



JAQUELINE ALVES BAREA

**EXTRAÇÃO DE DNA DE MATERIAL
DE ARQUIVO E FONTES ESCASSAS
PARA UTILIZAÇÃO EM REAÇÃO DE
POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA**



JAQUELINE ALVES BAREA

**EXTRAÇÃO DE DNA DE MATERIAL DE ARQUIVO E FONTES
ESCASSAS PARA UTILIZAÇÃO EM REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM
CADEIA (PCR)**

Dissertação apresentada ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia em Clínica Médica (Área de Concentração: Metabolismo e Nutrição).

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini

BOTUCATU
- 2001 -

Orientação:

Prof^a. Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini

**Pesquisadora do Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina – UNESP - Botucatu**

Local de execução

Hemocentro - Lab. de Biologia Molecular

Faculdade de Medicina – UNESP - Botucatu

DADOS CURRICULARES

JAQUELINE ALVES BAREA

NASCIMENTO	18.12.1972 – TUPÃ/SP
FILIAÇÃO	João Barea Torres Elisabeti Alves Barea
1991/1994	Curso de Graduação Ciências Biológicas – Faculdade de Ciências Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Bauru – SP
1995/1996	Aprimoramento Profissional – PAP/FUNDAP “Diagnóstico e Pesquisa Laboratorial em Hematologia” Hemocentro – Faculdade de Medicina – UNESP – Botucatu

Dedicatória:

À Beatriz e aos meus alunos – o futuro.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado**, então, diretor do Hospital das Clínicas de Botucatu, pela possibilidade de realização deste trabalho e por compartilhar seus conhecimentos e preocupações éticas, em momentos cruciais, suscitando novos questionamentos e dando novos horizontes à pesquisa;

À **Prof^a. Dra. Elenice Deffune**, Diretora da Divisão Hemocentro, pela chance concedida de desenvolvimento deste trabalho, no local o qual considero supremo em tecnologia, biossegurança e primoroso com relação à metodologia científica e que forneceu todo o suporte financeiro para realização desta pesquisa;

A querida e insuperável **Prof^a. Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini**, que, iluminada em sua forma de ser, consegue atender a tantos que recorrem a ela, muitas vezes, ao mesmo tempo, sempre com muita simpatia, solicitude e humildade. Por sua grande capacidade como pesquisadora e, ainda mais, como professora; com uma didática invejável, fez Biologia Molecular parecer cada vez mais fascinante e compreensível para mim, bem como os caminhos da Metodologia Científica. Obrigada!

A Mestre **Tsieko Gushiken**, pela amizade, por todo o auxílio técnico e pelos momentos prazerosos de discussões sobre Ética na utilização de material genético. Agradeço-a por toda assistência, que depende não só a mim, mas a todos que passam pelos Laboratórios de Biologia Molecular e de Seqüenciamento Gênico.

Aos **meus pais (João e Elisabete) e irmãos (Andréia, Alessandra e Rogério)**, que na interação familiar, me fizeram o que sou, meus defeitos e qualidades. Devo-lhes a atenção e os cuidados, principalmente nas horas difíceis.

À minha filha **Beatriz**, pelas inúmeras horas de ausência, infelizmente, irrecuperáveis e pela força, amor e vivacidade que seus olhos exóticos transmitem;

Ao meu, hoje, ex-marido, **Claudemir da Silva Carvalho**, por respeitar minha escolha e dedicação ao trabalho e por me auxiliar nos momentos de minha ausência;

As minhas amigas **Luíza Duenhas** e **Sônia Somera**, que tanto torceram e incentivaram, estando presentes nos momentos difíceis e compartilhando muitos, felizes; que tanto me mostraram sobre as pessoas, o respeito, a Arte, a multiplicidade das inteligências e a vida.

As queridas colegas do Laboratório de Biologia Molecular: **Magaly, Fátima, Ciça, Lara, Ana Lúcia e Érica, Paula, Vanessa, Rosana e Renata**, pelos excelentes momentos de convivência, onde um verdadeiro espírito científico, de trabalho, esforço, concentração e cooperação vigorava, independentemente da situação individual, fazendo de nossos laboratórios, os ambientes mais harmoniosos e de maior rendimento científico do Hemocentro. Meninas, o mundo é das mulheres!

A **Prof^a. Dra. Lígia Niéro-Melo**, por ter aceitado ser minha orientadora, no momento inicial e pela valiosa atenção a mim dispensada, nos momentos necessários. Agradeço-a, juntamente com a **Médica Assistente Lucilene Silva Ruiz e Rezende**, pelas amostras de mielograma, necessárias ao estudo.

Ao **Prof. Dr. José Mauro Zanine**, por possibilitar o contato com os doadores de sangue, para coleta de algumas amostras.

A **Bióloga Maria Aparecida Barros Agostinho**, do Hemocentro, e ao Departamento de Patologia, nas pessoas de **Dalva Aparecida Ferracine** e **Cilene Maria Carvalho Gandin**, por cederem amostras necessárias ao estudo.

A todos os amigos do Hemocentro, principalmente dos Laboratórios de Hematologia e Bioquímica Eritrocitária e especialmente àqueles que doaram diversos tipos de amostras para a realização desta pesquisa, sempre com muito bom humor e disposição em colaborar.

Um agradecimento especial ao **Técnico Laboratorial Amauri Benedito de Paula Assis** e a **Luciane Aparecida Caldera Lima**, funcionários do Hemocentro, que, além de doarem amostras, participaram de uma filmagem sobre as técnicas de extração de DNA, apresentada no Exame de Qualificação;

Ao **Senhor Beto Conte**, responsável pelo CEREM da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela filmagem e edição referida acima;

A **Carlos Eduardo Borgatto**, Auxiliar de Processamento do Departamento de Cirurgia, pelo tratamento visual dado às apresentações relacionadas a este trabalho;

À **Rita de Cássia Alvarado**, analista de sistemas do Hemocentro, que, mesmo dentro de suas inúmeras atribuições, me auxiliou na finalização do trabalho para o Exame de Qualificação;

A todos da Biblioteca do Campus de Botucatu, em especial **Rosângela Aparecida Soares** – Auxiliar de Biblioteca – pelo imenso carinho e atenção que dispensam a todos que necessitam de seus serviços;

Aos demais que participaram direta e indiretamente de todo o processo a culminar, e que por questão óbvia de se evitar o excesso, não foram citados.

**“Não existem atalhos para
qualquer lugar que
valha a pena”**

(Raul Garcia Bravo)

SUMÁRIO

Introdução e Revisão Bibliográfica.....	11
A) Aplicações Clínicas	17
- <i>Guthrie card</i>	18
- Células bucais.....	21
- Tecido fixado e incluído em parafina	24
- Células de sedimento urinário.....	28
- Bulbos capilares.....	30
- Outros materiais de arquivo e fontes escassas.....	31
B) Aplicações em Medicina Forense.....	33
Objetivos	38
Materiais e métodos,,,,.....	39
Obtenção das amostras.....	39
Extração de DNA.....	40
- Método 1.....	44
- Método 2.....	45
- Método 3.....	46
- Método 4.....	47
- Método 5.....	48
Avaliação dos métodos de extração.....	49
Eletroforese e visualização.....	52
Resultados obtidos.....	54
Resultados de espectrofotometria.....	54
Resultados de amplificação por PCR.....	55
Discussão.....	64
Conclusão.....	79
Referências bibliográficas.....	81
Anexo 1 (Procedimentos Operacionais Padrão).....	93
Resumo.....	123
<i>Abstract</i>.....	124

INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Quando a estrutura da molécula do ácido desoxirribonucleico (DNA) foi elucidada por Watson e Crick em 1953, nem mesmo os cientistas envolvidos com esses estudos, puderam vislumbrar a revolução que, algumas décadas depois, tal descoberta provocaria em várias áreas do conhecimento humano. Menos evidentes ainda, eram as aplicações potenciais dessa nova aquisição para a melhoria da qualidade de vida do público em geral (FARAH, 1997).

No final da década de 80, Kary Mullis descreveu uma técnica para amplificação enzimática de uma seqüência específica de DNA, visando a produção de milhões de cópias dessa seqüência em tubo de ensaio, denominada *Polymerase Chain Reaction (PCR)*, reação em cadeia da polimerase ou reação de polimerização em cadeia, em nossa língua.

Esse método tem revolucionado a genética molecular, pois possibilita uma nova estratégia na análise de genes por meio de um método simples e rápido de amplificação de seqüências (FARAH, 1997).

A PCR consiste na imitação, *in vitro*, do processo de duplicação do DNA. Uma ou mais fitas de DNA servem como molde (*template*), e têm uma dada seqüência gênica demarcada através de oligonucleotídeos – *primers* (cerca de 20 pares de bases) - que se anelam, por hibridação, às suas seqüências complementares, indicando o início e o fim do fragmento desejado, que passa a ser copiado, através do acréscimo, em ambas fitas do DNA molde, de nucleotídeos complementares presentes na reação, sob a ação de uma enzima polimerase do DNA termorresistente, proveniente da bactéria *Thermus aquaticus* (Figura 1).

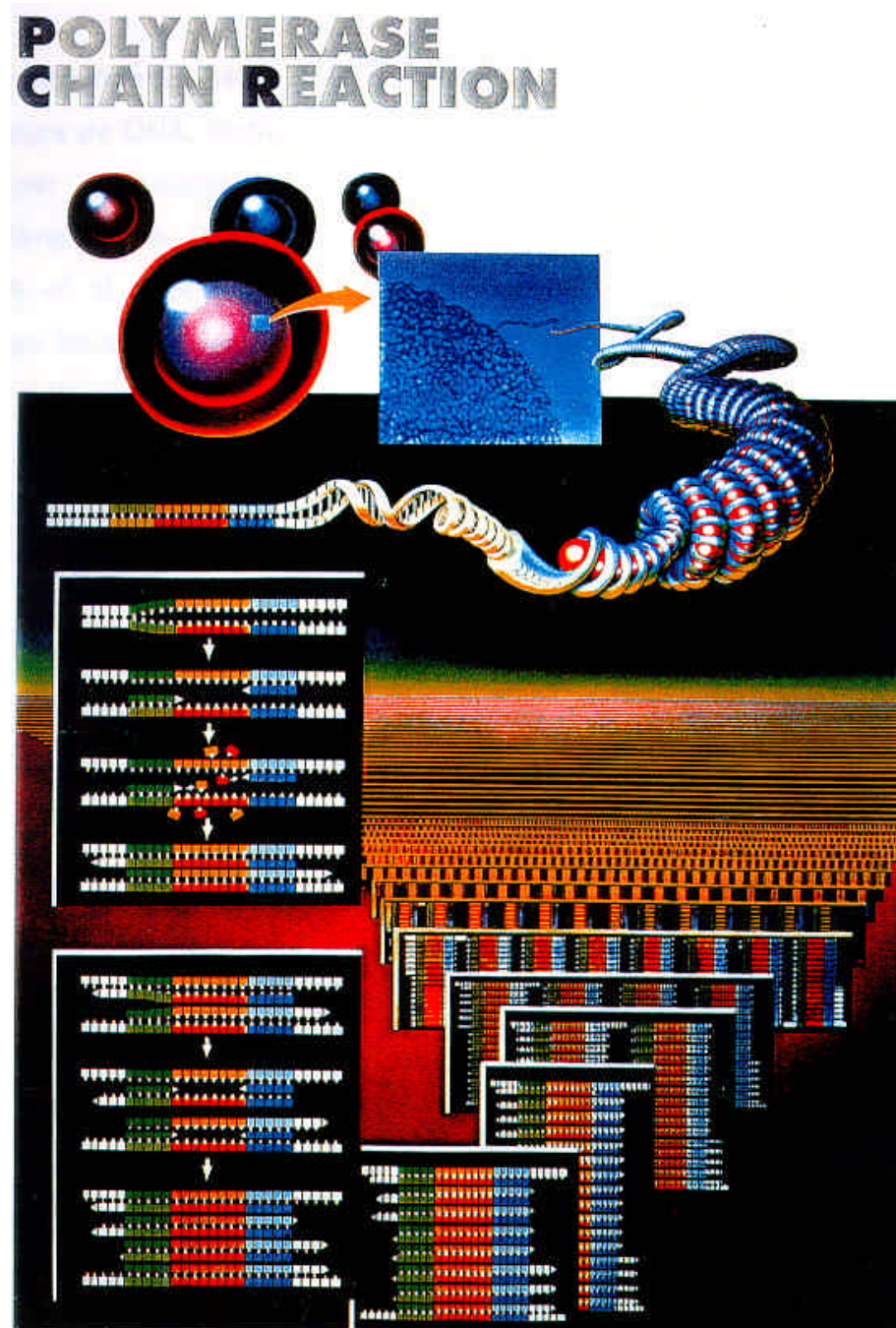


FIGURA 1 - Esquema ilustrativo da reação de polimerização em cadeia (PCR).

No laboratório, a preparação para tal reação ocorre em pequenos tubos do tipo *Eppendorf*, onde são adicionados o DNA molde, os quatro nucleotídeos necessários para a síntese dos novos fragmentos (dGTP, dCTP, dATP e dTTP), os *primers*, que são os oligonucleotídeos iniciadores, uma solução tampão, com condições adequadas de pH e salinidade, para que a reação ocorra e, por fim, a DNA polimerase (Figura 2).

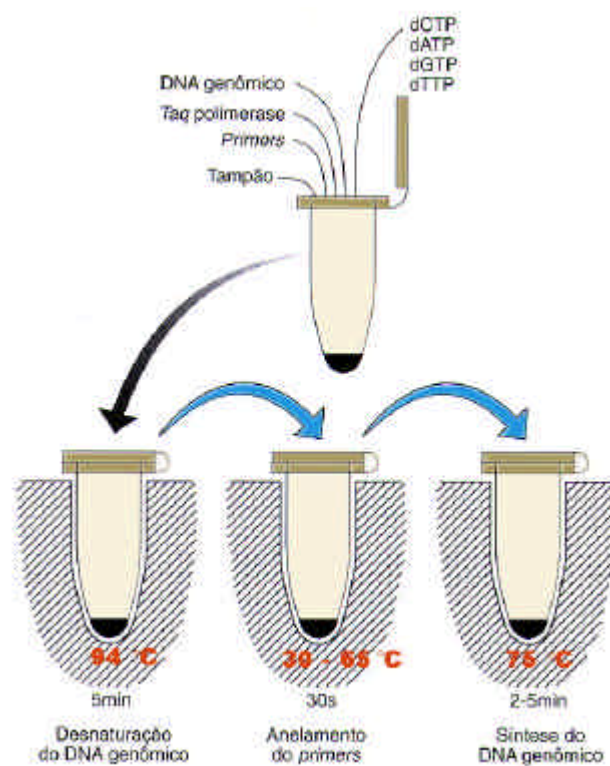


FIGURA 2 - Esquema representando os passos da reação de polimerização em cadeia no tubo de ensaio (in FARAH, 1997, pág. 124).

Com o auxílio de um aparelho denominado termociclador, ocorrem os ciclos de amplificação, que podem variar de 20 a 40 ciclos, dependendo da reação e outros fatores, vistos a seguir. Esses ciclos compreendem

oscilações de temperatura tais, que possibilitam que ocorram as seguintes fases da polimerização em cadeia do DNA molde:

1ª - desnaturação do DNA molde: 94°C por 30 segundos;

2ª - anelamento dos *primers*: em torno de 50°C por cerca de 30 segundos;

3ª - extensão do DNA, por acréscimo de nucleotídeos, ou síntese pela polimerase: 72°C, por 2-5 minutos. (Figura 3)

Esses ciclos podem ser precedidos por uma desnaturação inicial, a 94 °C, por 5 a 7 minutos, e sucedidos por uma extensão final de 10 minutos, a 72 °C.

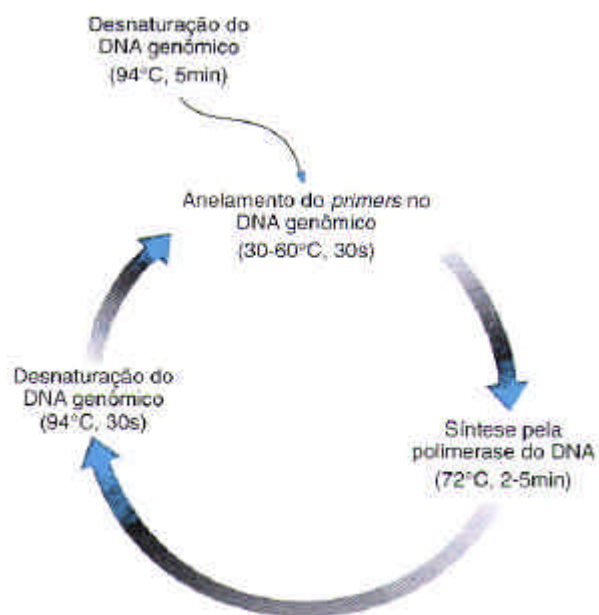


FIGURA3 - Esquema dos ciclos realizados na PCR. (in FARAH, 1997, pág. 124).

Os resultados dessa reação podem ser observados em gel eletroforético, seja de agarose ou poliacrilamida, banhado previamente em soluções reveladoras, sob luz ultravioleta, onde as cópias obtidas a partir do

fragmento demarcado, aparecem como bandas, sobre o gel, cujo tamanho é comparado a um padrão de peso molecular.

Além de rápido, esse método apresenta a vantagem de requerer quantidades muito pequenas de DNA. Teoricamente, a técnica pode ser eficaz até se realizada a partir de uma molécula de DNA proveniente de uma única célula, o que traz grandes vantagens no diagnóstico de várias doenças.

A sensibilidade da PCR tem sido ressaltada também na pesquisa de doença neoplásica residual mínima, com uma média de detecção de uma célula clonal em 2×10^5 células, superando, assim, outras técnicas utilizadas antes do advento da PCR (STETLER-STEVENSON *et al.*, 1988)

A Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) permite a amplificação de regiões do genoma, a partir de mínimas quantidades de DNA, mesmo que degradado (SAIKI *et al.*, 1988). Em vista disso, torna-se uma metodologia de escolha para a utilização em tecido fixado em formalina e incluído em blocos de parafina (SEPP *et al.*, 1994), além de outros materiais de arquivo e de fontes escassas de DNA, ampliando, assim, as possibilidades de utilização da técnica.

Realizando a PCR a partir de DNA extraído de fontes escassas e de materiais de arquivo tem-se, além de aplicações clínicas, utilidade para a Medicina Forense.

Os materiais de arquivo constituem-se basicamente de tecidos congelados ou fixados e incluídos em parafina; lâminas de mielograma, de esfregaço de sangue periférico, de análises citogenéticas, de exames ginecológicos preventivos; gotas de sangue em papel de filtro; etc. Tais materiais encontram-se arquivados nos diferentes serviços de um hospital, por meses, até anos, permitindo estudos retrospectivos (PERKINS & KJELDSBERG, 1993) e constituindo uma vasta fonte de tecidos humanos bem caracterizados (PROVAN *et al.*, 1992).

As fontes escassas de DNA podem ser fios de cabelo; gotas de esperma; resquícios de saliva; restos celulares em dentes arrancados ou sob unhas; sangue, ossos e tecidos de cadáveres decompostos; escarro, suco pancreático, bile e outros fluidos corpóreos que possam ser congelados e guardados, ou encontrados em diferentes situações; etc.

Concomitantemente com os avanços no emprego e na realização da técnica de polimerização em cadeia, os métodos de extração de DNA também passaram por um processo de aprimoramento, melhorias e adequações, de forma a serem empregados nos mais diferentes tipos de fontes potenciais, ampliando o campo de utilização da PCR.

Alguns autores (ARON *et al.*, 1994; WEGEL & HERRIN, 1994; SWEET & DIZINNO, 1996) descrevem técnicas de extração de DNA de fontes escassas ou de material de arquivo, mas, em sua maioria, estudam apenas um método para uma ou mais fontes.

A associação de mais de um método de extração de DNA para cada uma das fontes propostas para um estudo, pode resultar em ganho.

Pesquisar métodos alternativos que possam ser mais rápidos, práticos, baratos, livres de contaminação e de toxicidade e eficazes no que tange à quantidade, qualidade e possibilidade de amplificação por PCR, do DNA extraído, pode possibilitar a aplicação da pesquisa em outros estudos, como diagnósticos retrospectivos, identificação de indivíduos, estudos populacionais, envios de amostras à distância, etc..

De acordo com a bibliografia consultada, o método mais utilizado para a obtenção de DNA de diversas fontes, é o que inclui digestão por proteinase K, freqüentemente seguida de extração feita com fenol/clorofórmio. No entanto, esses métodos são trabalhosos e potencialmente tóxicos. Algumas modificações poderiam ser testadas, no sentido de facilitar o procedimento e minimizar os custos para utilização nos materiais disponíveis em um hospital

como o HC da UNESP de Botucatu, ou mesmo em outros locais e em diferentes circunstâncias.

Dois grandes campos de aplicação das técnicas de extração de DNA de material de arquivo e fontes escassas são a utilização Clínica e o uso em Medicina Legal e Forense.

A) APLICAÇÕES CLÍNICAS

O avanço no diagnóstico a partir do DNA tem sido causado pelo desenvolvimento da técnica da PCR e suas adaptações e nas melhorias e aperfeiçoamento da habilidade de extração de DNA e RNA a partir de fontes variadas.

Esses avanços técnicos têm contribuído para o desenvolvimento de grande número de formas efetivas de *screening* e descobertas de mutações pontuais, antes desconhecidas.

A PCR é uma técnica da Biologia Molecular que tem um grande potencial para a análise genética de tecidos. Isso inclui diagnóstico pré-natal rápido de doenças herdáveis (SAIKI *et al.*, 1988), detecção de doença residual (LEE *et al.*, 1987), detecção de clonalidade em lesões linfoproliferativas (Mc CARTHY *et al.*, 1990), identificação de mutações pontuais em protooncogenes celulares (HALIASSOS *et al.*, 1989), diagnóstico de infecções virais (LAURE *et al.*, 1988) e muitos outros.

No futuro, o desenvolvimento dessas tecnologias de estudo do DNA, associadas a outras da Biologia Molecular, poderá resultar em: diagnóstico automático a partir de DNA, facilitando a prática clínica; ênfase à bioinformática; estabelecimento definitivo da associação entre uma alteração genética específica e uma doença; explicações, dentro de base bioquímica, para muitas patologias; estratégias terapêuticas melhor direcionadas e até

mesmo oportunidade de terapia gênica dirigida para muitas desordens gênicas raras (McDONOUGH, 1999).

