

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
BACHARELADO EM BIOMEDICINA

**PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE DNA EM TECIDOS PARAFINADOS E
DESCALCIFICADOS**

Ana Beatriz Rodrigues dos Santos

João Pessoa

2024

ANA BEATRIZ RODRIGUES DOS SANTOS

**PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE DNA EM TECIDOS PARAFINADOS E
DESCALCIFICADOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Francisco Alves.

João Pessoa

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

Santop Santos, Ana Beatriz Rodrigues dos.

Padronização da extração de DNA em tecidos
parafinados e descalcificados / Ana Beatriz Rodrigues
dos Santos. - João Pessoa, 2024.

83 f. : il.

Orientador : Adriano Francisco Alves.

TCC (Graduação) - UFPB/CCS.

1. Amostras parafinadas. 2. Biologia Molecular. 3.
Extração de DNA. I. Alves, Adriano Francisco. II.
Título.

UFPB/CCS

CDU 665.761.6(083.76)

ANA BEATRIZ RODRIGUES DOS SANTOS

PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE DNA EM TECIDOS PARAFINADOS E DESCALCIFICADOS

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: 29 / 04 / 2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente



ADRIANO FRANCISCO ALVES
Data: 08/05/2024 07:40:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientador

Prof. Dr. Adriano Francisco Alves

Universidade Federal da Paraíba

Documento assinado digitalmente



WALLACE FELIPE BLOHEM PESSOA
Data: 09/05/2024 11:26:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro Titular

Prof. Dr. Wallace Felipe Blohem Pessoa

Universidade Federal da Paraíba

Documento assinado digitalmente



MAYARA KARLA DOS SANTOS NUNES
Data: 09/05/2024 08:51:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro Titular

Ms. Mayara Karla dos Santos Nunes

Universidade Federal da Paraíba



Documento assinado digitalmente

SERGIO DIAS DA COSTA JUNIOR

Data: 07/05/2024 17:25:30-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro Suplente

Dr. Sérgio Dias da Costa Júnior

Universidade Federal da Paraíba



Documento assinado digitalmente

FABRINE FELIPE HILARIO

Data: 07/05/2024 17:53:55-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro Suplente

Ms. Fabrine Felipe Hilário

Universidade Federal da Paraíba

Dedico este trabalho a Deus,
inteligência suprema, causa
primária de todas as coisas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço e dedico este trabalho a Deus e o amparo da espiritualidade que me guia e me guiou desde o dia da escolha da Biomedicina. Agradeço pelo suporte nesta existência e o amparo na realização dos meus sonhos.

Agradeço à minha família, meus pais e minha avó, suporte de todas as horas e elementos da minha construção pessoal e acadêmica.

Agradeço aos meus tios e tias, em especial às minhas tias Hilda e Ruth, essenciais para o lugar que eu estou agora, enquanto pessoa e futura profissional.

Agradeço a minhas irmãs, na qual destaco Paulinha (cenourinha), talvez eu não tivesse chegado aqui sem ela e seu imenso amor por mim. O significado de amor incondicional e amizade, para mim, deriva da nossa relação tão sincera. Obrigada pelo suporte de sempre e pra sempre, amo-te.

Agradeço aos meus amigos, na pessoa da minha amiga Maria Luiza, a maga. Muito se fala em amizade, mas nesses anos pude usufruir de uma irmandade muito forte e presente nos dias bons e, principalmente, nos ruins. Obrigada pelo apoio e o ombro amigo nas diversas situações que passamos juntas, sou muito lisonjeada de dividir muitas vivências e experiências com você. Já vibramos muito pelas nossas conquistas e vitórias, que esta seja mais uma no nosso *hall*.

Agradeço à equipe do LABIPEX, o laboratório que me acolheu antes mesmo de eu descobrir que gostava do que trabalho hoje. Especificamente falando dos mais presentes nesta minha jornada: Jana, Rayne, Giovanna, Rubens, Caio, João, Letícia e Carol. A nossa maior brincadeira é dizer que é um "lugar de gente feliz" e de fato é, posso dizer que eu amo meu trabalho e mais ainda o ambiente e as pessoas que comigo o dividem. Obrigada pelo apoio nos experimentos, as brincadeira, risadas, os conselhos e os diversos abraços que recebi nesses quase 5 anos. Cientificamente, tudo que sou deriva de vocês.

