



XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE HISTOTECNOLOGIA

FORTALEZA - CE - 02/05 A 04/05/2019



TÉCNICAS DE OBTENÇÃO E ANÁLISES DE ÁCIDOS NUCLEICOS OBTIDOS DE MATERIAIS PARAFINADOS

Dr. Howard Lopes Ribeiro Junior

Biólogo – Ciências Médicas

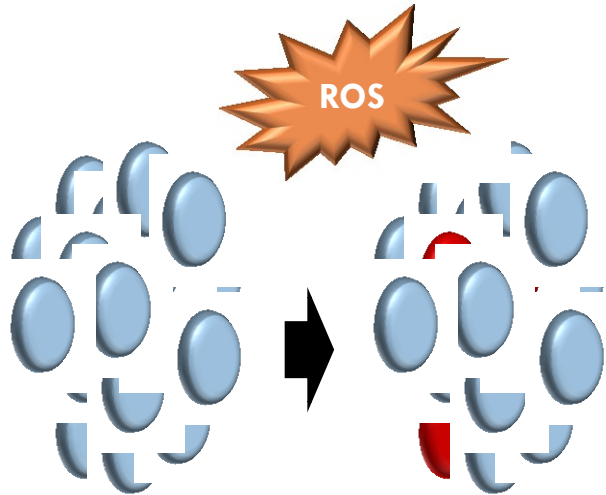
Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos

Universidade Federal do Ceará



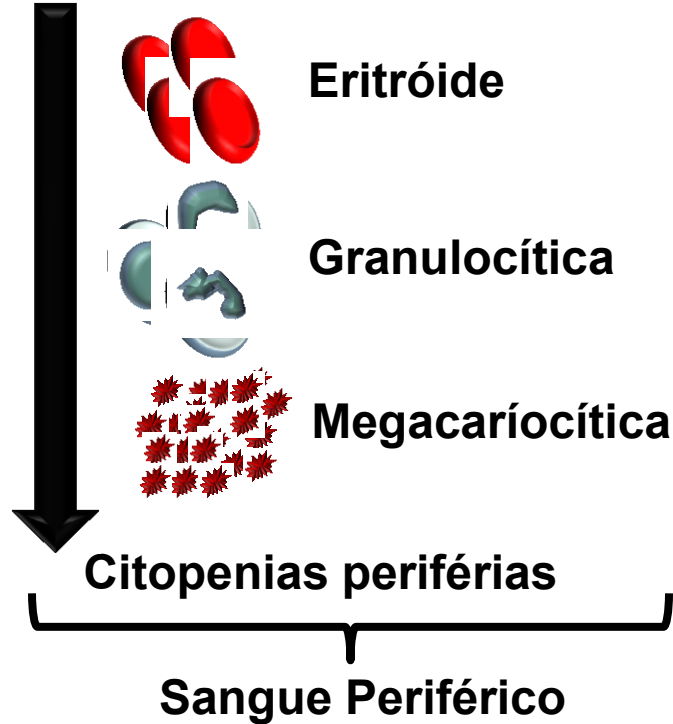
Situação clínica

Síndrome Mielodisplásica



Células tronco hematopoiéticas

Medula óssea



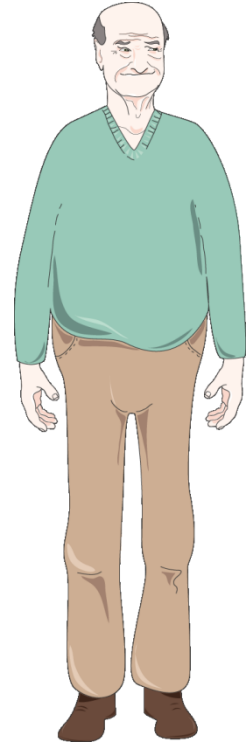
Eritróide

Granulocítica

Megacariocítica

Citopenias periféricas

Sangue Periférico



Situação clínica

Síndrome Mielodisplásica

Dados do SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results*) – 2007 – 2011

❖ 4,9 casos por 100.000 habitantes (COGLE, 2015)

❖ 0,14 caso por 100.000 habitantes/ano – idade menor que 40 anos

❖ 36 casos por 100.000 habitantes/ano – idade maior que 80 anos (SEKERES, 2010)

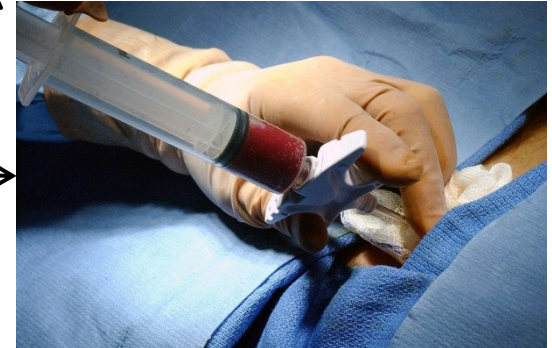
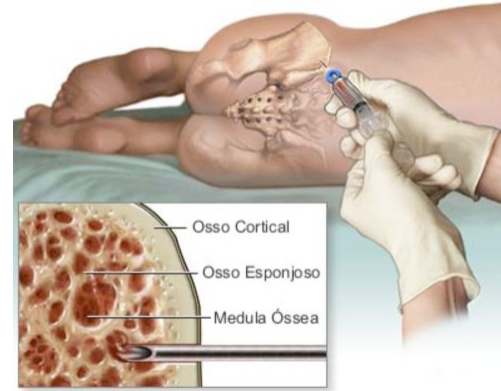
Situação clínica