Tradicionalmente, o DNA usado para análises diagnósticas, baseadas em PCR, tem origem em leucócitos fracionados de sangue total. Embora esse método forneça quantidades substanciais de DNA, há alguns inconvenientes no procedimento, incluindo a obtenção do sangue, a exposição do pesquisador a patógenos contaminantes, manuseio de amostra líquida e, algumas vezes, o procedimento de extração envolvido (RICHARDS *et al.*, 1993).

O uso de materiais de arquivo permitem análises genéticas quando não há material fresco disponível.

A possibilidade de utilização de materiais de arquivo e fontes escassas como fornecedores de DNA amplificável por PCR, aumentou a aplicabilidade da técnica, com relação às várias frentes da medicina clínica.

Focalizando algumas dessas fontes e materiais de arquivo, assinalam-se as possibilidades:

- ***Guthrie card***

Também chamado de *card*, que pode ser substituído por papel de filtro, onde são colocadas gotas de sangue, dentre outros materiais, e encaminhados para serviços de Biologia Molecular (Figura 4).

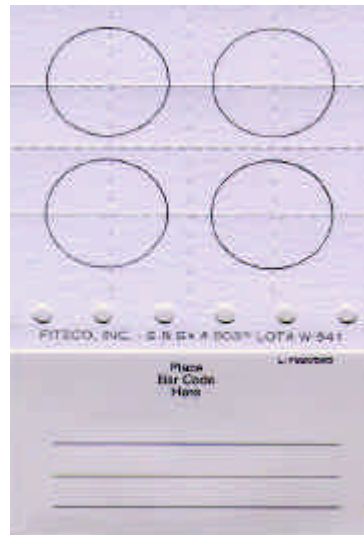


FIGURA 4 - Guthrie card. Deve-se observar que cada círculo é dividido em quadrantes, costumando-se pingar a gota de sangue, no cruzamento das linhas que os delimitam. Usa-se apenas um quadrante para extração de DNA para uma reação de amplificação.

Em muitos serviços neonatais (e até mesmo em bancos de doação de sangue), são tidos como materiais de arquivo, onde são colocadas gotas de sangue dos recém-nascidos para testes de doenças metabólicas. A extensão da utilização do *card* em outros serviços parece viável.

Com o surgimento de técnicas de extração de DNA a partir dessas gotas de sangue, percebeu-se que também poderia ser útil para o diagnóstico e estudo de doenças herdáveis, havendo grande destaque para fibrose cística, uma das mais citadas (MAKOWSKI & HOPFER, 1998; FELLOWES *et al.*, 1991; SANGIUOLO *et al.*, 1995).

CAGGANA e colaboradores (1988), utilizaram PCR *multiplex* para detecção de mutações de impacto em Saúde Pública, e concluíram que o DNA extraído do *card* é muito útil para laboratórios que processam grande número de amostras, principalmente os de *screening*; fragmentos gênicos

podem ser amplificados a partir de um corte de 1 mm², com menos de 1 µL de sangue total e, considerando que, material suficiente para outras reações permanecem no *card*, novas pesquisas podem ser feitas, particularmente, aquelas úteis para a correlação fenótipo-genótipo. Além disso, é ideal para o envio de amostras à distância, num caso onde há necessidade de um grande número de amostras ou estudo de populações refratárias à flebotomia.

Adicionalmente, a utilização do *card* para extração de DNA, consiste em método particularmente disponível nos países em desenvolvimento e regiões rurais isoladas, onde recursos são limitados. Grande número de amostras podem ser coletadas economicamente e enviadas para laboratórios de centros de referência, para análise genéticas ou sorológicas (CASSOL *et al.*, 1996).

Alternativamente, o sangue seco pode ser estocado e usado como um recurso de arquivo para estabelecer a freqüência e distribuição de mutações reconhecidas recentemente (como estabelecer um sistema de sentinela para o monitoramento sistemático da variação genética de agentes patogênicos, como o HIV-1) , confirmar a identidade de pacientes ou rastrear a origem e o surgimento de patógenos identificados recentemente (CASSOL *et al.*, 1996).

Os cuidados descritos para a utilização do sangue em *card* como fonte de DNA, são quanto à contaminação durante o tempo de estoque, de um *card* para outro, com o passar do tempo (JOHANSON *et al.*, 1997), o que pode ser evitado, protegendo-os com sacos plásticos (RASKIN *et al.*, 1992) e quanto à presença de inibidores de PCR (como albumina, proteínas contendo metais bivalentes, anidrase carbônica e hemoglobina), que se tornam mais fixados com o passar do tempo (MAKOWSKI *et al.*, 1996).

Quanto às condições de estoque, não são exigidas muitas regras, já que o DNA parece continuar estável, como demonstraram STROBEL e colaboradores (1998), que extraíram DNA de *card* arquivado há 12 anos, em

temperatura ambiente, para amplificação de segmento gênico de HIV-1, provando que um determinado paciente havia adquirido AIDS em uma transfusão sanguínea.

Os métodos descritos de extração de DNA de sangue fixado em *cards* são bastante simplificados e rápidos, baseados na utilização de resinas quelantes ou mesmo sendo utilizados fragmentos do *card* diretamente no tubo de reação de polimerização em cadeia (RASKIN *et al.*, 1992; DESCARTES *et al.*, 1992; POLSKI *et al.*, 1998).

Casos interessantes da utilização de gotas de sangue em *card* são descritos por alguns autores.

Houve relato da morte de um menino com evidência sugerida de defeito genético na beta-oxidação de ácidos graxos. O diagnóstico específico de deficiência na cadeia média da acetil-coA-desidrogenase, foi feita a partir da análise, por PCR, com DNA extraído de *card* de *screening* de recém nascido (CHRISTODOULOU *et al.*, 1993).

Pesquisadores utilizaram sangue seco em *card* de animais, para pesquisar a presença de *Theileria parva* através de métodos baseados em *seminested* RFLP-PCR, o que permitiu a investigação de extensa e dinâmica diversidade de populações do agente, no campo. Outros estudos moleculares, explorarão a estabilidade do genoma do microorganismo ao longo do tempo (GEYSEN *et al.*, 1999).

- **Células bucais**

Estas podem ser conseguidas através da raspagem da parte interna das bochechas, seja com hastes de extremidade revestida com algodão estéril, com outros objetos desenvolvidos para este fim (Figura 5), ou ainda

através de simples lavagem bucal com água estéril ou enxaguante bucal, como descrito por LUM & LeMARCHANT (1998).

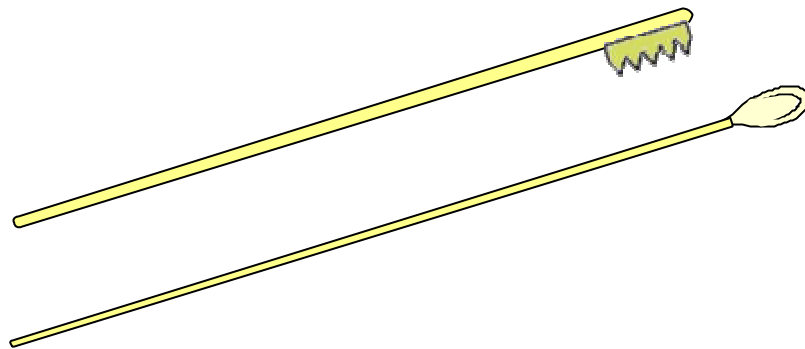


FIGURA5 - Esquema de um “raspador” e de um swab.

Caracterizando um método pouco invasivo, apresenta muitas das facilidades e aplicabilidades do *card*, descritas acima. Além disso, com ele, a coleta pode ser feita pelos próprios pacientes e/ou participantes da pesquisa e pode ficar estocado por meses antes da análise do DNA (LUM & LeMARCHANT, 1998).

Em alguns casos, como utilização de PCR para pesquisa sobre hemocromatose, o DNA extraído de células bucais, pode ser útil em casos onde as amostras de sangue contenham inibidores de PCR (SOLOWAY *et al.*,1999) e o DNA extraído de sangue pode não ser amplificável. A detecção de DNA de citomegalovírus por PCR (VEDYAKOV & DOLGIKH, 1998), herpesvírus por *nested* PCR (CATTANI *et al.*, 1999; POZO & TENORIO, 1999), *Helicobacter pylori* por *nested* PCR (DORE *et al.*, 1999), vírus da hepatite C (CALDWELL *et al.*,1996), HIV-1 por RT-PCR (QUERESHI *et al.*, 1997) e bactérias periodontopáticas (UMEDA *et al.*, 1998), dentre outros, é possível, a partir de saliva total ou células bucais. Dessa forma, a extração de DNA de células bucais pode ser utilizada para a pesquisa de infecção por agentes patogênicos presentes na cavidade oral.

CALDWELL e colaboradores (1996), realizaram um estudo sobre as formas de transmissão de um agente, verificando a presença de RNA do vírus da hepatite C na saliva, e em outros fluidos corpóreos, de pacientes que sofreram transplante de fígado. Apenas na saliva houve a detecção de tal ácido nucléico. Os pesquisadores concluíram que essa detecção é possível quando os níveis sanguíneos de RNA do vírus da hepatite C excedem 150×10^5 eq/mL. Não é certo se essas observações representam ou não um risco aumentado de transmissão da infecção durante o período imediato pós-transplante.

Pesquisas similares, buscando a presença de um agente em outras partes do corpo, que não as de transmissão, foram desenvolvidas para a detecção de expressão de DNA de herpesvírus em fluido de lavagem oral (WILBORN *et al.*, 1995) e de HIV-1 em células de mucosa oral (QUERESHI *et al.*, 1995; PIAZZA *et al.*, 1992) e os resultados de amplificação foram positivos, sugerindo que células epiteliais, em outras áreas do corpo, também podem ser infectadas.

Muitos estudos ainda devem ser feitos para se determinar a participação desses agentes na saliva, bem como a possibilidade de transmissão a partir de certas concentrações e quais as circunstâncias de maior vulnerabilidade do portador quanto a esses agentes, já que a técnica permite o monitoramento dessas infecções em indivíduos imunossuprimidos.

Os resultados de um ensaio, com PCR, para a detecção de *Helicobacter pylori* em biópsias gástricas, saliva e fezes, indicaram que a rota fecal-oral, pode ser uma forma importante de transmissão do agente em países em desenvolvimento, mas não tão significativa, como previamente suspeitado, nos países desenvolvidos, onde é mais provável a transmissão via oral-oral (FRIEDEZ & COQUOZ, 1996).

Além do estudo das implicações clínicas possíveis na expressão gênica de microorganismos na saliva e/ou cavidade oral, muitos estudos têm

sido realizados para aplicação em Medicina Forense e para a determinação da técnica ideal para a coleta e extração de DNA dessas fontes potenciais.

O método clássico de extração de DNA a partir de digestão com proteinase K e posterior extração com solventes orgânicos para essa fonte de DNA, vem sendo questionado, e modificações e substituições sendo sugeridas, como, após a digestão, haver apenas a utilização de uma resina quelante (SWEET & LORENTE *et al.*, 1996), ou suprimir o passo da digestão e utilizar apenas a resina (KLOOSTERMAN *et al.*,1993), ou ainda, a utilização direta da saliva total, sem extração prévia do DNA, para a PCR (YAMAMOTO & ISHIZU, 1995).

A placa dentária é uma outra fonte potencial de DNA, principalmente de microorganismos, presente na cavidade oral, e pode ser utilizada, como mostram os estudos de DORE (1999); AMANO (1999) e SONG (1999) e seus respectivos colaboradores.

- **Tecidos fixados e incluídos em parafina**

O estudo de tecidos parafinizados tem vantagem, por exemplo, sobre os congelados, pois os primeiros preservam uma qualidade morfológica superior e permitem análises retrospectivas (PERKINS *et al.*, 1993), além de serem numerosos, facilmente disponíveis e permitirem, em cortes seriados, a identificação de lesões precursoras de tumores invasivos (SUNDARESAN *et al.*,1993).

Para pesquisas envolvendo detecção ou mesmo diferenciação de microorganismos patogênicos, a utilização desse material de arquivo elimina a necessidade de culturas (van Der ZANDER *et al.*,1998).

Além do uso de PCR e outras técnicas de Biologia Molecular a partir desse material de arquivo, tem-se ainda a disponibilização de uma série de

novas informações, como a correlação entre a morfologia, a expressão fenotípica e a alteração gênica (KOPPER & KOVALSZKY, 1992).

Outra vantagem é que o DNA de tecido fixado e parafinado também pode servir para estudos de instabilidade de microssatélites, compreendendo uma vasta fonte de material para a construção de bancos de dados para identificação de indivíduos ou determinação da constituição genética de uma dada população (KULLMANN *et al.*, 1998).

O protocolo mais utilizado para a extração de DNA de tecidos fixados e emblocados em parafina, compreende, desparafinização da amostra por calor ou solventes, tratamento proteolítico – levando horas ou mesmo dias – sucedido, ou não, por purificação com solventes orgânicos (fenol/clorofórmio, principalmente) e precipitação com etanol (GOEZ *et al.*, 1985; IMPRAIN *et al.*, 1987; DUBEAU *et al.*, 1986; JACKSON *et al.*, 1990; WRIGHT *et al.*, 1990).

Embora sejam bem sucedidos na obtenção de DNA de alto peso molecular, para maiores quantidades de amostras, eles necessitam de vários passos e podem incluir transferências dos extratos de DNA a outros recipientes, ou ainda, procedimentos de lavagens. Esses passos adicionais, aumentam a chance de trocas de amostras, perdas e a introdução de contaminantes (WALSH *et al.*, 1991). Os solventes orgânicos utilizados são geralmente potencialmente perigosos e leva-se muito tempo para a conclusão do protocolo, caracterizando mais desvantagens (CALDARELLI *et al.*, 1999).

Na proposição de novos métodos de extração para esses materiais de arquivo, os autores ainda discutem, parecendo que há variação na padronização e reprodutibilidade dos protocolos, de um laboratório para outro, dada a grande sensibilidade da técnica quanto a fatores mínimos que possam ser influentes.

Vários são os passos que podem ser modificados para a obtenção de métodos mais rápidos e práticos para a obtenção de DNA amplificável. A

começar pela forma de obtenção dos cortes (CHEN & CLEJAN, 1993); a desparafinização, que, além de ser opcional (COATES *et al.*, 1991), se for feita, pode ser realizada através de calor ou lavagens com solventes como o xilol (COOMBS *et al.*, 1999) e o tempo de digestão por proteinase K (que pode variar de 1 hora a 5 dias) e a concentração desta, no tampão de digestão (DIAZ & BRADY, 1997; JACKSON *et al.*, 1990).

Uma grande utilidade dos cortes de tecidos fixados e parafinizados, é a busca de estabelecimento da associação de agentes patogênicos e cânceres e/ou estudos de expressões gênicas, potencialmente associadas.

Tentando correlacionar a presença de HPV, por PCR, em casos de carcinomas endocervicais, esofágicos e nasofaríngeos e para examinar a expressão do gene p53 em adenocarcinomas prostáticos e gástricos – bons exemplos de aplicação clínica - CHEN & CLEJAN (1993) desenvolveram uma técnica na qual o bloco de parafina é raspado com uma lâmina cirúrgica, no local desejado, sem que haja a necessidade de um micrótomo, e concluíram que a técnica é útil para as análises propostas. De forma geral, cortes de 7 a 10 μm , já são suficientes para ensaios com PCR.

Estudos assim, procuram associação entre a patologia (fenótipo) e as possíveis causas, sejam ambientais (como a presença de um agente patogênico) ou genéticas (mutações e alterações na expressão gênica).

De LAMBALLERIE e colaboradores (1994), em sua pesquisa, concluíram que o protocolo clássico, com remoção de parafina e digestão por proteinase K, foi mais sensível do que utilização de resina quelante, e que, um terceiro método, envolvendo remoção da parafina, digestão por proteinase K e fervura em resina quelante, antes da PCR, tornou o DNA mais suscetível ainda à amplificação.

Já SEPP e seus colaboradores (1994), correlacionaram o método de extração de DNA utilizado, o tamanho do fragmento gênico obtido e o

número de falhas na amplificação. Segundo seus estudos, na comparação entre os métodos de fervura da amostra em água, fervura em resina quelante e o método clássico, seguido de resina quelante, este último foi melhor sucedido na obtenção de DNA amplificável por PCR e também, na amplificação de fragmentos maiores (984 pb).

Estudando a amplificação de três fragmentos de tamanhos diferentes do gene para beta-globina humana, LIU *et al.* (1993), obtiveram que, mesmo utilizando o mesmo método de extração (o clássico) para tecidos fixados e emblocados em parafina, há variação no sucesso de amplificação de fragmentos gênicos cada vez maiores, ou seja, quanto maior o fragmento gênico a ser amplificado, menores as chances de sucesso de amplificação.

No Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro, UNESP – Botucatu, as tentativas de extração de DNA de tecidos incluídos em parafina tiveram resultados discordantes, havendo amplificação, em alguns momentos, enquanto que, em outros, não foram obtidos os mesmos resultados (PARDINI *et al.*, 1997).

As falhas no uso de tais amostras, não podem ser apenas atribuídas à ausência ou fragmentação das seqüências-alvo, mas podem ser um efeito direto do tipo de fixador, tempo e/ou temperatura de fixação usados (O'LEARY *et al.*, 1994). Além disso, outro fator a ser considerado, é o tempo de arquivo.

PAWLOWSKY (1995), conseguiu amplificação positiva de fragmentos de 788 pb e 977 pb do gene da amelogenina, em tecidos arquivados por dois anos, enquanto que PAVELIC *et al.* (1996), concluíram que tecidos fixados podem ser usados, com sucesso, para fragmentos de DNA menores que 318 pb, sempre que tiver menos de 39 anos de arquivo e, fragmentos maiores (720 pb), são amplificáveis, quando as amostras têm arquivo de 1 a 10 anos.

Portando, conhecer os procedimentos de fixação empregados nas amostras utilizadas, além do tempo de arquivo, é importante para a discussão de possíveis resultados negativos de amplificação.

- **Células do sedimento de urina**

Essas células caracterizam uma fonte potencial de DNA, que pode ser obtida de forma não invasiva, o que torna uma grande vantagem a sua utilização, que passou a ser melhor estudada nos últimos cinco anos.

Análise de microssatélites para detecção de câncer de bexiga (SCHNEIDER *et al.*, 2000), detecção de agentes causadores de DST, como: HPV (JACOBSON *et al.*, 2000), *Trichomonas vaginalis* (MAYTA *et al.*, 2000) e *Chlamydia trachomatis* (WILCOX *et al.*, 2000), são aplicações atuais do DNA obtido a partir de células do sedimento urinário.

SCHNEIDER *et al.* (2000), desenvolveram método sensível a partir de PCR associado a fluorescência para pesquisar alterações de microssatélites de DNA, correlacionados à presença de câncer de bexiga, no sedimento de urina, comparando com amostras pareadas de sangue periférico. A sensibilidade do teste para a detecção de câncer de bexiga, foi de 84%, permitindo, inclusive, o estadiamento da doença. O fator não invasivo combinado com a rapidez da técnica e a sensibilidade para a detecção de estágios iniciais, resulta em grande utilidade no diagnóstico de câncer de bexiga.

Um estudo comparou, por PCR, a perda de heterozigosidade do gene supressor de tumor p53, em amostras de biópsias de tumores de bexiga e sedimentos urinários de mesmos pacientes. A habilidade de detecção da perda de heterozigosidade a partir de células de sedimento urinário foi positivamente confirmada, oferecendo mais uma prática atrativa para

diagnóstico e prognóstico de pacientes com câncer de bexiga (FRIEDRICH *et al.*, 2000).

Testes no sedimento de urina para a detecção de agentes causadores de DST e sua prevalência, através de PCR, pode ser útil para a investigação epidemiológica e monitoramento de indivíduos infectados e do sucesso da terapia, apresentando-se tão sensíveis e específicos, quanto culturas obtidas através de *swabs* vaginais, podendo, inclusive, substituí-las. Além disso, suas comprovadas sensibilidade, especificidade e acurácia, o torna procedimento de escolha para diagnóstico de população de gestantes, com baixo risco e prevalência dessas infecções (JACOBSON *et al.*, 2000; MAYTA *et al.*, 2000; WILCOX *et al.*, 2000; GOPALKRISHNA *et al.*, 2000; PANUCO *et al.*, 2000).

A detecção de DNA do vírus da hepatite B na urina, pode indicar replicação viral ativa e infectividade. Devido ao fato de alta proporção de portadores crônicos desse vírus, ter DNA dele expressado na urina, independentemente do *status* imunológico de detecção do antígeno e anticorpos, sugere que a urina poderia ser uma via potencial de transmissão, a ser ainda investigada, como uma forma de transmissão horizontal e nosocomial do vírus da hepatite B (KNUTSON *et al.*, 2000).

Curiosamente, os cálculos renais, também podem ser utilizados para a detecção de agentes patogênicos através de PCR, independentemente da constituição deles e sempre quando os resultados das culturas a partir de urina forem negativos. A aplicação desse tipo de estudo, possibilitaria investigações posteriores da participação de infecções bacterianas na formação dos cálculos renais (HUANG *et al.*, 1999).

Os métodos de extração de DNA de tal amostra são muito discutidos devido à possível presença de muitos inibidores de PCR na urina. Dessa forma, autores discutem procedimentos de purificação do DNA obtido, geralmente a partir de adaptações básicas do método clássico de extração.

Novas pesquisas devem ser realizadas, para determinação de métodos ideais para utilização de células do sedimento de urina na técnica de PCR.

- **Bulbos capilares, cabelos e pêlos**

Considerados como fontes mínimas e alternativas de DNA, eles têm a vantagem de não causarem muita dor em sua obtenção e poderem ser enviados à distância, dentro de envelopes.

Sua origem pode ser do escalpo, sobrancelhas, cílios, pêlos dos braços, pernas, pubianos e perianais, havendo necessidade da presença dos bulbos, para que a extração seja bem sucedida.

A quantidade de DNA presente na raiz capilar, pode chegar a tão pouco quanto 0,5 µg, enquanto que, em cabelos encontrados desprendidos do couro cabeludo, pode conter menos de 10 ng (LUI *et al.*, 1990).

São úteis para os casos de seleção diferencial de expressão gênica através do tempo (SUE *et al.*, 1998) e, assim como as células bucais e de sedimentos urinários, têm potencial para avaliação do sucesso de transplante de medula óssea, no caso de inexistência de amostras anteriores.

O número de pêlos necessários para extração de DNA é bastante discutido e parece depender da técnica de Biologia Molecular a ser empregada, tamanho do fragmento pesquisado e método de extração utilizado. Recomendam-se estudos-piloto para a determinação da taxa de erro e da possibilidade de realização com determinados números de fios e técnicas empregadas (GOOSSENS *et al.*, 1998).