Ao meu orientador e amigo Adriano, talvez minha gratidão não possa se expressar nas xícaras de café ou montagem de lâminas, mas sou extremamente grata pela sua compreensão, acolhimento, ensinamentos e, principalmente, por me lembrar como a ciência deve ser e me fazer conhecer a patologia e amá-la. Ademais, agradeço pela oportunidade de ser sua amiga e de poder desfrutar da sua companhia nesta existência.

Ao meu professor e amigo Wallace, jamais poderia deixar de citá-lo neste momento tão importante, a nossa convivência desde o período da pandemia não pôde ser mais harmônica, pude experimentar o nascer de uma companhia sincera e uma amizade muito valiosa. Talvez a marca de nossa amizade sejam as risadas e os momentos no laboratório, estou grata me auxiliar academicamente a chegar até aqui e, principalmente, por garantir um amigo de todas as horas.

Aos meus colegas e amigos de curso que seguem sendo meus companheiros nessa jornada, em especial aos queridos Carol, Kássia, Matheus e Gabriel, talvez o estágio e o TCC fossem sem graça sem a companhia de vocês, obrigada por tanto.

Aos amigos e supervisores do HULW, que me auxiliaram durante o estágio, em especial Terezinha, Mônica, Paloma, Larissa, Charlane, Dani, Alexandre, Seu Bira, César, Romero, Bela, Viviane e tantos outros que me afeiçoei. Vocês talvez nem imaginam o quanto fizeram eu me apaixonar ainda mais pelo meu curso e pela vida. Meu abraço fraterno e sincero.

Ao curso de Biomedicina que me acolheu e me encanta.

Ao Centro de Ciências da Saúde e à UFPB.

*Ciência e vida cotidiana não podem e não
devem ser separadas”*

Rosalind Franklin

RESUMO

A extração de DNA é uma etapa fundamental para o fornecimento de informações essenciais sobre a genética e a patologia das doenças. Em laboratórios de Patologia, as amostras parafinadas são a principal fonte de manutenção do material biológico. A fixação do tecido em formalina e a inclusão em parafina são métodos essenciais no processo de preservação celular, sendo estas amostras, denominadas tecidos Fixados em Fo r mol e Incluídos em Parafina (FFIP). Nas amostras FFIP, devido às interações do DNA com o formol e ácido nítrico, ocorre uma dificuldade de extrair o material genético. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi padronizar a extração de DNA em tecidos parafinados e descalcificados. Para isto, foram selecionados blocos de tecidos FFIP oriundos de projetos realizados no Laboratório de Imunopatologia Experimental (LABIPEX). As amostras incluem espécimes de tecidos parafinados (baço, cérebro, fígado e rim) e tecidos parafinados e descalcificados (mandíbula). A partir disto, foi realizada a padronização do protocolo de desparafinização e a de três métodos de extração de DNA, que correspondiam aos métodos: fenol-clorofórmio, *salting-out* e uso de micro-ondas. Para análise dos resultados foram realizadas análises quantitativas e qualitativas através do espectrofômetro modelo *nanodrop 2000* e de eletroforese em gel de agarose, respectivamente. Foi possível extrair material genético apenas dos espécimes de fígado, baço e rim. As amostras de cérebro e mandíbula não obtiveram resultados significativos. Com base nas análises quantitativa e qualitativa, foi possível estabelecer o método de extração por fenol-clorofórmio, como o melhor para extração de DNA em tecidos FFIP de acordo com as condições experimentais do laboratório. Com isso, foi possível padronizar a técnica de desparafinização em tecidos FFIP, padronizar a técnica de extração de DNA em tecidos parafinados não-descalcificados e não foi possível padronizar a técnica de extração de DNA em tecidos parafinados e descalcificados.