Síndrome Mielodisplásica

❖ Doença rara

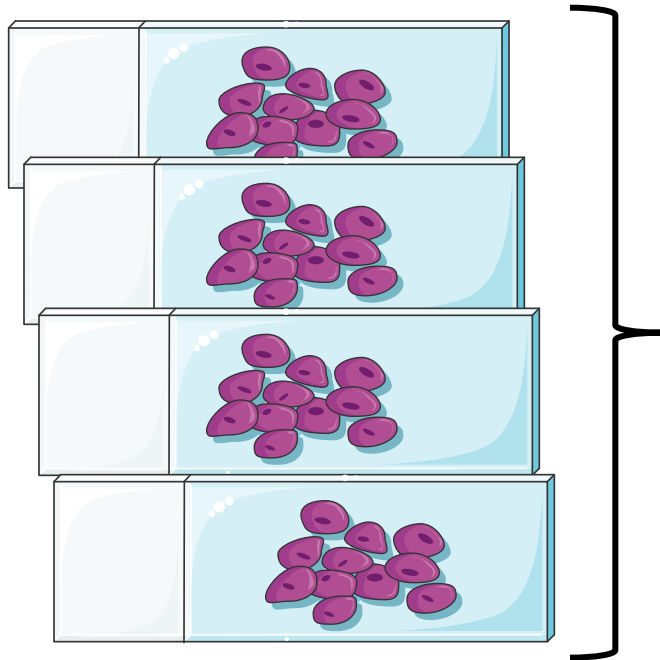
❖ Doença prioritariamente de idosos

❖ Dificuldades de obtenção de amostras de medula óssea



Situação clínica – Amostras de FFPE

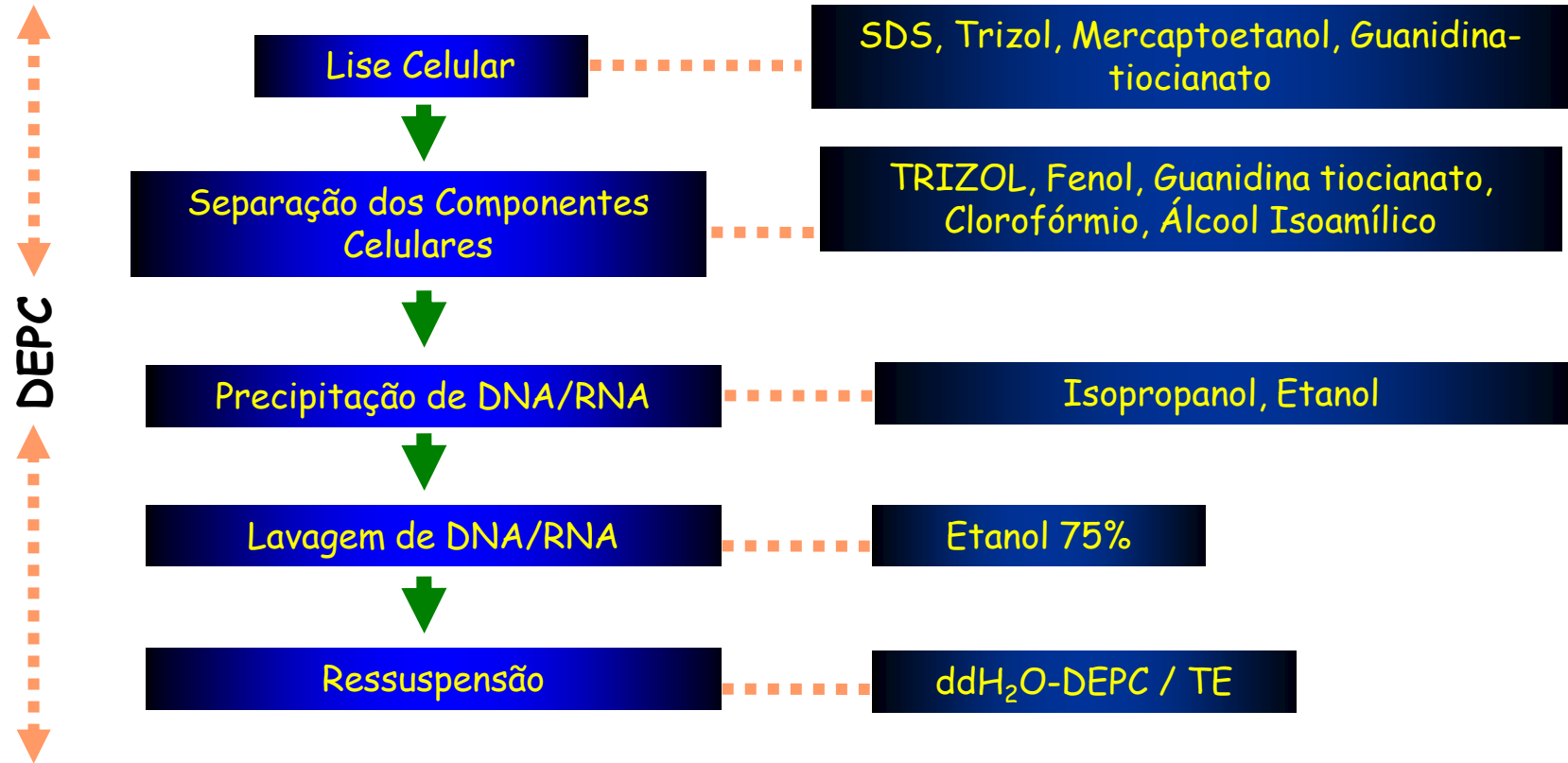
Banco de amostras



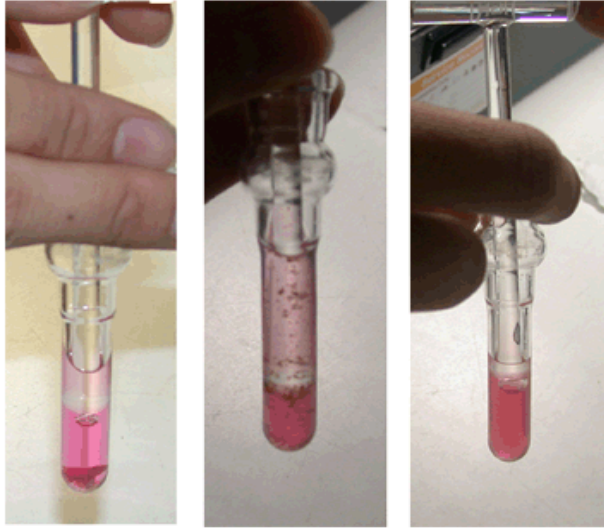
FFPE – *Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded tissue sections*

- ✓ Representam uma valiosa e extensa fonte de material para pesquisa biomédica;
- ✓ Método não invasivo;
- ✓ Diversificado diariamente nos laboratórios de patologia clínica;
- ✓ Possibilidades genômicas, transcriptômicas e proteômicas.

Extração de Ácidos Nucleicos – *in house*



Extração de Ácidos Nucleicos – *Kits*



aqueous phase: RNA

interphase: DNA

organic phase: proteins, lipids



Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids

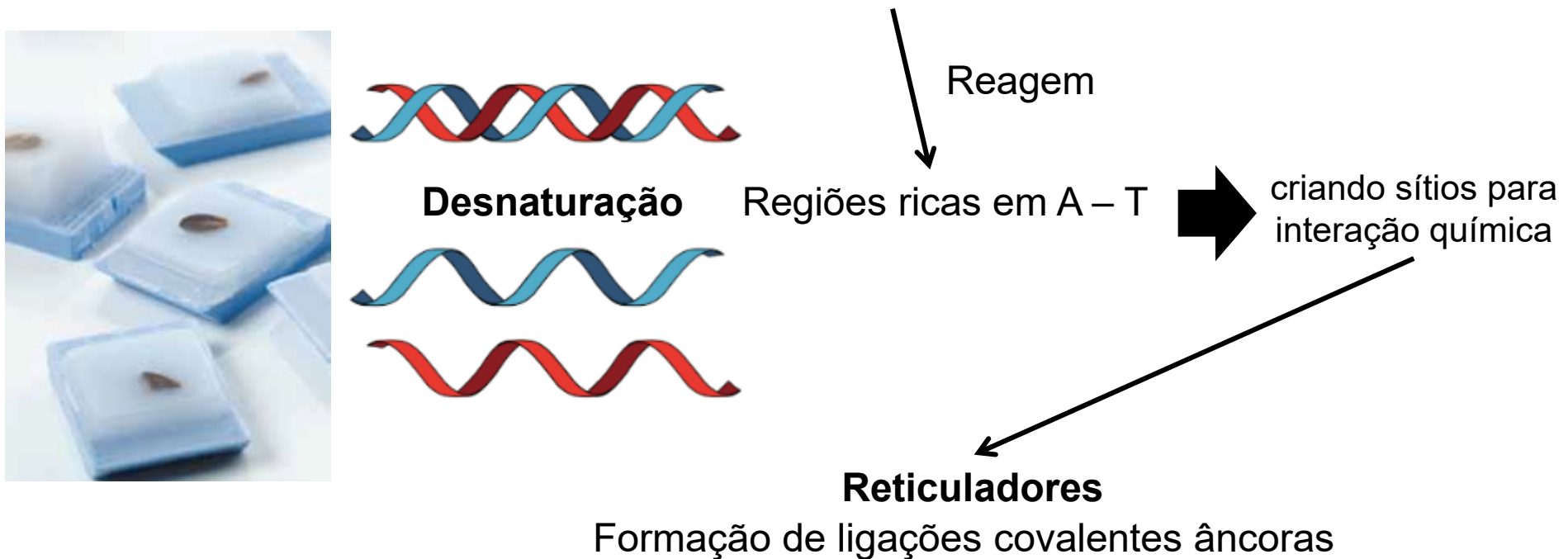
Mythily Srinivasan, Daniel Sedmak, Scott Jewell

Department and Pathology, The Ohio State University, Columbus, Ohio

The American Journal of
PATHOLOGY
Discoveries in Basic and Translational Pathobiology

ASIP
Official Journal of the American
Society for Investigative Pathology

Processo de fixação do tecido com formaldeído:



