

ANDERSON PAULO SCORSATO

**ESTUDO QUANTITATIVO E QUALITATIVO DO DNA OBTIDO DA MEDULA
ÓSSEA ARMAZENADA EM BLOCOS DE PARAFINA DE PACIENTES
PORTADORES DE ANEMIA APLÁSICA.**

**Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre.
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia, Parasitologia e Patologia da
Universidade Federal do Paraná.**

**Orientador: Prof. Dr. José Ederaldo Queiroz
Telles**

**CURITIBA
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETORES DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS e da SAÚDE
Departamentos de Patologia Básica e Patologia Médica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia

TERMO DE APROVAÇÃO

"Estudo quantitativo e qualitativo do DNA obtido da medula óssea armazenada em blocos de parafina de pacientes portadores de anemia aplástica",

por

ANDERSON PAULO SCORSATO

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada por:

Prof. Dr. José Ederaldo Queiroz Telles (presidente)

Prof.ª Dr.ª Karin Braun-Prado

Dr. Renato Nishihara

Curitiba, 02 de agosto de 2010

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Ederaldo Queiroz Telles, por seu apoio e orientação;

À CAPES e CNPq pela Bolsa de Mestrado e pelo suporte financeiro;

Aos Professores Do Programa De Pós-Graduação Em Microbiologia, Parasitologia E Patologia, nível mestrado, da Universidade Federal do Paraná, pelos ensinamentos e colaboração;

À Prof^a. Dra. Edilene de C. Alcântara, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia;

A mestranda Marcia Fabricio de Melo pela parceria no desenvolvimento do projeto;

A Aglaci De Fátima Marquetti, pelo apoio técnico;

Às técnicas do laboratório de histotécnica do Setor de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas de Curitiba, que colaboraram com as os cortes histológicos do material;

Aos Funcionários Do Serviço De Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela colaboração;

Aos Funcionários do Setor de Imunogenética do Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFPR, pela colaboração;

À Eliane Maria de Siqueira, que sempre foi muito prestativa e atenciosa toda vez que precisei de algo;

Ao Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética do setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná pelo fornecimento do espaço físico para desenvolvimento do projeto especialmente, aos responsáveis pelo laboratório Dra. Enilze S. F. Ribeiro e Dr. Iglénir João Cavalli, e a doutoranda Maria Constanza Rodriguez, pelo apoio técnico.

Dedico este trabalho aos meus pais,
familiares e a todos que me
apoiaram nesta jornada.

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos”.

(Charles Chaplin)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS	3
2 REVISÃO	4
2.1 ARQUIVOS DE MATERIAL BIOLÓGICO	4
2.2 QUALIDADE DE UM PRODUTO	6
2.3 FATORES INERENTES À QUALIDADE DO MATERIAL	7
2.3.1 Tempo de pré-fixação	7
2.3.2 Descalcificação e fixação	7
2.3.3 Aldeído Fórmico e sua interação com Proteínas e DNA	9
2.4 PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO E SUA LIGAÇÃO COM A QUALIDADE E QUANTIDADE DO DNA	11
2.4.1 Protocolo básico	11
2.4.2 Desparafinização	12
2.4.3 Digestão	13
2.4.4 Purificação	14
2.5 TÉCNICAS DE MENSURAÇÃO DA QUALIDADE E QUANTIDADE DO DNA	17
2.5.1 Espectrofotometria de DNA	17
2.5.2 Reação em cadeia da polimerase	18
2.6 CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS TECIDUAIS	20
2.6.1 Medula óssea e anemia aplásica	20
2.7 IMPORTÂNCIAS DO ESTUDO DO GENE HLA	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 PARCERIA DE PACIENTES	25
3.2 AMOSTRAGEM DO ESTUDO	25
3.3 CORTES PARA EXTRAÇÃO DE DNA	26
3.4 PRÉ-EXTRAÇÃO DA AMOSTRA	26
3.5 EXTRAÇÃO DO DNA	27
3.5.1 Protocolo de purificação e extração de DNA genômico	27
3.6 PROCEDIMENTO DE ESPETROFOTOMETRO	29
3.6.1 Preparação da Amostra	29
3.6.2 Procedimento para uso do espectrofotômetro	29
3.6.3 Análise e Interpretação dos Resultados	29
3.7 REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE	29
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
3.8.1 Teste da Binomial	31
3.8.2 Teste de Coeficiente de Correlação de Point-biserial	31
3.8.3 Teste T-Student simples	31
3.8.4 Teste T- Duas amostras independentes	31
3.8.5 Teste do Coeficiente de correlação de Pearson	31
3.8.6 Teste Shapiro-Wilk	31
4 RESULTADOS	32
4.3 EFICIÊNCIAS DA ESPECTROFOTOMETRIA TRADICIONAL	43
4.4 EFICIÊNCIA DA TÉCNICA DE PCR	46
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÃO	54
6.1 CONCLUSÕES GERAIS	54

6.2 CONCLUSÕES ESPECIFICAS	54
REFERÊNCIA	55
ANEXO	63
Anexo I: Protocolo de Utilização de espectrofotômetro	64
Anexo II: Tabela de diluições feitas das amostras extraídas para utilização na PCR.	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	PROGRAMAÇÃO UTILIZADA EM AMPLIFICAÇÃO.....	30
TABELA 2	RESULTADOS DE LEITURA DAS AMOSTRAS NO ESPECTROFOTÔMETRO	32
TABELA 3	RESULTADOS DE LEITURA DE ESPECTROFOTÔMETRO DAS AMOSTRAS POSITIVAS	37
TABELA 4	COMPARAÇÃO DA ESTATÍSTICA DESCRITIVA DE TODAS AS AMOSTRAS E DAS AMOSTRAS POSTIVAS	39
TABELA 5	RESULTADOS DO TESTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON DE TODAS AS AMOSTRAS E DAS AMOSTRAS POSTIVAS.....	42
TABELA 6	RESULTADO DO TESTE DE CORRELAÇÃO DE POINT- BISERIAL.....	44
TABELA 7	RESULTADOS DO TESTE T - STUDENT DE TODAS AS AMOSTRAS E DAS AMOSTRAS POSTIVAS.....	45

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	REAÇÃO QUÍMICA ENTRE FORMALDEIDO E PROTEÍNA.....	10
FOTOGRAFIA 1	MEDULA ÓSSEA COM ANEMIA APLÁSICA.....	22
GRÁFICO 1	BOXPLOTS PARA ANÁLISE DE DISPERSÃO DAS DUAS VARIÁVEIS DE ESTUDO.....	33
FOTOGRAFIA 2	AMPLIAÇÃO DO GEL DE AGAROSE EM ENSAIO DE ELETROFOSE PARA O GENE <i>HLA-DRB1</i>	35
FOTOGRAFIA 3	GEL DE AGAROSE EM ENSAIO DE ELETROFORESE COM AMOSTRAS TESTADAS PARA O GENE <i>HLA-DRB1</i>	36
GRÁFICO 2	BOXPLOTS PARA ANÁLISE DE DISPERSÃO DAS DUAS VARIÁVEIS DAS AMOSTRAS POSITIVAS	38
GRÁFICO 3	DISPERSÃO DOS DADOS DE CONCENTRAÇÃO COMPRADA À IDADE DOS BLOCOS.....	40
GRÁFICO 4	DISPERSÃO DOS DADOS DE PUREZA COMPRADA À IDADE DOS BLOCOS.....	41
GRÁFICO 5	GRÁFICO DE CORRELAÇÃO DOS DADOS DE PUREZA E CONCENTRAÇÃO.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm – Micrometro

µl- Microlitro

A230nM - Absorbância de 230 nanômetros

A260nM – Absorbância de 260 nanômetros

A280nM- Absorbância de 280 nanômetros

AAS - Anemia aplásica severa

AP - Apurinas e Apirimidinas

AT - Adenina + Timina

Bp - Pares de base

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Etilenodiamino tetra-acético

HCl - Ácido Clorídrico

HC-UFPR – Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

HLA - Human leukocyte antigen

Kpb - Quilo-pares-de-bases = mil pares de bases

MHC- Major histocompatibility complex

ml - Mililitro

NaCl - Cloreto de sódio

nm - Nanômetro

ng/ul - Nanograma/ Microlitros

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pH - Potencial hidrogeniônico

r_{pb} - Coeficiente de correlação de Point-biserial

RNA - Ácido ribonucleico

SDS - Dodecilsulfato de sódio

Tris - Trishidroximetilaminometano

RESUMO

Os avanços tecnológicos e metodológicos na biologia molecular criaram a possibilidade de obter DNA de amostras teciduais estocadas em blocos de parafina, alternativa esta que permite estudos retrospectivos de grandes bancos de tecidos, contendo inúmeras doenças raras. A quantidade e a qualidade do DNA obtido são considerados de suma importância para os procedimentos pós-extração e a presença de contaminantes pode inibir a amplificação, especialmente em condições de escassez de DNA. Nosso objetivo é realizar a análise quantitativa e qualitativa do DNA extraído de blocos de parafina de casos de anemia aplásica severa (AAS) e analisar a eficiência/qualidade das técnicas de espectrofotometria tradicional e PCR na mensuração da qualidade e quantidade de DNA.

Foram utilizadas 48 amostras de blocos de parafina contendo fragmentos de biópsia de medula óssea, do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UFPR em Curitiba, nas quais o DNA foi extraído pelo método do fenol-clorofórmio.

Os resultados estatísticos levantaram a suspeita da não confiabilidade da técnica de espectrofotometria na avaliação da eficiência do DNA extraído para amplificação e a comparação com os resultados da amplificação por PCR confirmam nossa suspeição. Foi realizada análise de correlação, no sentido de tornar mais evidente esta conclusão, a qual demonstrou a não ocorrência de correlação entre os níveis de pureza e a positividade da amostra (amplificação positiva), com $r_{pb} = -0.19$.

A amplificação por PCR ocorreu adequadamente em 45.85% (22 amplificações em 48 amostras) para o gene *HLA-DRB1*, sendo considerada satisfatória para o tipo de amostra utilizada, extremamente hipocelular e submetida previamente a protocolos de processamento considerados deletérios ao material genético.

O estudo da qualidade e da quantidade de DNA também depende das técnicas de mensuração utilizadas; estas são influenciadas por diversos fatores, e podem distorcer o entendimento dos resultados finais. Concluímos que a análise da qualidade e da quantidade de DNA deve ser ponderada conforme as técnicas que estão sendo utilizadas. Por fim, salienta-se a relevância da natureza da amostra sobre os resultados finais de qualidade e quantidade de DNA mensurado.

ABSTRACT

Advances in molecular biology laboratory methods have enabled to obtain DNA from tissue stored in paraffin blocks, thus enabling to use large pathological archive sources and samples of uncommon diseases in retrospective studies.

DNA amount and its quality may be adversely influenced due to tissue contaminants and also to severely hypocelular disease states.

Our goal in this study was to evaluate the data on quantity and quality of DNA extrated from paraffin blocks of bone marrow samples in cases of Severe Aplastic Anemia patients, using conventional spectrophotometry and PCR.

We studied 48 paraffin block samples from pathological archives at Hospital de Clinicas of Universidade Federal do Paraná in Curitiba, southern Brazil, and DNA was extracted according to classical phenol-cloroformium protocol.

Statistical analysis of our results raised the suspicion of non reliability of conventional spectrophotometry for evaluation of DNA quality in our study, according to amplification results. A further correlation analysis confirmed the lack of correlation for purity levels and amplification results ($r_{pb} = -0.19$).

PCR hybridization occurred in 45.85% (22 out of 48 samples) for *HLA-DRB1* gene, and we considered it adequate since we dealt with severely hypocelular tissue samples, which were previously submitted to technical protocols considered harmful to DNA.

Efficiency studies for DNA extraction and quality analysis are also influenced by measurement technology used, which in turn are dependent upon several factors, which can distort the meaning of final results.

We conclude that DNA qualitative and quantitative analysis results must be critically viewed according to the technical procedures used and that sample nature has strong influence in final results of measured DNA.

1 INTRODUÇÃO

Os avanços tecnológicos e metodológicos dos últimos tempos ampliaram a utilização dos blocos de parafina; o que inicialmente era apenas fonte de estudos histomorfológicos, passou a ser também um foco de pesquisadores da área de biologia molecular. A evolução do diagnóstico molecular faz com que este tipo de material seja requisitado como fonte de estudo. A obtenção de macromoléculas de amostras parafinizadas, possibilita estudos de genes candidatos e estudos retrospectivos de numerosas doenças; valiosas informações clínicas são adquiridas a partir de testes de patologia molecular.

Existem na literatura vários protocolos para a extração de DNA a partir de material parafinado, sendo sua obtenção de grande importância para a realização de estudos na área da biologia molecular; (SIMONATO et al., 2007). O método mais frequentemente utilizado na extração a partir dos blocos de parafina é o de digestão enzimática proteolítica, seguida da purificação com solvente orgânico e precipitação com etanol (MESQUITA et al., 2001; BAREA et al., 2004).

A utilização dos blocos de parafina para análises moleculares têm alguns empecilhos decorrentes do processamento do material. O tempo de pré-fixação, fixação e, em alguns casos, descalcificação influenciam diretamente a quantidade e a qualidade do DNA. O processamento histológico causam alterações significativas na estrutura e constituição do DNA; estas alterações atuam negativamente, também, nos passos subsequentes à extração, como os de espectrofotometria e PCR. (BEN-EZRA et al., 1991; FERNANDES et al., 2004; MESQUITA et al., 2001; GILBERT et al., 2007, SANTOS et al., 2008).

O espectrofotômetro é uma ferramenta utilizada para quantificar e qualificar características de biomoléculas. Muito frequentemente se utiliza a espectrofotometria para determinar a qualidade e quantidade do DNA. As amostras de DNA com a razão A_{260nm}/A_{280nm} que obtiverem valor aproximado entre 1.8 e 2.0 podem ser consideradas livres de contaminantes (SANTELLA, 2006). A medida de quantificação do DNA é determinada através da fórmula: $DNA = A_{260} \times 50 \times \text{Fator de diluição}$; a qual é calculada automaticamente pelo espectrofotômetro (CARNEIRO et al., 2003).

A PCR é uma síntese enzimática “*in vitro*” que permite a amplificação de sequências específicas de ácido desoxirribonucleico (DNA) ou de ácido ribonucleico (RNA). A combinação de alta especificidade e sensibilidade torna a PCR a principal técnica de diagnóstico molecular sendo ferramenta essencial nos mais diversos campos da investigação genética. Esta técnica pode ser utilizada na realização de estudos de DNA obtido a partir de material fixado em formol e embebido em parafina, além de outros materiais de arquivo (BAREA et al 2004; LUNGE et al., 2003; SIMONATO et al 2007; MESQUITA et al., 2001).

A PCR, quando aplicada em amostras de DNA extraídas de bloco de parafina, apresenta vários fatores que podem levar ao seu insucesso. Estes fatores podem trazer limitações do uso desta técnica para análise de DNA das amostras emblocadas em parafina. (CAO et al., 2003; MIRSHAHABI et al., 2007).

O estudo da quantidade e qualidade do DNA extraído em diferentes tecidos é necessário, já que estes apresentam padrões de reação diferentes ao tempo de pré-fixação (autólise) e ao procedimento de fixação. A obtenção de DNA de blocos de parafina de pacientes com anemia aplásica, nos quais, a histomorfologia da medula óssea é marcada pela hipocelularidade/acelularidade, e pelo desprovimento de células hematopoiéticas constitui um desafio de extração. (ASTER, 2007; PINETA DABOÍN et al.,2008). A aquisição de DNA viável, destas amostras, mostrará a viabilidade de utilizar outros materiais parafinados para estudos de biologia molecular; levando em considerações às peculiaridades do material e dos métodos de medição utilizados.

1.1 OBJETIVOS

O objetivo desse estudo é analisar a qualidade e a quantidade de DNA extraído de amostras de medula óssea, fixadas em formol e emblocadas em parafina. Para tanto, foram avaliadas amostras de DNA provenientes de blocos de parafina de pacientes com anemia aplásica severa; considerada amostra de tecido com características adversas, pela escassa quantidade de DNA nuclear (tecido paucicelular), além do efeito dos agentes fixadores e a ação da temperatura. Uma segunda análise foi feita quanto à eficiência de técnicas utilizadas para mensuração da qualidade e quantidade de DNA. As técnicas testadas são a espectrofotometria tradicional e a PCR, por serem técnicas comumente utilizadas na rotina para verificar qualidade e quantidade de DNA.

2 REVISÃO

2.1 ARQUIVOS DE MATERIAL BIOLÓGICO

As blocotecas dos setores de patologia, primeiro banco estruturado de tecidos patológicos em grande escala estabelecido, foram e continuarão sendo valiosas fontes de pesquisa de doenças (MACHUCA, et al., 2004; WATSON et al., 1996). Todos os dias, amostras de biópsias do corpo humano são retiradas para análises diagnósticas de doenças, sendo os fragmentos desses materiais fixados em formol a 10%, incluídos em parafina para microtomia e estudo histológico, sendo as reservas armazenadas nos laboratórios de setores de patologia. (SIMONATO et al., 2007; FERNANDES et al., 2004). Os avanços tecnológicos e metodológicos dos últimos tempos ampliaram a utilização dos blocos de parafina; além do uso nos estudos histomorfológicos, histoquímicos e imunoistoquímicos, passaram a ser também fonte de material para a pesquisa com métodos da biologia molecular (BEN-EZRA et al., 1991; FERNANDES et al., 2004).

Fatores genéticos são inerentes a muitas doenças, cuja expressão clínica resulta da combinação do efeito de genes em maior ou menor grau com o efeito do meio ambiente (WAJNER e VARGAS, 2003). Tais fatores fazem com que ocorra um enorme interesse nos estudos das bases genéticas das doenças, sendo que os acervos de materiais biológicos que foram enviados para exame nas rotinas hospitalares, permanecem como grande fonte de material para diferentes estudos genéticos (SANTOS et al., 2008, B). As amostras dos blocos de parafina podem ser fontes de estudos para a epidemiologia molecular, de caráter retrospectivo, de instabilidades em regiões de microssatélites, de detecção ou mesmo diferenciação de microorganismos patogênicos (SANTOS et al., 2008; SJOHOLM et al., 2005, BAREA et al., 2004; RIBEIRO-SILVA e GARCIA, 2008). As técnicas de biologia molecular oferecem hoje várias ferramentas para diagnóstico, monitoramento, prognóstico e decisões terapêuticas para doenças, como o câncer, por exemplo (DEVRIES et al., 2005, SEUÁNEZ et al., 2004).