Palavras-chave: amostras parafinadas; biologia molecular; extração de DNA.

ABSTRACT

DNA extraction is a fundamental step in providing essential information about the genetics and pathology of diseases. In Pathology laboratories, paraffin-embedded samples are the main source of biological material maintenance. Tissue fixation in formalin and inclusion in paraffin are essential methods in the process of cell preservation, with these samples being called Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) tissues. In FFPE samples, due to DNA interactions with formalin and nitric acid, there is difficulty in extracting genetic material. In this sense, the aim of this work was to standardize DNA extraction from paraffin-embedded and decalcified tissues. For this purpose, FFPE tissue blocks from projects carried out in the Laboratory of Experimental Immunopathology (LABIPEX) were selected. The samples include specimens of paraffin-embedded tissues (spleen, brain, liver, and kidney) and paraffin-embedded and decalcified tissues (jaw). From this, the standardization of the deparaffinization protocol and three DNA extraction methods was carried out, corresponding to the methods: phenol-chloroform, salting-out, and microwave-assisted extraction. For the analysis of the results, quantitative and qualitative analyses were performed using the Nanodrop 2000 spectrophotometer and agarose gel electrophoresis, respectively. It was possible to extract genetic material only from liver, spleen, and kidney specimens. Brain and jaw samples did not yield significant results. Based on quantitative and qualitative analyses, the phenol-chloroform extraction method was established as the best for DNA extraction in FFPE tissues according to the laboratory's experimental conditions. Thus, it was possible to standardize the deparaffinization technique in FFPE tissues, standardize the DNA extraction technique in non-decalcified paraffin-embedded tissues, and it was not possible to standardize the DNA extraction technique in paraffin-embedded and decalcified tissues.

Keywords: paraffin-embedded samples; molecular biology; DNA extraction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Lista de Figuras:

Figura 1: Representação da estrutura do DNA.....	19
Figura 2: Representação esquemática do dogma central	20
Figura 3: Representação do processo de mutação gênica na Anemia falciforme	22
Figura 4: Sequência esquemática das etapas de processamento histológico e inclusão em parafina de tecidos utilizados em laboratório de histopatologia	24
Figura 5: Alterações no DNA induzidas pela formalina	26
Figura 6: Esquemática das principais etapas da Extração de DNA.....	28
Figura 7: Esquemática das subdivisões metodológicas para cada protocolo desenvolvido	38

Lista de Imagens:

Imagem 1: Aspecto macroscópico dos blocos de tecidos incluídos em parafina	35
Imagem 2: Seguimento do processo inicial de clivagem do material para desparafinização	36
Imagem 3: Representação das etapas de extração	39
Imagem 4: Aspecto dos tecidos após a desparafinização pelo protocolo III	43
Imagem 5: Eletroforese em gel de agarose a 2% das amostras dos protocolos I e II	51
Imagem 6: Eletroforese em gel de agarose a 2% das amostras dos protocolos III e IV	52

Lista de Quadros:

Quadro 1: Comparação entre o método de Kawatta <i>et al.</i> (2010) e o método padronizado.....	33
Quadro 2: Comparação entre o método de Pereira <i>et al.</i> (2008) e o método padronizado.....	39
Quadro 3: Comparação entre o método de Souza (2018) e o método padronizado	41
Quadro 4: Comparação entre o método de Fernandes <i>et al.</i> (2018) e o método padronizado.....	42
Quadro 5: Comparação entre o método de Rivero <i>et al.</i> (2006) e o método padronizado.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise em espectrofômetro modelo Nanodrop Lite das espécimes de fígado	45
Tabela 2: Análise em espectrofômetro modelo Nanodrop Lite das espécimes de baço	45
Tabela 3: Análise em espectrofômetro modelo Nanodrop Lite das espécimes de rim	46
Tabela 4: Análise em espectrofômetro modelo Nanodrop Lite das espécimes de cérebro	46
Tabela 5: Análise em espectrofômetro modelo Nanodrop Lite das espécimes de mandíbula.....	47
Tabela 6: Amostras selecionadas com base na relação 260/280 e valor em ng/ μ l ..	50
Tabela 7: Comparação dos resultados dos Protocolos I e IV	54