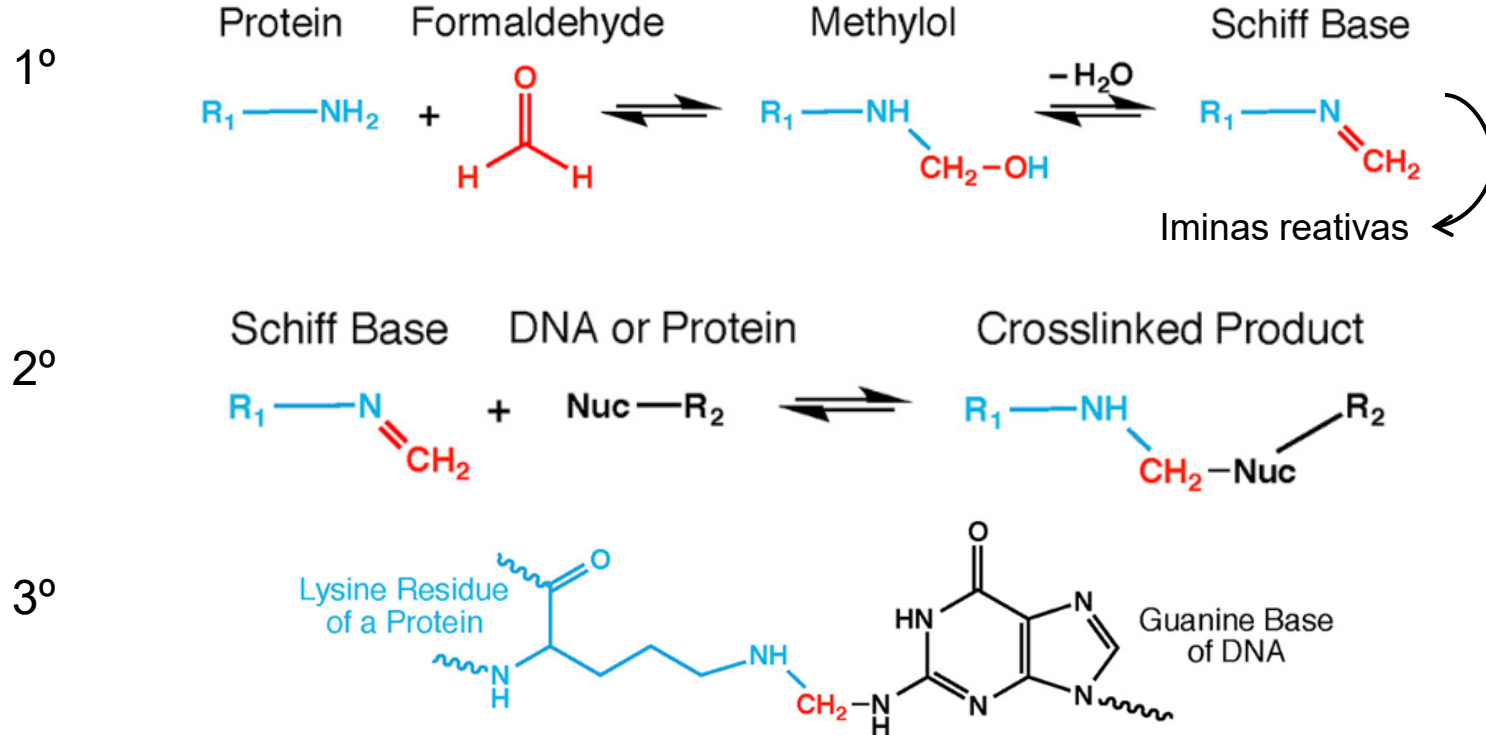
Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids

Mythily Srinivasan, Daniel Sedmak, Scott Jewell

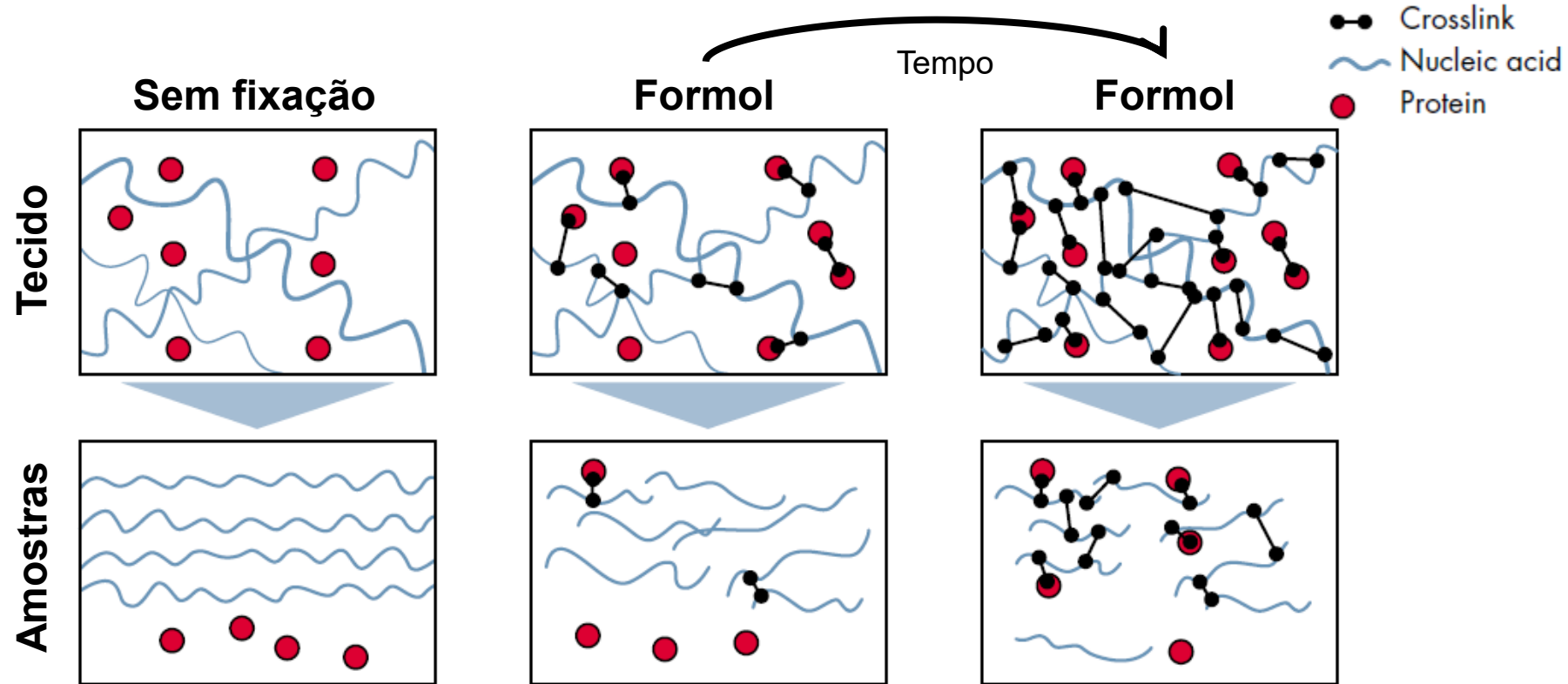
Department and Pathology, The Ohio State University, Columbus, Ohio

The American Journal of
PATHOLOGY
Discoveries in Basic and Translational Pathobiology

ASIP
Official Journal of the American
Society for Investigative Pathology



FFPE



FFPE

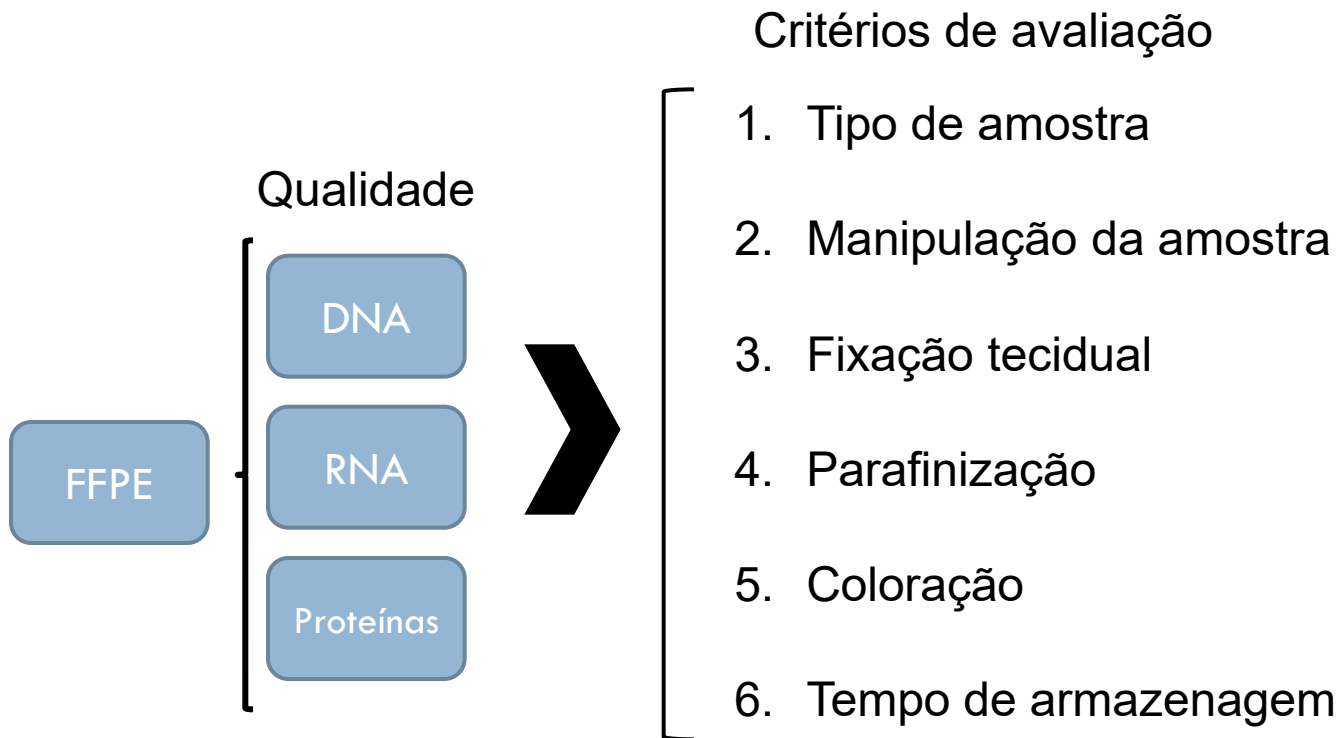
Sabemos das
consequências do
processamento tecidual
nas biomoléculas...