A análise molecular de ácidos nucleicos tem tradicionalmente exigido DNA genômico obtido a partir de tecidos frescos ou congelados; as macromoléculas

estão bem preservadas quando extraídas deste tipo de material (RIVERO et al 2006; VINCEK et al., 2003). Embora o DNA extraído de amostras frescas ou congeladas seja o ideal para análises moleculares, nem sempre é possível congelar e/ou obter tais amostras à fresco, quando consideradas as limitações da prática clínica. Os tecidos congelados ou frescos também apresentam limitações para a avaliação histomorfológica, assim como não permite que o material seja utilizado para estudos retrospectivos de longo prazo (VINCEK et al., 2003; DEVRIES et al., 2005).

O estudo de tecidos parafinados tem algumas vantagens; o material possui alta qualidade morfológica, apresenta-se em grande quantidade, é de fácil acesso e permite identificação de lesões precursoras (BAREA et al., 2004). Em alguns casos, como de doenças raras, são o último recurso disponível para a análise genética (SANTOS et al. 2008, B). A extração para amplificação do DNA, a partir de blocos de parafina, apresenta alguns pontos críticos, que podem influenciar no insucesso da amplificação. O grau de fragmentação do DNA, o efeito do fixador, tempo de fixação e temperatura utilizada no processamento do material, são exemplos de fatores que podem influenciar a amplificação destas amostras de DNA (KULLMANN et al.,1998, LEHMANN e KREIPE, 2001 e LIU et al.,1993).

O aperfeiçoamento dos métodos de extração de DNA para utilização na PCR permitiu o estudo investigativo e/ou retrospectivo de diferentes amostras biológicas, mesmo que essas apresentem um DNA de má qualidade ou em baixa quantidade (SIMONATO et al., 2007; FERNANDES et al., 2004).

A PCR é um método de amplificação *in vitro* que depende, para o seu sucesso, de uma amostra em condições adequadas de armazenamento e de um bom protocolo de extração de DNA (LIBÓRIO et al., 2005). Muitos estudos publicados que utilizaram tecidos armazenados em blocos de parafina para análise genética demonstraram que o DNA extraído de tecidos fixados em formol e emblocados em parafina são viáveis para a reação em cadeia da polimerase (RIVERO et al., 2006, SIMONATO et al., 2007; MESQUITA et al., 2001; CAO et al.. 2003; LIBÓRIO et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2003).

2.2 QUALIDADE DE UM PRODUTO

A qualidade de um produto está diretamente relacionada à qualidade dos processos que este é submetido. O produto final é símbolo de qualidade quando durante cada um dos vários estágios de processo ocorrer a menor variabilidade possível. Portanto, identificar as causas da variabilidade e eliminá-las do processo e de suma importância para os resultados finais. As causas naturais de variação são consequências do acúmulo de várias causas muito pequenas, mas inevitáveis. É conhecido que a variabilidade natural sempre existirá em um processo, independente de quão bem planejado e executado ele seja (CORREA E CHAVES-NETO, 2009).

Há outros tipos de variabilidade que podem ter como fontes: mão-de-obra, máquinas, meio ambiente, matéria-prima, método de trabalho e meios de medição. A variação decorrente destas causas é muito grande quando comparadas com as causas naturais ou aleatórias. Usualmente criam-se níveis aceitáveis desta variação que classificam um produto como aceitáveis ou não aceitáveis (CORREA E CHAVES-NETO, 2009). Um produto não aceitável não é, necessariamente, impróprio para o uso; por exemplo, este produto poderia ter uma eficiência mais baixa, podendo ainda ter um desempenho aceitável se usado em quantidades maiores. Um produto não aceitável é considerado imperfeito se tem uma ou mais distorções, que são deformidades sérias o bastante para afetar significativamente o uso seguro e efetivo do produto (MONTGOMERY, 2004).

A definição moderna de qualidade fala que esta é inversamente proporcional a variabilidade. Como a variabilidade só pode ser descrita em termos estatísticos, os métodos estatístico desempenham papel central nos esforços para a melhoria da qualidade (MONTGOMERY, 2004). O uso de ferramentas estatísticas na mensuração da qualidade produz resultados sólido e consistente na identificação de causas da variabilidade a serem eliminadas (CORREA E CHAVES-NETO, 2009).

2.3 FATORES INERENTES À QUALIDADE DO MATERIAL

2.3.1 TEMPO DE PRÉ-FIXAÇÃO

A pré-fixação é o tempo passado entre a coleta ou excisão cirúrgica do espécime e o início do processo de fixação (SRINIVASAN et al., 2002). Uma das condições básicas para uma boa fixação e, conseqüentemente, preservação do material é que o fixador seja aplicado ao espécime tão cedo quanto possível, após a colheita cirúrgica ou *post-mortem* (GRIMALDI FILHO, 1981).

Boa parte dos tecidos é removida cirurgicamente. Nas cirurgias os tecidos podem ser expostos a hipóxia por algum período de tempo, caso a interrupção da circulação seja continuada instala-se estado de anóxia tecidual. O processo de anóxia causa alterações locais de pH e pode levar ao aumento de fatores de transcrição de alguns genes relacionados a morte celular. (SRINIVASAN et al., 2002).

As alterações bioquímicas começam a ocorrer em média dentro de 10 minutos após iniciado o quadro de anóxia, embora este tempo varie conforme a natureza e metabolismo do tecido. Portanto, o tempo de pré-fixação deve ser reduzido a segundos para minimizar a degradação de RNA e proteínas, especialmente nos tecidos com altos níveis de RNases e proteases, como pâncreas, a vesícula biliar, pele e intestino. O tempo de fixação, bem como o fixador utilizado, influenciam na preservação de macromoléculas, como o DNA, RNA e proteínas; o que torna este processo de suma importância para a obtenção dos resultados a partir das técnicas de imunistoquímica e biologia molecular (BEN-EZRA et al., 1991).

2.3.2 DESCALCIFICAÇÃO E FIXAÇÃO

Para que se possa examinar histologicamente o tecido ósseo ou tecido calcificado, antes de realizar a microtomia, deve realizar-se a descalcificação, método que consiste na remoção do cálcio tecidual, sem alterações na estrutura morfo-celular. Varias substâncias podem ser empregadas como descalcificadores, todas de natureza ácida: ácido nítrico, fórmico, clorídrico,

acético, pícrico, sulfúrico, tricloroacético ou sulfossalicílico. Fixa-se o tecido em formalina por 12 ou 24 horas, antes do processo de descalcificação. Após este passo, coloca-se o fragmento de tecido em líquido descalcificador, em volume 100 vezes maior ao da peça, trocando-se o líquido diariamente, até que o tecido amoleça. O ponto adequado de descalcificação é atingido quando é possível transpassar o tecido com um alfinete sem que haja resistência ou dureza, indicando que o tecido está pronto para sofrer os demais procedimentos histológicos (TOLOSA et al., 2003).

As substâncias fixadoras têm por finalidade básica evitar alterações da constituição química das células, fixar proteínas e inativar enzimas proteolíticas, responsáveis pelo fenômeno de autólise (TOLOSA et al., 2003; JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2005). Os mecanismos de ação dos fixadores podem ser amplamente categorizados como desidratantes, caloríferos, ligação cruzada, acidificantes e combinações destes (SRINIVASAN et al., 2002).

A fixação depende de processos físico-químicos em que os constituintes químicos dos tecidos, principalmente as proteínas, são coaguladas ou precipitadas *in situ*. Uma fixação bem sucedida dependerá de um conhecimento preciso das propriedades físicas e químicas dos constituintes a serem preservados e suas interações com substâncias fixadoras (GRIMALDI FILHO, 1981; KINGSBURY e JOHANNSEN 1927).

Quase todos os bons fixadores são constituídos de duas ou mais substâncias fixadoras, a fim de que ao serem combinadas acabem corrigindo uma os defeitos da outra, pois todas as substâncias fixadoras têm alguma imperfeição (ALVES, 2002; TOLOSA et al., 2003; BECAK, 1976). Alguns tipos de fixadores que contém soluções como o ácido pícrico, mercúrio e ácidos descalcificantes, podem não ser compatíveis com testes de biologia molecular, pois interferem de alguma forma em seus resultados (HUNT, 2008).

O líquido de Bouin, que contém ácido pícrico e ácido acético glacial, podendo ou não conter formalina, é um fixador com característica descalcificante, e é muito utilizado para o processamento de amostras de medula óssea. Após a fixação é recomendado a remoção do ácido pícrico dos tecidos, antes de dar continuidade aos demais procedimentos histológicos. Resíduos deste ácido podem favorecer a deterioração da peça com o passar do tempo (SANTOS et al., 2008, B; TIMM, 2005).

O pH das soluções fixadoras é um dos fatores mais importantes a serem levados em consideração no momento da fixação de um material. A concentração iônica desequilibrada faz com que íons livres atuem destruindo os tecidos; a neutralização dos íons livres evita a oxidação dos tecidos. Os tampões estabilizam as modificações de pH que acompanham a morte celular à medida que o fixador penetra nos tecidos (ALVES, 2002; BECAK, 1976).

2.3.3 ALDEÍDO FÓRMICO E SUA INTERAÇÃO COM PROTEÍNA E DNA

Um fixador balanceado que se adéqua praticamente a todas as necessidades para a histologia e patologia de rotina é o aldeído fórmico 10%, que é uma solução a 10% (v/v) de formalina (solução aquosa saturada a 40% p/v de aldeído fórmico) (BECAK, 1976). O tecido fixado em formol pode permanecer por mais de 10 anos sem grandes modificações de sua estrutura, podendo ser posteriormente refixado em quase todos os outros fixadores (TOLOSA et al., 2003; GRIMALDI FILHO, 1981).

O aldeído fórmico tem alguns inconvenientes, como formação de “pigmentos de formol” e a formação de ácido fórmico. Quando exposto à luz, o formol se transforma em ácido fórmico, o qual provoca mais alterações desfavoráveis para as técnicas de biologia molecular em tecidos. (FOX et al., 1985; ALVES, 2002; GRIMALDI FILHO, 1981). A fixação em formol e emblocagem em parafina é adequada para muitos métodos histoquímicos qualitativos e quantitativos. É igualmente adequada para o enorme campo da imunohistoquímica, com métodos e reações padronizadas e de uso rotineiro.

A reação do aldeído fórmico com a proteína tem como base alguns grupamentos químicos como a amino, amida e grupos guanidil. (METZ et al 2004). O formaldeído reage com a amina ou grupos triol de aminoácidos e forma derivados de metilol ($R-NH_2 + CH_2OH \rightarrow R-NH-CH_2OH$). Tal ligação aumenta a reatividade dos componentes metilol, favorecendo a condensação dos grupos metilol com amida ou outros grupos que produzem pontes de metileno, que fazem ligação cruzada com cadeias polipeptídicas. (METZ et al., 2004; PUCHTLER E MEIOAN, 1985; FOX et al., 1985)

No caso da amino primária, o grupo metilol sofre parcialmente uma condensação se convertendo em uma imina, ou convertendo-se em uma “base

de Schiff” (Figura 1). Subsequentemente, uma imina ou “base de Schiff” pode fazer ligação cruzada com resíduos de glutamina, asparagina, triptofano, histidina, arginina, lisina, cisteína e tirosina (METZ et al 2004, FOX et al.,1985). Aminoácidos aromáticos permitem a ligação cruzada entre o aminometilol com os grupos fenol, inol, ou imidazol. A ligação de metilação entre átomos de nitrogênio e carbono são muito estáveis e resistentes a hidrólises ácidas. (PUCHTLER E MEIOAN,1985).

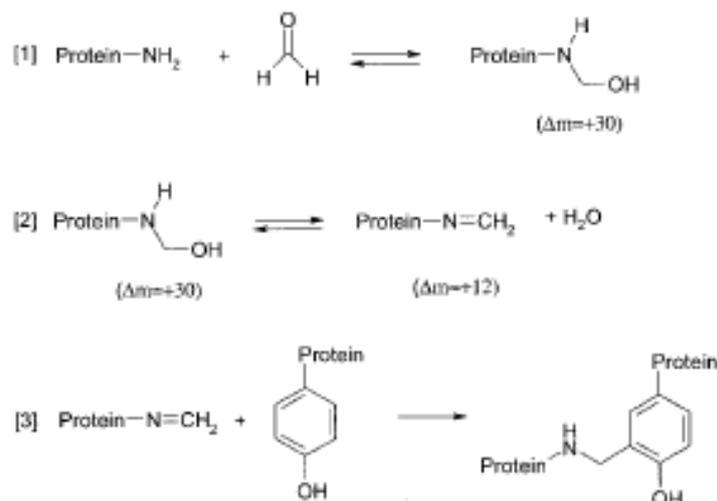


Figura 1 - Reação química entre formaldeído e proteína

NOTA: A reação do formaldeído com a proteína se inicia com a formação de metilol aduto em grupo amino (1). O metilol terminal do grupo amino primário é parcialmente desidratado, produzindo “base de Schiff” instáveis (2). Estas podem formar ligações cruzadas com vários resíduos de aminoácidos, por exemplo, com tirosina (3).

FONTE: METZ et al., 2004.

As proteínas sofrem alteração estrutural em razão das reações de ligação cruzada. Devido às suas seqüências variadas, os peptídeos sofrem uma grande variedade de modificações químicas após o tratamento com formaldeído. As modificações podem ser divididas em 3 tipos: 1) Grupos metilol, 2) “Base de Schiff” e 3) Ligação de metilação. A formação de metilol e bases de Schiff são reversíveis. A maior parte das modificações importantes nos peptídeos (proteínas), induzidas pelo formaldeído, ocorrem devido à formação de ligações de metilação estáveis (METZ et al., 2004).

Estudos químicos feitos entre formaldeído e ácido nucleico demonstraram que a reação básica entre eles é similar à observada na interação entre formol e proteína. O processo de formalização começa com a desnaturação: quebra de ligações de ponte de hidrogênio e desligamento de bases, em regiões ricas em AT da dupla fita de DNA, criando novas interações químicas (SRINIVASAN et al., 2002)

Segundo SRINIVASAN e colaboradores (2002), o formol tem 4 formas de interação com o DNA. A primeira é uma reação de adição; o formaldeído é acrescentado à base do ácido nucleico para formar um grupo hidroximetil (-CH₂OH), que é um metilol. O segundo é um lento ataque eletrofílico do N-metilol a uma base amino, para formar uma ponte de metilação entre os dois grupos de amino. O terceiro é o tratamento com formaldeído que pode gerar sítios de AP por hidrólise da ligação N – glicosídica, deixando resíduos livres de pirimidina e purina. Sítios AP têm um aumento dos íons carboxilas cíclicos instáveis que se hidrolisam rapidamente para produzir 2-deoxi-D-ribose. O quarto e último é o formaldeído que pode também causar lenta hidrólise da ligação fosfodiéster, principalmente as ligações curtas de polideoxiribose com pirimidina intacta.

A fixação com formaldeído resulta no envelhecimento de proteínas nucleares, na formação de ligações entre proteínas e DNA, assim como na fragmentação do DNA. Contudo, a usual tentativa de extração de DNA de tecidos fixados em formol para estudos de biologia molecular tem se apresentado uma opção variavelmente bem sucedida (MESQUITA et al., 2001; SRINIVASAN et al., 2002; OKELLO et al., 2010).

2.4 PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO E SUA RELAÇÃO COM A QUALIDADE E QUANTIDADE DO DNA

2.4.1 PROTOCOLO BÁSICO

A extração do DNA de blocos de parafina fixados em formol foi realizada pela primeira vez em 1985 por Goelz e colaboradores, utilizando como principais reagentes, a proteinase K e SDS (SHIN et al., 2002) Na literatura existem várias protocolos com a finalidade de extração de DNA de material

parafinado, cada um utilizando substâncias e estratégias diferentes. O DNA obtido destes materiais é de grande importância para a realização de estudos na área da biologia molecular. (SIMONATO et al., 2007; MESQUITA et al., 2001)

O protocolo mais frequentemente utilizado para a extração de DNA de tecidos fixados e emblocados em parafina compreende desparafinização da amostra por calor ou solventes, tratamento por digestão com enzimas proteolíticas sucedido, ou não, por purificação com solventes orgânicos e precipitação com etanol (MESQUITA et al., 2001; BAREA et al., 2004; MIRSHAHABI et al., 2007).

São vários os passos que podem ser modificados para a obtenção de métodos mais rápidos e práticos para a extração de DNA amplificável de materiais emblocados em parafina. A começar pela forma de obtenção dos cortes, que pode variar desde o modo de coleta (cortes, biópsia de bloco, etc), à espessura em micrômetros dos cortes. A desparafinização, que, além de ser opcional, se for feita, pode ser realizada através de calor ou lavagens com solventes como o xilol (BAREA et al., 2004). Os componentes principais do tampão de digestão - Tris-HCl, EDTA, NaCl, detergente e proteinase K – podem variar de concentração, tempo de utilização, e podem ser substituídos por substância homóloga (GILBERT et al., 2007).

2.4.2 DESPARAFINIZAÇÃO

Os cortes de material parafinado devem ser desparafinizados para obtenção de uma extração de DNA eficiente, segundo a maioria dos autores consultados. Sendo assim, torna-se necessário retirar a parafina do corte e, em seguida, hidratar o tecido. Contudo, sendo a parafina insolúvel em água e escassamente solúvel no álcool, para que os cortes possam ser desparafinizados é necessário que previamente sejam penetrados por um solvente da parafina, como o xilol e o benzol, para depois serem reidratados (BAREA et al., 2004, TOLOSA et al., 2003, BECAK, 1976).

A técnica mais comum para remoção da parafina se baseia no uso de xilol em concentrações crescentes (ou outro solvente similar) e posteriores banhos com etanol. Existem métodos alternativos, tal como a remoção direta através

do uso de banho-maria para derreter a parafina, ou mesmo a não desparafinização das amostras (ISHIKAWA et al., 2007, GILBERT et al., 2007)

A retirada da parafina pode ser realizada através de calor e/ou lavagens com solventes como o xilol. Existem protocolos em que há obtenção por um pré-tratamento com calor - imerso em solvente ou não antes da centrifugação com xilol. Os passos de retirada da parafina com solvente orgânico podem ser diferentes de autor para autor. O número e tempo dos banhos de xilol, tal como o processo de centrifugação variam muito de acordo com preferência do pesquisador. (GILBERT et al., 2007, VILANOVA-COSTA et al., 2008, MIRSHAHABI et al., 2007, RIVERO et al., 2006)

2.4.3 DIGESTÃO

Na primeira fase a técnica de extração do DNA, objetiva-se a ruptura ou lise das membranas celulares com a finalidade de liberar os componentes citoplasmáticos e/ou nucleares intracelulares. As metodologias mais comumente utilizadas para esta finalidade são a fervura, a digestão enzimática (proteínase K, lisozima), a ruptura mecânica (homogeneização), as ondas sonoras (sonicação), utilização de detergentes (SDS, Triton X-100), detergentes não iônicos (Tween 20, Laureth 12), Chaotropes, (Isotiocianato de guanidina, iodeto de sódio) e a utilização de soluções (solução salina hipotônica), na dependência do tipo da amostra ou célula (MESQUITA et al., 2001, GOLDENBERGER et al, 1995; HUNT, 2008)

Frequentemente, as células animais podem requerer a utilização de duas ou mais substâncias com a finalidade de romper a matriz tecidual e assim melhorar a disponibilidade das células para a substância de lise. A função do tampão de lise, além de destruir membranas plasmáticas, é manter o pH e quelar metais que, porventura, possam ativar endonucleases. Além das diferentes substâncias, o tempo ao quais as células ficam submetidas ao contato das substâncias, e as suas concentrações influenciam na qualidade e quantidade final de DNA extraído. (MESQUITA et al., 2001; CARNEIRO et al., 2003).