LISTA DE SIGLAS

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

RNA - Ácido Ribonucleico

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

FFIP - Fixado Em Formol Incluído Em Parafina

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

TBE - Tris- Borato-EDTA

SDS - Sódio Dodecil Sulfato

TE- Tris-EDTA

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	O DNA	18
2.2	OS GENES	19
2.3	ALTERAÇÕES GENÉTICAS	20
2.4	PROCESSAMENTO TECIDUAL E INCLUSÃO EM PARAFINA	22
2.5	AÇÃO DA FORMALINA NOS TECIDOS E NO DNA	25
2.6	AÇÃO DOS DESCALCIFICADORES NO DNA	26
2.7	EXTRAÇÃO DE DNA	27
2.7.1	Método fenol clorofórmio	27
2.7.2	Método <i>salting-out</i>	27
2.7.3	Método utilizando micro-ondas	28
2.8	EXTRAÇÃO DE DNA EM TECIDOS FFIP	29
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4	METODOLOGIA	31
4.1.	ORIGEM DOS BLOCOS DE PARAFINA UTILIZADOS	31
4.2	MICROTOMIA E CLIVAGEM	31
4.3	PROTOCOLO DE DESPARAFINIZAÇÃO DOS TECIDOS	31
4.4	PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO I	31

4.5 PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO II.....	31
4.6 PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO III.....	32
4.7 PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO IV	32
4.8 ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXTRAÇÃO DE DNA.....	32
4.9 ANÁLISE QUALITATIVA DA EXTRAÇÃO DE DNA.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 ALTERAÇÕES DO PROTOCOLO DE DESPARAFINIZAÇÃO	33
5.2 ALTERAÇÕES DOS PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO.....	37
5.2.1 Protocolo de extração I.....	39
5.2.2 Protocolo de extração II.....	40
5.2.3 Protocolo de extração III.....	41
5.2.4 Protocolo de extração IV	43
5.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DA INTEGRIDADE DO DNA	44
5.4 ANÁLISE QUALITATIVA DO RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO	49
5.5 SELEÇÃO DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO	57
6 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS.....	56
APÊNDICE A: PROTOCOLO DE DESPARAFINIZAÇÃO PADRONIZADO.....	62
APÊNDICE B: PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO I PADRONIZADO	63
APÊNDICE C: PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO II PADRONIZADO	64
APÊNDICE D: PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO III PADRONIZADO	65
APÊNDICE E: PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO IV PADRONIZADO	66
APÊNDICE F: ANÁLISE QUANTITATIVA DOS PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO	

DE DNA PARA AMOSTRAS DE BAÇO.....	69
APÊNDICE G: ANÁLISE QUANTITATIVA DOS PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA AMOSTRAS DE RIM	70
APÊNDICE H: ANÁLISE QUANTITATIVA DOS PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA AMOSTRAS DE MANDÍBULA	71
APÊNDICE I: ANÁLISE QUALITATIVA ANTES DA PADRONIZAÇÃO: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 1,0 %.....	72
APÊNDICE J: ANÁLISE QUALITATIVA ANTES DA PADRONIZAÇÃO: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 1,5 %.....	73
APÊNDICE K: ANÁLISE QUALITATIVA ANTES DA PADRONIZAÇÃO: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 2,0 %.....	74
ANEXO A: PROTOCOLO DE DESPARAFINIZAÇÃO DESCRITO POR Kawatta <i>et al.</i> (2010).....	75
ANEXO B: PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO I DESCRITO POR Pereira <i>et al.</i> (2009)	76
ANEXO C: PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO II DESCRITO POR Souza (2018).....	77
ANEXO D: PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO III DESCRITO POR Fernandes <i>et al.</i> (2004).....	78
ANEXO E: PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO IV DESCRITO POR Rivero <i>et al.</i> (2006)	80
ANEXO F: PADRÃO DE ELETROFORESE DE DNA DE TECIDOS FFIP (Libório <i>et al.</i> , 2005).....	81
ANEXO G: PADRÃO DE ELETROFORESE DE DNA DE TECIDOS FFIP (Yi <i>et al.</i> , 2020)	82
ANEXO H: PADRÃO DE ELETROFORESE DE DNA DE TECIDOS FFIP (Kalmar <i>et al.</i> , 2000).....	83

