% por 2 horas e ressuspendido em 80 $\mu$ l de solução TE (Tris-HCl 1mM e EDTA 0.5mM pH 8); b) Kit comercial (QIAamp Mini kit®, Qiagen): a extração de DNA foi realizada de acordo com as instruções do fabricante; c) *Salting-Out*: após o processo de digestão (mencionado anteriormente), foram adicionados 200 $\mu$ l de acetato de amônia 2M e incubados a -20°C por 5 minutos. Após a centrifugação a 13000xg por 3 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e 600 $\mu$ l de isopropanol foi adicionado e centrifugado a 16000xg por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 200 $\mu$ l de etanol 70% e centrifugado a 16000xg por 1 minuto. O DNA extraído foi conservado em 80 $\mu$ l de solução TE.

### Quantificação e análise

O DNA foi quantificado no Nanodrop® ND-1000 (Thermo Scientific®) e ajustado para PCR convencional (10ng/ $\mu$ l para ser utilizado 2 $\mu$ l de DNA em 25 $\mu$ l de reação). A amplificação da  $\beta$ -actina (136pb) e da amelogenina humana (212pb-218pb) foi realizada no termociclador ABI 9700, utilizando água MilliQ como controle negativo e K562 (Promega®, USA) como controle positivo. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 2% com Gel Red®, utilizando pGEM (Promega®, USA) como padrão de peso molecular através de luz UV pelo equipamento Kodak EDAS.

As amostras de DNA extraídas pelo kit comercial que foram amplificadas pelo gene da  $\beta$ -actina foram submetidas à PCR dos kits AmpFISTR Identifiler® e AmpFISTR MiniFiler™ (Applied Biosystems, USA), e genotipadas para análise dos fragmentos de X e Y, pelo gene da amelogenina, bem como dos fragmentos STR, através do sequenciador 3130 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

## RESULTADOS

A Tabela 1 mostra os resultados da concentração de DNA em ng/ $\mu$ l/cm<sup>2</sup> (média  $\pm$  DP) das amostras

de baço, fígado e cérebro (n=10 cada). A tabela apresenta os resultados obtidos dos 3 métodos de extração. O sucesso de amplificação através dos 2 tipos de *primers* estão expressados em porcentagem. Uma alta quantidade de DNA foi obtida nas amostras extraídas pelo método fenol, nos três grupos de amostras parafinadas (recentes e armazenadas por 1 e 5 anos), quando comparado aos outros 2 métodos de extração. As amostras congeladas foram amplificadas pelos 2 tipos de *primers*, como controle. Houve uma alta taxa de amplificação para o gene da  $\beta$ -actina em amostras recentes parafinadas, quando comparadas às amostras armazenadas por 1 e 5 anos.

**TABELA 1.** DNA extraído de amostras de fígado, baço e cérebro: (a) congeladas; (b) casos recentes FFPE; (c) amostras FFPE armazenadas por 1 ano; e (d) FFPE armazenadas por 5 anos (n=10 cada). Concentração média de DNA (ng/ $\mu$ l/cm<sup>2</sup>) e taxa de sucesso de amplificação (expresso em porcentagem) dos genes da  $\beta$ -actina e amelogenina.