A partir do material hidratado inicia-se a digestão dos componentes celulares e a extração propriamente dita do DNA. Há na literatura vários protocolos que descrevem o método de digestão celular. Existem autores que relatam a utilização de fervura, acompanhada ou não de solução de lise, e/ou digestão com proteinase K, estes associados a diferentes tampões (VILANOVA-COSTA et al., 2008, NASCIMENTO et al, 2003, SIMONATO et al, 2007). Outros descrevem a utilização de detergente Triton X-100 e o tiocianato de guanidina, para verificar também a efetividade dessas substâncias na ruptura ou lise das membranas celulares (MESQUITA et al., 2001, GOLDENBERGER et al, 1995). A utilização do detergente SDS, combinado com a proteinase K, que realiza a digestão enzimática, apresenta como resultado, uma eficiente extração de DNA (GOLDENBERGER et al., 1995; CAO et al., 2003). Métodos baseados na digestão enzimática (proteinase K) independentemente do método de extração do DNA genômico, resultam em materiais com quantidade e pureza satisfatórias para amplificação do DNA com a utilização da técnica de PCR. O tempo de digestão por proteína K (que pode variar de 1 hora a 5 dias) e a concentração desta, no tampão de digestão, variam de autor para autor (MESQUITA et al., 2001; BAREA et al., 2004; HUNT, 2008).

2.4.4 PURIFICAÇÃO

Após a obtenção do lisado contendo proteína, ácidos nucleicos (DNA/RNA) e lipídios, existe a necessidade de separar os ácidos nucleicos das outras moléculas (MESQUITA et al., 2001). Está descrito na literatura um variado número de diferentes métodos de recuperação e purificação de ácidos nucleicos, procedimentos seguintes aos pré-tratamentos de desparafinização e digestão. Tais protocolos apresentam algumas diferenças de acordo com o alvo em foco: DNA ou RNA; ou de acordo com a composição química do fixador (GILBERT et al., 2007; HUNT, 2008).

A técnica com fenol-clorofórmio é a metodologia mais frequentemente utilizada. Tal metodologia apresenta-se, frequentemente, como um método de purificação de alta eficiência para extração de DNA proveniente de materiais emblocados em parafina. O princípio dessa separação é a diferença de

solubilidade dos ácidos nucleicos, proteínas e lipídios nestes solventes orgânicos, de forma que, após a realização desta separação se obtém uma fase aquosa onde se encontra o ácido nucleico (MESQUITA et al., 2001; RIVERO et al., 2006). O fenol-clorofórmio utilizado após o rompimento da membrana celular auxilia na desnaturação das proteínas, estas que são removidas pelas subseqüentes centrifugações e lavagens (CARNEIRO et al., 2003, RIVERO et al., 2006).

Aparentemente, o método de purificação com fenol-clorofórmio tem resultado na recuperação e purificação satisfatórias em comparação com as outras técnicas (MESQUITA et al., 2001; COOMBS et al., 1999; CAO et al., 2003). No estudo de MESQUITA e colaboradores (2001), foi feito uma comparação de três métodos de purificação utilizando fenol-clorofórmio com proteinase K, sílica sem proteinase K e sílica com proteinase K. O fenol-clorofórmio juntamente com a técnica de sílica com a presença de proteinase K mostraram ser eficientes na purificação, resultando em um material de ótima qualidade para PCR. RIVEIRO e colaboradores (2006) em seu trabalho afirma que a metodologia de fenol-clorofórmio é um excelente método para extração de DNA de tecidos emblocados em parafina, assim como, o melhor método avaliado para extração de espécimes de células bucais.

O fato dos solventes orgânicos – fenol e clorofórmio – serem reagentes tóxicos traz problemas na sua manipulação. Além disso, o método necessita de um grande número de fases no processo laboratoriais. Tal fato fez com que, atualmente, pesquisadores buscassem alternativas para a extração de DNA, tanto em materiais parafinados, como em amostras fora destas condições (RIVERO et al., 2006; ABRÃO et al., 2005).

O protocolo de *salting-out* que utiliza uma solução de NaCl, ou raramente acetato de amônia, para precipitar as proteínas e tradicionalmente acetato de amônia para precipitação de ácido nucleico, é uma alternativa. O método de *salting-out* além de necessitar de menos passos laboratoriais, não apresenta tanta toxicidade quando comparada a do protocolo que utiliza fenol-clorofórmio. Tal método e largamente utilizado na extração de DNA de sangue, amostras citológicas e materiais sólidos, já obteve resultados satisfatórios de purificação de ácidos nucleicos de amostras fixadas em formol e emblocados em parafina (RIVERO et al., 2006; SANTOS et al., 2008, A).

Outro método que não utiliza solvente orgânico e, por tanto, não apresenta toxicidade, é o método de purificação com Chelex-100 associado à proteinase K. O Chelex-100 é uma solução quelante, que preferencialmente quela íons metálicos polivalentes, prevenindo a degradação do DNA. A técnica de Chelex-100 pode ser empregada, com sucesso, em amostras com poucas células, vários tipos de matérias forenses e tecidos emblocados em parafina (SIMONATO et al., 2007; SEPP et al., 1994).

Existem disponíveis no mercado muitos kits para extração de DNA, tanto de materiais parafinados, como para outros tipos de materiais. Tais Kits são utilizados por muitos autores na tentativa de obtenção de amostras de ácidos nucleicos de boa qualidade, provenientes de matérias fixados em formol e emblocados em parafina (SIMONATO et al., 2007, COOMBS et al., 1999, FERNANDES et al., 2004, NASCIMENTO et al., 2003, SJOHOLM et al. 2005, PRINCE et al. 2007; SANTOS et al., 2008, B). Os Kits comerciais – como exemplo o “QIAamp DNA micro kit” da Qiagen – são baseados no princípio da ligação com a sílica descrito por BOOM e colaboradores (1990) (GILBERT et al., 2007). A propriedade de ligação do DNA com a sílica faz com que esta substância possa ser utilizada na purificação de ácidos nucleicos (MESQUITA et al., 2001).

O kit comercial da Qiagen (“QIAamp DNA minikit”) é relatado em muitos trabalhos científicos que tem como objetivo a obtenção de DNA de amostras emblocadas em parafina (SIMONATO et al., 2007, COOMBS et al., 1999; SJOHOLM et al. 2005, PRINCE et al. 2007; CAO et al., 2003; GILBERT et al., 2007). O presente kit, no estudo de SIMONATO e colaboradores (2007), comparado com outra forma de purificação – Chelex 100 – apresentaram um grau de pureza dentro do ideal e uma amplificação de boa qualidade; mas seus resultados de amplificação não foram muito diferentes quando comparado ao outro método.

Outros *kits* de extração de DNA podem ser utilizados a partir de material desparafinado, como o kit da Promega (Wizard Genomic DNA Purifications Kit). NASCIMENTO e colaboradores (2003) concluíram em seu trabalho que através do protocolo estabelecido pelo kit comercial da Promega, era possível obter um DNA genômico de boa qualidade e concentração. Outros Kits que mostram ser eficientes na extração DNA de matérias parafinados são: *Kit*

GFXtm Genomic Blood DNA Purification, Quick-Gene DNA Tissue Kit S (Fujifilm Life Science), QIAquick Gel Extraction Kit e Kit Glass Max (Gibco BRL, USA)(FERANDES et al., 2004, SANTOS et al., 2008, B; SJOHOLM et al. 2005).

Uma cuidadosa comparação entre métodos comerciais e *in-house*, em espécimes arquivados, foi demonstrada no trabalho de Okello e colaboradores (2010). Nesta pesquisa foi apresentada uma comparação qualitativa e quantitativa do DNA através de 7 kits comerciais disponíveis, 2 dos quais divididos em duas extrações distintas, e um método *in-house* (Fenol-clorofórmio). Okello e colaboradores (2010) demonstram que os Kits WaxFree Paraffin Sample RNA Preparation Kit, e RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit–DNA, juntamente com a técnica *in-house*, são os métodos preferenciais para a recuperação de DNA amplificável.

2.5 TÉCNICAS DE MENSURAÇÃO DA QUALIDADE E QUANTIDADE DO DNA

2.5.1 ESPECTROFOTOMETRIA DE DNA

A espectrofotometria é realizada através do aparelho de análise laboratorial denominado espectrofotômetro. Segundo BISPO (1998) o espectrofotômetro é um instrumento usado para estudar a absorção ou emissão da radiação eletromagnética como função do comprimento de onda. As numerosas aplicações do espectrofotômetro podem ser divididas em três principais categorias: 1) Ser um instrumento de pesquisa geral em investigações de propriedades de materiais; 2) Uma ferramenta de grande utilidade em análises químicas rápidas de soluções e outros materiais; 3) tal aparelho é, ainda, a base fundamental de análise, padronização e especificação calorimétrica (BISPO, 1998).

O espectrofotômetro pode ser usado para quantificar e qualificar características de biomoléculas, como o ácido nucleico. A espectrofotometria de absorbância molecular trabalha na faixa ultravioleta, que apresenta uma distribuição de comprimento de onda de 200nm a 400nm. Para medir a concentração do DNA dupla fita, assim como de fita simples, utiliza-se o

comprimento de onda $\lambda = 260\text{nm}$. Tal técnica é frequentemente utilizada para determinar a qualidade do DNA; a razão entre as leituras de 260nm e 280nm pode ser considerada um indicador de pureza da amostra. As amostras de DNA presentes com razão A260nm/A280nm que obtiverem valor aproximado de 1.8 a 2.0 podem ser consideradas livres de contaminantes (PALMA et al., 2008, CARNEIRO et al., 2003; ROSA et al., 2008; SANTELLA 2006, PEREIRA PINTO et al., 2006).

A obtenção de uma razão abaixo do valor estipulado indica contaminação, que é decorrente da presença de proteínas, fenol ou outros componentes que podem vir a interferir na leitura. As proteínas têm um cume de absorbância entre 280nm, assim sendo, uma contaminação com proteínas leva a uma baixa da razão A260nm/A280nm. O fenol, utilizado na purificação, apresenta uma absorbância na faixa de 270nm, o que acaba, igualmente às proteínas, influenciando e baixando a razão A260nm/A280nm. Um aumento da razão indica que ocorreu contaminação com RNA, pois este também contribui para a absorbância da amostra (SANTELLA, 2006; PALMA et al., 2008; CARNEIRO et al., 2003; ETIENNE et al., 2001).

As proteínas também absorvem o comprimento de onda de 230nm, esta absorção é menos sensível que 280nm, assim sendo, a razão A260nm/A230nm também pode ser considerada um indicador de pureza da amostra. As amostras de razão A260nm/A230nm que obtiverem valor aproximado de 1.7 a 2.0 são consideradas puras. Além das proteínas outros compostos orgânicos, como polissacarídeo e nucleotídeos livres, podem absorver o comprimento de onda 230nm, influenciando no resultado da amostra (CARNELOSSI, 2008; STEFFAN et al., 1988; YEATES et al., 1998; GEUNA et al., 2004; OLIVEIRA, 2006; ETIENNE et al., 2001).

2.5.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A PCR é uma síntese enzimática "*in vitro*" que permite a amplificação de sequências específicas de DNA ou de RNA, sendo este último realizado a partir da síntese de cDNA. A PCR foi idealizada por Karl Mullis em 1983, citado por Marques (2003), desde então tem sido utilizada em vários campos da ciência. A característica mais importante da PCR é a capacidade de amplificar

exponencialmente cópias de regiões do genoma a partir de pouca quantidade de DNA, mesmo que em estado de degradação (LUNGE et al., 2003; SIMONATO et al 2007; MESQUITA et al., 2001).

A PCR tem vários fatores que podem levar ao seu insucesso, tanto em amostras emblocadas em parafina, como em amostras de outras procedências. Esses fatores são: 1) a ausência de uma quantidade de DNA alvo detectável em pequenas amostras ou biópsias; 2) a presença de inibidores, tais como hemoglobina; 3) a degradação do DNA alvo, que pode ocorrer devido ao longo tempo entre a remoção cirúrgica e fixação do tecido, o tipo de fixador utilizado, bem como a duração da fixação; 4) a fragmentação do ácido nucleico, devido à fixação com formol (CAO et al., 2003; MIRSHAHABI et al., 2007).

A técnica de PCR apresenta limitações com relação aos tamanhos dos fragmentos amplificados, sendo mais frequentemente utilizada para ampliações de fragmentos de tamanho inferior a 1Kbp (SEUÁNEZ et al., 2004). PRINCE e colaboradores (2007) demonstraram que ao se trabalhar com amostras de tecidos envelhecidos podem surgir dificuldades em amplificar fragmentos de DNA de mais de aproximadamente 250bp. No estudo de Talaulikar e colaboradores (2008), foi demonstrado que exons com 96bp amplificaram em 100% dos casos e em exons com 600 bp ocorreu uma redução para 8 % de eficiência

Outro fator importante que pode limitar a eficiência da PCR é a não remoção adequada da parafina nos procedimentos de pré-extração com xilol e etanol (GILBERT et 2007; SANTOS et al 2008, A; HUNT, 2008). Estes fatores podem limitar o uso da PCR para análise de DNA a partir de amostras de matérias fixados em formol e emblocados em parafina em diversos estudos. Identificar um método melhor para extração de DNA a partir de tecidos emblocados em parafina é de grande importância para o meio científico (CAO et al., 2003; MIRSHAHABI et al., 2007)

PRINCE e colaboradores (2007), em seu trabalho, evidenciaram alguns outros fatores que são relevantes para a eficiência da PCR. Estes autores utilizaram diferentes tecidos (próstata, laringe e linfonodo) provenientes de blocos de parafina, com resultados diferentes confrontados com os mesmos parâmetros de extração e amplificação. O DNA de melhor rendimento foi obtido a partir de amostras de linfonodo, que apresenta uma distribuição mais densa

de núcleos dentre os 3 tipos de tecidos analisados. PRINCE e colaboradores (2007) ainda relatam que as quantidades de reagente em relação à quantidade de amostra influenciam no resultado final, devido a uma menor eficiência na digestão. O tipo de tecido influencia neste parâmetro também, no estudo de PRINCE e colaboradores (2007), os tecidos prostáticos e laríngeos obtiveram quantidade de DNA estável ou aparentemente regressiva à medida que se aumentava a quantidade de tecido utilizada.

2.6 CARACTERÍSTICA DAS AMOSTRAS TECIDUAIS

2.6.1 MEDULA OSSEA E ANEMIA APLÁSICA

A medula óssea é um órgão disperso na porção esponjosa dos ossos por todo organismo, portanto volumoso e muito ativo. No adulto normal, produz por dia cerca de 2,5 bilhões de eritrócitos, 2,5 milhões de plaquetas e 1,0 bilhão de granulócitos por kg de peso corporal. A medula óssea é encontrada no canal medular dos ossos longos e nas cavidades dos ossos esponjosos. Distingue-se a medula óssea vermelha, hematógena, que deve sua cor a presença de numerosos eritrócitos em diversos estágios de maturação, e a medula amarela, rica em células adiposas, que não produz células sanguíneas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). A proporção relativa do tecido hematopoético e adiposo varia ao longo da vida, sendo máxima na primeira década de vida e reduzindo-se progressivamente na vida adulta e senilidade; a esta relação denomina-se celularidade da medula óssea, que também pode encontrar-se reduzida, em graus variáveis, em diferentes condições patológicas.

A medula óssea vermelha é sustentada por estroma de células reticulares associadas a fibras reticulares, as quais formam um arcabouço tipo esponja, percorrido por numerosos capilares sinusóides. Entre as células reticulares existem inúmeros macrófagos derivados do sistema mononuclear-macrofágico, células adiposas maduras e muitas células hemopoéticas. A matriz fibrilar extracelular mencionada contém, além de colágeno tipo I e tipo III, fibronectina, laminina, proteoglicanas e hemonectina. Além de produzir as células do sangue, a medula óssea armazena ferro sob a forma de ferritina e

de hemossiderina, principalmente no citoplasma dos macrófagos. Outra função da medula óssea vermelha é a destruição de eritrócitos envelhecidos (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004).

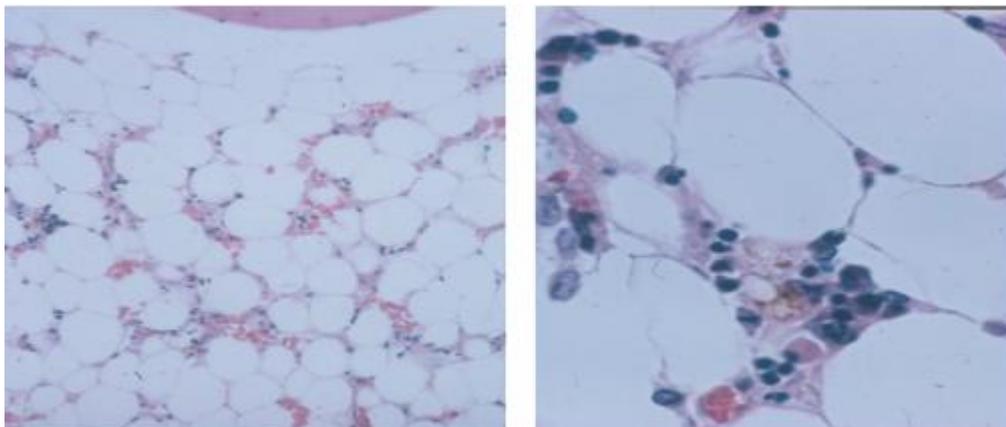
A Anemia aplásica é um termo amplo e parcialmente correto no sentido fisiopatológico, porém de uso clínico consagrado, que designa a síndrome da falência da medula óssea, associada pancitopenia, (anemia, neutropenia e trombocitopenia no sangue periférico); portanto os termos pan- hipoplasia/ pan-aplasia, ou mais adequadamente pan-hipotrofia/pan-atrofia, melhor designam a situação clínica que o tecido hematopoético vem a sofrer: de forma adquirida, a redução ou desaparecimento de suas células, de forma insidiosa. A falência na medula origina-se da supressão ou desaparecimento de células tronco multipotentes (BRODSKY E JONES, 2005).