A amplificação de DNA de HPV, subtipos 6 e 11, a partir de pêlos perianais e pubianos, mesmo de pacientes com tratamentos bem sucedidos e sem lesões aparentes no momento da coleta, pode caracterizar um argumento de que o DNA deles persiste na região, sugerindo que os

indivíduos podem manter um reservatório endógeno, que pode ter um papel importante na recorrência de verrugas genitais (BOXMAN *et al.*, 1999). Outros agentes causadores de DST também podem ser pesquisados da mesma maneira, para melhor definição das causas de recorrência.

Outro estudo feito com a expressão de DNA de HPV em pêlos, inclusive de braços e pernas, obteve resultados tais que indicaram que o vírus está presente na pele da população em geral e também naqueles pacientes que apresentam epidermodisplasia verruciforme. Mas a prevalência do DNA do vírus foi maior nos pêlos obtidos de pacientes que passaram por transplante renal e estavam imunossuprimidos. Se existe a situação dose-resposta para o potencial carcinogênico da infecção por HPV, esta descoberta pode ser relevante para o aumento do risco de câncer de pele para esse grupo de indivíduos (BOXMAN *et al.*, 1997).

Um estudo exótico apresentou a determinação do sexo de tamanduás gigantes usando raízes dos pêlos e PCR para região determinante de sexo do cromossomo Y, já que a determinação por genitália externa é difícil (TAKAMI *et al.*, 1998).

Tais estudos, exemplificam aplicações possíveis para essa fonte escassa de DNA.

- **Outros materiais de arquivo e fontes escassas para aplicação clínica**

Os esfregaços de sangue, medula óssea ou outros tecidos, em lâminas de vidro, caracterizam materiais de arquivo disponíveis em laboratórios de análises clínicas, que podem servir à extração de DNA amplificável por PCR, ou útil para outras análises genéticas.

Utilizando a técnica clássica de extração de DNA de lâmina de esfregaço sanguíneo, obtém-se DNA que permite análises genéticas estáveis e biosseguras (TATSUMI *et al.*, 1997).

Esfregaços citológicos de bile e suco pancreático, podem ter suas células extraídas com tampão contendo proteinase K, sofrendo purificação posterior do DNA com fenol/clorofórmio e ampliações para detecção de mutações protooncogênicas. A vantagem é que detalhes citológicos e moleculares poderiam ser comparativamente avaliados sobre a mesma lâmina, assessorando o diagnóstico (FUKUSHIMA *et al.*, 1998).

Esfregaços de material cervical (Papanicolaou) podem ser utilizados como fonte de DNA, obedecendo os critérios e tempo de arquivo e tamanho do fragmento a ser amplificado. Quanto maior o tempo de arquivo, mais repetições dos procedimentos de extração são necessários para extrair DNA suficiente. O tamanho máximo de 200 pb do gene para beta-globina, foi obtido por de RODA *et al.* (1995), quando o tempo de arquivo era maior que nove anos.

GOPALKRISHNA e colaboradores (1992), assinalam que é possível a utilização de DNA desse material para diagnóstico de HPV, apenas submetendo-o a digestão por proteinase K e autoinativação da enzima em altas temperaturas, utilizando diretamente o extrato na reação de polimerização em cadeia. Além disso, o DNA extraído de apenas uma lâmina é suficiente para 4 testes diferentes de detecção, o que dá oportunidade para verificar a sensibilidade, especificidade e confiabilidade de cada teste, para o diagnóstico de HPV, sem necessidade de biópsia.

Aspirados de tumores sólidos feitos com agulhas finas, são esfregados em lâminas de vidro. Esse material, bem como as sobras que ficam dentro da agulha podem passar por métodos de extração de DNA para utilização em PCR (HARNETT *et al.*, 1989).

Fluidos corpóreos também podem ser fonte de DNA amplificável.

VOCHEM *et al.* (1998), pesquisaram, por PCR, a presença de DNA de citomegalovírus presente em fibroblastos excretados no leite materno e avaliaram, buscando uma associação, entre a taxa de excreção do vírus no leite materno, e a incidência e significância da transmissão pós-natal do CMV, de mães para recém-nascidos prematuros, sendo assim, a técnica pode ser empregada na determinação do período onde ocorreu uma lesão ou infecção.

A descoberta do DNA do vírus JC – causador da leucoencefalopatia multifocal progressiva – no fluido cerebrospinal de pacientes com esclerose múltipla, sugeriu, para FERRANTE *et al.* (1998), que o vírus pode ter participação na iniciação e/ou manutenção do processo etiopatogênico da doença e, portanto, nesse caso, deve ser monitorado. Num caso como esse, as técnicas de extração de DNA podem ser fundamentais para a determinação da participação de um agente patogênico no surgimento de doenças, antes não correlacionadas a ele.

Para todas essas fontes, métodos de extração de DNA ainda estão sendo pesquisados, logo, o método clássico de extração, tem sido o mais empregado.

B) APLICAÇÕES EM MEDICINA FORENSE

A PCR forneceu também novas aplicações na Medicina Legal, visto que, a obtenção de uma quantidade mínima de DNA, colhida na cena de um crime, pode identificar um criminoso; ainda, possibilita o estudo do DNA de plantas e animais fósseis datados com dezenas de milhões de anos.

Nesses casos, a PCR pode ser utilizada para:

- identificação de criminosos, a partir de resquícios celulares deixados na cena do crime;
- determinação de vínculo genético de filiação;
- identificação de indivíduos em catástrofes;
- constituição de bancos de dados genéticos.

Em algumas situações, não há disponibilidade de tecido fresco, em grandes quantidades, para as análises a serem feitas. Sendo assim, os métodos de extração de DNA sofreram aprimoramentos, de forma a obterem DNA suscetível à amplificação, a partir de fontes escassas.

Em cenas de crimes, as fontes escassas mais encontradas, são fios de cabelo, resquícios de saliva - no corpo da vítima ou em objetos - e sêmen, restos de células de pele sob unhas, gotas de sangue e, em alguns casos, fragmentos de dentes.

Dependendo do tipo de catástrofe ocorrida e dos danos causados ao material biológico a ser colhido para a identificação, as fontes de DNA podem variar, desde sangue, ossos, dentes e tecidos moles, a fios de cabelo. Além disso, os substratos para análise, podem ser material biológico decomposto, ou que exija cuidados especiais nos métodos de coleta e extração (HOFF *et al.*, 1999).

LORD *et al.* (1998), por exemplo, desenvolveram um estudo, no qual o sangue extraído do trato digestivo de piolhos, parasitas de pessoas voluntárias, serviu como fonte de DNA para PCR e posterior seqüenciamento gênico, cujos resultados foram comparados com os obtidos a partir de *swabs* orais.

Segundo eles, a determinação de técnicas de extração de DNA para casos como esse, tem sido buscada há anos, tanto pela entomologia médica (para estudos de doenças transmitidas por vetores), como pela medicina

forense (identificação de indivíduos a partir de insetos hematófagos, ou seus excretas, encontrados na cena do crime).

Uma das fontes escassas mais utilizadas pela medicina forense são os resquícios de saliva deixados na cena do crime.

Relatos curiosos de identificação de criminosos, a partir dessa fonte, foram fornecidos por diversos pesquisadores: SWEET & HILDEBRAND (1999), compararam os padrões de *locus* hipervariáveis do DNA do sangue do suspeito, com aquele obtido através de resquícios de saliva deixados num pedaço de queijo, na cena do crime; NAKANISH & HASHIMOTO (1997), determinaram o sexo e genotiparam, quanto ao sistema AB0, cinco indivíduos, com DNA obtido da borda de copos utilizados por eles; HOCHMEISTER *et al.* (1991) amplificaram DNA, obtido de saliva depositada em “bitucas” de cigarro, inclusive de duas, deixadas no local de dois crimes; ALLEN *et al.* (1994), discutem a extração de DNA amplificável, extraído de selos e envelopes, que receberam saliva; na Áustria, um suspeito foi condenado, baseado na tipagem de seu DNA, comparativamente com aquele encontrado no bocal de uma garrafa encontrada no local do crime (NEUHUBER *et al.*, 1995); SWEET & SHUTLER (1999), descreveram um caso, onde o corpo de uma mulher, vítima de estupro, foi encontrado submerso em um rio. Comparando-se o DNA encontrado nos genitais da vítima com aquele obtido de uma marca de mordida em seu corpo, a polícia selecionou os suspeitos e resolveu o caso.

Nesses casos, as técnicas de obtenção da amostra, são baseadas na utilização de *swabs*, úmidos ou secos, ou ambos. Para extração do DNA, apresentam o uso de resina quelante ou ainda, em alguns casos, comparam o rendimento de diferentes métodos (como, SWEET *et al.*, 1996).

Os fios de cabelo também são fontes escassas de DNA importantes para a medicina forense. Ressalta-se que eles, assim como todas as outras fontes de mesmo tipo, podem sofrer intempéries ambientais e agressões de

natureza química e física e que estudos – como o de SUN *et al.*, 1995 – são realizados, de forma a quantificar e qualificar o grau de degradação sofrido pelo DNA, nessas circunstâncias.

Para os outros casos de medicina legal, estabeleceu-se privilegiar métodos de extração de DNA de materiais que possam ser obtidos de formas cada vez menos invasivas, principalmente, fios de cabelo e *swabs* orais.

Ressalta-se que, para qualquer tipo de identificação, é necessária a existência de padrões comparativos, seja por filiação, por materiais de arquivos ou ainda bancos de dados organizados para este fim.

Futuramente, a arquivagem de material biológico, seja por *card*, ou outros, nos mais variados serviços, receberá maior ênfase, devido ao seu potencial de utilização na identificação de indivíduos, bem como, poderá ser observado, o surgimento de órgãos de monitoramento, controle e fiscalização de tal serviço.

BAECHTEL *et al.* (1991), descreveram os três sub-índices relacionados ao CODIS – *Combined DNA Index System* - norte-americano, o qual caracterizaria uma compilação e organização de banco de dados genéticos da população e estabeleceria uma fonte para identificação de indivíduos envolvidos em crimes.

Segundo eles, esse sistema comporia-se de:

- um banco de dados estatísticos, o qual conteria freqüências de fragmentos de alelos em vários grupos da população;
- um banco de dados investigativo, o qual capacitaria a ligação de crimes violentos comuns a um mesmo suspeito e
- um banco de dados de criminosos condenados, que serviria para manter os perfis de tipagem de DNA, para comparação com os perfis encontrados em cenas de crimes violentos, onde o suspeito fosse desconhecido.

Atualmente, pesquisas são direcionadas à implementação de métodos-padrão para a análise de diversidade e variabilidade no DNA de uma população.

Para tanto, estudos são realizados, baseados na identificação de polimorfismos, seja no DNA mitocondrial ou nuclear, através de técnicas de Biologia Molecular que buscam variabilidades, entre indivíduos, no comprimento de fragmentos de DNA tratados com enzimas de restrição (técnica RFLP), ou no número de repetições aleatórias de bases nitrogenadas, inseridas em locais específicos do genoma, conhecidas como *short tandem repeats* (STR), através de PCR *multiplex*, que pesquisa mais de um *locus*, numa única reação.

Uma variedade de bancos de dados gerais, regionais, ancestrais e étnicos estão disponíveis para estudo por PCR.






Polimorfismos genéticos entre grupos e subgrupos populacionais podem ser, agora, estabelecidos, em regiões específicas do DNA, bem como os eventos genéticos que os causaram, como transversões, inserções, adições, etc.

A associação e o grau de independência entre diferentes *loci*, podem ser determinados em amostras populacionais e comparados a outras.

Os dados de frequência e a determinação do perfil de *loci* múltiplos em várias populações, podem ser utilizados em análises forenses, testes de paternidade e até mesmo na busca de um doador com maior potencial.

Geralmente, observam-se maiores diferenças na frequência de perfis de DNA entre grupos raciais, do que entre subgrupos étnicos ou geográficos. Portanto, a escolha dos *loci* múltiplos a serem estudados para estabelecimento de um banco de dados, deve ser bastante criteriosa, e precedida por pesquisas que verifiquem a sua validade (MONSON & BUDOWLE, 1998).

OBJETIVOS

-  Testar diferentes métodos de extração de DNA a partir de material de arquivo e fontes escassas;
-  Avaliar os métodos de extração conforme rendimento do DNA obtido e sucesso na amplificação por PCR;
-  Inferir sobre o grau de degradação da amostra extraída, amplificando segmentos gênicos de tamanhos diferentes;
-  Determinar o método de extração mais adequado para cada uma das fontes de DNA testadas;
-  Incluir os procedimentos padronizados no POP (Procedimento Operacional Padrão) do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção das amostras

Através de abordagem adequada, os voluntários receberam as informações necessárias sobre a natureza da pesquisa, tais como: a utilização que teria sua amostra, qual o tipo de amplificação que aconteceria, o que seria possível concluir da amplificação ou não dos segmentos gênicos escolhidos, além de outras adicionais, quando foram requisitadas. Após, assinaram o termo de consentimento esclarecido, cujo modelo, encontra-se abaixo:

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA APLICADA (Modelo que foi utilizado)

Eu, _____, tendo sido satisfatoriamente informado que os objetivos principais dessa pesquisa é a comparação de métodos de extração de DNA de amostras escassas e material de arquivo, para melhoria dos serviços prestados pelo Laboratório de Biologia Molecular e facilitação das coletas de material; que o DNA retirado das amostras doadas por mim servirão para amplificações de genes constitucionais, apenas, e que, restando material após os testes, ou estes serão arquivados para novas pesquisas, frente a novo consentimento, ou incinerado, aceito colaborar com a pesquisa **“Extração de DNA de Materiais de Arquivo e Fontes Escassas para Utilização em Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)”** por Biologia Molecular, realizada sob responsabilidade/orientação de Dra. Elenice Deffune/ Dra. Maria Inês de M. C. Pardini, concordo em colaborar e informo não ter sido pressionado ou obrigado a participar. Estou também ciente que as responsáveis por esse trabalho estarão disponíveis para responder quaisquer dúvidas de minha parte e garantem total sigilo dos resultados. Também estou informado que o não consentimento de minha parte, não interferirá na qualidade do atendimento oferecido pelo Hospital das Clínicas – UNESP - Botucatu .

Botucatu, ____ de _____ de _____.

Assinatura do doador de amostra

Extração de DNA

As amostras que necessitavam de pré-tratamento, foram assim manipuladas:

a) tecidos incluídos em parafina:

Oriundos de material excedente dos blocos em preparação do serviço de Patologia do HC – UNESP - Botucatu (“acertos de cortes”).

O material era aleatoriamente escolhido, sendo que, a única padronização foi que os cortes tivessem 10 µm de espessura.

O pré-tratamento baseou-se na desparafinização prévia à extração de DNA, que foi feita através de duas a três lavagens seqüenciais de 15 minutos cada, à temperatura ambiente, com 1 mL de xilol histológico e reidratação com duas lavagens com 0,5 mL de álcool etílico absoluto cada. Entre uma lavagem e outra, o material era centrifugado a 10.000 rpm, por 3 minutos e o sobrenadante devidamente descartado.

(Observação: alguns testes de amplificação por PCR foram feitos com amostras sem desparafinização prévia à extração do DNA).

b) lâminas de mielograma:

Esses materiais foram doados para esta pesquisa, por serem excedentes no arquivo do Hemocentro.

O pré-tratamento baseou-se na raspagem do material da lâmina, com o auxílio de lâminas estéreis de bisturis, para dentro de tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL. Após teste-piloto, e devido a escassez de amostras, foi determinado o teste de extração nº 4 (vide ficha técnica nº 13, em anexo).

c) esfregaço de sangue periférico corado, ou não, com *Leishman*

Dos esfregaços corados, só eram selecionadas lâminas cujo hemograma já tivesse sido realizado há mais de um mês; dos não corados, as lâminas eram excedentes, cujo o hemograma da lâmina-par corada, já tivesse sido realizado. Ambos, escolhidos aleatoriamente.

Da mesma forma que nos mielogramas, o pré-tratamento consistiu na raspagem do esfregaço, com lâmina de bisturi, para dentro de tubos tipo Eppendorf, onde procedia-se a extração de DNA. Observa-se que, no caso das lâminas coradas, que já haviam passado por leitura microscópica, havia óleo mineral sobre elas, o que tornou necessária uma pré-lavagem em xilol histológico para sua eliminação.

No caso dos testes com o método de extração de DNA de nº 2 (vide ficha técnica de nº 11, em anexo), foi verificado se, hemólise anterior do material, favoreceria a amplificação por PCR do DNA assim extraído. Essa hemólise foi realizada da seguinte maneira:

- dois volumes e meio de solução NH_4Cl a 0,144 M, mais NH_4CO_3 a 0,01 M, na proporção de 9:1, foram acrescentados aos esfregaços raspados das lâminas. Após homogeneização, a mistura foi deixada 15 minutos, à temperatura ambiente, com inversão intermitente. Seguiu-se centrifugação a 2.000 rpm, por 10 minutos e desprezo do sobrenadante. O processo foi repetido, partindo do acréscimo de 1,5 mL da solução de lise.

d) gotas de sangue em *Guthrie Card*

Essas gotas de sangue foram doadas após consentimento livre e esclarecido dos doadores de sangue do Hemocentro. Eram colhidas a partir do sangue restante do segmento de bolsa (“macarrão”).

As amostras eram devidamente acondicionadas em envelopes próprios, contendo também, dois saquinhos com sílica, para evitar a umidade, de onde eram retiradas apenas para obtenção de uma pequena

parte (1/4 de cada gota colhida, que era recortada com uma tesoura ,limpa e colocado dentro do tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL) para os testes de extração e amplificação. As condições de estoque foram a 4°C, numa geladeira, ou à temperatura ambiente.

Para os testes de extração de DNA com o método nº 1, também foi realizada a hemólise de algumas amostras, da forma como foi descrita acima.

Dentre as amostras que consistem fontes escassas de DNA, foram testadas:

a) bulbos capilares:

Provenientes de um e três fios de cabelo, que eram retirados com pinça, e depois cortados na distância de 1 cm a partir do bulbo e colocados dentro de tubos tipo Eppendorf, de 1,5 mL.

Como foi observado que grande quantidade de tecido gorduroso envolvia os bulbos capilares, foi padronizado lavá-los com 500 µL a 1 mL de solução TKM-1, na qual eram deixados por 10 minutos, à temperatura ambiente, e após centrifugação a 10.000 rpm, por 5 minutos, era retirada com pipeta e descartada.

b) células bucais colhidas com swab:

Os dois tipos de *swabs* citados na introdução, foram utilizados neste trabalho.

Ao serem retirados da embalagem estéril, eram friccionados nas partes internas das bochechas, próximo às maxilas, pelo pesquisador ou pelo próprio coletor da amostra. O único cuidado tomado no momento da coleta, era que, se o doador tivesse ingerido algum alimento momentos antes da coleta, que enxaguasse a boca anteriormente.

Após a coleta, a haste do *swab* era cortada ou era desprendida da parte coletora, que era acondicionada em tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL.

b) sedimentos obtidos a partir de urina:

As células do sedimento urinário caracterizam-se como fontes escassas de DNA, pelo fato da urina ser um fluido de baixa celularidade relativa.

Observa-se que as amostras citadas acima foram doadas por voluntários, após consentimento livre e esclarecido, para a participação na pesquisa.

A urina era coletada em tubos do tipo Falcon, de 50 mL, onde os doadores procuravam preenchê-lo até a altura de 35 mL.

Testes de extração de DNA foram realizados a partir de alíquotas de 35 mL de urina, 2 mL e 1 mL.

Após inversões repetidas do tubo Falcon, alíquotas de 2 mL eram retiradas com pipeta automática ou de vidro e colocadas em tubos tipo Eppendorf de 2,0 mL. Após 5 minutos de centrifugação a 14.000 rpm, o sobrenadante era descartado e o botão de células recebia 0,5 a 1 mL de solução TKM-1, vórtex até dissolver-se, nova centrifugação, como a anterior e descarte de sobrenadante. Dessa forma, as amostras podiam passar pelos métodos de extração.

A urina utilizada, por ser estocada por alguns dias dentro da geladeira, apresentava consistência alterada e formação de uma série de precipitados. Para possibilitar o seu uso, era colocada em banho-maria a 37°C, para dissolução dos precipitados.

Para cada uma das fontes, dentro de cada um dos diferentes métodos, foram feitos, no mínimo, dez testes de extração. Para tanto, após pré--

tratamentos e adequações para obtenção de DNA, seguiram-se, preferencialmente, os seguintes métodos:

Método 1 – digestão por proteinase K, seguida por fenol e clorofórmio

Após os pré-tratamentos das amostras, feitos em tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL, eram acrescentados 98 μ L de tampão de digestão por proteinase K (vide ficha técnica nº 22, em anexo) e 2 μ L de proteinase K a 20 mg/mL, perfazendo um total de 100 μ L de tampão de digestão. A mistura, então era incubada em banho-maria a 56 °C, por três horas. A inativação da proteinase K, acontecia por fervura em banho-maria, a 100 °C, por 8 minutos.

A precipitação do DNA era feita com 1 V de fenol (5 minutos, à temperatura ambiente, agitando) e 1 V de álcool isoamílico: clorofórmio (1:24) (mais 5 minutos à temperatura ambiente, agitando), seguida por centrifugação, por 5 minutos a 10.000 rpm, em microcentrifuga; a fase aquosa era transferida para novos tubos, onde eram adicionados 1/10 V de acetato de sódio a 3 M e mais 2 V de etanol 100%. Para precipitação do DNA, as amostras eram deixadas de 2 horas a toda noite, na temperatura de – 20 °C. Seguia-se nova centrifugação, a 14.000 rpm, por 10 minutos, descarte do sobrenadante, e secagem do DNA à temperatura ambiente, ou com a utilização de um *Speedvac*.

O DNA era, então, diluído em 50 μ L de água estéril, estando pronto para passar pelos testes de espectrofotometria e PCR.

Trata-se de um método muito utilizado, o qual apresenta muitas variáveis, principalmente quanto ao tempo de incubação, concentração da enzima e ao tampão de digestão.

Neste estudo, o método de extração de DNA por digestão com proteinase K, seguida por fenol/clorofórmio, foi alterada com relação ao tampão de digestão (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM de EDTA, pH 8; NaCl a

5 M e SDS a 0,5%); ao tempo de incubação para digestão – que, passou a ser de, no mínimo 12 horas e, no caso de tecidos parafinizados e bulbos capilares, chegou a 48 horas; e quanto à utilização de fenol e clorofórmio para extração subsequente.