|                |                                 | Congeladas         | Casos<br>FFPE recentes | 1 ano              | 5 anos            |
|----------------|---------------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|-------------------|
| <b>Baço</b>    |                                 |                    |                        |                    |                   |
|                | Fenol-clorofórmio               | 523,5 $\pm$ 88,8   | 323,9 $\pm$ 135,6      | 1009,5 $\pm$ 526,6 | 312,5 $\pm$ 141,7 |
|                | Kit comercial                   | 117,4 $\pm$ 50,7   | 21,2 $\pm$ 18,8        | 14,9 $\pm$ 8,3     | 34,4 $\pm$ 19,7   |
|                | Salting-Out                     | 80,5 $\pm$ 52,5    | 21,2 $\pm$ 20,1        | 10,5 $\pm$ 6       | 19,2 $\pm$ 24,1   |
|                | $\beta$ -actina (+) Fenol       | 100%               | 100%                   | 60%                | 50%               |
|                | $\beta$ -actina (+) Kit         | 100%               | 100%                   | 50%                | 50%               |
|                | $\beta$ -actina (+) Salting-Out | 100%               | 100%                   | 60%                | 100%              |
|                | Amelogenina (+) Fenol           | 100%               | -                      | 0%                 | -                 |
|                | Amelogenina (+) Kit             | 100%               | 100%                   | 0%                 | -                 |
|                | Amelogenina (+) Salting-Out     | 100%               | -                      | -                  | -                 |
| <b>Fígado</b>  |                                 |                    |                        |                    |                   |
|                | Fenol-clorofórmio               | 1522,7 $\pm$ 693,7 | 313,2 $\pm$ 152,4      | 1045,6 $\pm$ 572,4 | 274,4 $\pm$ 127,8 |
|                | Kit comercial                   | 80,7 $\pm$ 61,8    | 27,5 $\pm$ 15,8        | 14 $\pm$ 10,2      | 24,3 $\pm$ 21,8   |
|                | Salting-Out                     | 70,5 $\pm$ 50,2    | 11,7 $\pm$ 7,1         | 16,2 $\pm$ 11,8    | 7,6 $\pm$ 4,2     |
|                | $\beta$ -actina (+) Fenol       | 100%               | 90%                    | 70%                | 40%               |
|                | $\beta$ -actina (+) Kit         | 100%               | 100%                   | 60%                | 60%               |
|                | $\beta$ -actina (+) Salting-Out | 100%               | 100%                   | 70%                | 100%              |
|                | Amelogenina (+) Fenol           | 100%               | -                      | 0%                 | -                 |
|                | Amelogenina (+) Kit             | 100%               | 100%                   | 0%                 | -                 |
|                | Amelogenina (+) Salting-Out     | 100%               | -                      | -                  | -                 |
| <b>Cérebro</b> |                                 |                    |                        |                    |                   |
|                | Fenol-clorofórmio               | 524,8 $\pm$ 205,9  | 182,6 $\pm$ 125,7      | 335,2 $\pm$ 115,4  | 157 $\pm$ 69,3    |
|                | Kit comercial                   | 10,3 $\pm$ 3,9     | 11 $\pm$ 7             | 7,2 $\pm$ 4,3      | 14,5 $\pm$ 8,3    |
|                | Salting-Out                     | 148,6 $\pm$ 89,6   | 6,3 $\pm$ 3,1          | 6,5 $\pm$ 4,4      | 7,9 $\pm$ 6,3     |
|                | $\beta$ -actina (+) Fenol       | 100%               | 70%                    | 70%                | 50%               |
|                | $\beta$ -actina (+) Kit         | 100%               | 100%                   | 20%                | 40%               |
|                | $\beta$ -actina (+) Salting-Out | 100%               | 100%                   | 80%                | 100%              |
|                | Amelogenina (+) Fenol           | 100%               | -                      | 0%                 | -                 |
|                | Amelogenina (+) Kit             | 100%               | 100%                   | 0%                 | -                 |
|                | Amelogenina (+) Salting-Out     | 100%               | -                      | -                  | -                 |

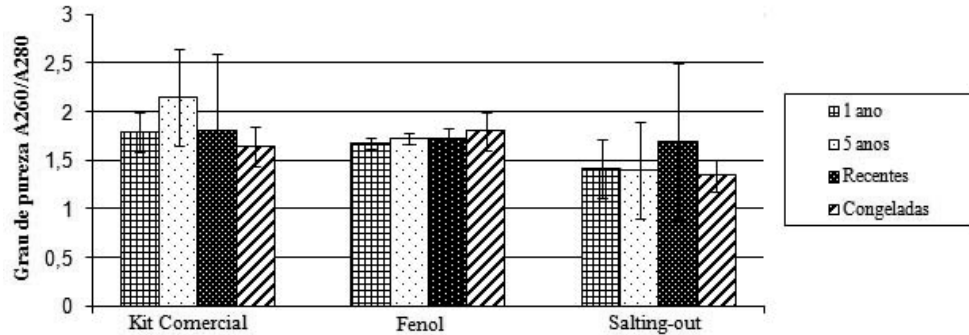
As amostras extraídas pelo *Salting-Out* apresentaram um menor grau de pureza,

heterogeneidade e variação, quando comparado às extrações com fenol e kit. A extração pelo kit ren-deu

um maior grau de pureza (leitura 260/280), embora, no método pelo fenol, houve uma maior homoge-