Então, o que precisamos
saber para a obtenção
destes alvos?

Qualidade da amostra!

FFPE – Qualidade da extração

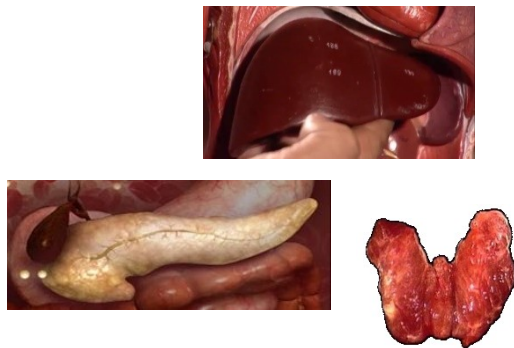
Pensando em um uso futuro de amostras FFPE...



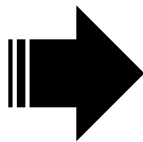
FFPE – Qualidade da extração

Tipo de amostra

Cada tecido tem uma **função fisiológica específica** e é único no que diz respeito à sua **estrutura e composição celular**.



Variação da
Velocidade



Degradação
Indução
Modificação das
Biomoléculas



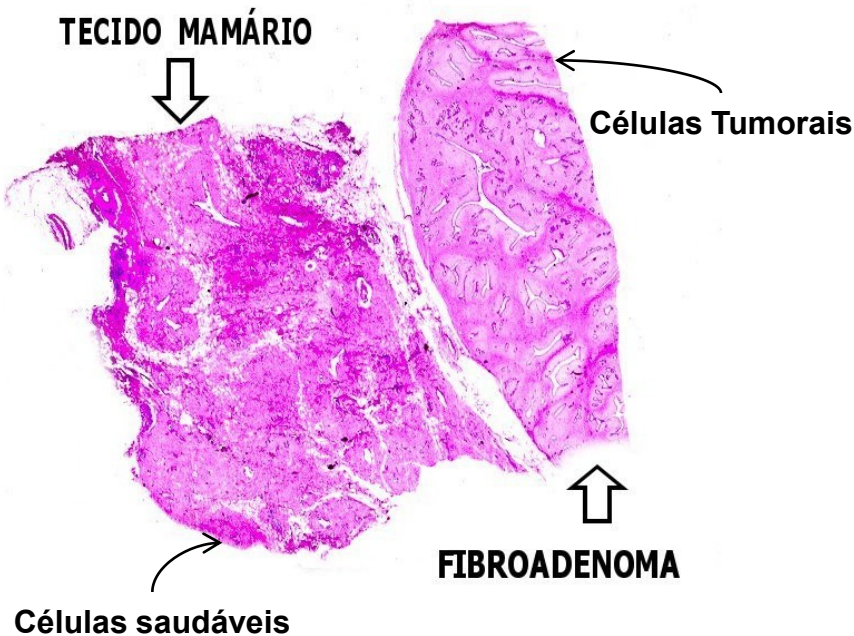
Os procedimentos para remoção e fixação do tecido devem ser feitos o mais rápido possível

FFPE – Qualidade da extração

Tipo de amostra

Tecido tumoral

→ Não são distribuídas de forma homogênea

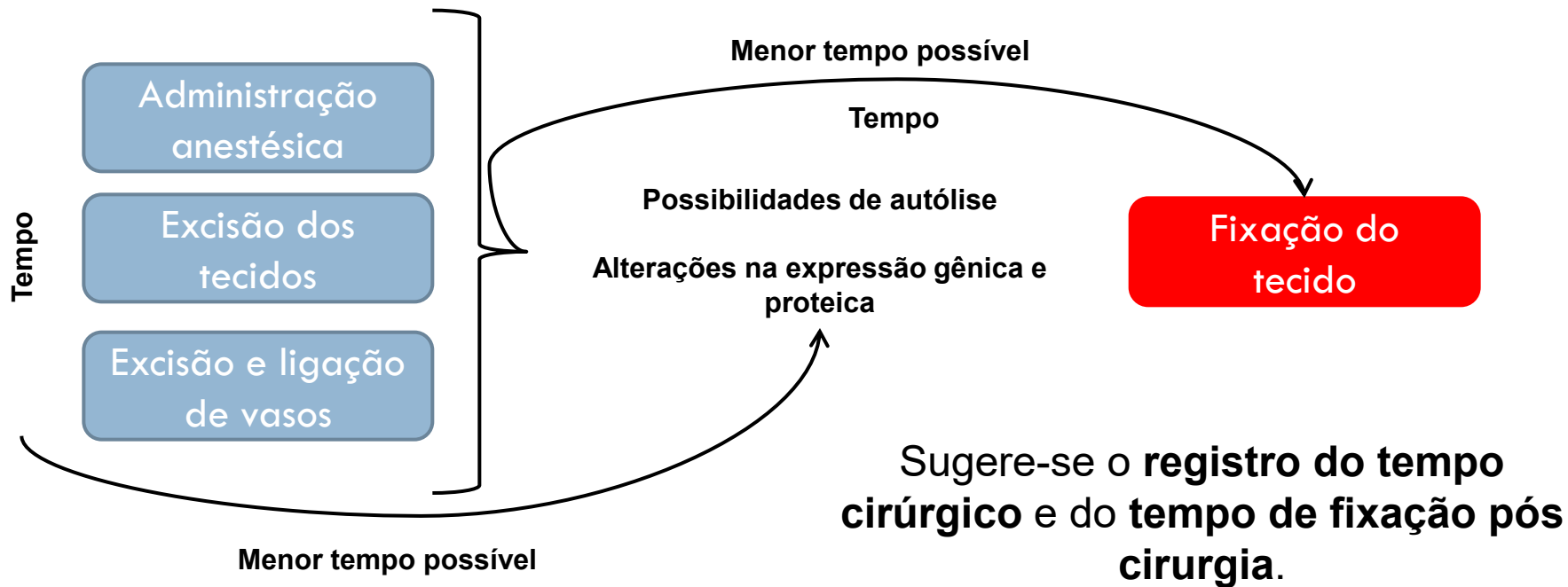


- ❖ Diferentes padrões de **expressão gênica**
- ❖ Diferentes perfis de **expressão proteicas**
- ❖ Provável diferenças nos **padrões de mutações**

FFPE – Qualidade da extração

Manipulação da amostra

Preocupação com a amostra desde o **procedimento cirúrgico**



FFPE – Qualidade da extração

Fixação tecidual

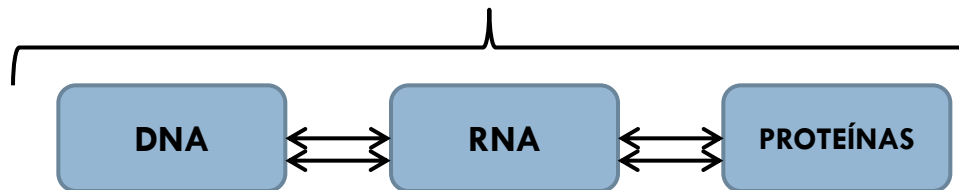
Fixação de tecidos

Solução de **Formol** a 10% onde pode conter 3.7% de **formaldehyde** como também entre 1–1.5% de **methanol**

- ❖ Solução de Formalina não tamponada ou ácida
- ❖ Solução de Formalina Neutra tamponada



Crosslinks



Três fatores são importantes quanto a extensão da fixação tecidual e a qualidade da obtenção do ácido nucléico:

**Espessura da amostra
de tecido**

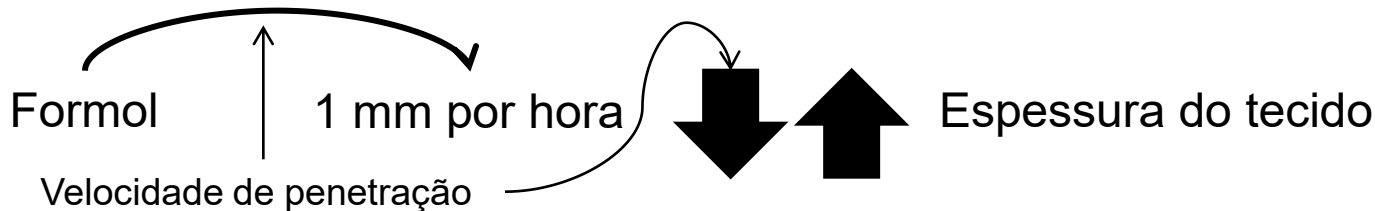
**Volume da solução
de formalina**

**Duração do processo
de fixação**

FFPE – Qualidade da extração

Fixação tecidual

Espessura da amostra de tecido



Cortes $\leq 4\text{mm}$

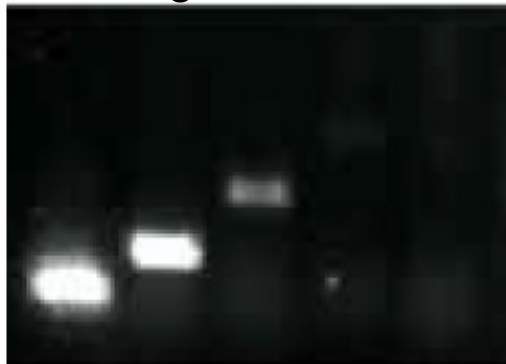
Órgãos inteiros

Evitar a fixação excessiva na periferia e a falta de fixação no centro.

Degradação de RNA em amostras de tecido com tamanho superior a **1cm**;

Sugere-se a fixação de tecidos com, no máximo, **5 mm de espessura**

785pb
613pb
400pb
206pb
96pb



FFPE – Qualidade da extração

Fixação tecidual

Volume da solução de formalina

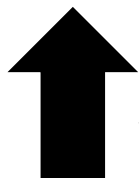
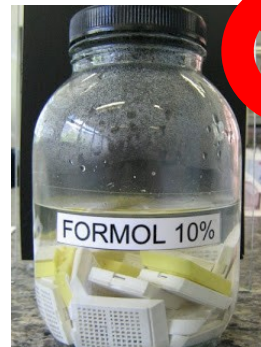
Formol

Tecido

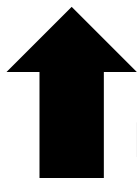


10: 1

Fixação ideal



Volume



Fixação



Controle da amostra
Expressão gênica e protéica

FFPE – Qualidade da extração

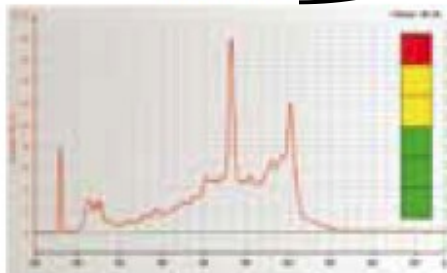
Fixação tecidual

Duração do processo de fixação

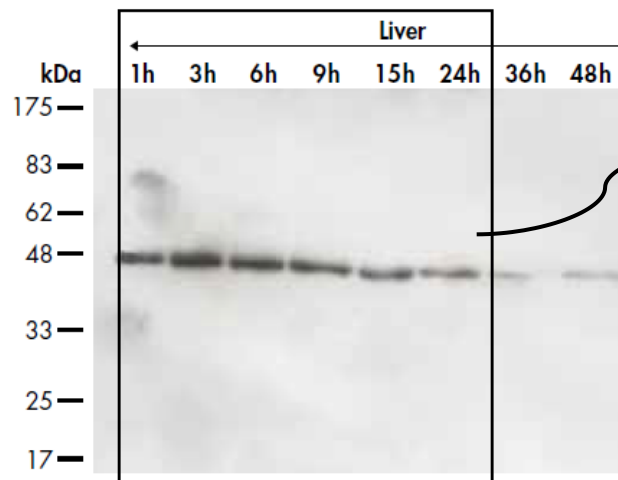
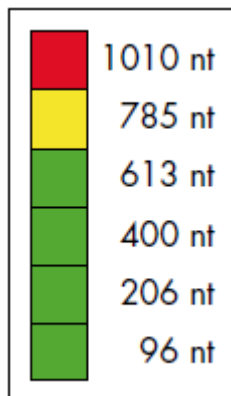
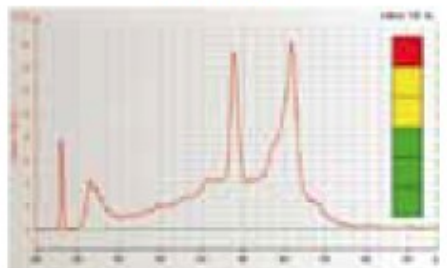
Fixação tecidual = máximo de 24 horas para evitar a fixação excessiva

20 h fix.

→ Amplificação



72 h fix.