Embora a maioria dos casos de AAS sejam adquiridos, existem formas incomuns, hereditárias. A fisiopatologia das formas adquiridas de AAS representa, na maioria dos casos, um processo imuno-mediado, onde linfócitos autoreativos mediam destruição das células tronco hematopoéticas. A exposição a agentes ambientais como drogas, vírus, toxinas, devem funcionar como gatilho para a resposta imune aberrante de alguns pacientes; no entanto, a maioria dos casos é classificada como idiopática. De forma semelhante a outras doenças auto-imunes, a anemia aplásica tem curso clínico variado, sendo que alguns pacientes tem sintomas leves e necessitam pouca ou nenhuma terapia, enquanto outros apresentam-se com pancitopenia e risco de vida, representando emergência médica (AAS). A Hemoglobinúria Paroxística Noturna e a Síndrome Mielodisplásico comumente se instalam na evolução de casos de AAS, apontando elos patofisiológicos entre estas doenças. A AAS adquirida pode ser tratada efetivamente com transplante de medula óssea alogênico, imunossupressão (geralmente globulina antitimocítica e ciclosporina), além de ciclofosfamida em altas doses (BRODSKY E JONES, 2005).

De forma simplificada, portanto, a patogênese da anemia aplásica pode se desenvolver ao longo de duas principais vias etiopatogênicas: uma supressão mediada imunologicamente e uma anormalidade intrínseca das células tronco (ASTER, 2007).

Correlacionando com a pan-citopenia variável observada no sangue periférico (anemia, leucopenia e plaquetopenia), a morfologia da medula óssea de pacientes com anemia aplásica é marcada pela hipocelularidade e desaparecimento de células hematopoéticas; frequentemente são encontrados apenas células adiposas, estroma fibroso, e focos dispersos ou grupos de linfócitos e remanescentes de plasmócitos (Fotografia 1). Apesar da morfologia das células hematopoéticas serem mais bem estudada em esfregaços de aspirados de medula óssea, freqüentemente nos casos de AAS este procedimento fornece material insuficiente e a biópsia de medula fornece uma melhor análise da aplasia medular (ASTER, 2007; PINETA DABOÍN et al.,2008).

Uma estimativa razoável do trofismo e atividade hematopoética medular é obtida através da avaliação da proporção de células adiposas em relação às células hematopoéticas nas amostras de biópsias de medula óssea. Em adultos normais, esta proporção é de 1:1, mas em hipoplasias medulares (e.g.: anemia aplásica), a proporção de células adiposas torna-se bastante aumentada.



FOTOGRAFIA 1 - Medula óssea com anemia aplásica.

Nota: Observa-se pan-hitrofismo notório do tecido hematopoético, com predomínio do tecido adiposo medular, além de alguns linfócitos e células plasmáticas residuais.

FONTE: PINETA DABOÍN et al.,2008.

Apesar do fato da medula hematopoética, conforme vista nos cortes histológicos, fornecer menos detalhes citológicos das séries hematopoéticas

individuais quando comparada aos esfregaços obtidos por aspiração da medula óssea (ASTER, 2007), ainda assim é superior ao aspirado na avaliação da anemia aplástica.

2.7 IMPORTÂNCIAS DO ESTUDO DO GENE HLA

Os genes HLA (human leukocyte antigen), parte do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), caracteriza-se por apresentar locos polimórficos. O sistema HLA, localizado no braço curto do cromossomo 6, é dividido, didaticamente, em três regiões: classe I, II e III, de acordo com sua localização cromossômica e função (JANEWAY et al., 2007). As codificações glicoproteínas de membrana, moléculas HLA de classe I e II, são fundamentais na apresentação de peptídeos antigênicos aos linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ e envolvidas na histocompatibilidade e rejeição de enxertos. A região de classe I é composta, principalmente, pelos loci HLA-A, -B, -C, que codificam as moléculas presentes praticamente em todas as células nucleadas. A região de classe II engloba os loci HLA-DR, -DP e -DQ, que codificam moléculas presentes, principalmente, na superfície de células apresentadoras de antígenos imunocompetentes, incluindo macrófagos, células dendríticas, monócitos, linfócitos T ativados e linfócitos B (ALVES et al., 2007, B; MONTE et al., 2004).

Os polimorfismos nas regiões promotoras dos genes HLA podem estar envolvidos na susceptibilidade ou severidade de várias doenças de natureza autoimune ou de etiologia infecciosa (MORAIS et al., 2008; FERNANDES et al., 2010). A importância biológica da associação do HLA com diversas doenças; deve-se, ao fato de que o HLA poder estar envolvido na identificação de genes candidatos. Genes presentes no organismo, que podem estar envolvidos com o desenvolvimento ou com a fisiologia de determinada característica, conferem ao paciente a vantagem de resistência ou a desvantagem de susceptibilidade à doença. (FERNANDES et al., 2010)

A anemia aplásica está associada com o antígeno de histocompatibilidade DR2 classe II, especialmente em pacientes que são dependentes contínuos de terapia medicamentosa imunossupressora. Em um estudo Canadense de base hospitalar com anemia aplásica pediátrica, uma incidência muito maior da

manifestação da doença foi encontrada em crianças de descendência asiática e correlacionada com diferentes HLAs, ambos os resultados implicaram no favorecimento genético (YOUNG E KAUFMAN 2008).

Assim, a capacidade de detectar alelos específicos, ou combinações de alelos específicos, nas fases iniciais do processo da doença aumenta a possibilidade de inferência do risco. A identificação desses pacientes de alto risco pode contribuir para diferentes predisposições, clinicamente significativas, para a ocorrência de doenças ou para o diagnóstico. (FERNANDES et al., 2010)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PARCERIA E PACIENTES

O presente projeto é decorrente de parceria do Departamento de Patologia Médica e Serviço de Anatomia Patológica do HC e o Setor de Imunogenética do Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFPR. O desenvolvimento de linha de pesquisa do setor de imunogenética propiciou a escolha de amostras de medula óssea emblocadas em parafina, utilizadas no presente estudo. A linha de pesquisa de genes alterados na anemia aplásica severa gera casuística necessário para o desenvolvimento do presente projeto, voltado para a extração, purificação e hibridização do DNA extraído dos blocos de parafina.

Neste contexto, as amostras de biópsia de medula óssea de pacientes portadores de AAS representam a casuística atual.

O trabalho foi aprovado pelo CEP/HC/UFPR; como sendo parte do projeto intitulado “Investigação da influência das variantes alélicas dos genes *HLA-DRB1* e *DQB1* na predisposição à anemia aplásica severa (AAS) e na capacidade de resposta ao tratamento com imunossuppressores por meio de um estudo de associação.”, processo N° 0064.0.208.000-09.

3.2 AMOSTRAGEM DO ESTUDO

As amostras da presente pesquisa foram obtidas do arquivo blocoteca do Serviço de Anatomia patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR), representadas por espécime obtido por biópsia de medula óssea, previamente fixada em formalina a 10% e descalcificado no líquido de Bouin, processado automaticamente: desidratação, diafanização e impregnação com parafina líquida, temperatura de inclusão de 60 graus centígrados.

Os casos de anemia aplásica registrados no Setor de Imunogenética foram levantados no sistema do Setor de Anatomia Patológica, incluindo requisição, blocos do período compreendido entre 1992 e 2008.

Dos 152 casos encontrados no Setor de Anatomia Patológica foram excluídos 24 blocos devido à escassez de material e excluídas biópsias provenientes de tecidos diversos (3 biópsias de pele, 1 biópsia de coração, 1 biópsia de mucosa bucal).

As 122 amostras, restantes, foram divididas em grupos conforme numeração dos blocos e foram submetidos ao processo de microtomia. Para o presente estudo foram utilizadas 48 amostras escolhidas aleatoriamente dentre as 122 amostras viáveis, sendo que o restante das amostras, já cortadas, deverá ser utilizado para estudos posteriores do Setor de Imunogenética-HC-UFPR.

3.3 CORTES PARA EXTRAÇÃO DE DNA

A retirada de parte do tecido emblocado em parafina foi realizada através de microtomia, cortes com espessura de 25 μ m. A descontaminação da lâmina de microtomia, pinças e superfície de trabalho com álcool 70%, transferência imediata dos cortes para microtubos e utilização de luvas, foram medidas adotadas, para evitar contaminação do material com DNA de outros blocos ou de células do técnico. A lâmina do micrótomo foi limpa com álcool 70% a cada troca de bloco, assim como a pinça utilizada para manuseio das amostras. Os cortes produzidos foram colocados imediatamente em um microtubo e armazenados até o momento da purificação; todos os procedimentos supracitados foram realizados com a utilização de luvas.

3.4 PRÉ- EXTRAÇÃO DA AMOSTRA

O material parafinado armazenado nos microtubos, recebeu xilol e na sequência foram centrifugados; o sobrenadante desprezado e novas trocas de xilol foram feitas, até a completa remoção da parafina. Ao precipitado foram feitos dois banhos com solução de etanol absoluto e na sequência foi feita a extração do DNA.

3.5 EXTRAÇÃO DO DNA

O protocolo de extração do DNA utilizado nos foi cedido pelo Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Dpto. de Genética do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. O protocolo tem como soluções principais: uma solução de lise, uma proteinase K, fenol-cloroformio-álcool isoamílico, etanol absoluto e etanol 70%. Os procedimentos e outras soluções envolvidas na extração encontram-se no protocolo logo abaixo.

3.5.1 PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO E EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

1. Retirar o excesso de parafina do material, isolando apenas o segmento de tecido. Tal procedimento devera ser feito em uma placa de Petri esterilizada, com auxilio de pinça e material perfuro cortante ésteres.
2. Colocar 1ml do xilol usando uma ponteira para cada amostra. Tal procedimento deve ser feito na capela.
3. Centrifugar em microcentrifuga a 14.000rpm por 5 minutos.
4. Retirar o sobrenadante na capela, ficando somente com o sedimento.
5. Repetir os passos 2 a 4.
6. Colocar 1ml de etanol absoluto.
7. Passar no vortex por 25 segundos.
8. Centrifugar em microcentrifuga a 14.000rpm por 5 minutos.
9. Retirar o sobrenadante ficando a penas com o sedimento.
10. Colocar no banho-maria a 56° por 10-15 minutos ou até que se observe a evaporação do etanol absoluto.
11. Adicionar 260 µL de tampão da proteinase K 5 X, 15 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 30 µL de SDS 20 %, nesta ordem. Homogeneizar em agitador vortex.
12. Incubar a amostra no bloco de aquecimento a 65°C por 24 horas. Após a incubação o botão deve apresentar um aspecto transparente, caso isto não seja observado, adicionar mais 15 µL de proteinase K (10 mg/mL), homogeneizar e incubar no bloco de aquecimento por mais 24 horas.
13. Elevar a temperatura do bloco de aquecimento para 95°C e incubar o microtubo por 10 minutos com a finalidade de inativar a proteinase K.

- Retirar do bloco de aquecimento e deixar atingir a temperatura ambiente antes de prosseguir.
14. Adicionar 1.5 μ L de RNase (20 mg/mL). Homogeneizar em agitador vortex e incubar a amostra no bloco de aquecimento a 37°C por 30 minutos.
 15. Com auxílio de pipeta remover o conteúdo do microtubo e transferí-lo para um microtubo novo.
 16. Na capela, adicionar 500 μ L da solução fenol-clorofórmio-álcool isoamílico.
 17. Passar no vortex por 25 segundos.
 18. Centrifugar em microcentrifuga a 14.000rpm por 5 minutos.
 19. Após a centrifugação formam-se duas fases: uma superior (ácidos nucleicos) e outra inferior (camada de fenol que contém proteínas e lipídeos), separadas por uma interfase turva (proteínas desnaturadas). Transferir a fase superior para um microtubo novo de 1,5 mL, tomando-se bastante cuidado para que não ocorra contaminação com a interfase.
 20. Repetir os passos 16 a 19.
 21. Adicionar 60 μ L de acetato de amônio 10mol e 600uL de etanol absoluto gelado,
 22. Agitar com as mãos e incubar a -20°C até o dia seguinte.
 23. Centrifugar em microcentrífuga a 14.000 rpm por 15 minutos e descartar o sobrenadante por inversão.
 24. Adicionar 1ml de etanol 70 % e inverter gentilmente, várias vezes.
 25. Centrifugar em microcentrífuga a 14.000 rpm por 5 minutos.
 26. Remover o sobrenadante com pipeta de 1ml, cuidado para não perder o sedimento. Deixar amostras secando de um dia para o outro.
 27. Ressuspende em 50ul de água milli-Q.
 28. Armazenar a amostra de DNA a -20°C.

3.6 PROCEDIMENTO DE ESPECTROFOTÔMETRO NOS APARELHOS TRADICIONAIS

3.6.1 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA.

O processo de espectrofotômetro foi realizado no Aparelho Biophotometer. O procedimento foi antecedido por resfriamento das amostras de DNA, seguido de diluição em 1:50 água ultrapura (5 µl de DNA + 245 µl de água ultra-pura) e homogeneizadas.

3.6.2 - PROCEDIMENTO PARA USO DO ESPECTROFOTÔMETRO

No momento da leitura da amostra é necessário estabelecer claramente qual tipo de molécula se está trabalhando e calibrar o aparelho. O procedimento de calibração do espectrofotômetro é feito com o acréscimo de água ultra-pura em cubeta especial, a qual é colocada em local apropriado para leitura e obtenção de valores zerados. Na sequência colocou-se água ultra-pura na cubeta e acrescentou-se a amostras de DNA diluído. Os processos de leitura foram feitos conforme descrito em protocolo utilizado na rotina do Setor de Imunogenética (Anexo I).

3.6.3 ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Quando a razão entre a absorbância 260nm e a absorbância 280nm está entre, ou aproximadamente, 1.8 e 2.0, o DNA está livre de contaminantes. Valores abaixo ou acima destes, indicam que há presença de proteínas, frações de membrana, RNA entre outros contaminantes e isto pode provocar falhas na amplificação.

3.7 REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE

As amostras de DNA extraídas dos blocos de parafina foram amplificadas através do protocolo da PCR-SSO utilizado na rotina do Setor de Imunogenética do Hospital de Clinicas do Paraná. A PCR foi feita utilizando-se

oligonucleotídeos iniciadores biotinizados e D-mix provenientes do kit LABType SSO, juntamente com a DNA polimerase *Taq platinum*. Os ciclos de desnaturação, acoplamento dos iniciadores e alongamento da cadeia no termociclador duraram em média uma hora e meia (Tabela 1). Os iniciadores de oligonucleotídeos que foram utilizados amplificam o exon 2 dos genes *HLA-DRB1* que possui 270bp. Uma amostra submetida a PCR, seguindo as recomendações do fabricante, deveria ter um volume final de 20µl, utilizando-se 2µl de DNA diluído a 20ng/µl, 13,8µl D-mix, 0,2µl Taq Platinum e o 4µl primer de amplificação. A quantidade de DNA diluído que foi utilizado sofreu adaptações de acordo com a quantidade DNA que as amostras apresentavam (anexo II). Para verificar se as amostras foram amplificadas satisfatoriamente, foram feitos géis de agarose 2% para corrida eletroforética. Amplificações bem sucedidas resultaram em um gel com uma banda correspondendo ao exon 2.

TABELA 1 - PROGRAMAÇÃO UTILIZADA EM AMPLIFICAÇÃO

Passo	Temperatura e tempo de Incubação	Nº de ciclos
Passo 1:	94°C – 2 minutos*	1
Passo 2:	94°C – 5 minutos	1
	94°C – 30 segundos	
Passo 3:	60°C – 20 segundos	40
	72°C – 20 segundos	
Passo 4:	72°C – 7 minutos	1
Passo 5:	04°C – infinito	1

Nota: * este protocolo refere-se ao uso da *Taq Platinum* (a enzima vem ligada a um anticorpo e precisa deste passo inicial para ficar na forma livre, capaz de promover a extensão da fita).

FONTE: O autor

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram colocados em banco de dados para facilitar a interpretação dos resultados. Os presentes resultados foram analisados estatisticamente por software SPSS 10.0 e/ou software R. Os testes estatísticos realizados foram:

3.8.1 Teste da Binomial

Trata-se de um teste não-paramétrico, sendo assim, é utilizado quando os eventos na população apresentam-se de forma dicotômica ou binária –sucesso e insucesso. Os valores amostrais são comparados com os dados da população.

3.8.2 Teste de Coeficiente de Correlação de *Point-biserial*

O coeficiente de correlação de *Point-biserial* é utilizado quando se deseja verificar a existência de associação linear entre duas variáveis, uma quantitativa e a outra qualitativa nominal. Uma medida de correlação é um valor numérico que expressa força e sentido do relacionamento entre as duas variáveis. É utilizado quando se deseja saber se um dado valor r , permite concluir a um dado nível de significância, que existe realmente correlação linear entre as variáveis.

3.8.3 Teste T-Student simples

O teste T-Student Simples permite comparar as diferenças entre o valor médio da variável na amostra em relação a um valor hipotético, ou da população de referência.

3.8.4 Teste T- Duas amostras independentes

Trata-se do teste T-Student, quando se dispõe apenas das médias, variâncias e tamanho das amostras. Seu objetivo é testar a igualdade entre duas amostras.

3.8.5 Teste do Coeficiente de correlação de Pearson

O coeficiente de correlação de Pearson é utilizado quando se deseja verificar a existência de associação linear entre duas variáveis, as duas quantitativas.

3.8.6 Teste Shapiro-Wilk

O teste de Shapiro-Wilk é utilizado para verificar a distribuição normal das variáveis estudadas, ou seja, quando a distribuição numérica segue uma tendência simétrica em torno de uma média.

4 RESULTADOS

Após as extrações foram feitas medições da qualidade e quantidade do DNA, através de espectrofotometria tradicional. Os resultados das razões de quantidade e pureza estão demonstrados na tabela 2.

TABELA 2 – RESULTADOS DE LEITURA DAS AMOSTRAS NO ESPECTROFOTÔMETRO.

Paciente	Concentração de DNA(ng/ul)	Pureza	Ano do bloco	Paciente	Concentração de DNA(ng/ul)	Pureza	Ano do bloco
1	57.1	1.56	1998	26	53.8	1.5	1999
2	32.9	1.55	1998	27	55.9	1.52	2000
3	40.9	1.48	1998	28	234.5	1.7	2000
4	68.8	1.45	1998	29	106.3	1.6	2000
5	43.8	1.43	1998	30	48.9	1.57	2000
6	78	1.56	1998	31	26.7	1.5	2000
7	55.3	1.53	1998	32	342.0	1.8	2003
8	275.8	1.62	1998	33	203.1	1.6	2003
9	53.5	1.46	1998	34	2400.5**	1.8	2003
10	166.3	1.53	1998	35	91.7	1.87	2003
11	372.9	1.85	2008	36	271.4	1.73	1996
12	11.0	1.73	1997	37	77.0	1.78	1995
13	86.2	1.75	2007	38	755.0**	1.56	1995
14	39.4	1.82	2002	39	566.0	2.06	2003
15*	-----	-----	1997	40	264.3	2.12	1997
16*	-----	-----	2006	41	770.1**	1.54	1997
17*	-----	-----	1993	42	45.4	1.68	1992
18	23.0	1.67	2006	43	488.8	1.97	1993
19*	-----	-----	2007	44	766.5**	1.54	2003
20	71.6	1.75	2008	45	535.7	2	1997
21	108.8	1.88	2001	46	80.1	1.81	1997
22	16.2	1.75	2001	47	34.3	1.64	1996
23	21.1	1.7	1999	48	61.6	1.43	1996
24	12.4	1.8	1999				
25	19.4	1.5	1994				

Nota: * Amostras que não apresentaram leituras no espectrofotômetro. ** Valores que podem ser considerados *outliers*.