Com relação a este último item, foi decidido testar um outro tipo de extração de DNA por digestão com proteinase K, já empregado no Laboratório de Sequenciamento Gênico do Hemocentro, que não incluía a purificação do DNA com fenol e clorofórmio, criando assim, uma nova oportunidade de testes, dentro da mesma variável, a digestão por proteinase K.

Alíquotas de 20 μL ou concentrações de 1 μg de DNA por 100 μL de tampão de reação foram utilizadas como *template* para PCR.

Testes-piloto foram realizados, utilizando diretamente o extrato após a digestão pela enzima, sem que houvesse purificação com os solventes orgânicos (SEPP *et al.*, 1996; AUSUBEL *et al.*, 1992), mas os resultados não foram conclusivos a ponto de se considerar um método de escolha para este estudo.

Método 2 – digestão por proteinase K (seguida por *salting-out*)

O protocolo foi extraído do *Paternity Testing Procedures for Use With the Life Tissues*, elaborado pelo FBI e consta de:

Após os pré-tratamentos devidos, eram acrescentados 790 μL do tampão, mais 10 μL de proteinase K a 10 mg/mL. A incubação era feita em banho-maria a 55°C, por toda noite. Os restos celulares eram decantados, após centrifugação a 12.000 rpm, por 10 minutos.

O sobrenadante era transferido para novos tubos tipo Eppendorf, e 400 μL de cloreto de lítio a 7,5 M eram acrescentados. A mistura era colocada em congelador, por 30 minutos, para garantir a precipitação da

proteínase K. Nova centrifugação a 14.000 rpm, por 15 minutos, e o sobrenadante era colocado em tubo de hemólise estéril, identificado. Nesse tubo, eram colocados 2 mL de álcool etílico absoluto, e deixados a – 20°C de duas a 24 horas. A centrifugação subsequente era a 2.000 rpm, por 15 minutos, e o sobrenadante desprezado, deixando-se aproximadamente, 200 µL no tubo, para ressuspensão do DNA e sua transferênciã para tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL.

Um mililitro de álcool etílico a 70% foi acrescentado, nova centrifugação a 10.000 rpm, por 5 minutos, e o DNA estava pronto para secar à temperatura ambiente e ser diluído em 50 a 100 µL de água estéril, para ser encaminhado aos testes.

Com o passar dos testes, foi percebido que, para uma digestão mais eficiente, era necessário aumentar a concentração da proteínase K. A enzima passou a ser preparada na concentração de 20 mg/mL.

Método 3: fervura em resina quelante (Chelex 100®)

Técnicas de extração que utilizam a resina quelante Chelex 100® (Bio Rad) são citadas na literatura científica (SEPP *et al.*, 1996; SHIBATA, 1994). Essa resina quela íons que são catalisadores na quebra do DNA, e é possível que se ligue a outras substâncias - como produtos derivados do sangue - que inibam a PCR (AUSUBEL *et al.*, 1992).

Nesse trabalho, a extração foi feita incubando em banho-maria, a 56°C, amostras de tecido (após desparafinização) e de lâminas de hemograma não coradas, com 100 µL dessa resina, a 5%, por 30 minutos, em seguida, fervura em banho-maria, por 8 minutos (inativação) e centrifugação a 14.000 rpm, por 5 minutos. Alíquotas de 20 µL foram utilizadas para amplificação (EDWARDS *et al.*, 1992).

Chelex 100® (Bio Rad) é uma resina que vem em pó, necessitando ser diluída antes do uso. Além disso, a diluição tem que ser feita com, no máximo, uma semana de antecedência; após esse prazo, sua atividade é prejudicada e a confiabilidade nos resultados, diminuída (observado em testes-piloto).

Outras resinas quelantes, como Chelex 100® (Bio Rad), estão disponíveis no mercado. Uma delas, a InstaGene Matrix® da BioRad, estava sendo testada no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro, para a extração de DNA de tecidos tumorais. A extensão de seu uso para materiais de arquivo e fontes escassas de DNA foi considerada (mesmo não sendo indicada pelo fabricante, constituindo o 4º método, descrito a seguir).

Método 4 – fervura em resina quelante (InstaGene Matrix®)

A resina InstaGene Matrix® (Bio Rad), já vem diluída, pronta para uso. Para utilizá-la, foram seguidos os seguintes passos:

Nas amostras pré-tratadas dentro de tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL, eram colocados 20 µL de água estéril, e após, 200 µL de InstaGene, não deixando de agitar o frasco da resina, durante a pipetagem.

Após vórtex e centrifugação rápida, a incubação era feita em banho-maria a 56°C, por 20 a 30 minutos.

Seguindo a ação da resina, novos vórtex e centrifugação eram realizados, para após, inativar a resina através de fervura em banho-maria, por 8 minutos.

Vórtex por 10 segundos, centrifugação a 10.000 rpm, por 3 minutos e 40 µL do sobrenadante eram utilizados como *template* para as PCRs (quantidade estipulada através de testes-piloto).

No caso do DNA extraído de lâminas de hemograma, foram feitos testes de amplificação onde, em vez de serem usados 40 μL do extrato com InstaGene, após a mensuração por espectrofotometria, foram usadas quantidades de extrato que correspondiam a 1 μg de DNA por 100 μL de reação final, para verificação da influência da quantidade de extrato colocada na PCR.

Além disso, foi verificado, nessas amostras, se a presença da resina no tubo onde a amostra era estocada a -20°C , prejudicaria a utilização posterior da amostra, bem como se o tempo de estoque influenciaria na possibilidade de amplificação do DNA obtido com InstaGene.

Para tanto, amostras foram guardadas com ou sem resina precipitada no fundo do tubo tipo Eppendorf e, após 10 dias de estoque, foi feito novo teste de amplificação por PCR; no segundo caso, duas amostras guardadas por mais de dois anos, foram também testadas para amplificação.

Método 5 – fervura em água estéril (SEPP *et al.*, 1994)

Autores sugerem a fervura direta em água estéril como método de extração de DNA de tecido fixado e emblocado em parafina (WEGEL & HERRIN, 1994; SEPP *et al.*, 1994; SWEET *et al.*, 1996). Foi pesquisado o quanto esse método seria também aplicável a outras fontes de DNA.

As amostras, após os devidos pré-tratamentos, eram fervidas em banho-maria em 100 μL de água estéril, por 10 minutos. A amostra fervida era adicionada diretamente à mistura de PCR, sendo usados 50 μL como *template*.

Os testes dos métodos de extração de DNA partiram dos métodos mais simples, rápidos e de menor custo, para os mais complexos, assim eliminando testes desnecessários, caso bons resultados já fossem obtidos.

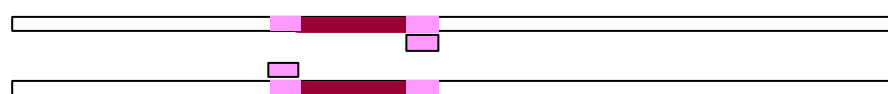
Avaliação dos métodos de extração

Além das análises quantitativas, feitas por espectrofotometria, a qualidade do DNA obtido pelos métodos de extração pesquisados e a eficiência dos procedimentos de tais métodos, foram avaliados utilizando o DNA obtido como *template* em reações de PCR.

Um fator de grande influência na possibilidade de amplificação do DNA extraído por PCR, é o seu grau de fragmentação. Muito do DNA é degradado no processo de fixação e extração, portanto, o DNA-alvo da PCR deve ser um fragmento menor que 400 pb (SHIBATA, 1994). Para solução de tal problema, a literatura a respeito sugere alterações nos ciclos de amplificação, aumentando a sensibilidade da reação, para detecção de fragmentos maiores (COATS *et al.*,1991). Tendo sido detectada tal necessidade, lançou-se mão do recurso.

Três *loci* constitucionais foram escolhidos como parâmetros de avaliação do grau de degradação do DNA oriundo dos materiais de arquivo e das fontes escassas (Figura 6):

- segmento do gene BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*) de 764 pb;
- segmento do gene FV (fator V da coagulação sanguínea) de 220 pb e
- segmento do gene ABL (Abelson; protooncogene localizado no cromossomo 9) de 106 pb.



Fragmento do gene ABL (106 pb)



FIGURA 6 - Representação esquemática dos fragmentos gênicos a serem amplificados como parâmetro indicativo do grau de degradação de DNA extraído.

Os ciclos de PCR foram aumentados: no caso da reação para amplificação do fragmento do gene BDNF, para tecidos frescos, indicam-se 30 ciclos de amplificação, mas, no caso deste trabalho, os ciclos foram aumentados para 40; com relação aos ciclos para o segmento gênico do FV, estes passaram de 30, para 35.

Os testes, preferencialmente, iniciavam pela tentativa de amplificação para BDNF, não amplificando, passava-se para testes com FV e, em caso de não amplificação, para ABL.

A mistura de reação para amplificação de BDNF consistiu em: 100 mM de *primers* BDNF-1 (5' AUG GAG AUC CCU GGA TCC ATG ACC ATC CTT TTC CTT 3') e BDNF-2 (ACG CGU ACU AGU GGA TCC CCT TTT AAT 3'); 200 µM de desoxinucleotídeos; 2,5 U de Taq DNA polimerase (Pharmacia®); 20 mM Tris-HCl e 1,5 mM MgCl₂.

Após a preparação da reação, a amplificação em termociclador (Perkin-Elmer®) para o segmento BDNF foi em 40 ciclos, com temperatura de desnaturação de 94°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 90 segundos. Extensão final a 72°C por 10 minutos.

Para amplificação do FV, a mistura de reação foi 400 ng de *primers* FV1 (5' CTT AAG GAA ATG CCC CAT TA 3') e FV2 (5' CCA TGC TTA ACA AGA CCA); 0,2 mM de desoxinucleotídeos; 2,5 U de Taq DNA polimerase (Pharmacia®); tampão Tris-HCl (pH7,5) a 10 mM, KCl a 50 mM e MgCl₂ a 1,5 mM.

A reação de amplificação foi realizada em 35 ciclos, com desnaturação a 94°C, por 40 segundos, anelamento a 57 °C, por 40 segundos e extensão a 72°C, por 2 minutos. Os ciclos foram precedidos por desnaturação inicial a 94 °C, por 7 minutos e sucedidos por extensão final a 72°C, por 7 minutos.

Caso fosse necessária, a amplificação para o gene ABL, a mistura para sua reação era: 150 nM de *primers* abl₂ (5' ATC TCC ACT GGC CAC AA 3') e c- abl₂ (5' AGT GAA GCC GCT CGT T 3'); 400 μM de desoxinucleotídeos; 1 U de Taq DNA polimerase (Pharmacia®); 20 mM Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM de KCl e 1,5 mM MgCl₂.

A PCR para esse segmento era em 35 ciclos, com temperatura de desnaturação de 94°C por 25 segundos, anelamento a 49°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Extensão final a 72°C por 10 min.

O êxito na amplificação do DNA extraído, por qualquer um desses três pares de *primers*, implicaria na possibilidade de utilização dos métodos de extração de DNA de materiais de arquivo em vários tipos de pesquisa.

Eletroforese e visualização

Os processos eletroforéticos foram evoluindo durante o estudo, sofrendo modificações durante o processo, até ser estabelecido um método que pudesse ser considerado pelos pesquisadores do Laboratório, como o ideal.

Para *amplicons* dos fragmentos dos genes BDNF e FV, foram utilizados géis de agarose em concentrações de 3,0% e 1,5%, com diluição feita em tampão TEB 0,5 X. As corridas eram feitas a 80 a 120 Voltz por 30 a 50 minutos. O tampão de corrida eletroforética também era TEB 0,5 X.

Quando os resultados eram inconclusivos, ou havia necessidade de amplificação com gene ABL, a eletroforese era então feita em gel de poliacrilamida 4 a 6%.

Após a eletroforese, o gel era corado com brometo de etídio e visualizado em luz U.V., e o resultado era sempre semelhante aos mostrados na figura 7, onde a **FOTO A** apresenta eletroforese em gel de agarose, a 1,5%, mostrando bandas de comprimentos 169 pb, 136 pb e 97 pb. A **FOTO B**, apresenta os mesmos fragmentos, no gel de poliacrilamida 5% (Gentilmente cedidas por TORALLE-PEREIRA, C.).

FOTO A



FOTO B

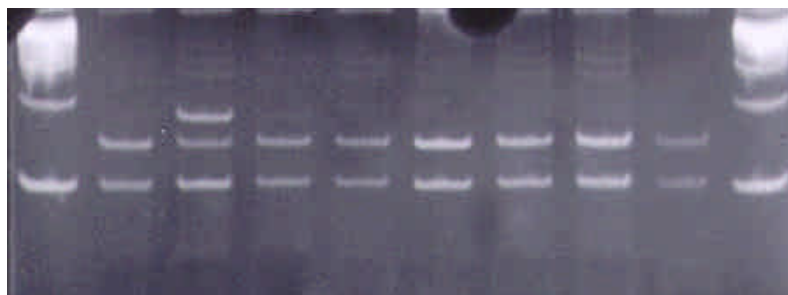


FIGURA7 - Comparação entre os resultados eletroforéticos.

RESULTADOS OBTIDOS

RESULTADOS DE ESPECTROFOTOMETRIA

Cada teste de extração foi feito com um grupo de 10 amostras, para cada um dos 5 métodos de extração de DNA testados.

Após os procedimentos de extração, as amostras tiveram suas concentrações obtidas por espectrofotometria. Os resultados são demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Rendimentos espectrofotométricos dos extratos de DNA obtidos

CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)					
	Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Método 5
Material de Arquivo:					
Tecido parafinado	0,219*	0,202	0,178	0,151	0,164
Lâmina não corada	-	0,085	1,747	1,830	2,670
Lâmina corada	0,094	0,137	-	0,149	0,269
Sangue em <i>card</i>	0,722	0,135	-	0,957	1,197
Mielograma	-	-	-	0,200	-
Fontes escassas:					
1 bulbo					
3 bulbos	0,174	0,136	-	0	-
<i>Swab</i> bucal	0,138	0,094	-	0,066	-
Urina	0,160	0,168	-	0,179	0,185
	0,586	0,168	-	0,049	-

*Resultados das concentrações médias - $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - de DNA obtidas em cada grupo de 10 amostras, com extração de DNA feita com cada um dos 5 métodos.

RESULTADOS DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR

Para cada uma das fontes de DNA propostas, dentro de cada um dos diferentes métodos de extração, foram feitos preferencialmente, 10 testes de extração. Os métodos de extração, os pré-tratamentos das amostras e as mesmas são descritos detalhadamente no item materiais e métodos.

Tabela 2 - Resultados obtidos nos testes de amplificação para cada um dos segmentos gênicos utilizados (BDNF, FV e ABL), tendo em vista o método de extração empregado e a fonte de DNA

MÉTODO 1			MÉTODO 2			MÉTODO 3			MÉTODO 4			MÉTODO 5			AMOSTRAS
BDNF	FV	ABL	BDNF	FV	ABL	BDNF	FV	ABL	BDNF	FV	ABL	BDNF	FV	ABL	
0/10*	10/10	-	0/10	10/10	-	0/10	6/10	0/4	0/10	9/10	1/1	0/10	10/10	-	Material de Arquivo:
-	-	-	0/10	0/10	0/10	9/10	1/1	-	8/10	1/2	-	9/10	1/2	-	Tecido parafinado
0/10	0/10	-	8/10	2/2	-	-	-	-	2/10	5/8	0/3	0/10	7/10	3/3	Lâmina não corada
0/10	0/10	0/10	0/10	2/10	0/10	-	-	-	5/10	5/5	-	0/10	10/10	-	Lâmina corada
-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/3	1/1	-	-	-	-	Sangue em <i>card</i>
10/10	-	-	2/10	8/10	-	-	-	-	0/10	10/10	-	-	-	-	Mielograma
9/10	1/1	-	8/10	2/2	-	-	-	-	4/10	6/6	-	-	-	-	Fontes escassas:
0/10	-	-	10/10	-	-	-	-	-	5/10	5/5	-	1/10	-	-	1 bulbo
5/5	5/5	-	1/10	0/9	-	-	-	-	8/10	2/2	-	-	-	-	3 bulbos
															Swab bucal
															Urina

* Nas frações, o numerador representa o número de amplificações por PCR positivas, enquanto o denominador, o número de testes feitos.

Alguns testes paralelos foram feitos à medida que os dados deste trabalho iam sendo obtidos.

Com as amostras de tecido incluído em parafina, utilizando extração de DNA por digestão com proteinase K, sem extração posterior com fenol/clorofórmio (método 2), foi testado se a desparafinização era realmente um passo decisivo na obtenção de sucesso na amplificação por PCR. Das dez amostras não desparafinizadas, que passaram pela extração de DNA pelo método 2, nenhuma amplificou para o fragmento gênico de BDNF e apenas duas amplificaram para FV. Portanto, a desparafinização é um passo importante na utilização de tecido incluído em parafina como fonte de DNA.

Tentativas também foram feitas de usar o tecido digerido pela proteinase K diretamente na PCR, com ou sem inativação da enzima por fervura em banho-maria, por 8 minutos, mas, em ambos os casos, os resultados de amplificação foram negativos.

Foi feita uma eletroforese em gel de agarose 2% para visualizar a fragmentação do DNA obtido de tecido parafinado com a digestão por proteinase K, seguida de purificação com fenol e clorofórmio e os resultados são observados na figura 8, onde nas pistas 2, 3 e 4, o DNA apresenta grande fragmentação ao ser comparado com um DNA de peso molecular conhecido; nas pistas 7 e 8, além de muito fragmentado, o DNA apresenta-se em quantidade baixa. Já nas pistas 5 e 6 o DNA extraído apresenta grande fragmentação, mas mantém certa quantidade de fragmentos maiores.

1 2 3 4 5 6 7 8

FIGURA 8 - Foto de eletroforese em gel de agarose 2% de 7 amostras de DNA extraído de tecido incluído em parafina, com o método 1, para verificação de degradação do DNA.

Com os esfregaços de sangue periférico em lâminas para hemograma, não coradas com *Leishman*, os métodos com resinas quelantes (Chelex 100® e InstaGene® – métodos 3 e 4, respectivamente), obtiveram os melhores resultados. As amostras de DNA extraído pelo método 2, não obtiveram sucesso em nenhuma amplificação testada, mas, após suas amostras sofrerem purificação com InstaGene® (BioRad), seguindo o método padronizado para as outras amostras, observou-se que o DNA passava a amplificar para o segmento gênico de FV, mas continuava não amplificando para BDNF.

Já o DNA extraído de lâminas de hemograma coradas com *Leishman*, curiosamente, apresentaram melhores resultados na amplificação para BDNF quando havia sido extraído através de digestão por proteinase K, sem fenol e clorofórmio, posteriormente. A utilização de InstaGene® na extração, foi sempre bem sucedida quanto à amplificação para o segmento do gene

FV. Quanto ao método 1 de extração de DNA e a fervura em água estéril, não foram bem sucedidos em nenhuma amplificação.

As gotas de sangue em *Guthrie card*, também apresentaram resultados de amplificação para o segmento de BDNF, todos negativos, quando a extração se deu por digestão com proteinase K, seguida de fenol e clorofórmio (método 1); após tratamento com InstaGene, as amostras amplificaram, apenas para FV.

Observando os resultados na Tabela 2, tem-se que a extração de DNA com o método 2, também não foi bem sucedida com relação às amplificações por PCR, mas quando esses extratos foram pós-purificados com InstaGene, 8 amostras, de 10 testes, tiveram sucesso na amplificação para o segmento de FV, mas o resultados permaneceram negativos para BDNF.

No caso dessas amostras e das de lâmina de hemograma não coradas, foi testado se hemólise prévia influiria nos resultados de amplificação, principalmente quando os métodos de extração de DNA empregados eram 1 e 2. Em ambos os casos, esse pré-tratamento não teve influência.

A fervura em água estéril para extração de DNA de gotas de sangue em *Card*, apresentou resultados diferentes daqueles de lâminas de hemograma não coradas; enquanto, nestas últimas, houve amplificações positivas para BDNF, nas primeiras, nenhuma. Em ambos os casos, a amplificação para fragmento de FV foi bem-sucedida.

Em 1996, no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu, foram realizados 3 testes-piloto com lâminas de mielograma, mas os testes de amplificação foram para o segmento do gene ABL, como pode ser observado na Figura 9, que está mostrando nas pistas 1, 2 e 3 bandas do gene ABL, amplificadas a partir de DNA extraído de mielogramas pelos

métodos fervura em água, Chelex 100® e InstaGene®, respectivamente. Como, para este estudo, só foram conseguidos 3 mielogramas, em vista dos resultados com lâminas de hemograma não coradas e gotas de sangue em *Card* e considerando os testes-piloto, o método de escolha para extração de DNA desse material foi o InstaGene®.



FIGURA 9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, de testes-piloto de 1996.

Os resultados sugerem que a extração de DNA de mielogramas com o método 4, pode ser útil até mesmo quando o fragmento gênico a ser amplificado é tão grande quanto o BDNF.

Com relação aos bulbos capilares, foi decidido por testes com apenas um e com três bulbos, para verificar qual seria a possível influência da quantidade de material na amplificação por PCR.

Anteriormente aos testes finais, foram realizados testes-piloto com extração de DNA pelo método 4 e, nestes, ficou sugerido que o número de

bulbos não influenciariam negativamente na amplificação para FV, mas sim para BDNF, quando esse método de extração fosse utilizado. Além disso, como *template* para a PCR, poderiam ser utilizados tanto os 40 μL padronizados, como 1 μg de DNA/100 μL de reação.

Outro fato, foi que a lavagem prévia com solução TKM-1, pareceu influenciar positivamente na obtenção de DNA amplificável por PCR.

Quanto à primeira afirmação, esta confirmou-se com os testes. Eles também demonstraram que, quando é utilizado apenas um bulbo capilar como fonte de DNA, para fragmentos gênicos tão grandes quanto BDNF, o método 1 de extração é o melhor de todos os testados neste trabalho, mas, para três bulbos capilares, além do método 1, o método 2, também é viável para este fragmento.

Para fragmentos gênicos tão pequenos quanto o do gene para fator V, não importando o número de bulbos disponíveis, o método 4 é bem sucedido na obtenção de DNA amplificável por PCR.

Quando as fontes escassas de DNA estudadas foram as células bucais retiradas com *swab*, observaram-se resultados negativos na amplificação do DNA extraído pelo método 1, para fragmento de BDNF e, curiosamente, após tratamento com InstaGene, 9 dessas mesmas amostras tiveram amplificação positiva para o mesmo fragmento e para o fragmento de FV. Isso já não foi necessário para o DNA extraído pelo método 2, onde todos sofreram amplificação para BDNF e, conseqüentemente, também sofreriam para FV.

Para fragmentos gênicos maiores, o método 2 demonstrou ser mais vantajoso, enquanto que, para fragmentos menores, é indiferente a utilização dos métodos 2 ou 4.

