
EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA EM MATERIAL BIOLÓGICO PARAFINADO

**CESAR AUGUSTO SAM TIAGO VILANOVA-COSTA,
JANAÍNA BUZahr NÓBREGA, RAFAEL SOUTO
APARECIDO DIVINO DA CRUZ**

Resumo: elaborou-se uma técnica de isolamento de DNA total de amostras parafinadas. Ela possibilitou a obtenção de DNA de qualidade, de forma rápida, prática e eficiente. No estudo, foram utilizados blocos de parafina, que continham tecido tumoral de biópsias de câncer da orofaringe, das quais, cerca de 55% se amplificaram, e amostras de câncer de mama, que foram submetidas ao mesmo tratamento, e o DNA obtido foi amplificado para todos os casos.

Palavras-chave: extração de DNA, purificação de DNA, material biológico parafinado, biópsias, câncer

Nos laboratórios, existe a seguinte prática: qualquer tecido sólido, removido de um paciente para o propósito de diagnose, é fixado em parafina e guardado. Outro procedimento comum é a manutenção destes tecidos, em blocos de parafina, pelos departamentos de patologia de hospitais e clínicas. Todo este material arquivado corresponde a uma fonte legítima de material biológico para estudo e pesquisas que objetivam a validação de diagnósticos que usam o DNA (VILLA *et al.*, 1997). Com o advento da reação em cadeia da polimerase (PCR) e com o avanço nos métodos de extração e purificação do DNA, o uso do material biológico

arquivado tem sido o recurso útil como um excelente método para a detecção de agentes infecciosos e de distúrbios genéticos, além de possibilitar estudos retrospectivos e epidemiológicos. Adicionalmente, a alta sensibilidade na amplificação por PCR tem tornado esta técnica biomolecular uma importante ferramenta no diagnóstico clínico (SYRJÄNEN *et al.*, 1991).

A grande maioria dos métodos atualmente utilizados para a preparação de DNA, com base em tecidos e células previamente fixados, prejudica a sua amplificação *in vitro* por PCR, em razão da baixa qualidade e quantidade do material genético obtido. Na maioria deles, o processo de extração é bastante laborioso, demorado e dispendioso, além de ser de baixa qualidade o material extraído. Geralmente obtém-se o DNA degradado e de baixo peso molecular, em razão do uso de fortes solventes, excessivas centrifugações e longos períodos de digestão com proteínase K. Adicionalmente, uma grande quantidade de contaminantes são carregados para o DNA extraído, que atuam como fortes inibidores da polimerização *in vitro*. Em geral, os procedimentos envolvem um grande número de passos e, por conseguinte, demoram horas e até dias para se obter o resultado final (HELLER *et al.*, 1991). Assim, otimizações que visam modificar as técnicas de extração de DNA, tornando-as eficientes, práticas e rápidas, são sempre necessárias, com o objetivo de se obter DNA de material biológico fixado em parafina com um padrão de qualidade que possibilite o seu uso em PCR e que ofereça uma amplificação eficiente.

MATERIAL E MÉTODOS

Grupo Amostral

Foi selecionado para o grupo amostral um total de 22 amostras, composto de 04 amostras de biópsias da mama e 18 amostras de biópsias da orofaringe.

As amostras estavam fixadas em blocos de parafina. Para controle positivo interno, foi utilizada uma amostra de biópsia de uma paciente portadora de câncer, com diagnóstico de infecção por HPV na laringe, denominada no estudo como GERM. O controle negativo consistiu de água destilada e deionizada (Promega®).

Preparação das Amostras Parafinadas

Dos tecidos embebidos em blocos de parafina foram obtidos cortes de 5µm de espessura do material, que foram então codificados (Tabela 1).

Tabela 1: Identificação das Amostras-Teste, segundo Região Anatômica e Peso Utilizado

Amostras	Região Anatômica	Peso (mg)
C01, C02, R01 e R02	Mama	7
A01, A02, A03, A04, A05, A06, A07, A08, A09, A10, A11, A12, A13, A14, A15, A16, A17 e A18	Orofaringe	17

Em seguida, os cortes histológicos foram pesados, e preparados, 7mg do material das amostras de câncer de mama e de 17mg das amostras de câncer da orofaringe. A diferença entre a massa das amostras estudadas deve-se às características histológicas próprias de cada tecido, tais como a densidade molecular das células e sua matriz extracelular.