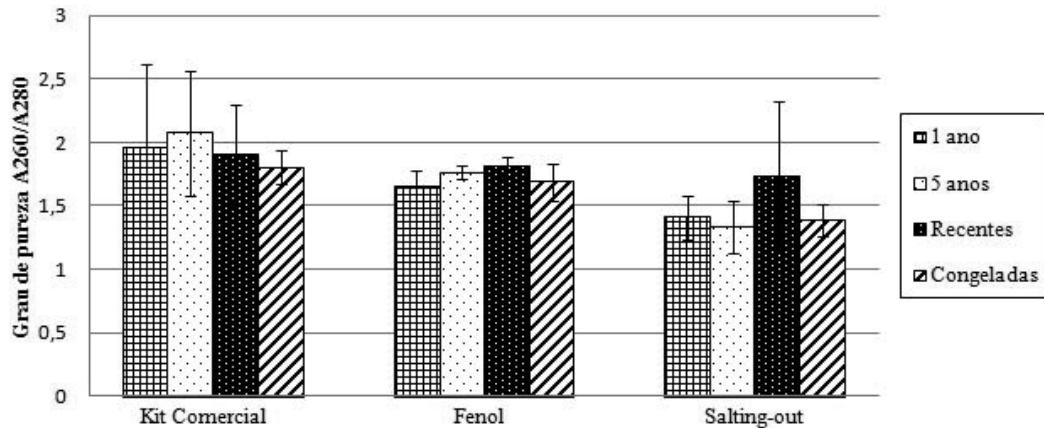
neidade entre as amostras parafinadas recentes e armazenadas por 1 e 5 anos (Gráficos 1 a 3).

#### DNA extraído de cérebro



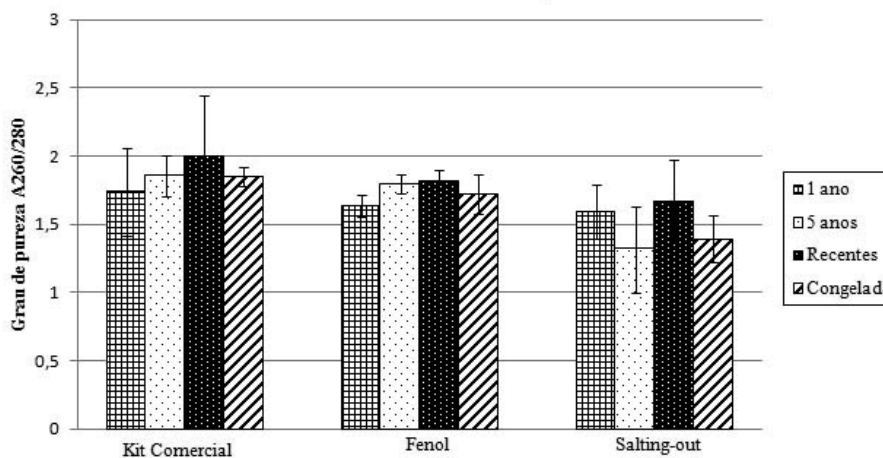
**GRÁFICO 1.** Grau de pureza (A260/A280) do DNA extraído de amostras de cérebro congeladas, parafinadas recentes e armazenadas por 1 e 5 anos, utilizando 3 métodos de extração: kit comercial, fenol e Salting-out

#### DNA extraído de fígado



**GRÁFICO 2.** Grau de pureza (A260/A280) do DNA extraído de amostras de fígado congeladas, parafinadas recentes e armazenadas por 1 e 5 anos, utilizando 3 métodos de extração: kit comercial, fenol e Salting-out

#### DNA extraído de baço



**GRÁFICO 3.** Grau de pureza (A260/A280) do DNA extraído de amostras de baço congeladas, parafinadas recentes e armazenadas por 1 e 5 anos, utilizando 3 métodos de extração: kit comercial, fenol e Salting-out

O gene da amelogenina foi amplificado em todas as amostras através do STR. A região de análise do gene da amelogenina tem o comprimento de 106-112pb (menor que a região visualizada no gel de agarose, de 212-218pb). Entretanto, apenas em algumas amostras parafinadas, a análise dos marcadores foi possível, com picos maiores que 50 RFU, assim como em outros loci que possuíam comprimento maior que 200pb (dados não mostrados).