Quanto à fervura em água estéril de células bucais, para extração de DNA, neste estudo, não foram obtidas ampliações bem sucedidas para

nenhum fragmento escolhido. Das 10 amostras testadas, apenas uma amplificou para BDNF, e para FV só foi observada amplificação, após passar as amostras por tratamento com InstaGene.

Alíquotas de 2 ml de urina total foram as últimas fontes escassas de DNA consideradas neste estudo. Os resultados dos testes de amplificação demonstraram que o método de escolha para extração de DNA de tais amostras é o de nº 4, sendo que o método 1 é válido na obtenção de amplificação de fragmentos gênicos menores.

As cinco amostras do método 1 que foram negativas na amplificação para BDNF, assim continuaram, mesmo após tratamento com InstaGene; no caso das amostras negativas do método 2, após o mesmo tratamento, mais duas amplificaram para fragmento de BDNF (3/10) e 7/10 amplificaram para fragmento de FV.

Fato interessante, foi a adesão dos doadores de amostras à participação na pesquisa. Sempre dispostos e com bom-humor, após assinarem o consentimento esclarecido, doaram vários tipos de amostras. Ao ser-lhes explicado a natureza da pesquisa, muitos procuraram conhecer os resultados, mesmo sabendo que os genes pesquisados eram constitucionais, e procuravam saber maiores detalhes da utilização dos dados.

Uma outra forma de apresentar resumidamente e finalizar os resultados, é considerar que:

- Digestão por proteinase K, seguida de purificação com fenol e clorofórmio (método 1), produziu DNA amplificável para BDNF (764 pb), quando as fontes de DNA foram um ou três bulbos capilares e 50% de sucesso nessa amplificação, quando a fonte foi 2 mL de urina; para amplificação do fragmento de FV (220 pb), o método foi bem sucedido, quando as amostras foram tecido incluído em parafina e urina e, considera-se que também bem sucedido naquelas que foram de amplificação positiva para BDNF.

No caso de gotas de sangue em *Guthrie card*, após purificação com InstaGene®, o DNA obtido com o método 1, foi amplificável para FV e DNA de DNA de *swab* bucal, da mesma forma, se tornou amplificável para BDNF.

- Por outro lado, a digestão por proteinase K, sem purificação posterior com solventes orgânicos (método 2), foi bem sucedido na amplificação de BDNF, no caso de DNA oriundo de hemograma corado com *Leishman*, *swab* bucal e três bulbos capilares, enquanto que, para amplificação de FV, o DNA extraído de tecido incluído em parafina e um bulbo capilar, através desse método, foi passível de amplificação. Um pós-tratamento com InstaGene®, nas amostras de DNA de hemograma não corado, gota de sangue em *card* e urina, permitiu amplificação para FV.

Dessa forma, conclui-se que utilizar uma resina quelante nos extratos obtidos através dos métodos 1 e 2, pode garantir uma melhor confiabilidade nos resultados de amplificação para as amostras citadas.

- A extração de DNA através da resina quelante Chelex 100®, obteve 60% de sucesso na amplificação do fragmento de FV quando o DNA foi obtido através de tecido emblocado em parafina e 90% de sucesso na amplificação de BDNF, quando o DNA era de hemograma não corado. Tais resultados foram semelhantes aqueles obtidos com InstaGene®, que passou a ser considerada, nesse estudo, como uma resina quelante ideal, por ser de utilização mais prática.

- Por sua vez, a resina quelante InstaGene® obteve DNA de amplificação possível para BDNF, quando as fontes foram hemograma não corado, mielograma, gotas de sangue em *card* e três bulbos capilares (ambos com 50% de sucesso), urina (80% de sucesso) e *swab* bucal (60% de sucesso); para o fragmento gênico de FV, o método apresentou-se como adequado para o DNA obtido de todas as fontes testadas.

- O DNA obtido através de fervura em água estéril, apresentou possibilidade de amplificação para BDNF, quando a fonte foi hemograma não corado; para o fragmento do gene FV, o método foi adequando apenas para DNA extraído de hemograma corado e gotas de sangue em *card*.

Sugere-se aqui que, para garantir melhor qualidade do DNA extraído, seja utilizada, pelo menos uma resina quelante em sua obtenção.

- O grau de fragmentação do DNA extraído e sua influência negativa na amplificação de fragmentos maiores é observado nas amostras vindas de tecido incluído em parafina, onde nenhum método mostrou-se eficaz para a amplificação de BDNF. Nas demais fontes, essa influência não ficou clara, mas a presença de inibidores de PCR podem ter impedido a amplificação de DNA vindo de hemograma não corado, gotas de sangue em *card* e urina, principalmente quando os métodos de extração foram 1 e 2.

DISCUSSÃO

Neste trabalho, foram pesquisados métodos para obter DNA de materiais de arquivo e fontes escassas.

Quanto às quantidades de DNA obtidas com cada método de extração – as médias sendo apresentadas nos resultados – determinou-se que os resultados espectrofométricos não são bons parâmetros nos quais deva-se apoiar para direcionar os procedimentos técnicos de extração, pois, mesmo quando as medidas espectrofotométricas não revelavam a presença de DNA, havia amplificação bem sucedida do fragmento esperado.

Em alíquotas de urina e um bulbo capilar, por exemplo, houve amostras que deram resultados nulos ou negativos, quanto à concentração de DNA e, mesmo assim, amplificavam na PCR.

De acordo com a bibliografia científica consultada, o método mais amplamente utilizado, é o que passa por digestão por proteinase K, seguida por purificação com solventes orgânicos (fenol e clorofórmio), principalmente quando a extração de DNA acontece a partir de tecidos incluídos em parafina.

No entanto, neste trabalho, observou-se que, para tecidos incluídos em parafina, o método de extração de DNA interfere diretamente na fragmentação do DNA obtido, pois, todos os métodos de extração testados aqui, foram eficientes na amplificação de fragmento de 220 pb, mas nenhum obteve sucesso na amplificação de fragmento de 764 pb.

SEPP *et al.* (1994), citam que, com digestão por proteinase K, os fragmentos obtidos em seu trabalho, foram de 100 a 4.000 pb, discordando de DRUT *et al.* (1994), que revelaram que o DNA de tecido incluído em parafina, extraído por este método, apresenta-se muito degradado, com a maioria do DNA sendo menor que 500 pb e de COATS *et al.* (1991), que

consideraram o fragmento de β -globina (355 pb) grande o suficiente para influenciar no sucesso da amplificação.

KULLMANN *et al.* (1998), testaram três métodos diferentes de extração de DNA desse tipo de arquivo, e concluíram que todos os métodos, dentre eles, o método convencional de extração de DNA (método 1), foram bem-sucedidos na amplificação de fragmento de 536 pb (40 a 100%), mas nenhum foi eficiente quanto à amplificação de fragmento de 989 pb.

Testando a amplificação de três segmentos diferentes do gene da β -globina, LIU e seus colaboradores (1993), utilizaram o método 1 de extração de DNA em tecidos frescos e incluídos em parafina, e obtiveram que, nesse segundo tipo de amostra, todas foram positivamente amplificadas, quando o fragmento gênico possuía 175 pb, 69% amplificaram, quando o fragmento era de 327 pb e 45% amplificaram quando o tamanho era de 676 pb.

SHIBATA *et al.* (1994), ainda ressaltam a necessidade de aumentar o número de ciclos de amplificação na PCR (sugerem de 40 a 50 ciclos), além da adição de passos que aumentem a sensibilidade da técnica, como detecção radioativa, após a reação, ou uso de *primers* internos (*nested*), sendo que, segundo eles, qualquer reação pode ser realizada, sem essas modificações, caso o fragmento-alvo tenha de 120 a 200 pb.

No caso desta pesquisa, os ciclos de amplificação foram aumentados em cinco ciclos, de forma a garantir a amplificação de DNA, caso este estivesse presente e com qualidade para ser amplificado.

Tendo em vista os resultados deste trabalho e daqueles consultados, tem-se que, o fator mais importante no sucesso da amplificação do DNA obtido de tecido incluído em parafina, é o grau de fragmentação do DNA presente nessas amostras. Falhas encontradas, podem também não ser apenas devido à ausência das seqüências-alvo pesquisadas, mas sim, um

efeito direto do fixador, tempo e/ou temperatura de fixação utilizados no processamento dessas amostras nos serviços de Patologia.

Em um estudo de detecção de clonalidade de células B, TBAKHI e colaboradores (1999), obtiveram sucesso na amplificação de fragmentos gênicos, nas proporções de 95% das amostras que haviam sido fixadas em tampão de formalina neutra, 94% em B5, 67% em fixador de Hollande, 87% de formalina com zinco e 0 em fixador de Bouin.

GALL *et al.* (1993), determinaram que amostras fixadas em formalina 10%, Carnoy ou Amex, foram melhores para análises por PCR para fragmento de 318 pb, sempre que a idade de arquivo era menor que 39 anos. No caso de fragmentos gênicos de 720 pb, a amplificação foi positiva, quando o tempo de arquivo variava de um a dez anos. Quando o fixador utilizado foi paraformaldeído ou acetona, houve comprometimento da eficiência das amplificações, e tecidos fixados em Bouin deram resultados negativos.

Segundo MURPHY e colaboradores (1994), produtos de amplificação foram detectados sempre que o DNA vinha de tecido fixado com formalina tamponada neutra e Carnoy, enquanto que, os fixados em fixadores baseados em cloreto de mercúrio, deram resultados negativos de amplificação. Além disso, a fixação nas temperaturas ambiente e 37°C, resultaram em amplificações positivas, bem como as amostras que tiveram tempo de fixação entre 24 e 48 horas.

Outro fator que influenciou o sucesso de amplificação de fragmentos gênicos obtidos a partir de DNA extraído de tecidos incluídos em parafina foi a desparafinização prévia das amostras.

Neste trabalho, das dez amostras cujo DNA foi extraído através do método 2 (proteínase K, sem fenol/clorofórmio), sem desparafinização prévia, apenas duas amplificaram para o fragmento de FV, mas havendo desparafinização prévia, dos dez testes de amplificação por PCR, todos

amplificaram. Dessa forma, fica clara a necessidade de desparafinização prévia da amostra, antes dos procedimentos de extração de DNA.

Outro detalhe que influencia a extração de DNA, mais diretamente relacionado aos métodos 1 e 2 de extração, é o tempo de digestão com proteinase K e sua concentração no extrato.

Por vezes, ao fim de digestão por uma noite, ainda se observava integridade no tecido digerido, tomando-se necessário o acréscimo de mais proteinase K e 24 horas a mais de período de digestão.

Uma hora de incubação com proteinase K é eficiente como procedimento de extração de DNA de tecido fresco. Para tecidos incluídos em parafina, um período de incubação ideal pode ser até de cinco dias (JACKSON *et al.*, 1990).

Quanto aos métodos de extração de DNA, de LAMBALLERIE e seus colaboradores (1994), determinaram, numa pesquisa sobre DNA do vírus da hepatite B, em 30 amostras de fígado incluído em parafina, que o protocolo clássico, usando o método 1 de extração de DNA, foi mais sensível que o método 3 (Chelex 100®) (10 X 6 ampliações positivas), mas purificar as amostras extraídas pelo método 1 com a resina quelante, antes da PCR, aumentaram em 6 as amostras positivas.

SEPP *et al.* (1994), também concordaram com tal descoberta, e ainda correlacionaram o melhor método com o tamanho dos fragmentos pesquisados, pois determinaram que, fragmentos do gene p53, de 408 pb, foram amplificáveis por PCR, quando o método de extração foi fervura, por 20 minutos, em água estéril; de 647 pb, foram amplificáveis, quando a extração era por Chelex 100®; e quando o fragmento era maior que 984 pb, o método de extração 1, seguido de purificação com a resina quelante, era o melhor sucedido.

Como, nesta pesquisa, o maior fragmento foi de 764 pb, maior do que o indicado como ideal pela maioria da literatura consultada, explicam-se os resultados negativos nas ampliações de tais fragmentos.

Confirma-se que, quando a fonte potencial de DNA se tratar de tecido incluído em parafina, devem ser feitas observações sobre:

- tamanho do fragmento a ser amplificado por PCR;
- fixador, tempo e temperatura de fixação;
- necessidade de desparafinização;
- tempo de incubação para digestão por proteinase K;
- técnica ideal de extração de DNA e a necessidade de acréscimo de novos passos no processo de extração, como nova purificação com resina quelante.

Observando os resultados obtidos com as extrações de DNA feitas a partir de lâminas de hemograma (coradas ou não com Leishman) e gotas de sangue em *Card*, comparativamente com aqueles obtidos com tecido incluído em parafina e com fontes escassas, nota-se que, os insucessos na amplificação do DNA, quando este foi extraído pelos métodos 1 e 2, não podem ser explicados pela fragmentação do DNA, já que nenhuma amplificação para FV, foi observada e houve ampliações positivas para BDNF, quando outros métodos de extração de DNA foram utilizados.

Por se tratarem de amostras com sangue periférico, cuidados foram tomados, com relação aos inibidores de PCR, pois, segundo GRIBBEN e colaboradores (1991), a hemoglobina pode inibir a reação, já que os íons Fe^{++} são competidores dos íons Mg^{++} , necessários à ação da DNA polimerase.

Testes foram feitos com hemólise prévia das amostras, quando o método 2 foi utilizado para extração de DNA de lâminas de hemograma não coradas e sangue em *card*, mas não houve influência positiva nas

amplificações, de forma que continuavam negativas (vide resultados finais na Tabela 2).

Em um estudo realizado sobre as propriedades de inibidores de PCR em gotas de sangue em *cards*, estocados de 1 a 30 meses, MAKOWSKI e colaboradores (1996) encontraram que esses inibidores (albumina, metais, proteínas, anidrase carbônica, hemoglobina) tornam-se cada vez mais fixados, com o passar do tempo, mas que, apesar de sua presença, é possível haver amplificações de fragmentos de 98 pb a 491 pb.

Tais inibidores, parecem ser resistentes à fervura, não destruídos por proteinases, não solúveis em solventes orgânicos e possuem um peso molecular menor que 10 quilodáltons (AN & FLEMING, 1991).

Autores sugerem passar o extrato obtido em microcoluna de Sephadex G-50 e a centrifugação em filtro Centricon-30 (AN & FLEMING, 1991; CHEN & CLEJAN, 1993) e, quando se tratar de gotas de sangue em *card*, umidecê-los, anteriormente à coleta, com tiocianato de guanidina, já que este retém 90% das proteínas inibidoras da PCR (MAKOWSKI *et al.*, 1997).

A presença de inibidores de PCR presentes nas amostras com sangue, poderia ser uma justificativa perfeitamente plausível, não fossem os resultados positivos nas amplificações de amostras, cuja extração de DNA se deu por fervura em água estéril, que apenas não foi útil em lâminas coradas com Leishman, aí sim, devido provavelmente à presença de inibidores.

Alguns autores até sugerem a utilização direta de discos milimétricos do *card* com sangue, diretamente na PCR, acrescentando apenas um passo de pré-aquecimento, no termociclador, para desprendimento das células (RASKIN *et al.*, 1992).

Buscando uma resposta para os resultados negativos na amplificação de DNA obtido pelos métodos 1 e 2 de extração, nesses arquivos, suas

amostras foram pós-tratadas com InstaGene®, de forma a buscar eliminar a possível presença de tais inibidores.

Os resultados encontrados (vide resultados) mostraram que, no caso do método 2 para DNA de lâminas de hemograma não coradas e sangue em *card*, onde não foram usados solventes orgânicos, após o tratamento de purificação com InstaGene®, passaram a ter resultados positivos para amplificação de FV, mas não de BDNF ou qualquer um dos dois, nas amostras do método 1.

No primeiro caso, fica sugerido que a InstaGene® purificou as amostras, retirando possíveis inibidores, o que não aconteceu quando o método de extração de DNA incluiu fenol e clorofórmio. Novos estudos envolvendo inibidores de PCR, que possam se formar, inclusive, durante os processos de extração, devem ser realizados para esclarecer os fatos observados, inclusive o da obtenção de amplificação positiva para BDNF, em DNA extraído com o método 2, de lâmina de hemograma corada com Leishman.

Quando os testes foram realizados com lâminas de hemograma não coradas, observou-se que os resultados na amplificação de DNA extraído com Chelex 100®, não foram muito diferentes daqueles com InstaGene® - resultado também observado no caso de tecido incluído em parafina – e foi optado por cessarem-se os testes com a primeira resina, pois a segunda era mais prática, por apresentar-se já diluída.

Além disso, a utilização de InstaGene® posteriormente a outros métodos de extração de DNA, pode aumentar a possibilidade de amplificação, assim como foi visto, com relação a tecido incluído em parafina.

As amostras de mielograma, infelizmente, foram poucas, mas, pelos bons resultados de extração e amplificação tidos com o DNA extraído pelo

método 4, pode-se indicá-lo para novos testes de extração, quando o material de arquivo for este.

Os bulbos capilares apresentaram-se como excelentes fontes de DNA para PCR. À medida que a quantidade de bulbos era menor, métodos mais refinados de extração de DNA foram necessários.

O método 1, foi o mais eficiente para a extração de DNA de um bulbo capilar, amplificável para o fragmento de BDNF, enquanto que para três bulbos, não foi necessária a purificação com fenol/clorofórmio, e o método 2 foi bastante eficiente. Dessa forma, evidencia-se, através dos resultados, que o número de bulbos capilares disponíveis para PCR, influenciam diretamente na escolha da técnica de extração do DNA.

Para o fragmento gênico de FV, todos os métodos de extração testados (1, 2 e 3) foram eficientes, quando os bulbos capilares foram as fontes escassas, independente do número de bulbos disponíveis para os testes.

Neste trabalho, foi observado que a lavagem dos bulbos capilares com solução TKM-1, anteriormente à extração de DNA, é necessária, já que testes anteriores à sua implementação, haviam negativado quanto à amplificação. A solução elimina o alo de gordura que fica ao redor do bulbo e provavelmente elui os resíduos de cosméticos ali deixados.

Tradicionalmente, a comparação microscópica vem sendo usada para definir a origem de um determinado fio de cabelo, em uma cena de crime. Mas, dessa forma, não é possível se estabelecer, com certeza, exceto em casos extremamente raros, que um cabelo encontrado é de um indivíduo em particular. Também não há dados disponíveis a respeito da frequência de uma determinada característica capilar (microtipo) ou traço, em uma população particular. A tipagem de cabelos baseada em testes de PCR, oferece aos examinadores forenses, uma oportunidade de catalogação de

dados, relativos à associação com a microscopia e taxas de erros desse método (SMITH & LINCH, 1999).

Para uma análise forense confiável de DNA vindo de um cabelo deixado em uma cena de crime, torna-se necessária a eliminação de possíveis células contaminantes (de saliva ou sangue, por exemplo), que podem ter seu DNA co-amplificado. Torna-se necessário o desenvolvimento de estratégias para remoção desses contaminantes e, alguns autores, indicam como solução para tal problema, a utilização de tampões de lise diferencial, antes da extração de DNA (JEHAES *et al.*, 1998).

Nesta pesquisa, optou-se por cortar os fios de cabelos colhidos, mantendo apenas 1 a 2 centímetros de fio adjacente aos bulbos. A opção pelo tamanho do fio a ser deixado na amostra, em alguns casos, pode influenciar os resultados, assim como a utilização de tinturas capilares pelo doador da amostra.

Curiosamente, em uma amostra colhida um dia após tintura capilar, apresentou bandas de amplificação extremamente discretas, insinuando uma possível influência que tais cosméticos poderiam ter sobre os resultados da PCR.

Pesquisadores japoneses, na tentativa de amplificação de região não codificadora de 333 pb de DNA mitocondrial, obtiveram os seguintes resultados: em cabelos pretos, o gene sempre foi amplificados, desde que o comprimento do fio adjacente ao bulbo não excedesse 11 centímetros; usando cabelos brancos, o gene sempre foi amplificado, mesmo que o comprimento do fio adjacente ao bulbo fosse de 31 centímetros; quando cabelos pretos naturais eram tingidos com tintura oxidativa (Bigen), o gene não era amplificado; quando preparações de DNA recebiam tintura, o gene não amplificava, mesmo quando era adicionado DNA purificado, mostrando a inibição causada pela tintura, onde o peróxido de hidrogênio permitia a solubilização da melanina (YOSHII *et al.*, 1992).

Para tipagem de HLA-DQA1, a partir de fios de cabelo, por exemplo, parece depender do balanço das concentrações de DNA e a melanina contaminante no extrato final de DNA (UCHIHI *et al.*, 1992).

YOSHII e colaboradores (1993), estabeleceram um método para remover a melanina solúvel, quando esta inibir a PCR: passar as preparações de DNA em minicoluna de Bio-Gel P-60, tamponada com acetato de sódio a 10 mM e pH 4,2, adsorvendo, assim, a melanina.

A utilização de *swabs* para coleta de células bucais, mostrou ser um método prático, pouco invasivo e útil para coleta de DNA amplificável por PCR.

Observando-se os bons resultados na amplificação do fragmento de BDNF, com extração de DNA através do método 2, tem-se que a técnica oferece DNA em quantidade suficiente e de alto peso molecular. O método 1, opondo-se ao método 2, não ofereceu DNA amplificável para tal fragmento, o que ocasionou a necessidade de outra purificação dos extratos, desta vez com a resina InstaGene®, o que tornou as amplificações para BDNF positivas, demonstrando que, a utilização de solventes orgânicos, pode proporcionar o surgimento de substâncias inibidoras de PCR, assim como o ocorrido com as amostras de sangue periférico em lâmina de hemograma e em *card*.

Quando a extração de DNA foi feita apenas com InstaGene®, obteve-se 50% de sucesso na amplificação para BDNF, tomando-se, então, um método de extração de DNA mais adequado para fragmentos tão pequenos quanto o do gene para FV.

Dos testes realizados com amostras fervidas em água estéril, obteve-se apenas um resultado de amplificação positiva, sendo esta para o fragmento de BDNF. As amostras apenas tornaram-se positivas para FV, após passarem por purificação com InstaGene®.

Embora alguns autores descrevam o acréscimo direto da saliva na PCR (YAMAMOTO & ISHIZU, 1995), sugere-se aqui, que seja adotado o uso de, pelo menos, uma resina quelante, para que seja potencializada a possibilidade de obtenção de resultados mais seguros de amplificação.

SWEET e seus colaboradores (1996) sugerem que, quando as quantidades de saliva (e, necessariamente, células bucais), tratem-se de resquícios (como os depositados sobre a pele numa mordida, por exemplo), seja utilizado um método alternativo, que inclui a coleta do material com *swab* duplo, pré-extração do DNA através de digestão com proteinase K, usando seqüencialmente 56 °C e 100 °C, como temperaturas de incubação e, por fim, purificação com Chelex 100®.