FONTE: O autor.

O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para verificar a normalidade da distribuição dos dados de concentração e pureza. O resultado obtido para pureza e concentração foi de não normalidade com um p-value de 0.0327 e 9.43e-11, respectivamente.

Na tabela 2 podemos verificar que há uma variabilidade dos resultados, principalmente na concentração. A falta de normalidade pode ser decorrente desta variabilidade e/ou presença de outliers. Então para um melhor entendimento dos dados foi realizada uma análise descritiva. Os *outliers* tiveram que ser desconsideradas para o cálculo da média, desvio padrão e coeficiente de variação. *Outlier* são valores extremos, que se situam bem fora do padrão geral de quase todos os demais dados e influenciam fortemente a média, desvio padrão e coeficiente de variação (TRIOLA, 2008). A escolha dos valores que foram desconsiderados foi realizada através da análise dos gráficos abaixo (Gráfico 1).

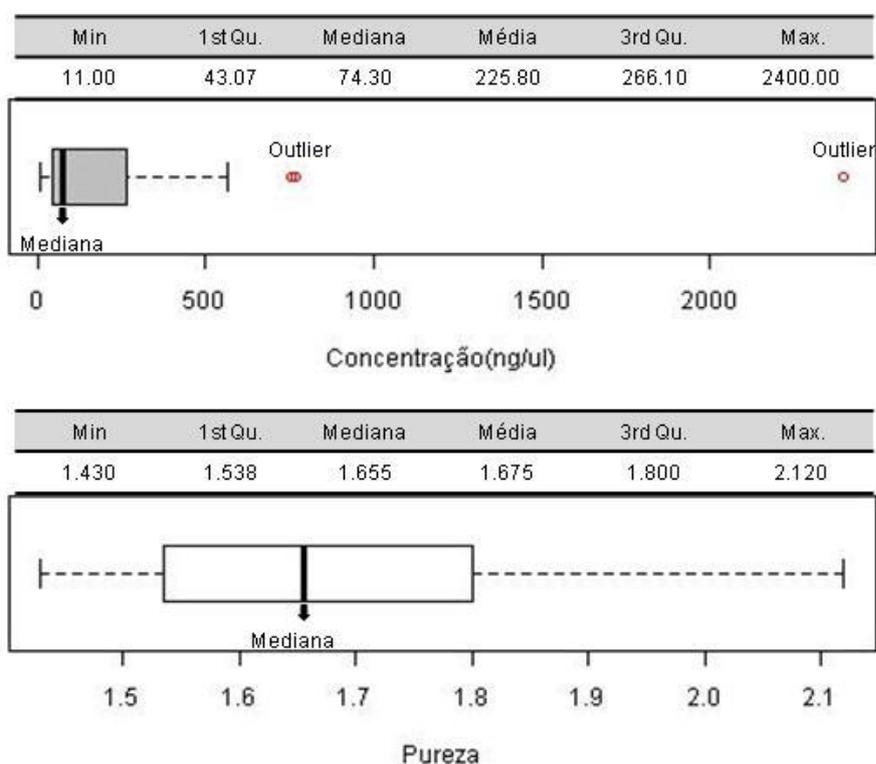


GRÁFICO 1 - Boxplots para análise de dispersão das duas variáveis de estudo.

Fonte: O autor.

Nos gráficos acima verificamos outlier apenas nos dados de concentração. Outra análise simples que pode ser feita através destes gráficos é em relação à simetria da distribuição dos dados. Nestes verificamos que a pureza está mais bem distribuída em torno da mediana, comparado à concentração, que apresentam uma assimetria bem acentuada.

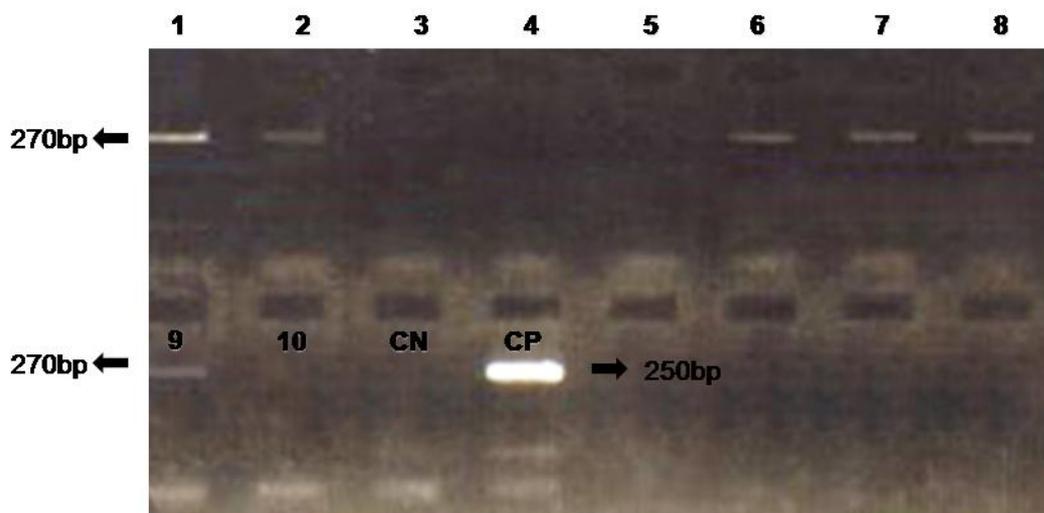
A pureza das amostras apresentou uma média de 1.675 e um desvio padrão de 0.174; com um intervalo de confiança da média igual a 1.621–1.73 (nível de confiança de 95%). Tais resultados mostram uma variabilidade reduzida, já que desvio padrão e o intervalo de confiança foram pequenos. O coeficiente de variação da amostra de pureza foi de 0.107; o que corrobora com a constatação acima.

A concentração das amostras apresentou uma média de 131.18ng/ul e o desvio padrão de 148.45ng/ul, com um intervalo de confiança da média igual a 83.55–178.55 (nível de confiança de 95%). O que podemos verificar através destas medições é que as concentrações têm uma variabilidade muito grande; tal resultado foi confirmado pelo coeficiente de variação, que foi de 1.1334.

Outro aspecto que temos que resaltar da tabela 2 são os valores que não apresentaram leituras e outros que apresentaram valores exorbitantes. Tais dados não foram colocados na estatística descritiva, mas devem receber uma atenção especial.

Após as leituras em espectrofotômetro as amostras foram submetidas à reação em cadeia da polimerase. A PCR realizada foi padronizada pela rotina do setor de imunogenética do HC-UFPR. Tal técnica foi desempenhada com o objetivo de verificação a possibilidade de utilização deste tipo de material para estudos futuros - como de hibridização com sondas marcadoras - e indiretamente medir a qualidade desta técnica. Em um primeiro momento foram testadas 10 amostras para evitar desprendimento de tempo e contenção de gastos. Os resultados de amplificação podem ser vistos através do gel de eletroforese realizado, mostrados na fotografia 2.

As 10 amostras processadas e submetidas a PCR, tiveram um resultado de 6 amostras positivas para o gene *HLA-DRB1* (Fotografia 2). Podemos observar algumas bandas não muito fortes. Tal fato provavelmente é decorrente do fato da técnica de eletroforese em agarose não ser muito sensível. Outra questão que se deve ressaltar é a má condição do material, anteriormente relatadas. O controle positivo, que apresenta 251bp, está aparentemente dentro dos padrões ideais, comprovando a qualidade da técnica aplicada. Na amplificação do loco DRB1 o controle negativo apresentou-se ótimo, assim sendo, não podemos verificar nenhuma banda inespecífica aparente.



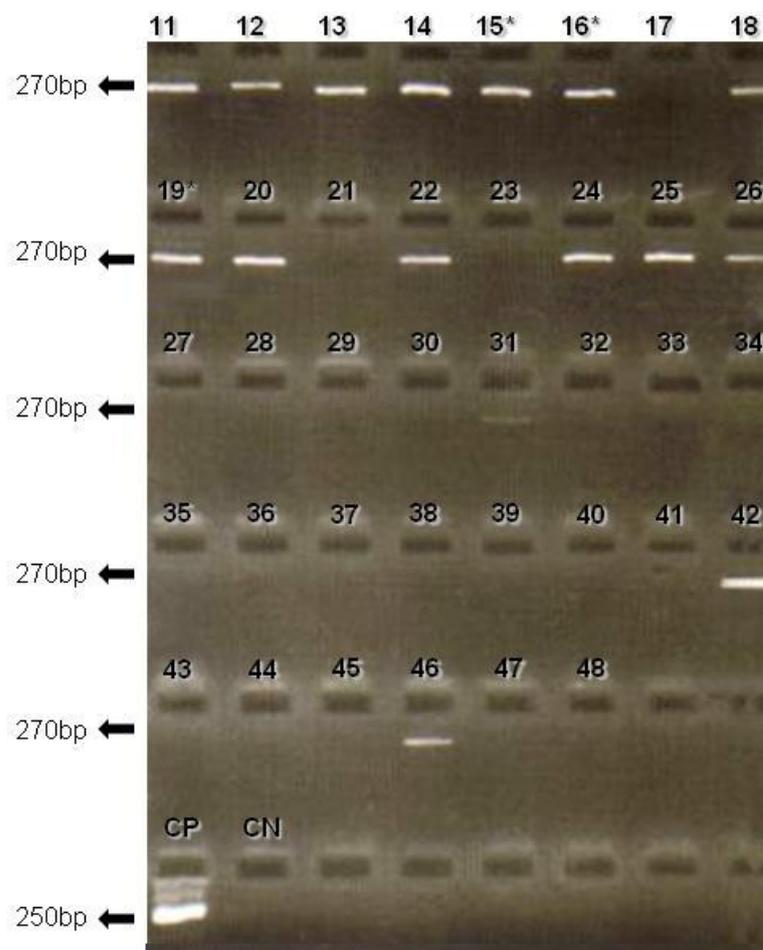
FOTOGRAFIA 2 - Ampliação do gel de agarose em ensaio de eletrofose para o gene *HLA-DRB1*.

Nota: Amplificação dos locos *HLA-DRB1* de pacientes com anemia aplásica por PCR a partir de DNA genômico. Colunas correspondentes a pacientes com anemia aplásica, CN (controle negativo) e CP (controle positivo).

Fonte: O autor.

As 38 amostras restantes foram amplificadas para o loco *HLA-DRB1* com objetivo de obter dados para confrontar a espectrofotometria tradicional e verificar o nível de eficiência da técnica de PCR, além de constatar a viabilidade deste material para estudos posteriores. O resultado da amplificação das amostras restantes é mostrado na fotografia 3.

Das 38 amostras 16 apresentaram-se positivos para PCR sendo todas de pacientes com anemia aplásica. O controle positivo e negativo mostraram-se dentro dos padrões.



Fotografia 3 - Gel de agarose em ensaio de eletroforese com amostras testadas para o gene *HLA-DRB1*.

Nota: Amplificação dos locos *HLA-DRB1* de pacientes com AAS por PCR a partir de DNA genômico. Colunas correspondentes a pacientes com anemia aplásica, CN (controle negativo) e CP (controle positivo).

*Amostras que não apresentaram leituras no espectrofotômetro.

Fonte: O autor.

A partir dos dados obtidos das amplificações optamos por gerar uma nova Tabela 3 com apenas os resultados positivos. Os outliers desta tabela são diferentes dos da tabela 2. A tabela 3 mostra que 3 valores sem leituras de D.Os apresentaram resultados positivos para PCR.

TABELA 3 – RESULTADOS DE LEITURA DE ESPECTROFOTÔMETRO DAS AMOSTRAS POSITIVAS.

Paciente	Concentração de DNA(ng/ul)	Pureza	Ano do bloco	Paciente	Concentração de DNA(ng/ul)	Pureza	Ano do bloco
1	57.1	1.56	1998	16*	-----	-----	2006
2	32.9	1.55	1998	18	23.0	1.67	2006
6	78	1.56	1998	19*	-----	-----	2007
7	55.3	1.53	1998	20	71.6	1.75	2008
8	275.8**	1.62	1998	22	16.2	1.75	2001
9	53.5	1.46	1998	24	12.4	1.8	1999
11	372.9**	1.85	2008	25	19.4	1.5	1994
12	11.0	1.73	1997	26	53.8	1.5	1999
13	86.2	1.75	2007	31	26.7	1.5	2000
14	39.4	1.82	2002	42	45.4	1.68	1992
15*	-----	-----	1997	46	80.1	1.81	1997

Nota:*Amostras que não apresentaram leituras no espectrofotômetro.**Valores que podem ser considerados *outliers*.

FONTE: O autor.

O teste de Shapiro-Wilk foi, também, aplicado nas amostras positivas para verificar a normalidade da distribuição dos dados de concentração e pureza. O resultado obtido para pureza foi de normalidade com um p-value de 0.1335. No caso da concentração obtivemos um resultado de não normalidade, com um p-value de 1.946e-07.

Nestas tabelas podemos verificar que há uma variabilidade menor que a da tabela 2, principalmente na concentração, onde encontram todas as amostras, inclusive as que foram negativas para amplificação, de acordo com a análise do gel de agarose. A falta de normalidade de concentração ainda pode ser decorrente da variabilidade e a presença de *outliers*. Então para um melhor entendimento dos dados foi realizada uma análise descritiva. Os *outliers* tiveram que ser descontados para o cálculo da média, desvio padrão e coeficiente de variação. A escolha dos valores que foram desconsiderados foi realizada através da análise dos gráficos abaixo (gráfico 2). Neste gráfico verificamos *outliers* apenas nos dados de concentração. Analisando a dispersão dos dados através do gráfico 2, verificamos que pureza e concentração estão relativamente bem distribuídas em torno na mediana, com uma leve assimetria.

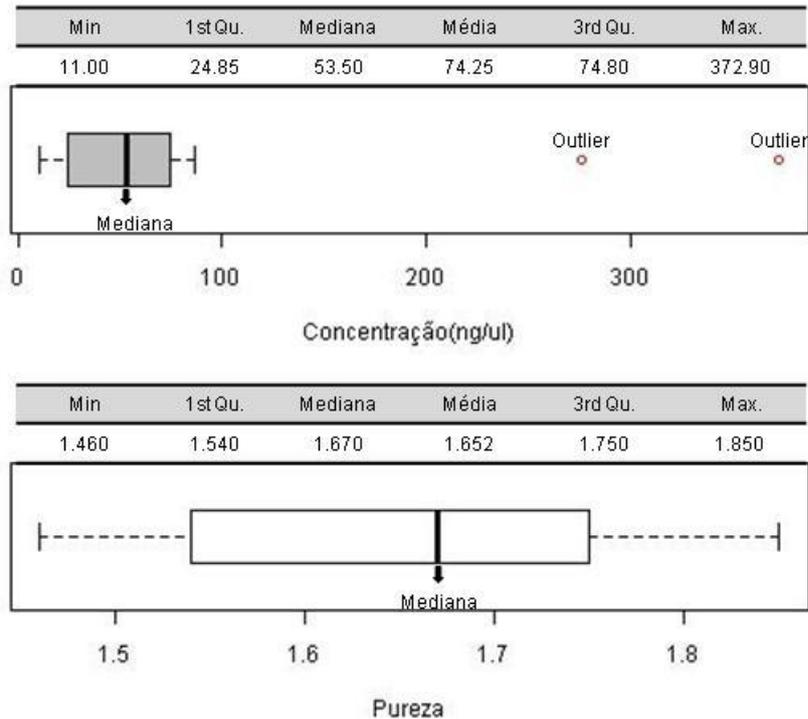


GRÁFICO 2: Boxplots para análise de dispersão das duas variáveis das amostras positivas.
Fonte: O autor.

A pureza das amostras positivas obteve uma média de 1.642 e um desvio padrão de 0.126. Sendo assim, o intervalo de confiança da média ficou entre 1.59–1.715, com um nível de confiança de 95 %. Tais resultados mostram uma variabilidade pequena. Comparando estes resultados com os da tabela 2, através de um teste t, verificam-se que não há diferença significativa entre eles (p-value de 0.315). O coeficiente de variação da amostra de pureza das amostras positivas foi de 0.0767; o que corrobora com a constatação acima.

A média da concentração das amostras positivas foi de 44.82ng/ul e o desvio padrão de 24.78ng/ul. Com isso, o intervalo de confiança da média ficou entre 33.8–55.80ng/ul, com um nível de confiança de 95 %. Tais resultados mostram uma variabilidade pequena. Comparando estes resultados com os da tabela 2, através de um teste t, verificam-se uma diferença significativa entre eles (p-value de 0.0007). As amostras positivas apresentaram uma média e um desvio padrão bem menor que o da totalidade das amostras. O coeficiente de variação da amostra de concentração das amostras positivas foi de 0.5587; um valor de variação alto; mas bem menor que o obtido para as amostras totais. Tais dados são mostrados resumidamente na tabela 4.

TABELA 4 – COMPARAÇÃO DA ESTATÍSTICA DESCRITIVA DE TODAS AS AMOSTRAS E DAS AMOSTRAS POSTIVAS.

Estatística descritiva de todas as amostras		
Medidas estatísticas	Pureza	Concentração (ng/ul)
Média	1.675	131.18
Desvio padrão	0.174	148.45
Intervalo de confiança	1.621–1.73	83.55–178.55
Estatística descritiva das amostras positivas		
Medidas estatísticas	Pureza	Concentração (ng/ul)
Média	1.642	44.82
Desvio padrão	0.126	24.78
Intervalo de confiança	1.59–1.715	33.8–55.80
Nível de significância de 95%.	p-value = 0.315	p-value = 0.0007

FONTE: O autor.

Observando os dados da tabela 2 e 3 é inerente pensarmos que a idade pode ter influenciado os resultados de concentração e pureza. Através de gráficos de dispersão podemos ter uma noção real da influência da idade dos blocos em relação à concentração e pureza. No gráfico 3 temos dois gráficos comparativos das concentrações de todas as amostras e das amostras positivas; em relação à idade dos blocos. O que verificamos é uma distribuição homogênea de concentração; não sendo possível verificar nenhuma tendência de perda de quantidade de material com o passar do tempo. Apenas no ano de 2003 verificamos um dado peculiar; nenhuma das amostras deste ano amplificou. Neste mesmo ano temos dois outliers, sendo que um deles é o de mais discrepância.