Desparafinização do tecido

A extração do DNA das amostras iniciou-se com a desparafinização do tecido em 600 µL de xileno. Os tubos foram colocados em banho-maria e pré-aquecidos, por 10 minutos, a 65°C, e aquecidos por 45 minutos a 67°C. Após a incubação, os tubos ainda quentes, foram centrifugados a 10.000 rpm, por 5 minutos, a uma temperatura de 25°C. Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e ao precipitado foram adicionados 600 µL de etanol a 95° GL. Os tubos foram novamente centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos a 25°C. Terminada a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante.

Extração de DNA das amostras parafinadas

Ao *pellet* do material biológico obtido, após a desparafinização, adicionou-se 1mL de água destilada mais 200 μ L de solução de proteinase K na concentração de 10 mg/mL. O material foi deixado em banho-maria por 3 horas, a 55°C, quando foram adicionados mais 100 μ L de solução de proteinase K (pK) na concentração de 10 μ g/mL, deixando-se os tubos por 9 horas a temperatura de 60°C.

Ao final da digestão proteolítica com pK, todo o material foi transferido para tubos novos, com o acréscimo de 600 μ L de álcool isopropílico PA. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado por 1 minuto e depois centrifugado a 14.000 rpm por 6 minutos à temperatura de 25°C. Após a centrifugação, desprezou-se todo o conteúdo dos tubos que foram então deixados em posição invertida para secar. Foram adicionados aos tubos secos 50 μ L de água destilada e deionizada. Os tubos foram levados à temperatura de 65°C por 15 minutos para rehidratação do DNA. Os tubos foram então congelados à temperatura de - 20°C até o momento de uso.

Quantificação do DNA por Fluorometria

Terminado o processo de extração, as amostras foram quantificadas em um fluorômetro DQ200 Dynaquant Fluorometer (*Hoefler Inc.*), segundo o protocolo indicado pelo fabricante. Foram obtidas concentrações de DNA satisfatórias (Tabela 2).

Tabela 2: Concentração de DNA nas Amostras-Teste Após o Processo de Extração

Amostras	Concentração Média (ng/ μ L)
C01	68
C02	21
R01	56
R02	32
A01, A02, A03, A04, A05, A06, A07, A08, A09, A10, A11, A12, A13, A14, A15, A16, A17 e A18	14

Amplificação por PCR

As amostras foram submetidas à PCR para amplificação de fragmentos genômicos de DNA humano, mediante a amplificação da região D8S135. Para isso, foi utilizado o *primer* D8S135 (*GIBCO - Life Technologies*) (Tabela III). O *primer* D8S135 é muito utilizado para controle e comprovação de amplificação de material humano (Figura 1), pelo fato de amplificar a região genômica do *locus* D8S135 microssatélite do cromossomo 8 (FÜZESI *et al.*, 1997).

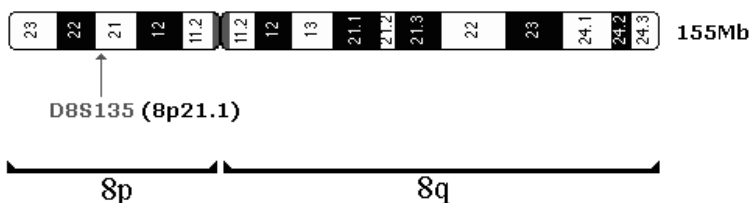


Figura 1: Ideograma Citogenético do Cromossomo 8 Humano Demonstrando a Posição do *Locus* Microssatélite D8S135

Fonte: NCBI (2005)

A solução de amplificação por PCR continha 10 μL de solução de DNA alvo, 2 μL de *primer* D8S135 a 15 $\text{pM}/\mu\text{L}$; 0,2 μL de Taq DNA-polimerase (Promega®, USA) a 5u/mL; 2,5 μL de tampão para PCR contendo 50 mM de KCl, 10 mM Tris-HCl em pH 8,3; 1,5mM MgCl mais 200 μM de cada desoxirribonucleotídeo Trifosfato (dNTP). O volume final para reação foi atingido com adição de 10,3 μL de água bi-destilada.

O protocolo de amplificação utilizado no experimento baseou-se no procedimento de termociclagem em *touchdown* (Tabela IV), sugerido por Cruz (1997), segundo o qual se diminui gradativamente a temperatura de anelamento, de forma a ampliar a concorrência dos *primers* com a região alvo até seu ponto ótimo. Desta forma, a ação da enzima Taq DNA-polimerase foi

potencializada, aumentando assim a probabilidade de amplificação e, conseqüentemente, a quantidade de material amplificado.