Somando-se a isso, tem-se os resultados obtidos neste trabalho, com o DNA extraído de lâminas de hemograma e gotas de sangue em *card*, que após a extração pelos métodos 1 e/ou 2, passaram por purificação com InstaGene®, e tiveram suas amplificações positivas. Portanto, utilizar digestão por proteinase K, sua inativação a 100°C, seguida por purificação com resinas quelantes, não deve ser descartado como método de extração passível de novos testes.

Utilizando-se alíquotas de 2 mL de urina (cuja determinação encontra-se em Materiais e Métodos), foram realizados testes com os métodos 1, 2 e 4 de extração de DNA.

Os resultados demonstram que, os dois métodos que apresentam maior possibilidade de livrarem a amostra de substâncias contaminantes e possivelmente inibidoras de PCR (métodos 1 e 4), foram bem sucedidos quanto à amplificação dos fragmentos utilizados, havendo destaque para InstaGene®, para amplificação de BDNF.

Observou-se que, ao serem mantidas a 4°C, as amostras apresentaram após algumas horas, alta concentração de sais depositados e

maior espessamento do muco presente nas amostras femininas. Evidencia-se a necessidade de, antes dos procedimentos de extração de DNA, submeter a urina a incubação em banho-maria a 37°C, por 10 minutos.

MORRE e colaboradores (1999), ainda assinalaram que, se deixada à temperatura ambiente de cinco a sete dias, a urina tem seu DNA degradado e que o mesmo não ocorre, caso ela seja estocada a 4°C.

Alguns dos métodos testados e padronizados através deste trabalho, já foram utilizadas em outros, do mesmo laboratório, mesmo sem a finalização de todos os testes e publicação final dos resultados. BARRACH *et al.* (2.000), utilizaram extração de DNA através do método 4, de gotas de sangue colhidas em *Guthrie card*, para a pesquisa sobre identificação de predisposição genética para trombose venosa, na qual o DNA amplificado por PCR, ainda passava por digestão pela enzima de restrição *MnII*, antes da determinação dos padrões eletroforéticos esperados; TORALLES-PEREIRA (2001), utilizou células bucais colhidas com *swab*, como fonte de DNA, que foi obtido também através do método 4, para desenvolver estudo sobre polimorfismo de antígenos plaquetários.

Dessa forma, ressalta-se a grande aplicabilidade e extensão alcançada por esta pesquisa e espera-se que, com a melhor organização metodológica e formalização de seus resultados, alcançadas agora, muitos outros possam se beneficiar dos métodos aqui estabelecidos.

Pela facilidade de utilização e a possibilidade de estoque de grande quantidade e variabilidade de material genético, deve-se sempre observar o comprometimento ético no uso desse tipo de arquivo.

O consentimento esclarecido deve ser inteligível para o doador da amostra, e abordar todos os aspectos e tipos de pesquisa nos quais o seu material pode ser envolvido.

Questiona-se também qual o destino que tais amostras terão, caso não forem esgotadas no estudo proposto. Para segurança do doador, o que

restar, dever ser encaminhado para incineração ou, em caso de utilização do material em nova pesquisa, o doador deve ser comunicado, assinar um novo consentimento esclarecido e os pesquisadores devem obter um novo parecer positivo do Comitê de Ética.

No estabelecimento do *design* da pesquisa, todas as possibilidades devem ser avaliadas e determinadas de forma racional e ética, evitando a “ciência por intuição”, que pode resultar numa descoberta interessante, mas com conseqüências outras, não tão interessantes assim – haja visto o trabalho de Einstein; a possibilidade da utilização do processo de clonagem para satisfazer a vaidade humana ou princípios de uma seita, com valores distorcidos; a manipulação de embriões humanos, muito útil à medicina e ciência, mas que leva ao questionamento do valor da uma vida humana em seu início; a terapia gênica, contrapondo-se aos caminhos e desígnios da natureza; os transgênicos, com o aumento estrondoso na produção, sobrepondo-se à tendência natural de manter a variabilidade, e acabando com os pequenos produtores ou ainda criando uma concorrência desleal entre os países que detêm e os que não detêm a tecnologia; ou mesmo as técnicas de extração de DNA, que facilitam a criação de Bancos de Dados Genéticos populacionais, que podem ser manipulados sob vários aspectos e com as mais diferentes formas de visão moral e ética.

A tecnologia envolvida no estudo do DNA, dependendo a quem esteja restrita, seus princípios éticos, e mesmo morais, pode ter uma utilização tal que leve ou não prejuízos aos espectadores dessa ciência.

Considerando que o domínio das técnicas científicas relacionam-se diretamente com o poder econômico e de investimento na área, não é raro observar um grande número de detenção de patentes, mesmo sobre riquezas naturais de outros países, por uma minoria rica; ou ainda testes de uma droga ou de um tratamento feitos por países desenvolvidos na

população de países em desenvolvimento. A ciência se torna mais um instrumento de dominação política e econômica.

A sociedade, de forma geral, precisa estar atenta às descobertas e discussões a respeito das ciências do DNA, pois há a necessidade de estabelecimento de princípios morais mais rígidos, por parte dela, e uma responsabilidade ética daqueles que apresentam novidades dentro dessa área.

A participação da sociedade nos processos da ciência e na discussão dos princípios éticos envolvidos, principalmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil, é praticamente inexistente, baseando-se naquilo que a mídia apresenta, que muitas vezes, não excede a mera apresentação de fatos, como se esses fossem acabados e finais, marginalizando ainda mais a crítica e a participação da sociedade ou, em casos piores, banalizando a utilização do material genético, associando-os à resolução de casos pontuais, com outros tipos de “atrações” envolvidas, ou ainda a princípios morais um tanto questionáveis e banais.

Sobre a população, é pensado, de forma geral, que não tem os pré-requisitos necessários para discussões acerca da ciência, mas possuem seus valores morais, muitas vezes fundamentados pela religiosidade e tradições. Pode ser que o que lhe falta sejam oportunidades mais concretas de ser envolvida ou ouvida mais atentamente.

Dentro do processo de envolvimento da sociedade na participação da criação científica, as escolas têm um papel muito importante, pois lá é que o interesse pela ciência é iniciado, cabendo então, desde seu princípio, discussões éticas sobre os fatos científicos históricos, atuais e do cotidiano da sala de aula. Os professores devem manter um canal aberto com os acontecimentos do mundo, ou mesmo com a(s) Universidade(s), o berço das descobertas científicas.

As universidades também, dentro de sua estrutura, devem desenvolver aberturas de extensão à comunidade, que permitam, além de corresponder ao caráter assistencial, participar da formação e desenvolvimento crítico da sociedade, quanto aos processos científicos.

Existem setores da UNESP de Botucatu que têm se preocupado com isso, e têm criado cursos, ministrados principalmente a professores da rede pública de ensino. Os resultados têm sido profissionais com atuação mais incisiva e direcionada dentro da escola, com uma preocupação acentuada e renovada de desenvolver o espírito crítico de seus alunos e valores éticos e morais desejáveis.

Por outro lado, não é produtivo cientificamente, barrar a apresentação de uma determinada pesquisa, por medo das utilidades que ela possa vir a ter, mas o questionamento sobre suas aplicabilidades deve sempre estar explícito, principalmente por parte de quem a realizou.

Isso deve ser feito sempre concomitantemente com a realização da pesquisa, de forma a assinalar o comprometimento ético dos pesquisadores e suscitar a comunidade ao seu redor para o estabelecimento de valores e regras, quanto aos possíveis usos dos resultados de sua pesquisa.

CONCLUSÃO

Cinco métodos diferentes de extração de DNA foram testados em materiais de arquivo e fontes escassas e, conforme os resultados obtidos, buscou-se sugerir o método de extração de DNA mais adequado para cada fonte.

A avaliação, por espectrofotometria, do rendimento de DNA proporcionado por cada método, em cada fonte, não influenciou os resultados nas ampliações dos fragmentos pesquisados.

Com relação ao sucesso na amplificação por PCR do DNA extraído, tem-se que considerar o tamanho do fragmento gênico a ser pesquisado. Quanto maior este for, menores são as chances de amplificação, principalmente quando as fontes forem tecido parafinado e sangue em *card*, por exemplo.

Conclui-se que os métodos de extração de DNA mais adequados para cada fonte são:

1 – Tecido incluído em parafina: métodos 1, 2 e 4 quando o fragmento gênico tem cerca de 220 pb;

2 – Hemograma não corado: métodos 3 e 4, para fragmentos em torno de 764 pb (e, conseqüentemente, menores); método 2, seguido por purificação com InstaGene®, para 220 pb ;

3 – Hemograma corado com *Leishman*: método 2, para BDNF; métodos 4 e 5, para FV;

4 – Mielograma: método 4, para ambos fragmentos;

5 – Gota de sangue em *Guthrie card* para BDNF, apenas o método 4 (50% de sucesso na amplificação); métodos 4 e 5 para FV, assim como métodos 1 e 2, seguidos do método 4;

6 – *Swab* bucal: para BDNF, o método 2, método 4 (60% de sucesso na amplificação) e método 1 com pós-purificação com InstaGene®; todos citados também são úteis para FV;

7 – Três bulbos capilares: para BDNF, os métodos 1 e 2; para FV, os métodos 4, 1 e 2;

8 – Um bulbo capilar: para 764 pb, o método 1; para 220 pb, métodos 4 e 2;

9 – Urina: para 764 pb, método 4; para 220 pb, métodos 1, 4 e 2, seguido pelo método 4.

No Anexo 1 são apresentados os métodos organizados para a inclusão no manual de Procedimentos Operacionais Padrão do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro.

Os resultados deste trabalho, bem como a sistematização e organização deles, permite a ampliação da utilização da técnica de PCR em materiais amplamente disponíveis nos serviços hospitalares, bem como a facilitação da coleta de amostras, principalmente em grande número, ou em situações especiais.

Além disso, contribuem com a melhoria da qualidade e confiabilidade da técnica de PCR quando da utilização de tais amostras, permitindo maior segurança e aproveitamento das amostras, bem como economia de tempo e gastos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, M.; Saldeen, T; Gyllensten, U. PCR-based DNA typing of saliva on stamps and envelopes. **Biotechniques**, v. 17, p. 546, 1994;
- AMANO, A; Nakagawa, I; Kataoka, K; *et al.* Distribution of *Porphyromonas gengivalis* strains with fim A genotypes in periodontitis patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 1426, 1999;
- ARON, Y.; Swierczewski, E.; Lockhart, A. A simple and rapid micromethod for genomic DNA extraction from jugal epithelial cells. **Allergy**, v. 49, p. 788, 1994;
- AUSUBEL, FM; *et al.*; Unit 15: The polymerase chain reaction, *in* **Current Protocols in Molecular Biology**, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, 1992;
- BAECHTEL, FS; Monson, KL; Forsen, GE; *et al.* Tracking the violent criminal offender through DNA typing profiles: a national database system concept. **EXS.**, v. 58, p. 356, 1991;
- BOXMAN, I; Hogewoning, A; Mulder, L; *et al.* Detection of human papillomavirus types 6 and 11 in pubic and perianal hair from patients with genital warts. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 2270, 1999;
- BOXMAN, I; Berkout, RJ; Mulder, L; *et al.* Detection of human papillomavirus in plucked hairs from renal transplant recipients and healthy volunteer. **J. Invest. Dermatol.**, v. 108, p. 712, 1997;
- CAGGANA, M; Conroy, JM; Pass, KA. Rapid, efficient method for multiplex amplification from filter paper. **Hum. Mut.**, v. 11, p. 404, 1988;
- CALDARELLI, SR; Vago, L; Bonetto, S; *et al.* Use of magnetic beads for tissue. DNA extraction and IS6110 *Mycobacterium tuberculosis* PCR. **Molec. Pathol.**, v. 52, p. 158, 1999;

- CALDWELL, SH; Sue, M; Bowden, JH; *et al.* Hepatitis C virus in body fluids after liver transplantation. **Liver Transpl. Surg.**, v. 2; p. 124, 1996;
- CASSOL, AS; Read, S; Weniger, BG; *et al.*; Dried blood spots on filter paper: a international resource for the diagnosis and genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 351, 1996;
- CATANI, P; Capuano, M; Cerimele, F; *et al.* Human herpesvirus 8 seroprevalence and evaluation of nonsexual transmission routes by detection of DNA in clinical specimens from human immunodeficiency virus-seronegative patients from central and southern Italy, with and without Kaposi's Sarcoma. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 1150, 1999;
- CHEN, BF; Clejan, S. Rapid preparation of tissue DNA from paraffin-embedded blocks and analysis by polymerase chain reaction. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 41, p. 765, 1993;
- COOMBS, NJ; Gouch, AC; Primrose, JN. Optimization of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. **Nucleic Acids Res.**, v. 27, p. 12, 1999;
- COATS, PJ.; d'Ardenne, AJ; Khan, G.; *et al.* Simplified procedures applying the polymerase chain reaction to routinely fixed paraffin-wax sections. **J. Clin. Pathol.**, v. 44, p. 115, 1991;
- CRISTODOULOU, I; Clarke, JT; Rugar, CA; *et al.* Retrospective diagnosis of medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. **J. Pediatr. Child Health**, v. 29, p. 237, 1993;
- De LAMBERIE, X; Chapel, F; Vignoli, C; Zandotti, C. Improved current methods for amplification of DNA from routinely processed liver tissue by PCR. **J. Clin. Pathol.**, v. 47, p. 466, 1994;
- De RODA, HAM; Snyders, PJ; Stel, HV; *et al.* Processing of long-stored archival cervical smears for HPV detection by polymerase chain reaction. **Br. J. Cancer**, v. 72, p. 412, 1995;

- DESCARTES, M; Huang, Y; Zang, YH; *et al.* Genotyping confirmation from the original dried blood specimens in a neonatal hemoglobinopathy screening program. **Pediatr. Res.**, v. 31, p. 217, 1992;
- DIAZ, CSJ; Brady, SP. DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues: protein digestion as a limiting step from retrieval of high-quality DNA. **Diagn. Mol. Pathol.**, v. 6; p. 342, 1997;
- DORE, DC; Heitz, M; Yang, H; *et al.* *Helicobacter pylori* in the oral cavity reflects handling of contaminants but no gastric infection. **Digestion**, v. 60, p. 196, 1999;
- DUBEAU, L; Chandler, LA; Gralow, JR; *et al.* Southern blot analysis of DNA extracted from formalin-fixed pathology specimens. **Cancer Res.**, v. 46, p. 2964, 1986;
- EDWARDS, A; *et al.* Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeats *loci* in four human population groups. **Genomics**, v. 12, p. 241, 1992.
- ERLICH, HA; Arnheim, N. Genetic analysis using polymerase chain reaction. **Annu. Ver. Genet.**, v. 26, p. 479, 1992;
- FARAH, SB. DNA no diagnóstico das doenças humanas. *In: DNA segredos e Mistérios*. São Paulo: Sarvier, p. 103-140, 1997;
- FELLOWES, AP; Murphy, JM; Wesley, AW; *et al.* Molecular screening of cystic fibrosis patients. **N. Z. Med. J.**, v. 104, p. 415, 1991;
- FERRANTE, P; Omodeo, EZ; Caldarelli, SR, *et al.* Detection of JC virus DNA in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. **Mult. Scler.**, v. 4, p. 49, 1998;
- FRIEDEZ, F; Coquoz, R. Polymerase chain reaction DNA typing of stamps: evaluation of the DNA extraction. **Forensic Sci. Int.**, v. 78, p. 103, 1996;
- FRIEDRICH, MG; Erbersdobber, A; Schwaibold, H; *et al.* Detection of loss heterozygosity in the p53 tumor-suppressor gene with PCR in the urine of patients with bladder cancer. **J. Urol.**, v. 163, p. 1039, 2000;

- FUKUSHIMA, M; Suzuki, M; Fukayama, M. Analysis of K-ras oncogene mutation directly applied to atypical cell clusters on cytologic smear slides of bile and pancreatic juice. **Pathol. Int.**, v. 48, p. 33, 1998;
- GALL, K; PAVELIC, J; SANTEL, D; *et al.* DNA amplification by polymerase chain reaction from brain tissues embedded in paraffin. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 74, p. 333, 1993;
- GEYSEN, D; Bishop, R; Skilton, R; *et al.* Molecular epidemiology of *Theileria parva* in the field. **Trop. Ned. Int. Health**, v. 4, p. A21, 1999;
- GOELZ, SE; Hamilton, SR; Vogelstein, B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. **Biocem. Biophys. Res. Commun.**, v. 130, p. 118, 1985;
- GOOSENS, B; Waits, LP; Taberlet, P. Plucked hair samples as a source of DNA: reability of denucleotide microsatellite genotyping. **Mol. Ecol.**, v. 7, p. 1237, 1998.
- GOPALKRISHNA, U; Aggawal, N; Malhotra, UL; *et al.* *Chlamydia trachomatis* and *Human papillomavirus* infection in Indian women with sexually transmitted diseases and cervical precancerous and cancerous lesions. **Clin. Microbiol. Infect**, v. 6, p. 88, 2000;
- GOPALKRISHNA, U; Francis, A; Sharma, JK; *et al.* A simple and rapid method of high quantity dna isolation from cervical scrapers for detection of *Human papillomavirus* infection. **J. Virol. Met.**, v. 36, p. 6372, 1992;
- HALIASSOS, A; Chomel, JC; Tesson, L.; *et al.* Modification of enzymatically amplified DNA for detection of point mutations. **Nuclei Acids Res.**, v. 17, p. 3606, 1989;
- HARNETT, PR; Greenberg, ML; Tattersall, MH; *et al.* Method of extracting DNA from fine needle aspirates of human solid tumors for Southern blot analysis. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, v. 11, p. 375, 1989;
- HOCHMEISTER, MN; Budowle, B; Jung, J; *et al.* PCR-based typing of DNA extracted from cygarrete butts. **Int. J. Legal Med.**, v. 104, p. 229, 1991;

- HOFF, PO; Mevag, B; Staalstrom, E; *et al.* Extraction of DNA from decomposed human tissue. Na avaliation of five methods for short tandem repeat typing. **Forensic Sci. Int.**, v. 105, p. 171, 1999;
- HUANG, HS; Chen, J; Teng, LJ; Lai, MK. Use of polymerase chain reaction to detect *Proteus mirabilis* and *Ureaplasma urealyticum* in urinary calculi. **J. Form. Med. Assoc.**, v. 98, p. 844, 1999;
- IMPRAIM, CC; Saiki, RK; Erlich, HÁ; Tepliz, RL. Analysis of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by enzymatic amplification and hybridization with sequence-specific oligonucleotides. **Biochem. Biophys. Res. Commun. Res.**, v. 142, p. 710, 1987;
- JACKSON, DP; Lewis, FA; Taylor, GR; *et al.* Tissue extraction of DNA and RNA analysis by polymerase chain reaction. **J. Clin. Pathol.**, v. 43, p. 499, 1990;
- JACOBSON, DL; Womack, SD; Peralta, L; *et al.* Concordance of *Human papillomavirus* in the cervix and urine among inner city adolescents. **Ped. Infect Dis.**, v. 19, p. 722, 2000;
- JEHAES, E; GILISSEN, A; CASSIMAN, JJ; DECORTE, R. Evaluation of a decontamination protocol for hair shafts before mtDNA sequencing. **Forensic Sci. Int.**, v. 94, p. 65, 1998.
- JOHANSON, PJH; Jonsson, M; Ahlfors, K; *et al.* Retrospective diagnostics of congenital cytomegalovirus infection performed by polymerase chain reaction in blood stored on filter paper. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 29, p. 465, 1997;
- KLOOSTERMAN, AD; Budowle, B; Daselaar, P. PCR amplification and detection of the human D1580 VNTR locus. Amplification conditions, population genetics and application in forensic analysis. **Int. J. Legal Med.**, v. 105, p. 257, 1993;
- KNUTSON, M; Kidd, KL. Urine from chronic hepatitis B virus carriers: implications for infectivity source. **J. Med. Virol.**, v. 60, p. 17, 2000;

- KOPPER, I; Kovalszky, I. Pathology on a molecular level (determination of nucleic acids from fixed embedded samples). **Orv. Hetil.**, v. 133, p. 1741, 1992;
- KULLMANN, F; Bocker, T; Schoelmeurich, J; Rueschoff, J. A comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissue for microsatellite instability analysis by PCR. **Acta. Biotech.**, v. 18, p. 77, 1998;
- LAURE, F; Rouzioux, C.; Veber, B.; *et al.* Detection of HIV 1 DNA in infants and children by means of the polymerase chain reaction. **Lancet**, 1988;
- LEE, M-S.; Chang, K-S.; Cabanillas, F.; *et al.* Detection of residual cells carrying the t(14;18) by DNA sequence amplification. **Science**, v. 237, p. 175, 1987;
- LIU, J; Johnson, RM; Traweek, ST. Rearrangement of the BCL-2 gene in follicular lymphoma. Detection by PCR in both fresh and fixed tissue samples. **Diagn. Mol. Pathol.**, v. 2, p. 241, 1993;
- LORD, WD; Dizinno, JÁ; Wilson, MR; *et al.* Isolation, amplification and sequencing of human crab louse, *Pthirus pubis* blood meals. **J. Forensic Sci.**, v. 43, p. 1097, 1998;
- LUI, TC; Chang, IG; Lin, CP; *et al.* Detection of beta-globin gene from single hairs. **Kao Hsuing I. Hsueh ko. Hsueh Tsa. Chih.**, v. 6, p. 181, 1990;
- LUM, A; Le Marchand, L. A simple mouthwash method for obtaining genomic DNA in molecular epidemiological studies. **Can. Epidem. Biom.**, v. 7, p. 719, 1998;
- MAKOWSKI, GS; DAVIS, EL; HOPFER, SM. The effect of storage on Guthrie cards: implications for deoxyribonucleic acid amplification. **Am. Clin. Lab. Sci.**, v. 25 (5): 458-69, 1.996;
- MAKOWSKI, GS; DAVIS, EL; HOPFER, SM. Amplification of Guthrie card DNA: effect of guanidine thiocyanate on linding of natural whole blood PCR inhibitors. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 11 (2): 87-93, 1997;