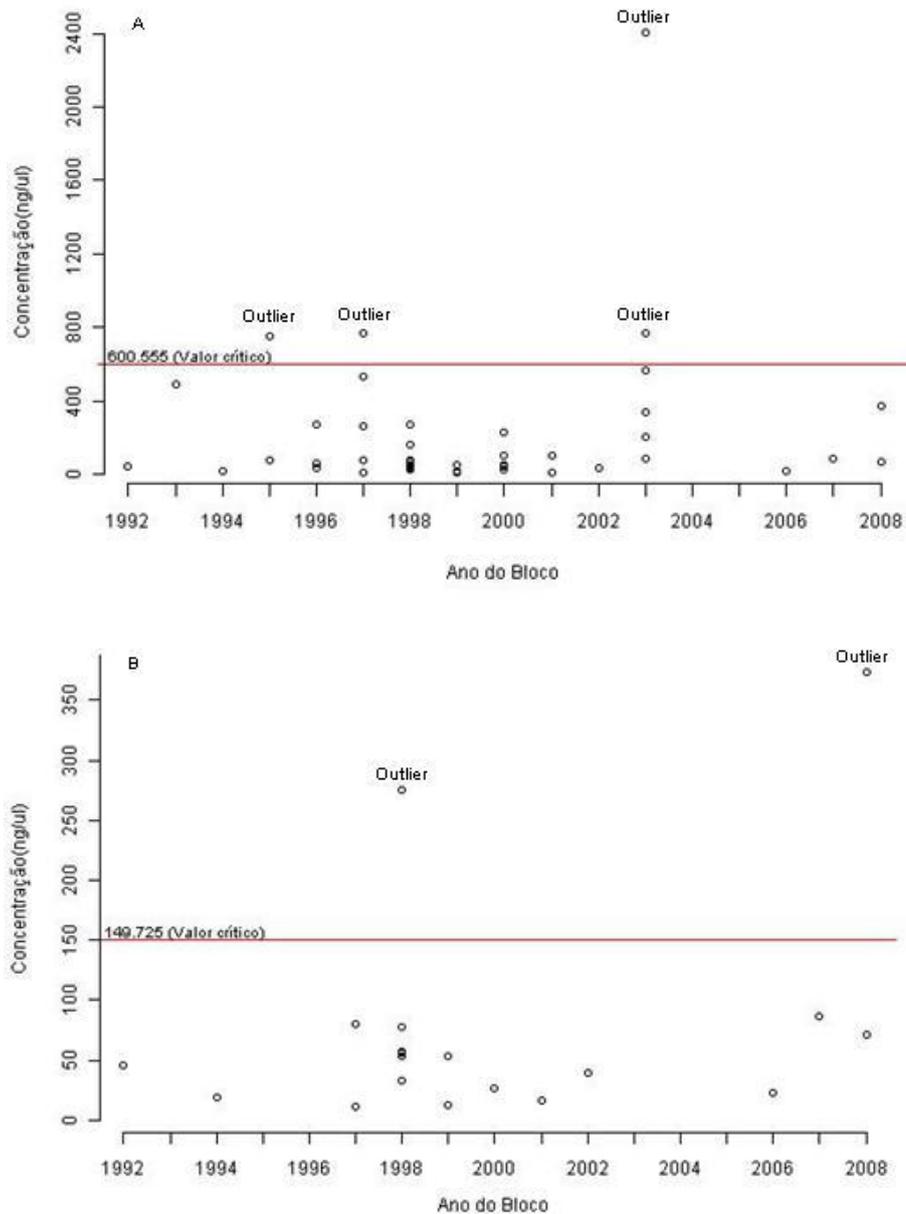


GRÁFICO 3 - Dispersão dos dados de concentração comprada à idade dos blocos.

Nota: A= Gráfico de dispersão de todas as amostras.

B= Gráfico de dispersão das amostras positivas.

Linha vermelha= limite do valor crítico.

FONTE: O autor.

No gráfico 4 temos dois gráficos comparando a pureza de todas as amostras e das amostras positivas; em relação à idade dos blocos. O que verificamos é uma distribuição homogênea de pureza; não sendo possível verificar nem uma tendência de ganho de qualidade de pureza com o passar do tempo.

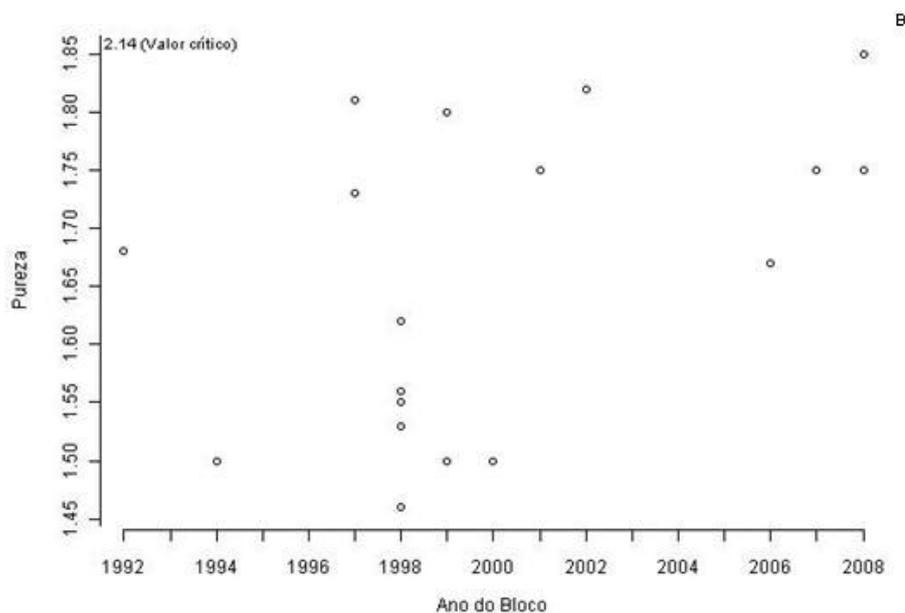
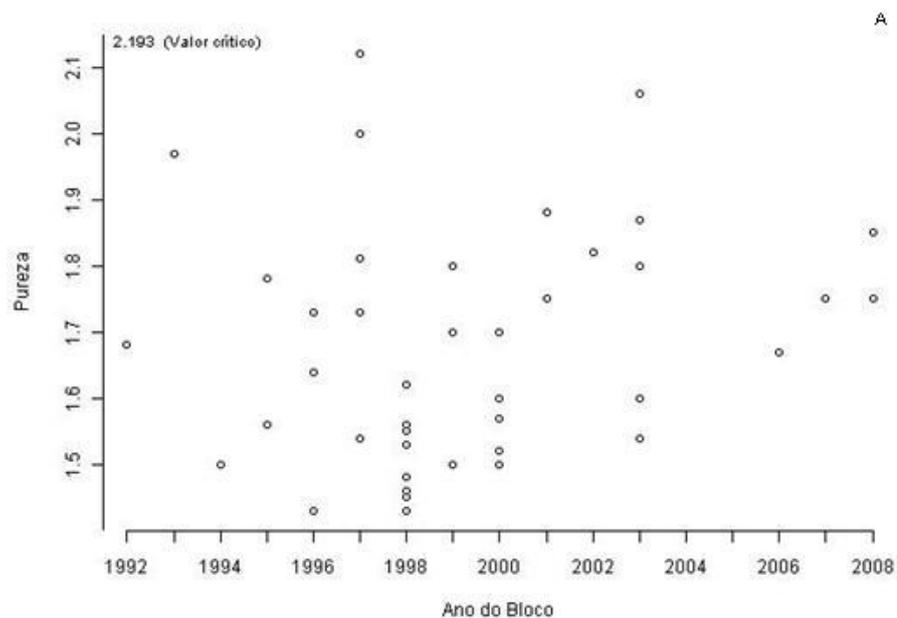


GRÁFICO 4 - Dispersão dos dados de pureza comprada à idade dos blocos.

Nota: A= Gráfico de dispersão de todas as amostras.

B= Gráfico de dispersão das amostras positivas.

FONTE: O autor

A relação entre pureza e concentração pode ser medida através de um teste de correlação. O objetivo do teste de coeficiente de correlação de Pearson foi verificar se existe alguma associação entre a razão de pureza e a concentração. A hipótese testada foi de que o coeficiente de correlação

populacional é igual a 0. O coeficiente de correlação (r_p) foi de 0.628. Isso mostra que a correlação linear é positiva, mas não muito forte, devido ao fato do valor r estar muito próximo a 0.5, sendo assim, as duas variáveis tem uma correlação que não tendem ao equilíbrio. O resultado do teste de hipótese foi a de rejeição do mesmo ao nível de significância de 95%, com p de 1.438e-05. Sendo assim, o valor r é considerado diferente ao valor de coeficiente populacional de correlação.

O mesmo teste foi realizado apenas para as amostras positivas com mesmo objetivo e hipótese nula. O coeficiente de correlação (r_p) foi de 0.00135. Isso mostra que a correlação linear é fraca, devido ao fato do valor r estar muito próximo a 0, sendo assim, as duas variáveis tem uma correlação que tendem ao equilíbrio. O resultado do teste de hipótese foi a de não rejeição do mesmo ao nível de significância de 95%, com p de 0.99. Sendo assim, o valor r é considerado igual ao valor de coeficiente populacional de correlação (tabela 5).

TABELA 5 – RESULTADOS DO TESTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON DE TODAS AS AMOSTRAS E DAS AMOSTRAS POSTIVAS.

Coeficiente de Correlação de Pearson				
Hipótese nula	p-value	Coeficiente de correlação (r)	Resultado	Conclusão
$r_o = 0$	p de 0.0025	0.628	Rejeição a hipótese	$r_o \neq r_p$
Nível de significância de 95%.				
Coeficiente de Correlação de Pearson das amostras positivas				
Hipótese nula	p-value	Coeficiente de correlação (r)	Resultado	Conclusão
$r_o = 0$	p de 0.99	0.00135	Não rejeição a hipótese	$r_o = r_p$
Nível de significância de 95%.				

Nota: r_o = Coeficiente de Correlação populacional.

FONTE: O autor

No gráfico 5, através de dois gráficos, é mostrada a correlação de concentração e pureza. Onde podemos constatar que realmente há uma correlação, quando consideramos todas as amostras. No gráfico A temos uma reta com uma tendência crescente e positiva; mas quando pensamos apenas

em amostras positivas temos uma falta de correlação. No gráfico B constatamos uma reta quase sem tendência, dividindo o gráfico em duas regiões iguais.

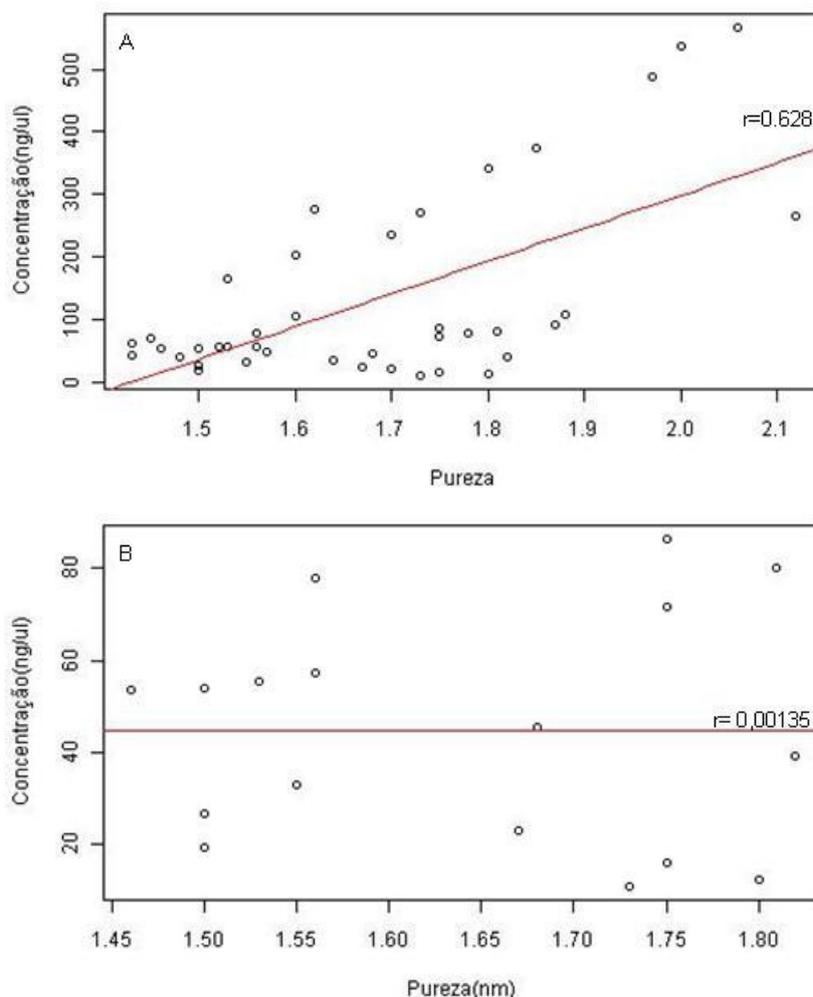


GRÁFICO 5: Gráfico de correlação dos dados de pureza e concentração.

Nota: A= Gráfico de correlação de todas as amostras.

B= Gráfico de correlação das amostras positivas.

FONTE: O autor

4.1 EFICIÊNCIAS DA ESPECTROFOTOMETRIA TRADICIONAL

Observando os resultados das tabelas e ilustrações acima, vemos que as medidas obtidas e os resultados de amplificação são conflitantes. Para obtermos resultados mais conclusivos sobre a confiabilidade das medidas de espectrofotometria foram feitas novas estatísticas. A qualidade da técnica de espectrofotometria pode ser mensurada através de uma análise de correlação,

onde se esperava que a positividade estivesse intimamente relacionada à valores de qualidade melhores.

O objetivo do teste de coeficiente de correlação foi verificar se existe alguma associação entre a razão de pureza e os resultados da PCR. A hipótese testada foi de que o coeficiente de correlação populacional é igual a 0. O coeficiente de correlação (r_{pb}) foi de -0.19. Isso mostra que a correlação linear é fraca, devido ao fato do valor r estar muito próximo a 0, sendo assim, as duas variáveis tem uma correlação que tendem ao equilíbrio. O resultado do teste de hipótese foi a de não rejeição do mesmo ao nível de significância de 95%, com p de 0.225. Sendo assim, o valor r é considerado igual ao valor de coeficiente populacional de correlação (tabela 6).

TABELA 6 – RESULTADO DO TESTE DE CORRELAÇÃO DE POINT-BISERIAL.

Coeficiente de Correlação de Point-biserial				
Hipótese nula	p-value	Coeficiente de correlação (r_{pb})	Resultado	Conclusão
$r_o = 0$	p de 0.225	-0.19	Não rejeição a hipótese	$r_o = r_{pb}$
Nível de significância de 95%.				

Nota: r_o = Coeficiente de Correlação populacional.

FONTE: O autor.

O resultado esperado era de que a correlação fosse positiva, isso quer dizer que quanto maior a pureza maior seria a possibilidade de positividade. Tal fato não foi visto em nossos dados. A correlação que obtivemos foi quase nula, mostrando que não ocorreu uma correlação entre positividade e altos níveis de pureza. A amplificação destas amostras foi o mesmo em relação à pureza.

Podemos crer que as medidas de pureza que obtivemos estão muito próximas das ideais, relatadas pela literatura; tal fato sendo verdade, podemos considerar que as medidas obtidas estão dentro das mensurações ideais. Para termos certeza que nossos dados estão fora destas medidas foi feita um teste T-Student Simples.

O objetivo do teste T - Student foi verificar se as razões de pureza encontradas nas amostras são diferentes das relatadas como ideais na literatura. A hipótese nula testada é que a média da razão de pureza da

amostra e da referência são iguais. As médias de referência de comparação foram 1.80. O resultado obtido foi de rejeição da hipótese nula para valor de p de $2.0 \cdot 10^{-5}$. Tais valores refletem que a média amostral foi diferente da média estipulada pela literatura como padrão de pureza ideal.

O mesmo teste foi aplicado apenas para amostras positivas para a PCR, ou seja, aquelas que tenham apresentado bandas para o gene do loco *HLA-DRB1*. O resultado obtido foi de rejeição da hipótese nula para valores respectivos de p de $12.56 \cdot 10^{-6}$ (tabela 7). Tais valores refletem que a média amostral foi diferente da média estipulada pela literatura como padrão de pureza ideal.

TABELA 7 – RESULTADOS DO TESTE T - STUDENT DE TODAS AS AMOSTRAS E DAS AMOSTRAS POSTIVAS.

Teste T - Student			
Hipótese nula	p-value	Resultado	Conclusão
$\mu = 1.80$	p de $2.0 \cdot 10^{-5}$	Rejeição da hipótese nula	$\mu \neq 1.80$
Nível de significância de 95%.			
Teste T - Student das amostras positivas			
Hipótese nula	p-value	Resultado	Conclusão
$\mu = 1.80$	p de $12.56 \cdot 10^{-6}$	Rejeição da hipótese nula	$\mu \neq 1.80$
Nível de significância de 95%.			

Nota: μ =Média relatada como ideal pela literatura.

FONTE: O autor

Após termos certeza que nossas amostras diferem dos valores considerados ideais pela literatura, pudemos pensar que nossas medidas de espectrofotometria não eram muito confiáveis. Tal fato nos reporta à duas situações: 1) Nossas amostras podem estar fora dos padrões ideais e mesmo assim ter amplificado. 2) O espectrofotômetro acabou mensurando as medidas de pureza e concentração erradamente.

4.2 EFICIÊNCIA DA TÉCNICA DE PCR

A técnica da PCR está intimamente relacionada à qualidade do material, mas também à técnica de eletroforese, utilizada para verificar esta positividade. Os dados foram bons, mas poderiam ser melhor caso fosse utilizada uma técnica de eletroforese mais sensível.

A qualidade da nossa técnica de PCR pode ser mensurada através da técnica de binomial. O teste da binomial é aplicado em amostras provenientes de populações que se constituem de apenas duas categorias (variáveis dicotômicas). O objetivo do teste da binomial foi comparar se existe alguma diferença entre os resultados positivos e negativos da PCR, para assim mensurar sua eficiência. A hipótese nula que foi testada é a de que as frequências de resultados positivos e negativos são iguais. O resultado obtido foi de não rejeição da hipótese nula, ao nível de significância de 95%, com p de 0.56 (tabela 8). Sendo assim, ambos os valores tem a mesma frequência, e o teste tem uma eficiência de aproximadamente 50%.

TABELA 8 – RESULTADO DO TESTE BINOMIAL.

Teste Binomial			
Hipótese nula	p-value	Resultado	Conclusão
P = N	p de 0.56	Não rejeição da hipótese nula	P = N

Nível de significância de 95%.

Nota: P=Positivo, N=Negativo.