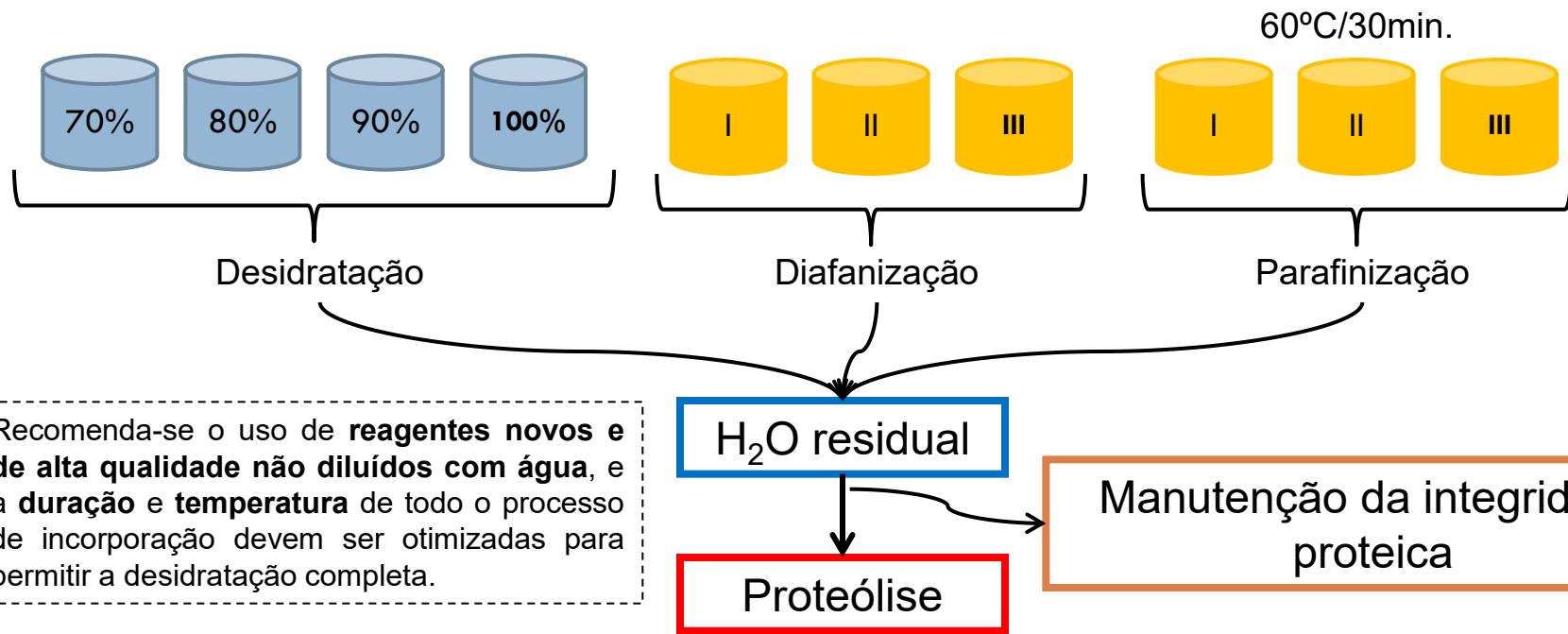


Diminuição e
quantidade de
expressão proteica

FFPE – Qualidade da extração

Parafinização

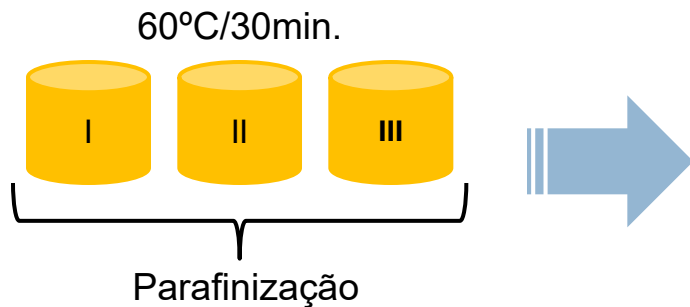
Processamento histológico



FFPE – Qualidade da extração

Parafinização

Processamento histológico



Inclusão

Diferentes tipos de parafinas demandam distintos tipos de temperatura de fusão



Alta T°C de fusão

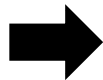


Alta T°C de aquecimento



Degradação da amostra

Para recuperação de ácidos nucleicos e proteínas



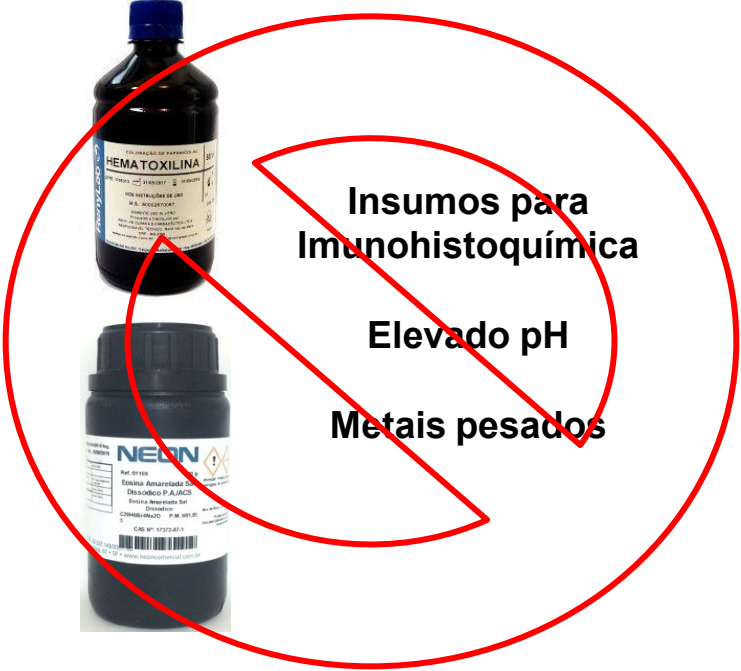
Parafina de baixo ponto de fusão

FFPE – Qualidade da extração

Coloração

Evitar ao máximo colorações das amostras de FFPE

Azul de metileno - MAMA



**Insumos para
Imunohistoquímica**

Elevado pH

Metais pesados

Degradação

DNA

RNA

Proteínas



**Coloração de Nissl
Cresil Violeta**

FFPE – Qualidade da extração

Tempo de armazenagem

Blocos de FFPE devem ser idealmente armazenados quanto a temperatura

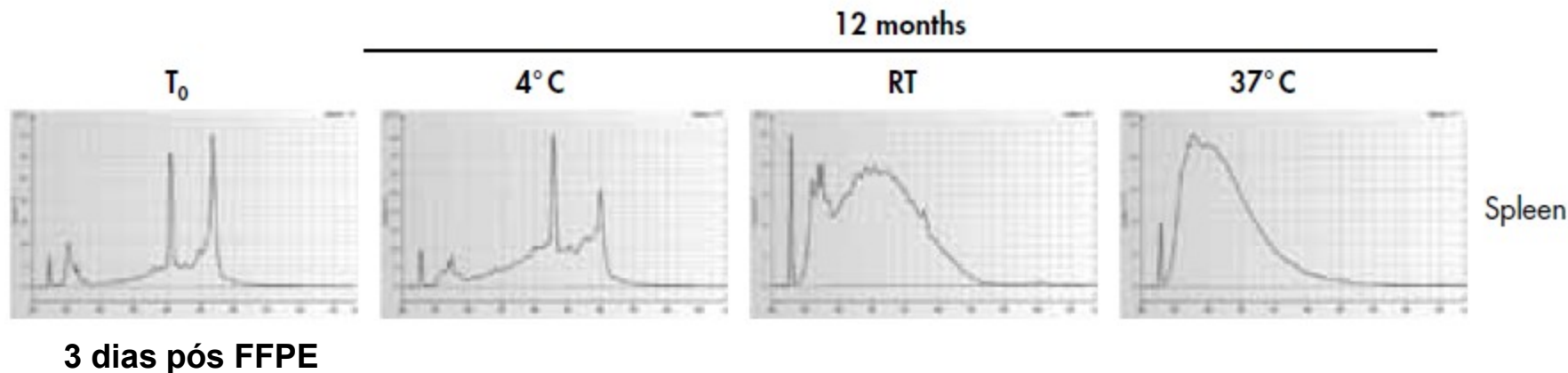


Temperatura



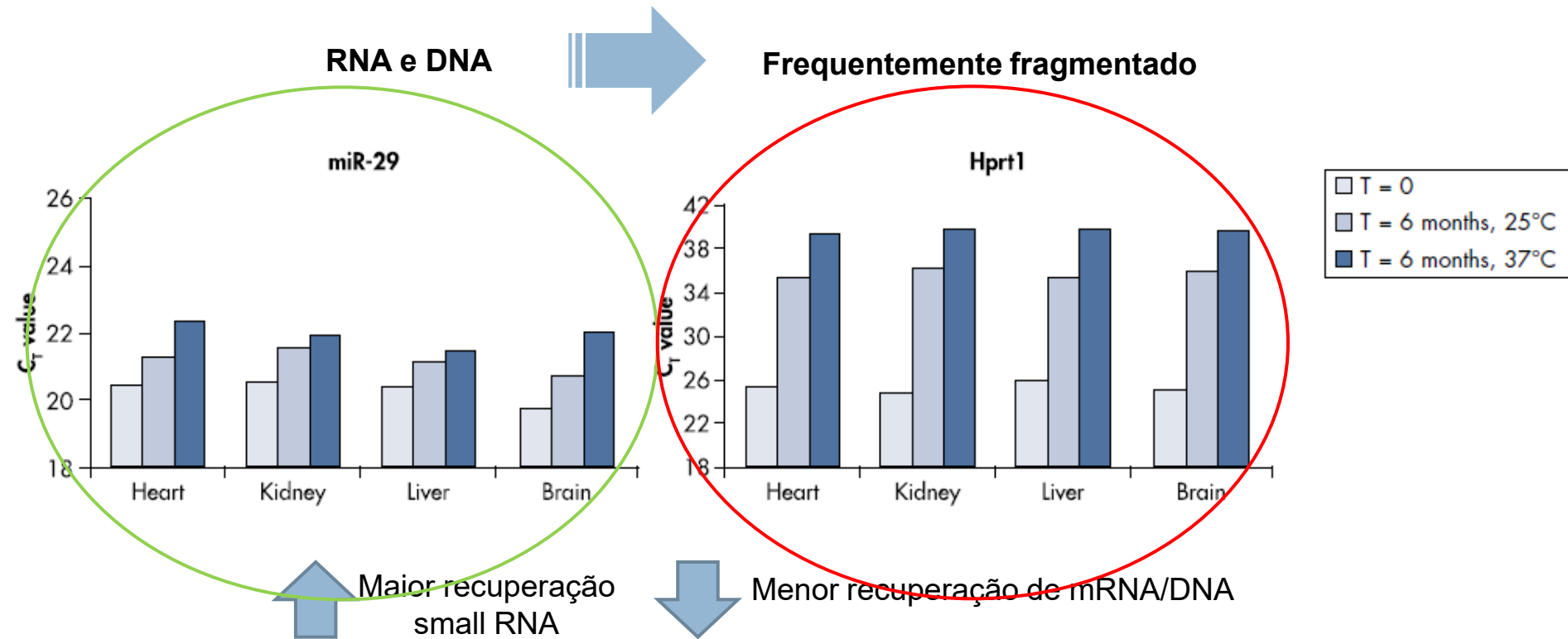
Degradação DNA/RNA/Proteínas

Comparação de distintas temperaturas de armazenamento na **integridade de RNA**



FFPE – Qualidade da extração

Tempo de armazenagem



FFPE

Como proceder para a obtenção de biomoléculas a partir de amostras FFPE?