Utilizou-se um termociclador Perkin-Elmer GeneAmp® PCR System 9700 Thermal Cycler AB (*Applied Biosystems, USA*) segundo o qual se submeteu o material a uma desnaturação inicial, a temperatura de 95°C, por um período de 5 minutos, seguida por 10 ciclos contínuos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, de anelamento iniciando a 60°C e baixando 1°C, a cada ciclo, até atingir a temperatura de 51°C, no último ciclo, e extensão a 72°C por um minuto. Terminada esta fase, o material foi então submetido a mais 30 ciclos contínuos de desnaturação a 95°C, por 1 minuto, seguida de anelamento a 51°C por mais 1 minuto e extensão a 72°C por mais um minuto. Terminados os 30 ciclos, o material permaneceu por mais 5 minutos à temperatura de 72°C, de forma a favorecer um maior tempo de extensão. Com a totalidade de 40 ciclos, as possíveis cópias da região alvo poderiam ser em número de bilhões (GRIFFITHS *et al.*, 1998).

Tabela 4: Protocolo de Termociclagem em Touchdown Utilizado para Amplificação

Fase	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95	5	1
Desnaturação	95	1	10
Anelamento	60 - 51	1	(1 ciclo para cada temperatura de anelamento)
Extensão	72	1	
Desnaturação	95	1	
Anelamento	51	1	30
Extensão	72	1	
Extensão Final	72	5	1

Visualização dos Fragmentos Amplificados

Para a análise dos produtos obtidos por PCR, o material amplificado foi submetido a eletroforese, em gel de poliacrilamida, a 8%, em solução tampão Tris-borato de EDTA (TBE) a 2x para as amostras tipo C e R e agarose a 2% em solução tampão a 1x para as amostras tipo A. No gel de poliacrilamida, as amostras foram submetidas a um campo elétrico constante de 8 V/cm por um período de 1 hora e 15 minutos. Já para o gel de agarose, utilizou-se uma tensão constante de 10 V/cm por 45 minutos.

Os géis de poliacrilamida e agarose foram corados com brometo de etídio a 5 µg/mL, por um período de 15 minutos. Após a coloração, as bandas foram reveladas com o uso de um sistema de foto-documentação (VDS®-Amersham Pharmacia Biotech, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Amostras C e R

Foram obtidas amplificações nas 4 amostras analisadas, totalizando o percentual máximo entre o número de amostras e amplificações obtidas (Tabela V). A quantificação por fluorometria indicou quantidade de material genético suficiente nas amostras, fato confirmado na eletroforese após a amplificação por PCR.

Observou-se um forte arraste na raia da amostra R1, indicando um excesso de DNA ou resquícios de proteínas associadas, sugerindo uma extração e purificação deficientes. No entanto, a hipótese de contaminação protéica parece pouco provável em razão da intensa digestão por pK. A proteinase K é produzida pelo fungo *Tritirachium album Limber*, que apresenta largo espectro de clivagem. Portanto, e provavelmente, as proteínas mais resistentes, como as do citoesqueleto, foram completamente clivadas durante o processo ativo da pK. Assim, conclui-se que proteínas mais sensíveis, como as histonas, também sofreram intensa ação proteolítica. A ação ou presença de lípidos no material a ser amplificado é remota, pois o reagente aromático dimetilbenzeno (xilol) tem ação decisiva em sua total degradação nas etapas iniciais do processo de extração.

Tabela 5: Percentual de Amplificação entre as Amostras por Região Anatômica

Região Anatômica	Amostras	Amplificação	Percentual de Amplificação
Mama	C01, C02, R01 e R02	Positiva	100%
Orofaringe	A02, A03, A04, A05, A06, A07, A08, A11, A12 e A16	Positiva	55,5%
	A01, A09, A10, A13, A14, A15, A17 e A18	Negativa	

Amostras A

As amostras de tecido extraído de biópsias de tumores da orofaringe foram submetidas a um gel de agarose à concentração de 2%, oferecendo uma boa resolução, principalmente em relação ao tamanho dos fragmentos amplificados, pois os *ladders* (L) utilizados se apresentaram bastante definidos no gel. Os fragmentos amplificados de D8S135 apresentaram comprimentos de aproximadamente 98 pb.

Nestas amostras obtivemos 10 amplificações para o *primer* D8S135 representando um percentual aproximado de 55% de amplificação (Tabela V).

Tais resultados superaram aqueles apresentados na literatura, que são, em média, de 20% (SHIBATA *et al.*, 1988). Após a revelação do gel, observou-se um arraste nas raiais, sugerindo, outra vez, a possibilidade de haver grande concentração de DNA amostral. Para amplificação das amostras por PCR, utilizou-se células HeLa (H) como controle positivo amplificado por D8S135 e DNA de GERM (G), amplificado pelos *primers* GP 5 e GP 6 para HPV. Utilizou-se, como controle negativo, água destilada (W) e *mix* para PCR (C-). Este último apresentou a formação de dímeros de *primer*, auxiliando para a confirmação das bandas amplificadas por D8S135.