FONTE: O autor

Dos 48 blocos de parafina utilizados neste estudo 22 foram positivos para PCR, isso resulta em uma eficiência de 45,85. Mas o teste de binomial mostra que a técnica de PCR, possui uma eficiência de aproximadamente 50% de amplificar amostras que se encontram dentro das características descritas neste estudo.

5 DISCUSSÃO

As amostras de tecidos humanos retiradas em procedimentos cirúrgicos têm como fixador universal e ideal para a técnica histológica, a solução de formalina a 10% e uso da parafina como meio de inclusão. A partir do interesse crescente nas técnicas de biologia molecular direcionadas para o DNA, os blocos de parafina arquivados nos setores de patologia, decorrentes da rotina de exames anátomo-patológicos, ganharam mais uma grande importância: além do estudo histomorfológico, histoquímico e imunoistoquímico clássicos, a possibilidade de realizar estudos genômicos.

A grande maioria das doenças está relacionada a algum tipo de alteração genética, que por sua vez, sofre influência, em maior ou em menor grau, oriunda do ambiente. O interesse em entender estes fatores genéticos fez com que muitos pesquisadores investissem na busca de materiais e técnicas que viabilizassem a obtenção de macromoléculas. Amostras à fresco e congeladas são consideradas pela maioria dos autores, as ideais para este tipo de análise, porém, nem sempre é possível obter amostras à fresco ou congeladas, devido às limitações da prática clínica.

Os blocos de parafina vieram a ser uma das soluções encontradas para este tipo de análise; com o adendo de serem de fácil acesso e geralmente apresentarem grande quantidade de tecido amostrado. Existem muitos estudos publicados que utilizam blocos de parafina para estudos de macromoléculas. Tais estudos têm enfoques retrospectivos, com relação a fatores oncológicos, epidemiológicos ou de aperfeiçoamento da técnica de obtenção de macromoléculas de blocos de parafina.

A espectrofotometria é uma ferramenta muito utilizada para detecção de características relacionadas à quantidade e qualidade do DNA. Muitos autores relatam em seus trabalhos que, com relação a qualidade do DNA, existem medidas ideais para obtenção de sucesso na PCR. Santella e colaboradores (2006) afirma que a quantidade ideal de um DNA de boa qualidade seria aproximadamente $1.80(A_{260}/A_{280})$. Santos e colaboradores (2008, B) entendem como aceitável um valor entre 1.8 e 2.0, e afirma que o ideal seria em torno de 1.8. Os resultados do presente estudo mostram um intervalo de confiança da

média de 1.621 a 1.73 de todas as amostras e das amostras positivas para PCR de 1.59 a 1.715.

A técnica de PCR tem se estabelecido como uma metodologia de rotina em patologia diagnóstica, devido a sua especificidade e sensibilidade. Tal técnica é uma ferramenta que foi adaptada para detecção de agentes infecciosos, mutações, translocações, e amplificações gênicas. A PCR apresenta uma alta capacidade de amplificação a partir de uma quantidade reduzida de DNA, mesmo que este apresente um determinado grau de degradação (RIVERO et al., 2006; EVANS et al., 2009). Se por um lado a PCR apresenta pontos positivos, que a tornam técnica interessante de ser utilizada em DNA extraído de blocos de parafina, por outro, há vários fatores que podem levar ao seu insucesso. A ausência de uma quantidade mínima do DNA alvo detectável, a presença de materiais contaminantes, a degradação do DNA alvo e sua fragmentação, devido à ação dos fixadores/descalcificadores, são, segundo alguns autores, os pontos-chaves de insucessos da amplificação. (CAO et al., 2003; MIRSHAHABI et al., 2007).

Os dados obtidos neste trabalho mostram resultados conflitantes entre as leituras do espectrofotômetro e os resultados de amplificação. Logo na primeira análise dos dados, onde foi obtido valores que não apresentaram leitura e os casos com concentrações de DNA foram muito elevadas, desconfiamos da confiabilidade das técnicas de espectrofotometria. A não ocorrência da leitura em 4 amostras pode ser oriunda da presença de materiais contaminantes, onde mesmo com essas condições, 3 amostras apresentaram positividade para PCR. Tal fato ressalta a falta de confiabilidade da técnica, já que mesmo amostras sem leituras obtiveram resultados positivos.

Uma comparação entre a estatística descritiva de todas as amostras e apenas das amostras positivas veio ressaltar a variabilidade dos valores de leitura obtidos, principalmente da concentração. Nesta análise ficou clara que as amostras totais apresentaram uma variabilidade de concentração muito maior que as que foram positivas. Tais dados sugerem que esta variabilidade deve-se as características do material que estamos trabalhando.

A ideia de que a idade dos blocos é fator não influenciável na concentração e pureza foi mostrada nos resultados obtidos por Libório e colaboradores em seu trabalho. Os dados obtidos neste trabalho corroboram

com a ideia de que a idade dos blocos não influencia os resultados de leitura de concentração e pureza. Outra questão que podemos ressaltar deste dado é que não podemos relacionar pureza e concentração neste tipo de material. Existem muitos fatores que podem ter influenciado a leitura de pureza e concentração; tais fatores decorrentes da natureza do material do estudo.

As medidas estatísticas de resumo deste estudo retornam dados de pureza em um intervalo de 1.59 a 1.715. Tais resultados são valores menores que os referidos pelos autores como ponto de comparação ideal. Para termos certeza que nossa média amostral estava diferente da média considerada como ideal, foi feito o teste de T- Student Simple. O resultado obtido comprovou a diferença entre os valores das médias de nossos dados e o da literatura. Assim era de se esperar que a maioria das amostras não apresentasse amplificação.

Os dados obtidos em espectrofotometria tradicional não são confiáveis, já que as amostras, mesmo em quantidades entendidas como sendo abaixo do padrão ideal, aproximadamente 50% delas, apresentaram positividade para PCR. Muitas das amostras amplificadas (22) estavam bem abaixo dos padrões ideais com relação aos dados da espectrofotometria, e ainda assim, apresentaram resultados satisfatórios com relação a PCR. Tal observação já havia sido relatada no trabalho de Simonato e colaboradores (2007), onde com outro método de extração foi obtido resultados positivos para amostras fora dos padrões ideais de leitura. Simonato e colaboradores (2007) obtiveram uma absorbância em um intervalo de 0.8 a 1.41, destas, 29 de 35 foram positivas.

O teste de correlação foi fundamental para mostrar a instabilidade da técnica de espectrofotometria tradicional. Em uma comparação direta entre os resultados obtidos de PCR e as leituras, não obtivemos correlação entre qualidade da amostra de DNA e positividade da PCR. Assim não podemos confiar fielmente nas leituras de D.Os do espectrofotômetro, pois esta técnicas apresenta fatores variáveis que podem influenciar o resultado final e aumentar o erro de interpretação dos dados.

Como ressaltado acima, um dos agravantes, neste caso, é o de se trabalhar com blocos de parafina. Aparentemente a falta de confiabilidade nos dados de leitura pode se dever a alterações no DNA não identificadas no momento da PCR. A presença de materiais contaminantes, a fragmentação do

ácido nucleico pelo fixador e o efeito do agente descalcificante pode influenciar diretamente os resultados de espectrofotômetro e PCR.

As reações constituintes do processo da fixação podem dificultar os bons resultados da extração e amplificação do DNA. (CAO et al., 2003; MIRSHAHABI et al., 2007). A fixação por aldeído fórmico possibilita a degradação do DNA devido à troca de bases nitrogenadas na molécula de DNA, que pode inserir erros em sua sequência (SJOHOLM et al., 2005). Gilbert e colaboradores (2007) ressaltam que não é possível quantificar as possíveis sequências de erros introduzidas durante o processo de fixação. Em outras palavras, apesar de danos menores ao DNA poderem ser reparados, degradações mais graves, como a fragmentação, poderiam impedir a amplificação (GILBERT et al., 2007).

O líquido de Bouin, solução que contém ácido pícrico e formaldeído, possui pH extremamente baixo. Neste ponto não podemos deixar de considerar que o DNA pode se fragmentar em situações de pH excessivamente ácido. Shin e colaboradores (2002), mostra em seu trabalho que alterações do pH no momento da extração influencia no resultado da amplificação, concluindo que valores de pH mais altos beneficiam a qualidade do DNA obtido. A incompatibilidade entre as características da solução fixadora e as macromoléculas reforça a ideia de que a amplificação pode ser influenciada negativamente pelo fixador utilizado.

Atualmente reconhecemos os seguintes pontos ou etapas constituintes do método do processamento em parafina que poderiam influir deletariamente na recuperação do DNA, nos resultados de espectrofotometria e no sucesso da PCR. Esses pontos seriam: tempo de pré-fixação, fixação e descalcificação.

Deixando de lado os efeitos da fixação e do processamento, temos ainda que considerar que diferentes tecidos reagem de forma particular às reações da fixação e processamento e que isso pode resultar em alterações diferenciadas na qualidade do material e grau de sucesso da amplificação. Rivero e colaboradores (2006) ressaltam que mesmo tecidos de natureza semelhante, mas com doenças diferentes, reagem de forma diferente a reação de fixação. Os diferentes tipos de tecidos, os fatores que os levam a necrose e a presença de nucleases, poderiam ser importantes fatores que influenciam a recuperação do DNA de forma intacta. Gari e colaboradores (2006) descrevem

que a presença de excesso de sais e proteínas em certos tecidos, agem como inibidores da extração, podendo refletir diretamente na quantidade de DNA obtido, pois ocorre uma interferência negativa na destruição da célula e posterior liberação do DNA.

De acordo com Gilbert e colaboradores (2007); Santos e colaboradores (2008, B) diversas medidas de qualidade de ácidos nucleicos existem, e essa diversidade nem sempre permite comparabilidade entre as amostras, explicando ainda porque motivo não é incomum encontrar dados conflitantes nos estudos publicados; os mesmos autores citam ainda que a qualidade do ácido nucleico contido nos espécimes cirúrgicos fixados são altamente dependentes de um grande número de variáveis, muitas destas podem levar à degradação dos ácidos nucleicos. Os autores citam que a qualidade e a quantidade do ácido nucleico extraído são altamente dependentes de um grande número de parâmetros. Esses parâmetros estão intimamente relacionados a todos os procedimentos que envolveram a manipulação antes e após a extração do DNA propriamente dito.

Tais questões devem ser consideradas no momento de se interpretar os dados de espectrofotometria, que como já ressaltamos apresentam uma confiabilidade intimamente ligada a inúmeras variáveis. Sendo assim, a comparação entre métodos de extração, através de medidas de espectrofotometria, deve ser feita de forma criteriosa. Assim como a admissão destes como parâmetros de tomada de decisão.

Os resultados de quantidade de DNA das amostras positivas ao PCR no presente estudo, mostram a eficiência desta técnica de biologia molecular pois mesmo com quantidades inferiores aos teores considerados ideais na literatura, ainda assim, as amostras foram positivas. A quantidade ínfima do DNA mensurado nesse caso pode também ser explicada pelas características do tecido, pois na anemia aplásica severa, há redução ou desaparecimento das células nucleadas na medula óssea; O fato de concentrações maiores de DNA serem negativas em muitos casos pode ser explicado pela provável fragmentação deste DNA, ou presença de alterações significantes em sua conformação. Outro fator relevante que já foi mencionado nos resultados é a questão da sensibilidade do gel e agarose, Tal fato leva a imaginar que algumas amostras não apresentam bandas aparentes. A utilização de gel de

poliacrilamida aumentaria a sensibilidade do teste, o que poderia tornar possíveis bandas não aparentes tornarem-se aparentes. Restam ainda os contaminantes que influenciam as leituras do espectrofotômetro.

Quanto à eficiência da técnica de PCR dos presentes experimentos, em princípio pareceram favoráveis. O teste binomial realizado mostrou que não havia diferença entre a positividade e a negatividade da técnica, pois a eficiência obtida foi de aproximadamente 50% da amplificação do gene *HLA-DRB1*. Gari e colaboradores (2006) obtiveram uma eficiência de 74% investigando medulas ósseas de leucemia linfoblástica e leucemia mielóide aguda. A razão para esse insucesso de amplificação, na visão dos autores, foi atribuída a presença de substâncias inibidoras da PCR durante o processamento. As razões que podem ter levado ao insucesso nas amplificações por PCR no presente trabalho, podem ser inúmeras, algumas relatadas por Cao e colaboradores (2003), sendo de extrema relevância no contexto do presente estudo.

Acreditamos que um fator adicional a ser considerado é a baixa quantidade de células nucleadas, já que essas seriam fontes de DNA. Como relatado o tecido de medula óssea de pacientes com anemia aplásica apresenta uma hipocelularidade causada pela doença. Tal fato pode ocasionar uma quantidade de DNA não detectável pela técnica de PCR.

Além disso, o processo de descalcificação, necessário para processamento histológico dos tecidos provenientes de medula óssea, é outro fator importante nesse contexto. Sjöholm e colaboradores (2005) corroboram com os dados supracitados quando relata que a baixa taxa de sucesso global do seu experimento pode ser devido a diferenças no tratamento dos tecidos ou por alterações do DNA, presumivelmente devido a formaldeído. Santos e colaboradores (2008, A) relatam que a solução de Bouin, que contém ácido pícrico e formaldeído, provoca despurinação do DNA, fazendo com que esses não possam ser amplificados com sucesso devido às modificações causadas pela solução.

No entanto os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que a técnica de PCR apresentou uma eficiência surpreendente. Levando em consideração os padrões adversos deste trabalho, pode-se dizer que os resultados do teste de binomial são ótimos. Chegamos a esta afirmação

considerado as características do material que estamos trabalhando, este com vários fatores negativos, os resultados da concentração das amostras positivas e o método de visualização de amplificação que utilizado. Como já relatamos o método de eletroforese em gel de agarose apresenta uma sensibilidade baixa; assim sendo utilizando outro método, o de poliacrilamida, poderíamos ter obtido mais amostras com padrões positivos.

A PCR necessita receber uma atenção em todos os seus passos, inclusive na visualização dos resultados. A eletroforese é de suma importância para o resultado final; assim, sempre devemos buscar um método de sensibilidade adequada, para evitar falsos negativos.

A mensuração da qualidade e da quantidade do DNA teve ser feita de uma forma cautelosa, pois ficou claro que os métodos escolhidos para obtenção destas medidas influenciam nos resultados finais. A escolha de outros métodos de mensuração e a comparação, com as técnicas utilizadas no presente trabalho, seria importante para uma melhor visualização da real situação da qualidade e quantidade de DNA. Alguns métodos que podem vir a confrontar as presentes técnicas utilizadas são: 1. Um espectrofotômetro mais moderno, como o Nanodrop; 2. Uma possível visualização do material em poliacrilamida; 3. Hibridização do material com alguma sonda específica; 4. A realização de PCR em tempo real. Por fim, demonstramos indiretamente que amostras de material parafinado provenientes de medula óssea fixada em formol e que passaram por processo de descalcificação em líquido de Bouin são possíveis de obter um material adequado para a reação em cadeia da polimerase.

6 CONCLUSÕES

6.1 Conclusões gerais

- Os indicadores qualitativos e quantitativos do DNA extraído devem ser ponderados de acordo com a técnica de mensuração utilizada e de acordo com as características do tecido de interesse.
- A técnica de espectrofotometria tradicional pode ser influenciada por diversos fatores decorrentes da amostra ou de características equipamento, tais como modelo e tempo de uso; assim a técnica se torna sem confiabilidade para o tipo de tecido estudado. Tal método pode apresentar variações que levam às falsas interpretações dos resultados reais.
- O estudo morfo-patológico das alterações do tecido intrínsecas à doença básica permite antever as dificuldades a serem encontradas, servindo como orientação para as adaptações metodológicas pertinentes na técnica de extração, mensuração e amplificação do DNA, evitando resultados falso-negativos.

6.2 Conclusões específicas

- A Reação em Cadeia da Polimerase demonstrou-se uma técnica de extrema eficiência, ao amplificar um DNA aparentemente degradado e em baixa quantidade.
- As amostras utilizadas, de baixo teor celular e, portanto pobres em DNA devido ao fato de serem submetidas à fixação e de serem processadas sob condições físico-químicas julgadas como adversas para a técnica de PCR, ainda assim são viáveis para amplificação.

REFERÊNCIAS

1. ABRÃO M. G., BILERBECK A. E., NISHI M. Y., MARUI S., MENDOÇA B. B. Padronização da Técnica de Extração de DNA de Células de Mucosa Oral Com NaCl: Aplicação no Estudo do Gene PROP1. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2005; 49(6): 978-982.
2. ALVES A. Análises histopatológicas: porque demoram os resultados. **Congresso de Ciências Veterinárias** 2002; 239-247.
3. ALVES C., MEYER I., TORALLES M. B. P., SANTIAGO M. B. Complexo principal de histocompatibilidade: sua participação na patogênese das doenças reumáticas auto-imunes. **RBPS** 2006; 19 (3): 155-163,A.
4. ALVES C., VEIGA S., TORALLES M. B. P., LOPES A. C. V. O papel do complexo principal de histocompatibilidade na fisiologia da gravidez e na patogênese de complicações obstétricas. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.** 2007; 7 (4): 357-363,B.
5. ASTER J. C. Distúrbios Hemorrágicos e dos Eritrócitos. In: KUMAR V., ABBAS A. K., FAUSTO N. **Patologia – Bases patológicas das doenças**. 7.ed, São Paulo: Elsevier, 2007. p. 652-693.
6. BAREA J. A., PARDINI M. I. M. C., GUSHIKEN T. Extração de DNA de Materiais de Arquivo e Fontes Escassas: Revisão e Apontamentos Sobre as Possíveis Aplicações. **NewsLab** 2004; 63: 96-114.
7. BECAK, W. Métodos de estudo. In:_____. **Técnica de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Ed. Livros técnicos, 1976. p. 22-38.
8. BEN-EZRA J., JOHNSON D. A., ROSSI J., COOK N., A. WU. Effect of Fixation on the Amplification of Nucleic Acids from Paraffin-embedded Material by the Polymerase Chain Reaction. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry** 1991; 39(3): 351-354.
9. BISPO J. M. **Sistema de análise do espectro de transmissão de córneas doadas para utilização em banco de olhos**. Ribeirão Preto, 1998. 90f. Tese (Mestre em Ciências - Área: Física Aplicada à Medicina e Biologia) - Departamento de Física e Matemática, Universidade de São Paulo.