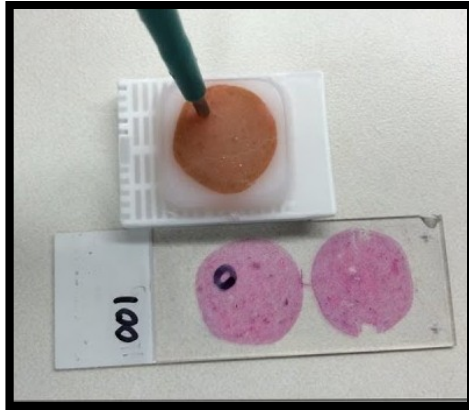
Desparafinização

Kits comerciais

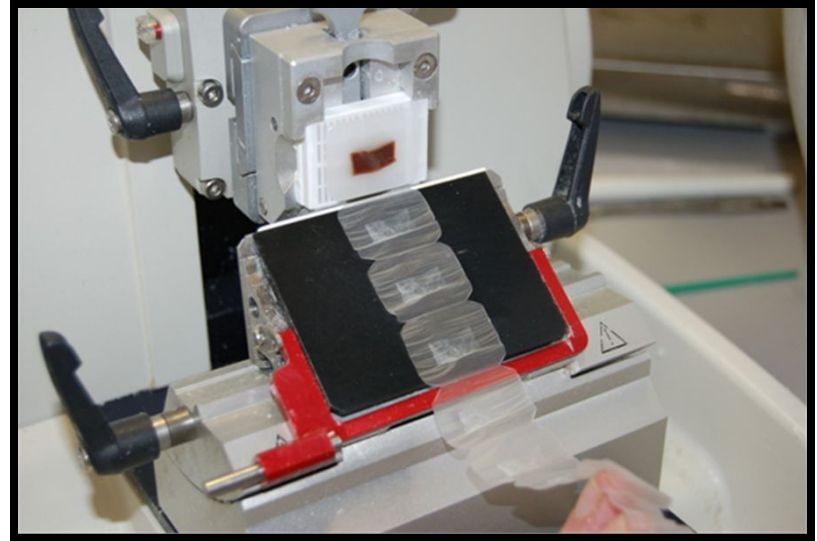


Patente

Punch ou Slides?



Área: 3 x 3mm
Inicial: 10mg/amostra
Máximo: 25mg/amostra



Corte: 10-20 μ m
Inicial: 4x10 μ m/amostra
Máximo: 2x20 μ m/amostra

Desparafinização

DNA/RNA

Digestão com **proteínase K**;
Xileno Heptanos



Aquecimento



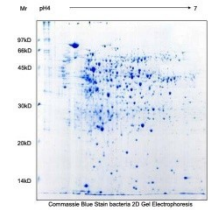
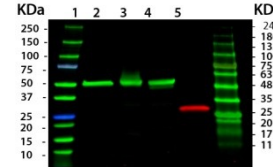
Proteínas

Xileno

Heptanos

Western-blotting

2D-PAGE



Maior eficiência

Desparafinização

Deparaffinization Solution (Qiagen – #19093)

- ❖ Utilizada para extração de DNA/RNA de amostras FFPE;
- ❖ Uso simultâneo com Proteinase K;
- ❖ Parafina condensa na parede do tubo ou no sobrenadante.
- ❖ Separação por pipetagem



AllPrep DNA/RNA FFPE Kit

Qiagen



❖ Para purificação simultânea de **DNA genômico** e **RNA total** (incluindo *small* RNA) a partir de **secções** de tecido fixadas com formalina e embebidas em parafina (FFPE) a partir de um método de solubilização com patente pendente.

Secções

Colunas

**DNA/RNA/
miRNA**

É otimizado para reverter o máximo possível de modificação de formaldeído sem maiores degradações de DNA e RNA

AllPrep DNA/RNA FFPE Kit

Qiagen

AllPrep DNA/RNA FFPE Procedure

FFPE tissue sections



Remove paraffin and dry, then lyse with proteinase K digestion



Cool on ice and then centrifuge to obtain RNA-containing supernatant and DNA-containing pellet

Incubate supernatant at 80°C



Lyse pellet with proteinase K digestion, then incubate at 90°C



Bind total RNA

Total RNA



Treat with DNase, then wash



Elute

Eluted RNA



Bind genomic DNA

Genomic DNA



Wash



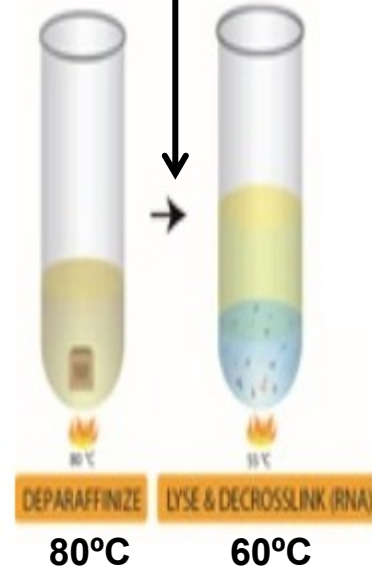
Elute

Eluted DNA

FormaPure Total Beckman Coulter

Centrifugação

❖ Para purificação simultânea de **DNA genômico** e **RNA total** (incluindo *small* RNA) a partir de **secções** de tecido fixadas com formalina e embebidas em parafina (FFPE) a partir de um método de solubilização com patente pendente.



Secções

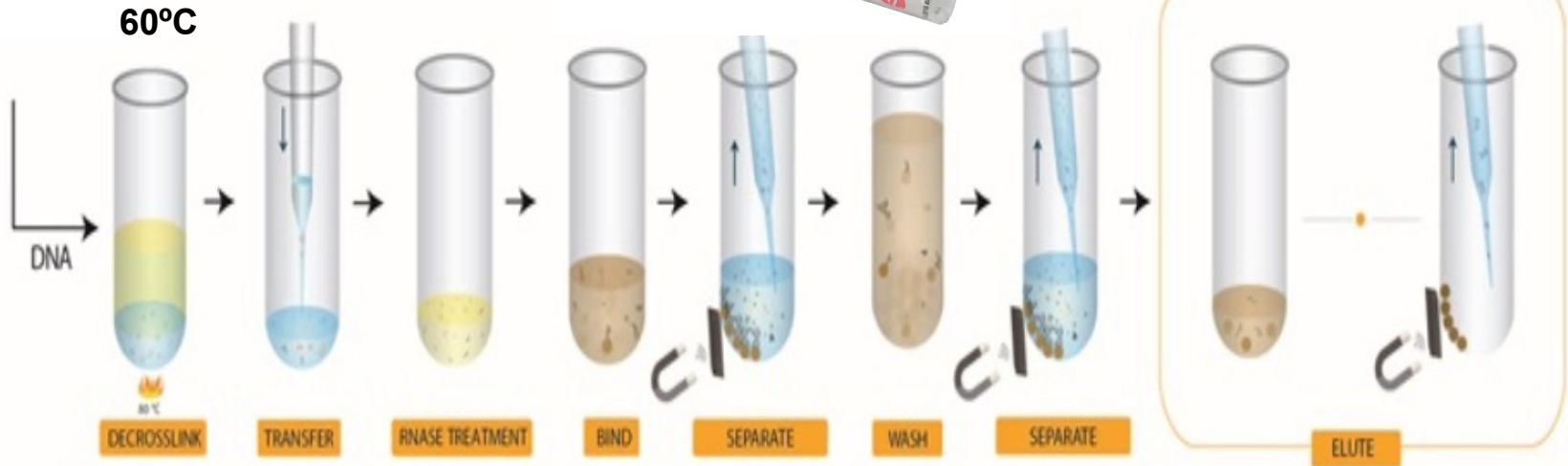
**Binds
Magnéticas**

DNA/RNA

Mantêm ácidos nucleicos de integridade mais alta para dar suporte à sensibilidade aprimorada das aplicações de **sequenciamento de próxima geração** (NGS).