## DISCUSSÃO

Os melhores resultados de amplificação do gene da  $\beta$ -actina foram observados nas amostras recentes, mostrando uma pequena variação entre os tecidos, especialmente nas amostras de cérebro extraídas com fenol. Os períodos restantes, de 1 e 5 anos de armazenamento, mostraram um decréscimo gradual na amplificação utilizando o método de fenol, indicando que, embora este método consiga extrair grandes quantidades de DNA, algumas regiões afetadas podem não ser amplificadas para uso em biologia molecular.

O método de extração *Salting-Out* mostrou variações nos resultados de amplificação em relação às extrações com fenol e kit nas amostras armazenadas por 1 e 5 anos. As amostras armazenadas por 1 ano tiveram piores resultados. Esse dado é contrário ao esperado, uma vez que o mais lógico seria melhores resultados nessas amostras em relação às de 5 anos. Por outro lado, também observamos nos gráficos 1-3, níveis de pureza encontrados nas amostras armazenadas por 1 ano inferiores em relação às armazenadas por 5 anos. Uma das explicações possíveis podem ser variações na qualidade dos reagentes utilizados no processamento das amostras. No geral, os dados de 5 anos em relação aos casos recentes mostraram-se consistentemente piores na obtenção de reações positivas de PCR. Nossas amostras obtidas de necropsias não são uniformes em relação ao tempo de fixação e ao processo de inclusão em parafina, o que poderia explicar alguns de nossos resultados. Em nosso estudo, também, o processo de inclusão das amostras pode ter afetado os resultados. O tempo de armazenamento dos blocos pode influenciar na qualidade do DNA extraído, porém a qualidade dos materiais utilizados no processamento de fixação dos tecidos e dos blocos de parafina pode interferir na qualidade do DNA obtido.

Enquanto a extração com fenol apresentou

melhores resultados quanto ao grau de pureza (valores de 1.8 para as leituras de A260/A280) e maior concentração de DNA, a extração com kit comercial mostrou maiores intensidades de banda no gel de agarose. Neste tipo de extração, o processo de purificação resulta em um melhor material pós-PCR a ser analisado, por conta do processo de filtragem presente no kit.

Diversos protocolos de extração têm sido descritos para obtenção de um DNA de melhor qualidade em amostras arquivadas<sup>8, 9, 15</sup>. As variações nos protocolos focam em diferentes etapas do processamento das amostras, como a desparafinização, tempo, digestão com proteinase K, extração de DNA e métodos de purificação.

O processo de fixação e inclusão em parafina parece "amarrar" o DNA, inibindo as reações de PCR. De acordo com diversos autores, a etapa mais crítica para se obter um DNA íntegro é na fixação em formalina<sup>10,15</sup>. Entretanto, em nosso estudo e de acordo com Gillio Tos et al 2007<sup>11</sup>, o processo de inclusão em parafina mostrou uma importante ação na obtenção de um DNA amplificável para análise.

O kit de STR Identifiler® é rotineiramente utilizado para estudos de genética forense e, mais recentemente, os mini-STR têm sido adotados para análise de perfis genéticos para identificação humana<sup>14</sup>. Nestes kits, o *primer* da amelogenina (106-112pb) está incluído em uma reação única e multiplex de PCR. Os resultados incompletos dos perfis de STR corroboram com outros autores<sup>13</sup> em relação à fragmentação e não amplificação.

Um cuidado especial deve ser tomado ao comparar a qualidade do DNA extraído de material de necropsia FFPE com biópsias. Muitas vezes, materiais de autópsias permanecem mais tempo no fixador em relação aos espécimes cirúrgicos. No entanto, é intuitivo que os resultados do presente estudo sobre os diferentes métodos de extração e os fatores que influenciam a qualidade do DNA também possam ser encontrados ao lidar com biópsias.