10. BRODSKY R. A., JONES R. J. Aplastic anaemia. **Lancet**. 2005; 365(9471):1647-1656.
11. CAO W., HASHIBE M., RAO J., MORGENSTERN H., ZHANG Z. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. **Cancer Detection and Prevention** 2003; 27: 397–404.
12. CARNEIRO N. P., A. L. M., SOUZA I. R. P., OLIVEIRA C. M., OLIVEIRA E., LANA U. G. P., PAIVA E. Extração de DNA de Spiroplasma Kunkelii Whitcomb Cultivado in Vitro. **Circular Técnico** 2003; 34: 61-65.
13. CARNELOSSI E. A. G. **Diferenças moleculares entre citótipos de Mazama americana (artiodactyla: cervidae)**. Jaboticabal, 2008. 67f. Tese (Mestre em Genética e Melhoramento Animal) - Campus de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista.
14. COOMBS N. J., GOUGH A. C. PRIMROSE. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. **Nucleic acids research** 1999; 27(16): e12.
15. CORRÊA J. M., CHAVES-NETO A. Estudo do controle e análise da capacidade do processo de produção de água potável. **XLI SBPO 2009 – Pesquisa Operacional na Gestão do Conhecimento**. 2009; 1414-1424.
16. DEVRIES S., NYANTE S., KORKOLA J., SEGRAVES R., NAKAO K., MOORE D., BAE H., WILHELM M., HWANG S., WALDMAN F. Array-Based Comparative Genomic Hybridization from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Breast Tumors. **J Mol Diagn** 2005; 7: 65–71.
17. EVANS M. F. The polymerase chain reaction and pathology practice. **Diagnostic histopathology** 2009; 15(7): 344:356.
18. FERNANDES J. V., MEISSNER R. V., MEDEIROS FERNANDES T. A. A., ROCHA L. R. M. CABRAL M. C., VILLA L. L. Comparação de três protocolos de extração de DNA a partir de tecido fixado em formol e incluído em parafina. **J Bras Patol Med Lab** 2004; 40(3): 141-146.
19. FERNANDES T. A. R., FUKAI R., SOUZA C. A., LORAND-METZE I. MAGMA L. A., KRAEMER M. H. S. Molecular identification of the HLA-DRB1-DQB1 for diagnosis and follow-up of acute leukemias. **Blood Cells, Molecules, and Diseases** 2010; 44: 69–73.

20. FOX C.H., JOHNSON F. B., WHITING., ROLLER P. P. Formaldehyde fixation. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry** 1985; 33(8): 845-853.
21. GARI M. A., ABUZENADAH A. M., CHAUDHARY A. G., AL-QAHTANI M.H. , AL-SAYS F. M., DMANHOURI G. Pilot study of DNA extraction from archival unstained bone marrow slides: comparison of three rapid methods **African Journal of Biotechnology** 2006; 5 (6): 532-535.
22. GEUNA F., MAITTI C., DIGIUNI S., BANFI R. A method for extracting genomic DNA suitable for medium - throughput applications from plant tissues rich in contaminants. **Plant Molecular Biology Reporter** 2004; 22: 87a–87f.
23. GILBERT M. T. P., HASELKORN T., BUNCE M., SANCHEZ J. J., LUCAS S. B., JEWELL L. D. MARCK E. V., WOROBEY M. The Isolation of Nucleic Acids from Fixed, Paraffin-Embedded Tissues–Which Methods Are Useful When?. **PLoS ONE** 2007; 2(6): e537, p.1-12.
24. GOLDENBERGER D., PERSCHIL I., RITZLER M., ALTWEGG M. A simples “universal” DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR. **PCR Methods Appl** 1995; 4: 368-370.
25. GRIMALDI FILHO G. Fixação. In:_____. **Técnica histológica**. 2^aed. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 1981. p.10-39.
26. HUNT J. L. Molecular Pathology in Anatomic Pathology Practice: A Review of Basic Principles. **Arch Pathol Lab Med** 2008; 132: 248-260.
27. ISHIKAWA C. C., AB’SABER A. M., PARRA E. R., LIN C. J., BARBAS C. S. V. CAPELOZZI V. L. Imunofenotipagem e rearranjo gênico em doenças pulmonares linfocíticas e linfoproliferativas. **J Brás Pneumol** 2007; 33(6): 625-634.
28. JANEWAY C. A., TRAVERS P., WALPORT M. SHLOMCHLIK M. J. Apresentação de Antígenos para os Linfócitos T. In:_____. **Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença**. 6^aed. São Paulo: artmed, 2007. p. 169-2031.
29. JUNQUEIRA L. C., CARNEIRO J. Histology & its methods of study. In:_____. **Basic Histology**. 11^aed. New York: McGraw-Hill, 2005. p.1-18, (e-book).

30. JUNQUEIRA L.C., CARNEIRO J. Hemocitopoese. In:_____. **Histologia básica**. 10^aed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 238-253.
31. KINGSBURY B. F., JOHANNSEN O. A. Fixation. In:_____. **Histological Technique: A Guide for Use in a Laboratory Course in Histology**. 2^aed. New York: Kingsbury Press, 1927. p. 1-6, (e-book).
32. KULLMAN, F., SCHÖLMERICH J., BOCKER T., RÜSCHOFF J. A comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissue for microsatellite instability analysis by PCR. **Acta Biotech** 1998; 18(1): 77-83.
33. LEHMANN, U.; KREIPE, H. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. **Methods** 2001; 25(4): 409-418.
34. LIBÓRIO T. N., ETGES A, NEVES A. C., MESQUITA R. A., NUNES F. D. Evaluation of the genomic DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded oral samples archived for the past 40-years. **J Bras Patol Med Lab** 2005; 41(6): 405-410.
35. LIU, L., JOHNSON R. M., TRAWEEK S. T. Rearrangement of the BCL-2 gene in follicular lymphoma. Detection by PCR in both fresh and fixed tissue samples. **Diagn Mol Pathol** 1993; 2(4): 241-247.
36. LUNGE V. R. SIMON D., IKUTA N. Métodos de diagnóstico genético - molecular. In: MARQUES E. K. **Diagnóstico Genético - Molecular**. Canoas: Editorea da Ulbra, 2000. p. 27-45.
37. MACHUCA T. N., PREVEDELLO D. M., POPE L. Z. B., HARATZ S. S., ARAÚJO J. C., TORRES L. F. B. Gliosarcoma: Report of four cases with immunohistochemical findings. **Arq Neuropsiquiatr** 2004; 62 (3-A): 608-612.
38. MESQUITA, R. A.; ANZAI, E. K.; OLIVEIRA, R. N.; NUNES, F. D. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesqui Odontol Brás** 2001; 15(4): 314-319.
39. METZ B., KERTEN G. F. A., HOOGERHOUT P., BRUGGHE H. F. TIMMERMANS H. A. M., JONG A., MEIRING H., HOVE J., HENNINK W.E., CROMMELIN D. J. A., JISKOOT W. Identification of formaldehyde-

- induced modifications in proteins. **The journal of biological chemistry** **2004**; 279(8): 6235-6243.
40. MIRSHAHABI H., MESHKAT Z., SOLEIMANJAHI H., HASSAN Z. M., MESHKAT M. Different DNA Extraction Methods for Paraffin-Embedded Pathological Samples. **Iranian Journal of Pathology** 2007; 2 (4): 159-164.
41. MONTE S. J. H., NETO J. M. M., RAMFIM G. F., SHULZHENCO N., MORGUN A., GEREBABE-DeLIMA M. Polimorfismo do sistema HLA em uma amostra de mestiços da população de Teresina, Piauí. **Rev. Assoc. Med. Bras.** 2004; 50(4): 422-426.
42. MONTGOMERY D. C. Melhoria da qualidade no contexto da empresa moderna. In:_____. **Introdução ao controle estatístico da qualidade.** 4ªed. Rio de Janeiro: LTC editora, 2004. p. 1-22.
43. MORAIS A., ALVES H., LIMA B., DELGADO L., GONÇALVES R., TAFULO S. Estudo de polimorfismos genéticos do HLA (classes I e II) e do TNF- α em doentes com sarcoidose. **Revista Portuguesa de Pneumologia** 2008; XIV (6): 727-746.
44. NASCIMENTO E. M., SPINELLI M. O., RODRIGUES C. J., BOZZINI N. Protocolo da extração de DNA de material parafinado para análise de microssatélites em leiomioma. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** 2003; 39(3): 253-255.
45. OKELLO J. B. A., ZUREK J., DEVAULT A. M., KUCH M., OKWI A. L., SEWANKAMBO N. K., BIMENYA G. S., POINAR D., POINAR H. N. Comparison of methods in the recovery of nucleic acids from archival formalin-fixed paraffin-embedded autopsy tissues. **Analytical Biochemistry** 2010; 400: 110–117.
46. OLIVEIRA C. C. **Alteração da expressão gênica e das respostas fisiológicas de macrófagos peritoneais de camundongos pelo canova.** Curitiba, 2006. 102f. Tese (Doutor em Biologia Celular e Molecular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
47. PALMA B. F., FERRARI A. B., BITAR R. A., CARDOSO M. A. G., MARTIN A. A., MARTINHO H. S. DNA Extraction Systematics for Spectroscopic Studies. **Sensors** 2008; 8, 3624-3632.

48. PEREIRA PINTO G. H. V. **A Importância da Determinação de Metais Pesados nos Derivados de Petróleo.** Natal, 2006. 60f. Monografia (Engenharia Química) Departamento de Engenharia Química - Programa de Recursos Humanos, Universidade Federal Rio Grande do Norte.
49. PINETA DABOÍN K. M., GARCÍA G. R., GARCÍA M. I. R. URIBE A. R. Biopsia de médula ósea: utilidad y limitaciones. **Patología** 2008; 46(3): 237-247.
50. PRINCE M. E., UBELL M. L., CASTRO J., OGAWA H., OGAWA T., NARAYAN A., PAULINO A., COLE A., WOLF G. T., RUBIN M. A., LYINS R. H., BRADFORD C.R., CORY T. E. Tissue-preserving approach to extracting DNA from paraffin-embedded specimens using tissue microarray technology. **Wily Periodicals, Inc. Head Neck** 2007; 29: 465-471.
51. PUCHTLER H., MEIOAN S. N. On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. **Histochemistry** 1985; 82: 201-204.
52. RIBEIRO-SILVA A., GARCIA S. B. Estudo comparativo de três diferentes procedimentos para extração e RNA a partir e amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina. **J Bras Patol Med Lab** 2008; 44(2): 123-130.
53. RIVERO E. R. C., NEVES A. C., SILVA-VALEZUELA M. G., SOUSA S. O. M., NUNES F. D. Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. **Pathology- Research and Practice** 2006; 202: 523-529.
54. ROSA D. D. Método rápido de extração de DNA de bactérias. **Summa Phytopathologica** 2008; 34(3): 259-261.
55. SANTELLA R. M. Approaches to DNA/RNA Extraction and Whole Genome Amplification. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2006; 15(9): 1585-1587.
56. SANTOS M. C. L. G., SAITO C. P. B., LINE S. R. P. Extraction of genomic DNA from paraffin-embedded tissue sections of human fetuses fixed and stored in formalin for long periods. **Pathology - Research and Practice** 2008; 204: 633-636, doi:10.1016/j.prp.2008.04.005,A.

57. SANTOS S., SÁ D., BASTOS E., GUEDES-PINTO H., GUT I., GARTNER F., CHAVES R. An efficient protocol for genomic DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. **Res.Vet.Sci.** 2008, doi:10.1016/j.rvsc.2008.08.007,B.
58. SEPP R., SZABO I., UDA H., SAKAMOTO H. Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. **Clin Pathol** 1994;47: 318-323.
59. SEUÁNEZ H. N., MAREIRA M. A. M., OTAZÚ I. B., BRAGGIO E., RENAULT I. Z. Métodos moleculares de diagnóstico. In: Ferreira C. G., Rocha J. C. **Oncologia Molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.13-27.
60. SHIN S. R., COTE R. J., WU L., LIU C., RAM D., SHI Y., LIU D., LIM H., TAYLOR C. R. Dna extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. **The journal of histochemistry e citochemistry** 2002; 50(8): 1005-1011.
61. SIMONATO L. E., GARCIA J. F., NUNES C. M., MIYAHARA G. I. Avaliação de dois métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação em PCR. **J Bras Patol Med Lab** 2007; 43(2): 121-127.
62. SJOHOLM M. I. L., HOFFMANN G., LINDGREN S., DILLNER J., CARLSON J. Comparison of Archival Plasma and Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue for Genotyping in Hepatocellular Carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2005; 14(1): 251–255.
63. SRINIVASAN M., SEDMAK D., JEWELL S. Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. **American Journal of Pathology** 2002; 161(6): 1961-1971.
64. STEFFAN R. J., GOKSOYR J., BEJ A. K., ATLAS R. M. Recovery of DNA from Soils and Sediments. **Applied and Environmental Microbiology** 1988; 54(12): 2908-2915.
65. TIMM L. L. Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas. **Caderno La Salle XI** 2005; 2(1): 231–239.
66. TOLOSA E. M. C., RODRIGUES C. J., BEHMER O. A., FREITAS-NETO A. G. Técnica histológica. In:_____. **Manual de técnicas para**

- histologia: Normal e Patológica.** 2^aed. Rio de Janeiro: Manole, 2003. p. 19-85.
67. TRIOLA M. F. Estatística para Descrição, Exploração e Comparação de Dados. In:_____. **Introdução a Estatística.** 10^aed. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2008. p.96 - 109.
- 68.VILANOVA-COSTA C. A. S. T., NÓBREGA, J. B., CRUZ R. S. A. D. Extração e purificação de DNA em material biológico parafinado. **Estudos, Goiânia** 2008; 35(1/2): 143-152.
- 69.VINCEK V., NASSIRI M., NADJI M., MORALES A. R. A Tissue Fixative that Protects Macromolecules (DNA, RNA, and Protein) and Histomorphology in Clinical Samples. **Laboratory Investigation** 2003; 83(10): 1427- 1435.
- 70.WAJNER M., VARGAS C. R. Diagnóstico genético – molecular aplicado à medicina humana. In: MARQUES E. K. **Diagnóstico Genético - Molecular.** Canoas: Ed. Ulbra, 2000. p. 71-126.
- 71.WATSON P. H., SNELL L., PARISIEN M. The NCIC-Manitoba Breast Tumor Bank: A resource for applied cancer research. **CAN MED ASSOC J** 1996; 155 (3): 281-283.
- 72.YEATES C., GILLINGS M. R., DAVISON A. D., ALTAVILLA N., VEAL D. A. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. **Biological Procedures Online** 1998; 1(1): 40-47.
- 73.YOUNG N. S., KAUFMAN D. W. The epidemiology of acquired aplastic anemia. **haematologica** 2008; 93(4): 489-492.

ANEXOS

Anexo I: Protocolo de Utilização de espectrofotômetro

1 - PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

1. Deixar a amostra de DNA esfriar antes de fazer a diluição
2. Diluir a amostra de DNA 1:50 em água ultrapura (5 µl de DNA + 245 µl de água ultra-pura). Identificar os tubos de microcentrifuga. Homogeneizar em vortex.

2 - PROCEDIMENTO PARA USO DO ESPECTROFOTÔMETRO

1. Ligar o estabilizador e o aparelho.
2. Aguardar 15 minutos para correta estabilização.
3. Selecionar o que vai ser medido:
 - dsDNA - leitura de amostras de DNA de dupla fita.
 - RNA - leitura de amostras de RNA.
 - oligo - leitura de amostras de oligonucleotídeos *primers* ou sondas.

Para leitura de amostras de DNA e RNA:

4. Colocar 500µl de água ultrapura na cubeta e colocá-la no local apropriado, com a ponta do triângulo inscrito na cubeta voltada para trás.
5. Acrescentar a fator de diluição:
 - pressionar a tecla *dilution*;
 - se diluição 1:50 - digitar *5 enter 245 enter*;
6. Pressionar a tecla *blank*.
7. Após o aparelho estar zerado (visor: 0,00), retirar a cubeta.
8. Desprezar a água da cubeta e colocar 500µl da amostra diluída após homogeneização.
9. Colocar a cubeta no local apropriado com a ponta do triângulo voltada para trás.
10. Pressionar a tecla *sample*.
11. Copiar a leitura apresentada no visor (concentração, D.O.260 e 260/280) na ficha do paciente.
12. Retirar a cubeta e lavá-la várias vezes com água ultrapura (mínimo 4 vezes), secar em papel absorvente ultramacio. Pressionar a tecla *enter*.

Obs: não usar papel áspero pois risca a cubeta e esta fica inutilizada.

13. Colocar a próxima amostra na cubeta e repetir o procedimento.

14. Ao terminar as leituras colocar a tampa de borracha preta sobre o local de inserção da cubeta no aparelho.

Desligar o aparelho e o estabilizador.

Anexo II: Tabela de diluições feitas das amostras extraídas para utilização na PCR.

Paciente	Pureza	Concentração ng/ul	Diluição H ₂ O / DNA	
1	1.56	57.1	Puro	2 µl
2	1.55	32.9	Puro	2 µl
3	1.48	40.9	Puro	2 µl
4	1.45	68.8	Puro	2 µl
5	1.43	43.8	Puro	2 µl
6	1.56	78	Puro	1 µl
7	1.53	55.3	Puro	2 µl
8	1.62	275.8	9,4	0,7µl
9	1.46	53.5	Puro	2 µl
10	1.53	166.3	Puro	0,7µl
11	1.85	372.9	9,5	1 µl
12	1.73	11.0	Puro	2 µl
13	1.75	86.2	Puro	1 µl
14	1.82	39.4	Puro	2 µl
15	----	----	Puro	3 µl
16	----	----	Puro	3 µl
17	----	----	Puro	3 µl
18	1.67	23.0	Puro	2 µl
19	----	----	Puro	3 µl
20	1.75	71.6	Puro	1 µl
21	1.88	108.8	Puro	1 µl
22	1.75	16.2	Puro	2 µl
23	1.70	21.1	Puro	2 µl
24	1.80	12.4	Puro	2 µl
25	1.50	19.4	Puro	2 µl
26	1.50	53.8	Puro	2 µl
27	1.52	55.9	Puro	2 µl
28	1.70	234.5	9,1	0,9
29	1.60	106.3	Puro	1 µl
30	1.57	48.9	Puro	2 µl
31	1.50	26.7	Puro	2 µl
32	1.80	342.0	9,4	0,6µl
33	1.60	203.1	9,0	1,0µl
34	1.80	2.400.5	19,8	0,2µl
35	1.87	91.7	Puro	1 µl
36	1.73	271.4	9,3	0,7µl
37	1.78	77.0	Puro	1 µl

38	1.56	755.0	9,7	0,3µl
39	2.06	566.0	9,6	0,4µl
40	2.12	264.3	9,2	0,8µl
41	1.54	770.1	9,7	0,3µl
42	1.68	45.4	Puro	2 µl
43	1.97	488.8	9,6	0,4µl
44	1.54	766.5	9,7	0,3µl
45	2.00	535.7	9,6	0,4µl
46	1.81	80.1	Puro	1 µl
47	1.64	34.3	Puro	2 µl
48	1.43	61.6	Puro	2 µl
49	1.70	31.9	Puro	2 µl
50	2.08	589.2	9,7	0,3µl

Fonte: O autor.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)