CONCLUSÃO

Extrair e purificar material genômico humano é um processo meticuloso e trabalhoso, com os resultados nem sempre satisfatórios, principalmente, quando se trabalha em amostras antigas, com mais de cinco

anos, e com um protocolo experimental em via de otimização. Após todo o trabalho processual de extração de DNA dos tipos tissulares em estudo e a posterior amplificação de fragmentos específicos através de PCR, os resultados sugerem que a técnica testada possui grandes potencialidades, pois foram obtidos resultados significativos, principalmente se comparados aos processos atualmente utilizados em pesquisas e no mercado de diagnóstico.

Referências

CROWE, J. S. et al. Improved cloning efficiency of polymerase chain reaction (PCR) products after proteinase K digestion. *Nucleic Acids Research*, v. 19, p. 184-186. 1991.

DA CRUZ, A. D. Monitoring the genetic health of humans exposed to ionizing radiation of cesium-137 in Goiânia (Brazil) [dissertation]. British Columbia, Canada, University of Victoria, 1997.

FLEMING, K. A.; NA, S. F. Removal of inhibitor(s) of polymerase chain reaction from formalin fixed, paraffin wax embedded tissues. *Journal of Clinical Pathology*, v. 44, n. 11, p. 924-927, 1991.

FÜZESI, L. et al. Novel enzyme immunoassay and optimized DNA extraction for the Detection of Polymerase-chain-reaction-amplified vital DNA from paraffin-embedded tissue. *American Journal of Pathology*, v. 150, n. 5, p.1537-1546, May 1997.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. Introdução à Genética. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

HELLER, M.J. et al. An efficient method for the extraction of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissue by sonication. *BioTechniques*, v.11, n.3, p.372-375. 1991.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Biologia celular e molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

NCBI: National Center for Biotechnology Information. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: jun. 2005.

NEUBAUER, A., et al. Analysis of gene amplification in archival tissue by differential polymerase chain reaction. *Oncogene*, v. 7, p.1019-1025, 1992.

RAOULT, D.; STEIN, A. A simple method for amplification of DNA from paraffin-embedded tissues., v. 20, n. 19, p. 5237-5238. 1992.

SHIBATA, D. K.; MARTIN, W. J.; ARNHEIN, N. Analysis of forty-year-old paraffin-embedded thin tissue sections: a bridge between molecular biology and classical histology. *Cancer Research*, n. 48, p. 4564-4566. 1988.

SYRJÄNEN, K. et al. A simple method for isolation of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded samples for PCR. *Journal of Virological Methods*, v. 35, p. 39-47, 1991.

VILLA, L. L.; PINTO, A. P. A spin cartridge system for DNA extraction from paraffin wax embedded tissues. *Journal of Clinical Pathology: Molecular pathology*, v. 51, n. 1, p. 48-49, 1998.

ZAHA, A. et al. *Biologia molecular básica*. 3. ed.. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2001.

Abstract: Protocols actually used to prepare DNA derived from fixed tissues and cell turn almost impracticable the PCR use due to poor quality of the material obtained. DNA amplification in most of these extraction methods is a laborious work that uses multiple steps, great number of centrifugation, strong solvents and long digestions with proteinase K. Some procedures can easily delay hours and even days to achieve the final results. Therefore, was elaborated a technique that extract DNA efficiently and fast, in order to earn biological samples up to actual requires established by science and medicine. This was the purpose of this study that developed a method in DNA extraction and purification from paraffin-embedded samples earning high quality and concentration material.

Key words: DNA Extraction, DNA Purification and Paraffin-embedded tissues

CESAR AUGUSTO SAM TIAGO VILANOVA-COSTA

Mestre em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal de Goiás (UFG). Pesquisador do Núcleo de Pesquisas Replicon da Universidade Católica de Goiás (UCG) e do Laobatório de Genética Molecular e Citogenética da UFG.

JANAÍNA BUZahr NÓBREGA

Especialista em Genética pela UCG. Pesquisadora do Instituto de Ciências Farmacêuticas (ICF).

RAFAEL SOUTO

Mestre em Genética pela UFG. Pesquisador de Núcleo de Pesquisas Replicon da UCG.

APARECIDO DIVINO DA CRUZ

PhD em Biologia Molecular pela University of Victoria, Canadá. Professor Titular no Departamento de Biologia da Universidade Católica de Goiás, Coordenador do Núcleo de Pesquisas Replicon da Universidade Católica de Goiás e Biomédico Geneticista da Superintendência de Ciência e Tecnologia em Saúde - Leide das Neves Ferreira, LaGene Laboratório