Este é o primeiro trabalho que avaliou tecidos não tumorais FFPE com três métodos de extração de DNA mais comuns, avaliando PCR para identificação de sexo e STR de até 400pb, mostrando que embora alguns tecidos FFPE contenham grandes quantidades de DNA e com alto grau de pureza, os efeitos da formalina e os reagentes usados no processo de parafinização impedem a amplificação efetiva pela PCR dos fragmentos alvos.

Concluindo, o método que empregou o kit comercial apresentou resultados reprodutíveis

e mais consistentes na amplificação por PCR do gene da  $\beta$ -actina e amelogenina. Este estudo fornece uma compreensão dos desafios envolvendo

amostras parafinadas para análises de biologia molecular, principalmente para futuros estudos em amostras de tecidos FFPE.

## REFERÊNCIAS

1. Alvarez-Lafuente R, Aguilera B, Suárez-Mier MA et al. Detection of human herpesvirus-6, Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in formalin-fixed tissues from sudden infant death: a study with quantitative real-time PCR. *Forensic Sci Int.* 2008; 178: 106–11.
2. Lassalle S, Hofman V, Ilie M, et al. Assessment of morphology, antigenicity, and nucleic acid integrity for diagnostic thyroid pathology using formalin substitutive fixatives. *Thyroid.* 2009; 19: 1239–48.
3. Budimlija Z, Lu C, Axler-DiPerte G, et al. Malignant tumours and forensics – dilemmas and proposals, *Croat Med J.* 2009; 50: 218–27.
4. Ananian V, Tozzo P, Ponzano E, et al. Tumoural specimens for forensic purposes: comparison of genetic alterations in frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Int J Legal Med.* 2010; 125: 327–32.
5. Banaschak S, Du Chesne A, Brinkmann B. Multiple interchanging of tissue samples in cases of breast cancer. *Forensic Sci Int.* 2000; 113: 3–7.
6. Doran GH, Dickel DN, Ballinger Jr. WE et al. Anatomical, cellular and molecular analysis of 8000-yr-old human brain tissue from the Windover archaeological site. *Nature.* 1986; 323: 803–6.
7. Crisan D, Cadoff EM, Mattson JC, et al. Polymerase chain reaction: amplification of DNA from fixed tissue. *Clin Biochem.* 1990; 23: 489–95.
8. Ferrer I, Armstrong J, Capellari S, et al. Effects of formalin fixation, paraffin embedding, and time of storage on DNA preservation in brain tissue: a Brain Net Europe study. *Brain Pathol.* 2007; 17: 297–303.
9. Duval K, Aubin RA, Elliot J, et al. Optimized manual and automated recovery of amplifiable DNA from tissues preserved in buffered formalin and alcoholbased fixative. *Forensic Sci Int.* 2010; 4: 80–8.
10. Bonin S, Petrera F, Niccolini B, et al. PCR analysis in archival postmortem tissues. *J Clin Pathol.* 2003; 56: 184–186.
11. Gillio-Tos A, De Marco L, Fiano V, et al. Efficient DNA extraction from 25- year-old paraffin-embedded tissues: study of 365 samples. *Pathology.* 2007; 39: 345–48.
12. Coura R, Prolla JC, Meurer L, et al. An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol.* 2005; 58: 894–5.
13. Casale V, Oneda R, Lavezzi AM, et al. Optimisation of postmortem tissue preservation and alternative protocol for serotonin transporter gene polymorphisms amplification in SIDS and SIUD cases. *Exp Mol Pathol.* 2010; 88: 202–5.
14. Hill CR, Kline MC, Mulero JJ, Lagacé RE, Chang CW, Hennessy LK, Butler JM. Concordance study between the AmpFISTR MiniFiler PCR amplification kit and conventional STR typing kits. *J Forensic Sci.* 2007; 52: 870–3.
15. Greer CE, Lund JK, Manos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies. *PCR Methods Appl.* 1991; 1: 46–50.

“Financial Support : FAPESP and Capes”