- MAKOWSKI, GS; Hopfer, SM. Cystic fibrosis: molecular approaches to diagnosis. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, v. 28, p. 380, 1998;
- MAYTA, H; Gilman, RH; Calderon, MM; *et al.* 18S ribosomal DNA-based PCR for diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 2683, 2000;
- McCARTHY, KP; Sloane, JP; Wiederman, LM; *et al.* Rapid method for distinguishing clonal from polyclonal B cell populations in surgical biopsy specimens. **J. Clin. Pathol.**, v. 43, p. 593, 1990;
- McDONOUGH, PG. Molecular Biology and Reproduction. **Keio J. Med.**, v. 48, p. 12, 1999.
- MONSON, KL; Budowle, B. Effect of reference database on frequency estimates of polymerase chain reaction (PCR)-based DNA profiles. **J. Forensic Sci.**, v. 43, p. 483, 1998;
- MORRE, AS; van VALKENGOED, IG; de JONG, A; *et al.* Mailed, home-obtained urine specimens: a reliable screening approach for detecting asymptomatic *Chlamydia trachomatis* infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 976, 1.999;
- MURPHY, J; JOHNSON, MI; LEWIS, FA; *et al.* A importance of fixation procedures on DNA template and its suitability for solution-phase polymerase chain reaction and PCR in situ hybridization. **Histochem. J.**, v. 26, p. 337, 1.994;
- NAKANISHI, A; Hashimoto, Y. Sex determination and ABO genotyping from dry saliva fixed to the brim the cups. **Res. Prac. Forensic Med.**, v. 40, p. 49, 1997;
- NEUHUBER, F; Radacher, M; Sorgo, G. Clarification of a forced entry theft based on a leverage bottle left at the scene and PCR DNA typing of superficial saliva traces. **Arch. Kriminol.**, v. 196, p. 165, 1995;
- O'LEARY, JJ; Browne, G; Landers, RJ; *et al.* The importance of fixation procedures on DNA template and its suitability for solution-phase in

- polymerase chain reaction and PCR *in situ* hybridization. **Histochem. J.**, v. 26, p. 337, 1994;
- PANUCO, CAB; Rodriguez, ID; Mendez, JTH. Detection of *Chlamydia trachomatis* in pregnant women by the Papanicolaou technique, enzyme immunoassay and polymerase chain reaction. **Acta Cytol.**, v. 44, p. 114, 2000;
- PARDINI, MIMC; Barea-Carvalho, JA; Gushiken, T; Machado, PEA. Extração de DNA detectado emblocado em parafina para utilização em PCR. **J. Bras. Med.**, v. 72, p. 43, 1997;
- PAVELIC, J; Gall, TK; Bosnar, MH; *et al.* PCR amplification of DNA from archival specimens. A methodological approach. **Neoplasma**, v. 43, p. 75, 1996;
- PAWLOWSKY, R. Identification analysis using PCR of fresh or fixed and paraffin-embedded tissue. **Pol. Tyg. Lek.**, v. 50, p. 6, 1995.
- PERKINS, SL; Kjeldsberg, CR. Immunophenotyping of lymphomas and leukemias in paraffin-embedded tissues. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 99, p. 362, 1993;
- PIAZZA, M; Chirianni, A; Luizzi, G; *et al.* HIV-1 proviral DNA sequences in the saliva with HIV infection. **Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.**, v. 68, p. 475, 1992;
- POLSKI, JM; Kimzey, S; Percival, RW; Grosso, LE. Rapid and effective processing of blood specimens for diagnostic PCR using filter paper and Chelex 100. **Mol. Pathol.**, v. 51 and p. 215, 1998;
- POZO, f; Tenorio, A. Detection and typing of lymphotropic herpesviruses by multiplex polymerase chain reaction. **J. Virol. Met.**, v.79, p. 9, 1999;
- PROVAN, AB; Hodges, E; Smith, AG; Smith, JL. Use of wax embedded bone marrow trephine biopsy specimens as a source of archival DNA. **J. Clin. Pathol.**, v. 45, p. 763, 1992;

- QUERESHI, MN; Barr, CE; Hewlitt, I; *et al.* Detection of HIV in oral mucosal cells. **Oral Dis.**, v. 3 (suppl.), p. S73, 1997;
- QUERESHI, MN; Barr, CE; Seshamma, T; *et al.* Infection of mucosal cells by human immunodeficiency virus type 1 in seropositive persons. **J. Infect Dis.**, v. 171, p. 190, 1995;
- RASKIN, S; Phillips, JA; Kaplan, G; *et al.* Cystic fibrosis genotyping by direct polymerase chain reaction analysis of Guthrie blood spots. **PCR Methods Appl.**, v. 2, p. 154, 1992;
- RICHARDS, B; Skoletsky, J; Shuber, AP; *et al.* Multiples PCR amplification from the CFTR gene using prepared from buccal brushes/swabs. **Hum. Mol. Genet.**, v. 2, p. 159, 1993;
- SAIKI, RK; Gelfand, DH; Stoffel, S; *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487, 1988;
- SANGUIOLO, F; Maceratesi, P; Mesoraca, A; *et al.* Simultaneous detection of delta F508, G542X, N1303K, G551D, 1717-1G-->A cystic fibrosis alleles by a multiplex DNA enzyme immunoassay. **Int. J. Clin. Lab. Res.**, v. 25, p. 142, 1995;
- SCHNEIDER, a; Borgnat, S; Lang, H; *et al.* Evaluation of microsatellite analysis in urine sediment for diagnosis of bladder cancer. **Cancer Res.**, v. 60, p. 4617, 2000.
- SEPP, S.; Szabó, I.; Uda, H.; Sakamoto, H. Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. **J. Clin. Pathol.**, v.47, p.318, 1994;
- SHIBATA, D. extraction of DNA from paraffin-embedded tissue for analysis by polymerase chain reaction: new tricks for a old friend. **Human Pathol.**, v. 25, p. 561, 1994;

- SMITH, SL; LINCH, CA. A review of major factors contributing to errors in human hair association by microscopy. **A. J. Foren. Med. Pathol.**, v. 20, p. 269, 1999;
- SOLOWAY, RD; Hansen, K; Lyon, DL; Payne, DA. Inhibitors presents in blood do not inhibit PCR from buccal cell preparations: case report. **In vivo Attiki**, v. 13, p. 453, 1999.
- SONG, Q; Haller, B; Schmid, R; *et al.* *Helicobacter pylori* in dental plaque: a comparison of different PCR primer sets. **Odontol.**, v. 44, p. 479, 1999;
- STETLER-STEVENSON, M; Raffeld, M; Cohen, P; Cossman, J. Detection of occult follicular lymphoma by specific DNA amplification. **Blood**, v. 72, p. 1822, 1988;
- STROBEL, E; Emminger, C; Mayer, G; *et al.* Detection of HIV-1 infection in dried blood spots from a 12-year-old ABO bedside test card. **Vox Sang.**, v. 75, p. 303, 1998;
- SUE, CM; Quigley, A; Katsabanis, S; *et al.* Detection of MELAS A3243G point mutation in muscle, blood and hair follicles. **J. Neurol. Sci.**, v. 161, p. 36, 1998;
- SUNDARESAN, v; Ganly, P; *et al.* Paraffin wax-embedded material as source of DNA for the detection of somatic genomic changes. **J. Pathol.**, v. 169, p.43, 1993;
- SUN, G; Xu, Y; Wu, M. Effects of some physical and chemical factors on both human and hair DNA and results of Sex determination by polymerase chain reaction. **Hua Hsi I Ko Ta Hsueh Hsueh Pao**, v. 26, p. 311, 1995;
- SWEET, D.; Dizinno, JÁ. Personal Identification Through Dental Evidence – Tooth Fragments to DNA. **CDA Journal**, v. 24, p. 35, 1996;
- SWEET, D; Hildebrand, D. Saliva from cheese bite yields DNA profile of burglar: a case report. **Int. J. Legal Med.**, v. 112, p. 201, 1999.

- SWEET, D; Lorente, M; Valenzuela, A; *et al.* Increasing DNA extraction yield from saliva strains with a modified Chelex method. **Forensic Sci. Int.**, v. 83, p. 167, 1996;
- SWEET, D; Shutler, GG. Analysis of salivary DNA evidence from a bite mark on a body submerged in water. **J. Forensic Sci.**, v. 44, p. 1069, 1999;
- TBAKHI, A; TOTOS, G; PETTAY, J; *et al.* The effect of fixation on detection of B-cell clonality by PCR. **Modern Pathol.**, v. 12, p. 272, 1999;
- TAKAMI, K; Yoshida, M; Yoshida, Y; Kojima, Y. Sex determination in giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) using hair roots by polymerase chain reaction amplification. **J. Reprod. Develop.**, v. 44, p. 73, 1998;
- TATSUMI, N; Yokota, M; Shindoh, K; *et al.* Detection of thalassemia genes using smeared blood film or leukocytes adhering to polystyrene fiber. **Soth. As. J. Trop. Med. Health**, v. 28 Suppl, p. 128, 1997;
- UCHIHI-R; TAMAKI-K; KOJIMA-T; YAMAMOTO-T; KATSUMATA-Y. Deoxyribonucleic acid (DNA) typing of human leukocyte antigen (HLA)-DQA1 from single hairs in Japanese. **J. Forensic Sci.**, v. 37, p. 853, 1992;
- UMEDA, M; Contrera, A; Chen, C; *et al.* The utility of whole saliva to detect the oral presence of periodontopathic bacteria. **J. Periodont.**, v.69, p. 828, 1998;
- Van Der ZANDEM, AGM; Hoentjen, AH; Heilman, FGC; *et al.* Simultaneous detection and strain differentiation on *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and in stained microscopic preparations. **Mol. Pathol.**, v.51, p. 209, 1998;
- VEDYAKOV, AM; Dolgikh, MS. Detection of cytomegalovirus DNA by polymerase chain reaction in biological from patients with organ allografts. **Klin. Lab. Diag.**, v. 0; p. 19, 1998;

- VOCHEM, M; Hamprecht, K; Jalman, G; Speer, CP. Transmission of cytomegalovirus to preterm infants through breast milk. **Ped. Infect Dis. J.**, v. 17, p. 53, 1998;
- YAMAMOTO, I; Ishizu, H. Km genotyping by polymerase chain reaction using allele specific amplification primers. **Forensic Sci. Int.**, v. 75, p. 85, 1995;
- YOSHII-T; TAMURA-K; ISHIYAMA-I. Presence of a PCR-inhibitor in hairs. **Nippon-Hoigaku-Zasshi.**, v. 46, p. 313, 1992;
- YOSHII-T; TAMURA-K; TANIGUCHI-T; *et al.* Water-soluble eumelanin as a PCR-inhibitor and a simple method for its removal. **Nippon-Hoigaku-Zasshi.**, v. 47, p. 323, 1993.
- WALSH, PS, Metzger, DA; Higuchi, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **Biotechniques**, v. 10, p. 506, 1991;
- WAN, JH; Trainor, KJ; Brisco, MJ; Morley, AA. Monoclonality in B-cell lymphoma detected in paraffin wax embedded sections using polymerase chain reaction. **J. Clin. Pathol.**, v. 43, p. 888, 1990;
- WEGEL, JG.; Herrin, G. Deduction of the order of sexual assaults by DNA analysis of two condoms. **J. Foren. Sci.**, v. 39, p. 844, 1994;
- WILBORN, F; Schinidt, CA; Lorenz, F; *et al.* Human herpesvirus type 7 in blood donors: detection by polymerase chain reaction. **J. Med. Virol.**, v. 47, p. 65, 1995;
- WILCOX, MH; Reynolds, MT; Hoy, CM; Brayson, J. Combined cervical swab and urine specimens for PCR diagnosis of genital *Chlamydia trachomatis* infection. **Sex. Trans. Infect**, v. 76, p. 177, 2000;
- WRIGHT, DK; Manos, MM. Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In: INNIS, MA, ed. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego Academic Press, 153-156, 1990.

ANEXO 1

Escolha do material para extração de DNA

1. **Material de Arquivo**: procurar os laboratórios responsáveis pelos arquivos e solicitar da chefia as amostras necessárias. Podem ser solicitados:
 - ❖ **Tecidos incluídos em parafina** (coleta na ficha técnica 2)
 - ❖ **Lâminas de Hemograma** (coleta na ficha técnica 3)
 - ❖ **Lâminas de Mielogramas** (coleta na ficha técnica 4)
 - ❖ **Gotas de sangue em card.** (coleta na ficha técnica 5)
 - ❖ **Lâminas de Papanicolaou, aspirados tumorais, líquido amniótico, fluido cerebrospinal, etc.**

2. **Fontes escassas**: após assinatura de consentimento esclarecido, voluntários a participar de pesquisas podem doar suas amostras ou estas serem encaminhadas juntamente com uma solicitação médica para realização de exames;
 - ❖ **Células da mucosa bucal** (coleta na ficha técnica 6)
 - ❖ **Bulbos capilares** (coleta na ficha técnica 7)
 - ❖ **Urina total** (coleta na ficha técnica 8)

FICHA TÉCNICA nº 2**Coleta e pré-tratamentos de tecidos incluídos em parafina para extração de DNA**

- ❖ Fazer com antecedência a solicitação do material para o chefe de Departamento de Patologia;
- ❖ Solicitar cortes de 10 µm de tecidos específicos ou de amostras aleatórias, dependendo do estudo a ser realizado;
- ❖ Os cortes devem ser guardados em tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL, e mantidos à temperatura ambiente até o momento da extração;
- ❖ Antes da extração de DNA, os cortes deve passar pelo processo de desparafinização, descrito abaixo:
 - acrescentar 1 mL de xilol na amostra, e deixar à temperatura ambiente, por 15 minutos, agitando o tubo algumas vezes;
 - centrifugar a amostra por 5 minutos e, com pipeta de 1 mL, descartar o xilol em frasco adequado, com cuidado para não dispensar a amostra;
 - repetir os procedimentos acima;
 - acrescentar à amostra, 0,5-1 mL de álcool etílico 100% e agitar e deixar à temperatura ambiente por 5 minutos;
 - centrifugar, por 5 minutos, e, com pipeta de 1 mL, descartar o etanol em frasco adequado;
 - repetir esses procedimentos;

- deixar a amostra secar à temperatura ambiente ou em estufa, antes que os procedimentos de extração de DNA se iniciem.

FICHA TÉCNICA nº 3

Coleta e pré-tratamento de lâminas de hemograma coradas e não-coradas para extração de DNA**Lâmina de Hemograma Não Corada**

- ❖ Solicitar ao responsável pelas amostras as lâminas não coradas que são duplicatas de lâminas que já passaram pela microscopia, ou solicitá-las junto ao paciente/doador, no momento da coleta;
- ❖ Com lâmina de bisturi, raspar o esfregaço para dentro de tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL, tomando o cuidado de proteger a bancada e as demais amostras da sujeira e de trocar a lâmina de bisturi para cada amostra;
- ❖ Guardar os tubos com as amostras em temperatura ambiente, até a extração de DNA.

Lâmina de Hemograma Corada com Leishman

- ❖ As lâminas coradas geralmente pertencem a arquivos de alguns meses e já passaram pela microscopia. Solicitá-las junto ao responsável pelo arquivo;
- ❖ Por já terem sido “lidas”, encontram-se com óleo mineral sobre o esfregaço corado. Para que este seja retirado, a lâmina deve ser lavada dentro de um frasco com xilol, sendo segura com uma pinça. Deve-se esperar a secagem do xilol que ficou sobre a lâmina;
- ❖ Com o auxílio de uma lâmina de bisturi, o esfregaço corado deve ser raspado para dentro de um tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL e conservado em temperatura ambiente até o momento da extração de DNA.

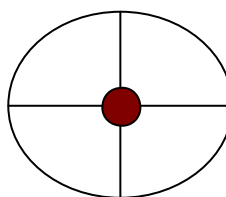
FICHA TÉCNICA nº 4**Coleta e procedimentos iniciais para extração de DNA de mielograma**

- ❖ Solicitar a amostra de mielograma ao responsável pelo seu arquivo;
- ❖ Escolher amostras que apresentam duplicatas e cujo esfregaço de aspirado de medula óssea não tenha ficado ideal para microscopia;
- ❖ Com uma lâmina de bisturi estéril, raspar o esfregaço para dentro de tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL, tomando os cuidados para proteção da bancada e das demais amostras da sujeira feita, bem como trocar de lâmina de bisturi para amostras diferentes.

FICHA TÉCNICA nº 5

Coleta e procedimentos iniciais para extração de DNA de gotas de sangue em Guthrie card

- ❖ Assinatura de consentimento esclarecido do doador de amostra, que pode ser uma amostra aleatória ou de pacientes específicos, quando os testes são também para estudos de um gene específico;
- ❖ As gotas de sangue podem ser oriundas de segmento de bolsa de doação de sangue (“macarrão”), ou através de perfurações realizadas com perfurador estéril, no dedo anular da mão esquerda do doador, que passou por higienização precedente;
- ❖ As gotas de sangue devem ser colhidas em quadruplicatas (ou duplicatas, dependendo do *card* utilizado), sendo colocadas no centro de cada círculo do *card*, onde geralmente, encontram-se duas linhas que se cruzam. Colocar a gota sobre a intersecção dessas duas linhas, como mostra a figura:



- ❖ O *Card* deve ser adequadamente guardado dentro de envelopes específicos (geralmente vendidos junto com os *cards*), juntamente com pequenos saquinhos com sílica, vedados e devidamente identificados;
- ❖ Destacar apenas um quadrante do círculo, recortando o excesso de papel com tesoura limpa com álcool 70% e colocando o fragmento com sangue

dentro de tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL, para iniciarem-se os procedimentos de extração de DNA;

- ❖ Para extração de DNA, deve ser acrescentado no Eppendorf, 1 mL de solução TKM-1 (ficha técnica 22), deixando-o à temperatura ambiente por 30 minutos, realizando vórtex algumas vezes, para desprendimento das células do *card*. Também pode ser feita, incubação em banho-maria, a 37 °C, para a mesma finalidade;
- ❖ Após vórtex final de 1 minuto, o fragmento de papel deve ser retirado com pinça estéril, ou com auxílio de uma ponteira estéril, e a amostra deve ser centrifugada por 5 minutos, e a solução de TKM-1, deve ser descartada, com o auxílio de uma pipeta de 1 mL. Dessa forma, a amostra está pronta para os procedimentos de extração de DNA;
- ❖ **Observação:** no caso de extração de DNA utilizando resinas quelantes como Chelex 100® e InstaGene®, a eliminação anterior do fragmento de papel não é necessária, podendo ocorrer após a incubação da amostra com a resina.

FICHA TÉCNICA nº 6

Coleta e procedimentos iniciais para extração de DNA de células de mucosa oral

- ❖ Recomenda-se que, anteriormente à coleta, caso o doador tenha se alimentado minutos antes, que seja feito um enchague da boca com água corrente, ou água estéril;
- ❖ Realizar a coleta com o auxílio de um *swab* estéril;
- ❖ A coleta pode ser feita pelo pesquisador, ou pelo próprio doador, à medida que vai sendo instruído sobre como fazê-la;
- ❖ Friccionar o *swab* no fundo interno da bochecha, tomando o cuidado para não sangrar;
- ❖ Se houver sangramento, descartar adequadamente o *swab*;
- ❖ Após a coleta, colocar o *swab* em um tubo tipo Eppendorf de 1,5 a 2,0 mL, e cortar a haste excedente, com tesoura limpa com álcool 70%;
- ❖ O material coletado, pode ser mantido a 4°C, por até dois dias, ou a – 20°C, num período de tempo maior, até a extração de DNA;
- ❖ Para retirada das células do *swab*, recomenda-se incubação deste, em banho-maria a 37°C, por 10 minutos, ou à temperatura ambiente, por 30 minutos, com 1 mL de solução de TKM-1 ou mesmo água estéril;
- ❖ Realizar vórtex de 15 segundos, várias vezes, e um vórtex final de 1 minuto e, com o auxílio de uma pinça, retirar o *swab*;
- ❖ A amostra deve ser centrifugada por 5 minutos e o sobrenadante retirado com pipeta de 1 mL, restando apenas o botão de células bucais no fundo do tubo tipo Eppendorf, prontas para os procedimentos de extração de DNA.

Coleta e procedimentos iniciais para extração de DNA de bulbos capilares

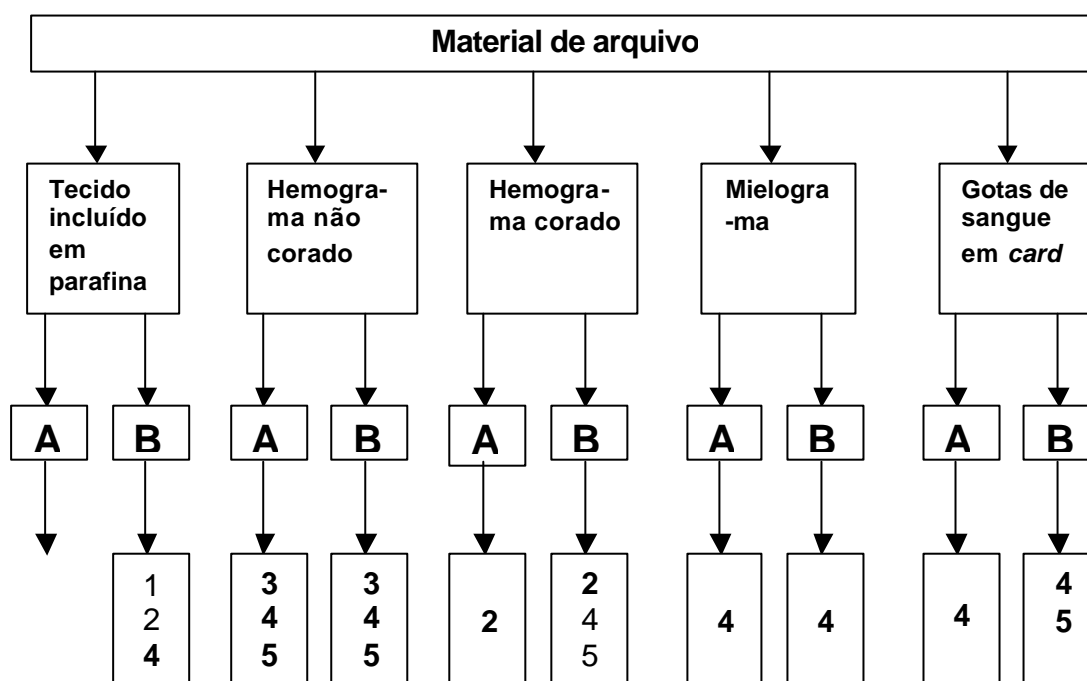
- ❖ Com o auxílio de uma pinça de retirar sobrancelhas, limpa com álcool 70%, retirar, um a um, os fios de cabelo, contendo os bulbos capilares;
- ❖ Com tesoura limpa com álcool 70%, recortar o fio adjacente ao bulbo, mantendo cerca de 1 cm deste;
- ❖ Colocar o(s) bulbo(s) capilar(es) dentro de um tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL;
- ❖ Guardar a amostra a -20°C ;
- ❖ Acrescentar à amostra, 0,5 a 1 mL de solução TKM-1 e deixar à temperatura ambiente, por 5 minutos;
- ❖ Centrifugar a amostra por 5 minutos, e retirar a solução com o auxílio de uma pipeta de 1 mL. O Bulbo já pode passar pelos procedimentos de extração de DNA.