FormaPure RNA Total

Beckman Coulter

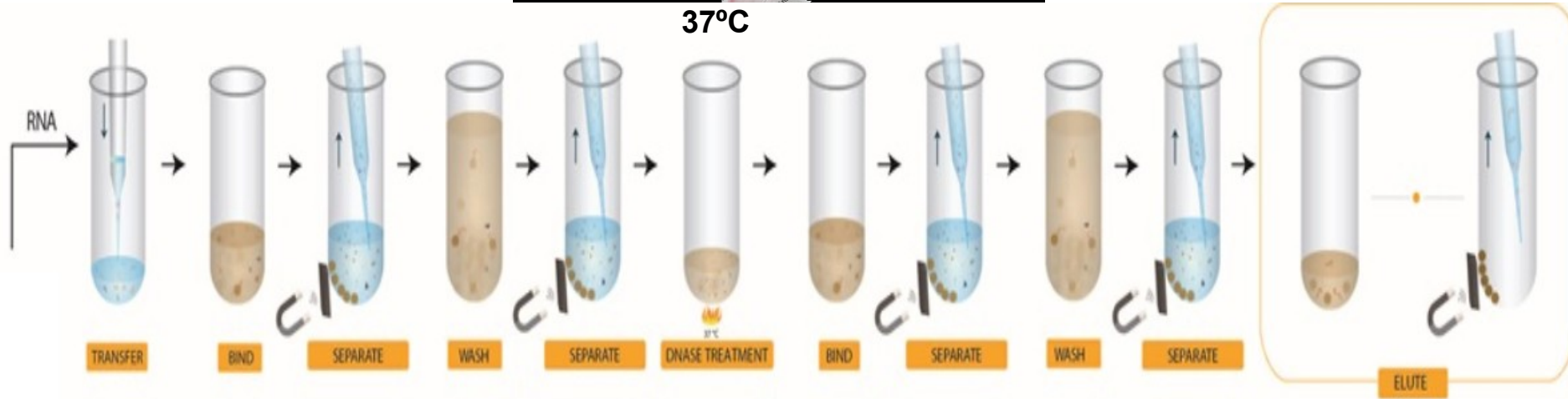


FormaPure DNA Total

Beckman Coulter

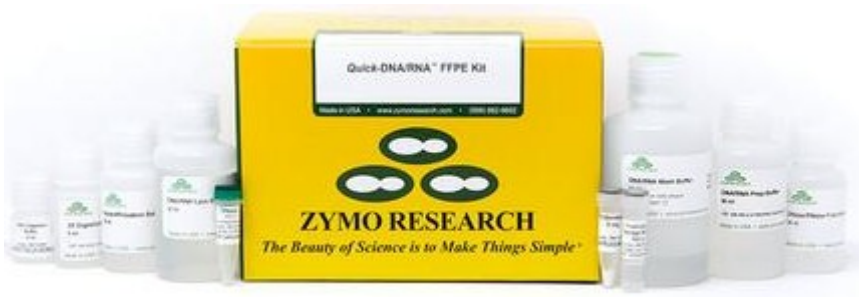


37°C



Quick-DNA/RNA FFPE Miniprep Kit

Zymo Research



❖ **Processamento Fácil:** Solução de Desparafinização incluída para remoção simples de parafina. Não é necessário uso de Xileno.

❖ **Recuperação melhorada:** Uso de digestão (Proteinase K) e de calor garantem a recuperação máxima.

❖ **Alta Qualidade:** DNA não reticulado e RNA livre de DNA estão prontos para todas as aplicações posteriores, incluindo PCR, Next-Gen Sequencing, etc.

Secções

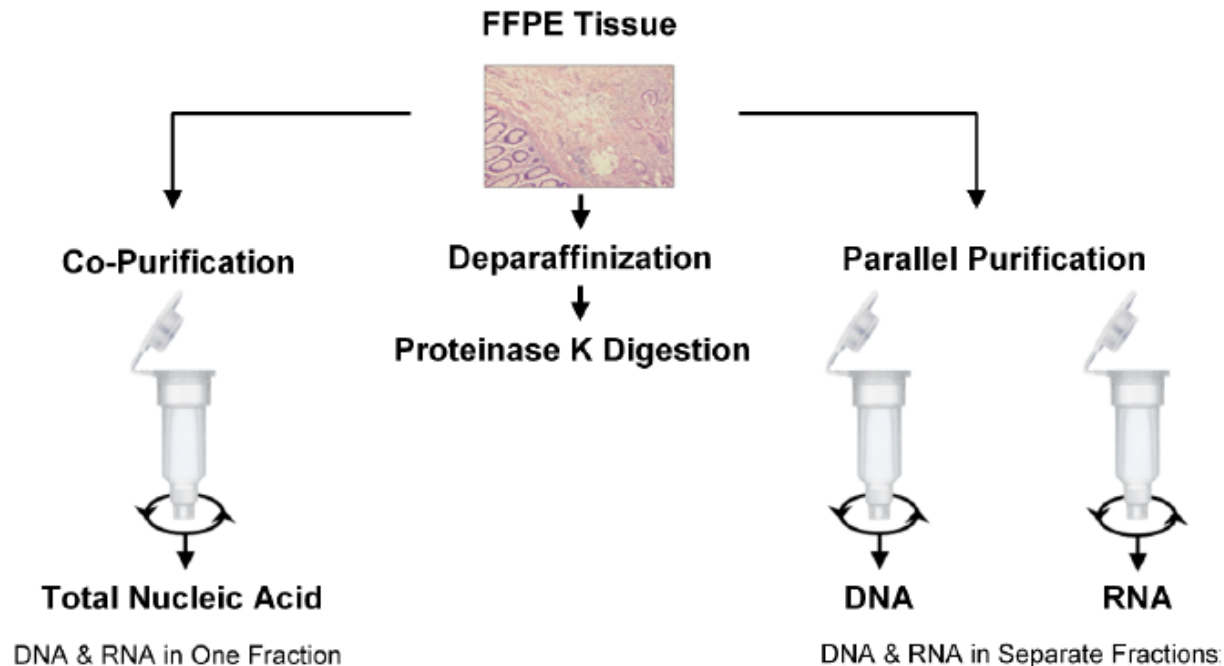
Colunas

DNA/RNA

As químicas únicas do produto foram otimizadas para a recuperação máxima de DNA e de espécies de RNA (complexos ou de regulação).

Quick-DNA/RNA FFPE Miniprep Kit

Zymo Research



[PLOS One](#). 2018; 13(5): e0197456.

Published online 2018 May 17. doi: [10.1371/journal.pone.0197456](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197456)

PMCID: PMC5957415

PMID: [29771965](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29771965/)

Evaluation of commercial DNA and RNA extraction methods for high-throughput sequencing of FFPE samples

[Stine H. Kresse](#), Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Visualization & editing,^{#1} [Heidi M. Namlos](#), Formal analysis, Investigation, Visualization & editing,^{#1} [Susanne Lorenz](#), Data curation, Formal analysis,^{1,2} [Jean Ola Myklebost](#), Funding acquisition, Resources, Writing – review & editing,¹, [Leonardo A. Meza-Zepeda](#), Funding acquisition, Project administration, Resources – review & editing^{1,2,3,5,*}



INTERNATIONAL JOURNAL OF
MEDICAL SCIENCES

[Home](#) | [Editorial board](#) | [Author info](#) | [Submit a manuscript](#)

[Int J Med Sci](#). 2014; 11(5): 494–499.

Published online 2014 Mar 27. doi: [10.7150/ijms.8842](https://doi.org/10.7150/ijms.8842)

PMCID: PMC3970103

PMID: [24688314](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24688314/)



[Virchows Arch](#). 2010 Sep; 457(3): 309–317.

Published online 2010 Jul 28. doi: [10.1007/s00428-010-0917-5](https://doi.org/10.1007/s00428-010-0917-5)

Comparison of Methods for the Extraction of DNA from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Archival Tissues

[Burcu Sengüven](#),^{1,✉} [Emre Baris](#),¹ [Tulin Oygur](#),¹ and [Mehmet Berktaş](#)²

► [Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#) [Disclaimer](#)

Multicentre validation study of nucleic acids extraction from FFPE tissues

[Serena Bonin](#),¹ [Falk Hlubek](#),² [Jean Benhattar](#),³ [Carsten Denkert](#),⁴ [Manfred Dietel](#),⁴ [Pedro L. Fernandez](#),⁵ [Gerald Höfler](#),⁶ [Hannelore Kothmaier](#),⁷ [Bozo Kruslin](#),⁸ [Chiara Maria Mazzanti](#),⁹ [Aurel Perren](#),¹⁰ [Helmuth Popper](#),⁷ [Aldo Scarpa](#),¹¹ [Paula Soares](#),¹² [Giorgio Stanta](#),^{✉1} and [Patricia J. T. A. Groenen](#)¹³

Estudos Genômicos



QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

REPLI-g FFPE Kit



EpiTect Plus FFPE Bisulfite Kit



Estudos Transcriptômicos e Proteômicos



RNeasy FFPE Kit



Qproteome FFPE Tissue Kit



miRNeasy FFPE Kit

Reflexões

Limitações das pesquisas com FFPE:

- ☐ Falta de interesse dos Laboratórios de Patologia Clínica por pesquisa científica;
- ☐ TCLE – blocos são de propriedade do paciente;
- ☐ Guarda dos blocos por 5 anos (Resolução CFM nº 1.472, de 10 de março de 1997, e o Parecer CFM nº 13/94) – estudos de epidemiologia molecular.
- ☐ Blocos danificados (*punch* ou *slices*?);
- ☐ Alto custo dos estudos em Biologia Molecular.



XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE HISTOTECNOLOGIA

FORTALEZA - CE - 02/05 A 04/05/2019



Dúvidas?

Contatos:

howard.junior@pesquisador.cnpq.br

Laboratório de Citogenômica do Câncer

Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos

Universidade Federal do Ceará