Coleta e procedimentos iniciais para extração de DNA de urina total

- ❖ O doador deve receber um tubo Falcon estéril de 50 mL, no qual deve depositar a urina;
- ❖ No laboratório, a urina deve ser homogeneizada por inversão e alíquotas de 1 a 2 mL devem ser colocadas em tubo tipo Eppendorf, com o auxílio de pipeta de vidro ou automática;
- ❖ Caso a urina seja guardada, deve ser conservada, até 3 dias, a 4°C. Para um tempo maior, -20°C. Ao ser retirada de ambas temperaturas, podem ser colocadas em banho-maria a 37°C, por 10 minutos, para dissolução dos grumos que se formam com a baixa temperatura;
- ❖ Centrifugar as alíquotas a 14.000 rpm, por 5 minutos, com descarte do sobrenadante, com auxílio de pipeta de 1 mL;
- ❖ Acrescentar ao botão de células, 1 mL de solução TKM-1;
- ❖ Realizar vórtex até o botão se dissolver na solução;
- ❖ Centrifugar novamente, a 14.000 rpm, por 5 minutos e descartar o sobrenadante. A amostra está pronta para a extração de DNA.

Escolha do método de extração de DNA

Para facilitação da escolha do método de extração de DNA de cada tipo de amostra, foi elaborado o segundo diagrama:



A – fragmento a ser amplificado, em torno de 764 pb
B – fragmento a ser amplificado, em torno de 220 pb

1 – extração de DNA com digestão por proteinase K e purificação com fenol/clorofórmio (ficha técnica 10);

2 – extração de DNA com digestão por proteinase K, sem fenol/clorofórmio (ficha técnica 11);

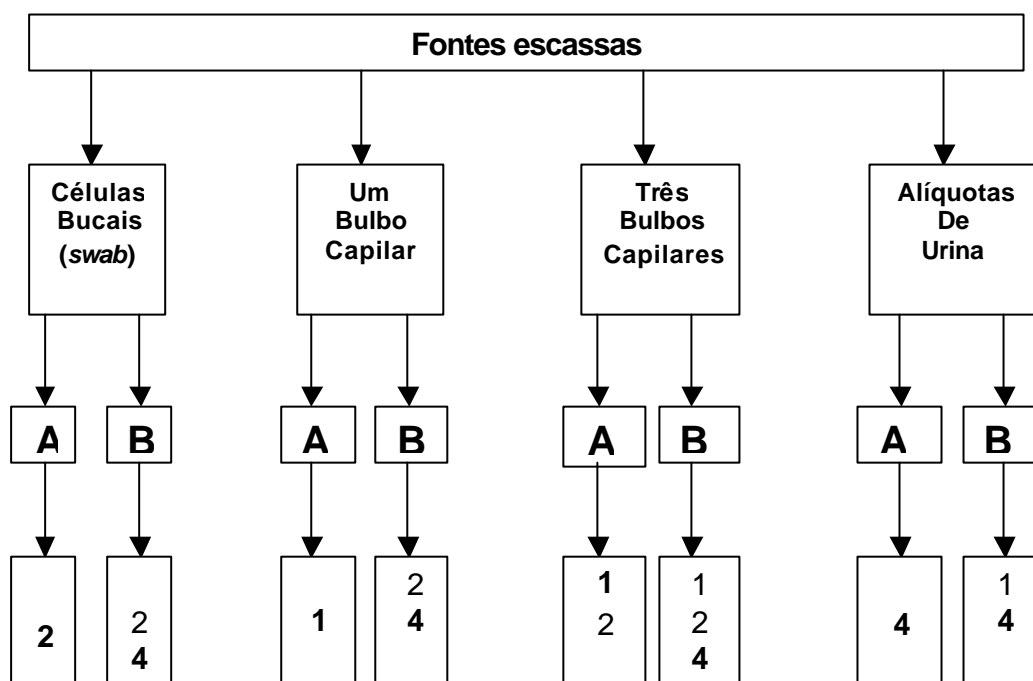
3 – extração de DNA com Chelex 100® (BioRad) (ficha técnica 12);

4 – extração de Dna com InstaGene® (BioRad) (ficha técnica 13);

5 – extração de DNA por fervura em água estéril (ficha técnica 14).

Observação: o número do método em negrito destaca aquele mais fácil, rápido e eficiente.

POP/BLP – Biologia Molecular – Hemocentro de Botucatu



Extração de DNA por digestão com proteinase K, seguida de purificação com fenol/clorofórmio (método 1)

- ❖ Acrescentar 196 μL de tampão de digestão por proteinase K e 4 μL de proteinase K a 20 mg/mL (ficha técnica 22);
- ❖ Incubar em banho-maria a 56°C, por toda noite;
- ❖ Ferver em banho-maria, a 100°C, por 8 minutos;
- ❖ Acrescentar 1V de fenol, e deixar à temperatura ambiente, por 5 minutos, agitando intermitentemente o tubo;
- ❖ Adicionar 1V de solução de clorofórmio com álcool isoamílico 24:1, deixando à temperatura ambiente por 5 minutos, agitando a amostra;
- ❖ Centrifugar a 10.000 rpm, por 5 minutos e transferir a fase aquosa para um novo tubo tipo Eppendorf de 1,5 a 2,0 mL;
- ❖ Acrescentar 1/10V de acetato de sódio 3 M e 2V de álcool etílico 100%;
- ❖ Submeter a mistura a -20°C, por duas horas ou toda a noite;
- ❖ Centrifugar a 14.000 rpm, por 5 minutos e desprezar o sobrenadante;
- ❖ Adicionar 500 μL de álcool etílico 70% e agitar o tubo;
- ❖ Centrifugar a 14.000 rpm, por 5 minutos e desprezar o sobrenadante, secando o máximo a amostra, com o auxílio de uma pipeta de 100 μL ;
- ❖ Deixar secar à temperatura ambiente, em estufa ou em liofilizador;
- ❖ Diluir o DNA em 50 a 80 μL de água estéril, facilitando com incubação em banho-maria, a 56°C, por 10 minutos.
- ❖ Fazer leitura espectrofotométrica, e utilizar 1 μg de DNA como molde para PCR.

Extração de DNA com digestão por proteinase K, sem purificação com fenol/clorofórmio (método 2)

- ❖ Acrescentar à amostra 790 μL de tampão de digestão e 20 μL de proteinase K a 10-20 mg/mL;
- ❖ Submeter à digestão em banho-maria, a 56°C, por toda noite;
- ❖ Centrifugar a 12.000 rpm, por 10 minutos e transferir o sobrenadante para tubo tipo Eppendorf de 2,0 mL;
- ❖ Acrescentar 400 μL de cloreto de lítio a 3 M e deixar 30 minutos a -20°C ;
- ❖ Centrifugar a 14.000 rpm, por 15 minutos e transferir o sobrenadante para tubo de hemólise;
- ❖ Acrescentar 2 mL de etanol absoluto, deixar a -20°C por toda noite;
- ❖ Centrifugar a 2.000 rpm, por 15 minutos, descartando o sobrenadante;
- ❖ Passar o DNA para Eppendorf de 1,5 a 2,0 mL e acrescentar 1 mL de etanol 70% e inverter;
- ❖ Centrifugar a 10.000 rpm, por 5 minutos e desprezar o sobrenadante;
- ❖ Deixar secar à temperatura ambiente, em estufa ou liofilizador;
- ❖ Fazer leitura em espectrofotômetro e usar 1 μg de DNA como molde para a PCR.

**Extração de DNA através de incubação em resina Chelex 100[®]
(método 3)**

- ❖ Preparar solução de Chelex 100[®] (BioRad) a 5%;
- ❖ Acrescentar 200 µL dessa solução na amostra;
- ❖ Vórtex por 15 segundos;
- ❖ Spin;
- ❖ Incubar em banho-maria a 55°C, por 20 a 30 minutos;
- ❖ Vórtex por 15 segundos;
- ❖ Spin;
- ❖ Ferver a 100°C, em banho-maria, por 10 minutos;
- ❖ Vórtex
- ❖ Centrifugar a 10.000 rpm, por 5 minutos;
- ❖ Usar alíquotas de 20 µL como DNA molde de PCR;
- ❖ Estocar a -20°C e, ao reutilizar o extrato, fazer novo vórtex e centrifugação.

**Extração de DNA através de incubação em resina InstaGene®
(método 4)**

- ❖ Acrescentar 200 µL de InstaGene® (BioRad) (aliquotar em agitação);
- ❖ Vórtex, por 15 segundos;
- ❖ Spin;
- ❖ Incubar em banho-maria, a 56°C, por 20 a 30 minutos;
- ❖ Vórtex;
- ❖ Spin;
- ❖ Ferver em banho-maria, por 8 minutos;
- ❖ Vórtex, por 15 segundos;
- ❖ Centrifugar a 10.000 rpm, por 3 minutos;
- ❖ Usar alíquotas de 40 µL, como molde para a PCR;
- ❖ Estocar a -20°C e, ao reutilizar a amostra, dar vórtex e centrifugar novamente.

Obs.: Em reações onde o volume final é pequeno e que não permite 40µL como molde, deve-se utilizar o volume que corresponda à soma da água mais o DNA dessa reação.

Extração de DNA por fervura em água estéril (método 5)

- ❖ Acrescentar 100 μL de água estéril à amostra;
- ❖ Ferver a 100°C, em banho-maria, por 10 a 20 minutos;
- ❖ Usar 50 μL como molde para PCR ou fazer leitura espectrofométrica e utilizar 1 μg de DNA.

Leitura do DNA em espectrofotômetro

- ❖ Em tubo tipo Eppendorf estéril, colocar: 497,5 μ L de água deionizada estéril e 2,5 μ L do extrato;
- ❖ Homogeneizar;
- ❖ Spin;
- ❖ Deixar em geladeira por toda noite;
- ❖ Realizar a leitura em espectrofotômetro Pharmacia®, transferindo a amostra em cubetas de quartzo;
- ❖ Operação do espectrofotômetro Pharmacia®:
 - Colocar papel na impressora e ligá-la;
 - Ligar o espectrofotômetro (botão atrás do equipamento) e esperar calibração;
 - Abrir a tampa do espectrofotômetro e colocar na posição 1, uma cubeta de quartzo, com água estéril (para referência) e, a partir da 2, as amostras a serem quantificadas;
 - Apertar o botão *mode* até aparecer na tela DNA, então apertar *enter*;
 - Aparece escrito *Background Y/N* (se não estiver posicionado em *No*, posicionar com o auxílio das setas);
 - Aparece *Set reference* e então apertar o botão *Set ref* para que a água seja utilizada como referência;
 - Apertar a tecla *Run* para a leitura de cada uma das amostras;
 - A leitura do DNA é feita em 260 nm e a de proteína em 280 nm;
 - Os resultados são impressos e podem ser trabalhados.

Preparação da PCR para amplificação de BDNF

Preenchendo corretamente a grade abaixo, cada coluna representa um tubo para a reação. A concentração final, logicamente, depende da concentração dos reagentes:

	AMOSTRAS										[]	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	final	
Água												(varia)
Tampão 10X												20 mM
dNTP												100 µM
MgCl ₂												3 mM
Primer 1												100 mM
Primer 2												100 mM
Taq												3 U
DNA												(varia)

Obs. 1: O 1 deve ser sempre um DNA conhecidamente positivo para a amplificação estudada, e o 10, a mistura para PCR, sem o DNA (controle negativo);

Obs. 2: Os *primers* para BDNF possuem a seguinte seqüência: BDNF1 (5`AUG GAG AUC CCU GGA TCC ATG ACC ATC CTT TTC CTT 3`) e BDNF2 (5`ACG CGU ACU AGU GGA TCC CCT TTT AAT 3`)

Os ciclos de amplificação são 40 e podem ser resumidos da seguinte maneira:

Passo 1 (1X)	Passo 2 (40 X)	Passo 3 (1 X)
94°C por 7 minutos	94°C por 45 segundos	72°C por 10 minutos
	55°C por 30 segundos	
	72°C por 90 segundos	

- ❖ Os resultados podem ser visualizados em eletroforese (fichas técnicas 19 e 20)
- ❖ As amostras amplificadas devem ser guardadas a -20°C.

Preparação da PCR para amplificação de FV

	AMOSTRAS										[]
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	final
Água											(varia)
Tampão 10X											10 mM
DNTP											200 µM
MgCl ₂											3 mM
Primer 1											400 ng
Primer 2											400 ng
Taq											2,5 U
DNA											(varia)

Obs.: Fv1 (5'CTT AAG GAA ATG CCC CAT TA 3') e Fv2 (5'CCA TGC TTA ACA AGA CCA 3')

Os ciclos de amplificação são 35 e podem ser resumidos da seguinte maneira:

Passo 1 (1X)	Passo 2 (35 X)	Passo 3 (1 X)
94°C por 7 minutos	94°C por 40 Segundos	72°C por 7 minutos
	57°C por 40 Segundos	
	72°C por 2 minutos	

- ❖ Os resultados podem ser visualizados em eletroforese (fichas técnicas 19 e 20)
- ❖ As amostras amplificadas devem ser guardadas a -20°C.

Preparação da PCR para amplificação de ABL

	AMOSTRAS										[]
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	final
Água											(varia)
Tampão 10X											20 mM
DNTP											400 µM
MgCl ₂											1,5 mM
Primer 1											150 nM
Primer 2											150 nM
Taq(hot start)											1 U
DNA											(varia)

Obs.: ab1 (5' ATC TCC ACT GGC CAC AA 3') e ab2 (5' AGT GAA GCC GCT CGT T 3')

Os ciclos de amplificação são 35 e podem ser resumidos da seguinte maneira:

Passo 1 (1X)	Passo 2 (35 X)	Passo 3 (1 X)
94 °C por 7 minutos	94 °C por 25 segundos	72 °C por 10 minutos
	49 °C por 30 segundos	
	72 °C por 60 segundos	

- ❖ Os resultados podem ser visualizados em eletroforese (fichas técnicas 19 e 20)
- ❖ As amostras amplificadas devem ser guardadas a -20°C.

FICHA TÉCNICA nº 19

Eletroforese em gel de agarose 3 %

- ❖ Medir 0,90 g de agarose, preferencialmente dentro de um Erlenmeyer de 200 mL;
- ❖ Acrescentar 30 mL de TEB 0,5 X (ficha técnica 22);
- ❖ Medir a massa da mistura e anotar;
- ❖ Ferver por 1,5 minutos em forno microondas, na temperatura máxima;
- ❖ Sobre a balança, completar o volume com água deionizada, até atingir a massa inicial da mistura;
- ❖ Colocar 10 μL de brometo de etídio, a 8 mg/mL (ficha técnica 22), no gel e agitar;
- ❖ Despejar sobre o berço, anteriormente preparado, colocar o pente e esperar polimerizar;
- ❖ Aplicar a amostra amplificada, sendo que, em cada poço, devem ser colocados 6 μL do *amplicon*, misturados a 2 μL de *bluejuice* Gibco® 5X;
- ❖ Em um poço, deve ser colocada uma mistura de 1,5 μL de peso molecular conhecido e 2 μL de *bluejuice* Gibco® 5X;
- ❖ A corrida deve ser feita a 100 V, 400 mA, por 30-40 minutos, com tampão TEB 0,5X na cuba;
- ❖ A visualização deve ser feita em transiluminador UV e registrada.

Eletroforese em gel de poliacrilamida 5 % (6 géis)

- ❖ Preparar 30 mL de solução, suficiente para 6 géis: 24 mL de água deionizada, 2,3 mL de TEB 10X e 3,7 mL de bis-acrilamida 40% (ficha técnica 22);
- ❖ Deixar a mistura 5 minutos na bomba de vácuo a 30 pol/Hg;
- ❖ Aliquotar em tubo de vidro com tampa, 5 mL da solução, o que equivale a um gel;
- ❖ Guardar a 4°C até o uso;
- ❖ Para usar, preparar uma solução de persulfato de amônio 10 % em tubo tipo Eppendorf;
- ❖ Em fluxo laminar ou capela de exaustão, acrescentar em cada tubo com gel 31,4 µL de persulfato de amônio 10% e 3,14 µL de TEMED;
- ❖ Fechar tubo e homogeneizar por inversão;
- ❖ Aplicar os géis nas placas, previamente limpas e montadas, colocar os pentes e esperar polimerização (pode ser adiantada em estufa a 36°C);
- ❖ Aplicar as amostras nos poços (2 µL de *bluejuice* Gibco® 5X, misturados com 10 µL de *amplicon*);
- ❖ Em um poço aplicar uma mistura de 1,5 µL de peso molecular conhecido e 2 µL de *bluejuice* Gibco® 5X;
- ❖ Correr a 70 V, 400 mA, por 60 a 70 minutos, em cuba eletroforética com tampão TEB 1X;

- ❖ Preparar uma cuba com solução de 250 mL de água deionizada e 100 μ L de brometo de etídio 0,8%;
- ❖ Retirar cuidadosamente o gel das placas e marcar o canto esquerdo dele. Banhá-lo na solução de brometo de etídio, por 3 a 5 minutos e transferir o gel para o transiluminador UV, utilizando um suporte apropriado;
- ❖ Registrar o resultado.

Interpretação dos resultados eletroforéticos

- ❖ Nas reações para BDNF, devem ser vistas bandas de 764 pb; para FV, bandas de 220 pb e, para ABL, bandas de 106 pb;
- ❖ Em todas as reações as bandas devem aparecer, já que se tratam de genes constitucionais. Caso haja negatividade na amplificação, sugere-se que os métodos de extração não foram satisfatórios (inclusive para eliminar inibidores da PCR) ou que há grande fragmentação de DNA;

Resultados duvidosos que dificultam interpretação

1. O DNA controle não amplifica e aparecem as bandas pesquisadas:
 - ❖ Se as bandas forem bem definidas, não há necessidade de repetição da reação.
2. Amplificações negativas, com DNA controle positivo amplificando, quando os métodos de extração de DNA forem o 1, 2 e 5:
 - ❖ Os extratos devem passar por tratamento com a resina quelante InstaGene® (BioRad), conforme ficha técnica número 13;
 - ❖ Nova PCR deve ser realizada.
3. Negativo apresenta amplificação:
 - ❖ Há evidência de contaminação das amostras e/ou do laboratório;
 - ❖ Após detecção do grau de contaminação das amostras e/ou ambiente, deve-se iniciar trabalho de descontaminação.
4. Presença de bandas inespecíficas:

- ❖ Se não atrapalharem a interpretação dos resultados, não é necessário repetir a reação;
- ❖ Caso sejam muitas e atrapalhem a interpretação da amplificação, a reação deve ser repetida, diminuindo o número de ciclos de PCR, ou a concentração de magnésio.

Principais soluções utilizadas❖ Solução TKM-1

10mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 2 mM EDTA

Para preparar 500 mL:

2,5 mL de Tris-HCl pH 7,6 2M

5 mL de KCl 1M

Autoclavar todas as soluções

10 mL de MgCl₂ 1M

5 mL de EDTA 1M

❖ TEB 10X

Tris 27g

EDTA 25 mL de solução 0,2 M

Ácido bórico 13,75 g

Água deionizada qsp 250 mL

Acertar o pH em 8,0

Autoclavar

Estocar a 4°C

❖ Brometo de etídio 0,8 %

8 mg de brometo de etídio

1 mL de água deionizada

Estocar a 4°C

❖ Bis-acrilamida 40 %

38 g de acrilamida

2 g de N,N'metilenobisacrilamida

Água deionizada qsp 100 mL

❖ Solução de digestão por proteinase K

10 mM Tris-HCl

10 mM EDTA

10 mM NaCl

0,5 % SDS

Exemplo: 1 mL HCl; 0,2 mL NaCl; 2 mL EDTA, 5 mL SDS; água qsp 100 mL;

❖ Proteinase K a 20 mg/mL

Medir em balança analítica 0,02 g de proteinase K e 1 mL de água.

RESUMO

Este trabalho visou a comparação de 5 diferentes métodos de extração de DNA, a partir de amostras de materiais de arquivo (tecido incluído em parafina, lâmina de hemograma corada e não corada com Leishman, lâmina de mielograma, gotas de sangue em *Guthrie card*) e fontes escassas (células bucais, 1 e 3 bulbos capilares, 2 mL de urina), para avaliar a facilidade de aplicação dos mesmos e possibilidade de amplificação desse DNA pela técnica de PCR. Os métodos incluíram digestão por proteinase K, seguida e não seguida por purificação com fenol/clorofórmio, utilização de Chelex 100[®], utilização de InstaGene[®] e fervura em água estéril. O DNA obtido, foi testado por PCR, para a amplificação de três fragmentos gênicos: de *Brain-derived neutrophilic factor* (764 pb), de Fator V Leiden (220 pb) e de Abelson (106 pb), sendo que, a amplificação para o primeiro, eliminava a necessidade dos demais. Conforme o tamanho do fragmento gênico estudado, a fonte potencial de DNA e o método de extração utilizado, os resultados caracterizaram o melhor caminho para padronização dos procedimentos técnicos a serem incluídos e apresentados no manual de Procedimentos Operacionais Padrão do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro – HC – UNESP – Botucatu.

ABSTRACT

The present work aimed to compare five different methods of DNA extraction of archived materials samples (paraffin-embedded tissues, periferic blood smear – stained or non-stained with Leshman, aspired bone marrow smears and blood guts in *Guthrie* card) and rare sources (oral cells, 1 and 3 capilar bulbs, 2 mL urine), to avaliate the aplication facility and the amplification possibility one for PCR. The methods included proteinase K digestion – followed or non by phenol/chloroform purification, Chelex 100® (BioRad), InstaGene® (BioRad) and boilling in sterile water. The DNA obtained, was tested for amplification of 3 genic fragments: from Brain-derived neutrophic factor gene (764 bp), Factor V Leiden gene (220 bp) and Abelson gene (106 bp). According to the genic fragment lenght studed, the DNA potential source and the extraction method used, the results characterized better guidelines for padronization of the techniques procedures for to Good Manufacturing Practices from Molecular Biology Laboratory from Blood Center – Medicine School – UNESP - Botucatu .

Autorizo a reprodução deste trabalho desde que sejam obedecidas as
devidas normas de citação de seu autor.

Botucatu, 10 de setembro de 2001.

JAQUELINE ALVES BAREA