1 INTRODUÇÃO

As células são consideradas unidades fundamentais e desempenham funções especializadas e reguladas por sistemas complexos de comunicação (Alberts, 2017b). Todas as células eucarióticas possuem uma mesma estrutura, formada pela membrana plasmática, citoplasma e núcleo. (Zaha ; Passaglia *et al.*, 2014).

Uma característica das células eucarióticas é sua organização em organelas, ou seja, compartimentos ligados à membrana. Esta organização permite a separação de processos bioquímicos e permitem que as organelas coordenem suas atividades biológicas gerando a manutenção da função celular (Cohen *et al.*, 2018).

O núcleo é, normalmente, a organela mais proeminente em uma célula eucariótica e está envolvido por duas membranas que compõem o envelope nuclear. No interior do núcleo encontram-se as moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA), de estrutura helicoidal composta de dois polímeros de nucleotídeos arranjados de forma antiparalela. Em todos os organismos, a informação genética necessária à manutenção e integridade celular é codificada nas moléculas de DNA e, além disso, o DNA é duplicado com extrema precisão antes de cada divisão celular (Alberts, 2017a; Menck, 2017).

Em laboratórios de Patologia, as amostras parafinadas são a principal fonte de manutenção do material biológico. A fixação do tecido em formalina e a inclusão em parafina são métodos essenciais ao diagnóstico e a pesquisa, devido a capacidade de preservação da morfologia e detalhes celulares, além de garantir viabilidade da amostra por períodos mais longos à temperatura ambiente, o que é mais econômico do que armazenar tecidos congelados em temperaturas negativas (Frazer *et al.*, 2020; Kokkat *et al.*, 2013; Oba *et al.*, 2022).

A inclusão em parafina é uma técnica padrão usada em laboratórios de anatomia patológica e/ou de pesquisa para gerar blocos que podem ser cortados através da microtomia e corados por reações histoquímicas ou imunohistoquímicas, com objetivo de evidenciar visibilidade de células ou de proteínas de interesse (Frazer *et al.*, 2020; Oba *et al.*, 2022). As amostras parafinadas contêm material biológico de grande valia, no entanto, devido à fixação prévia em formol, relata-se uma dificuldade de amplificação do material

genético, principalmente o DNA, através da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Shi *et al.*, 2002; Hedegaard *et al.*, 2014; Frazer *et al.*, 2020).

Os tecidos, quando mineralizados, precisam ainda, além da fixação com formol, serem submetidos a um processo de descalcificação e, para isso, são usados ácidos inorgânicos fortes, como ácido clorídrico ou ácido nítrico, e ácidos orgânicos mais fracos, como ácido fórmico ou ácido fosfórico. Além disso, também existem agentes quelantes como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) que se ligam aos íons de cálcio e formam um complexo insolúvel (Alers *et al.*, 1999; Bauer *et al.*, 1988; Miquelestorena-Standley *et al.*, 2020).

É importante compreender que estes agentes descalcificadores não apenas descalcificam o tecido como também destroem componentes celulares resultando em maior dificuldade para obtenção de material genético destinado à reações de biologia molecular (Singh *et al.*, 2013; Zoledziwska *et al.*, 2002).

Por fim, considerando a rotina de um laboratório histopatológico e, reafirmando as dificuldades de extração de DNA íntegro e em quantidade razoável, bem como, a sua amplificação satisfatória; o desenvolvimento de um protocolo específico para tecidos parafinados e descalcificados visa além de uma melhoria metodológica, a possibilidade de desenvolver técnicas que auxiliem na definição de mecanismos moleculares do estabelecimento de doenças, colaborando no seu processo de prevenção e tratamento, à medida que estes mecanismos são elucidados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

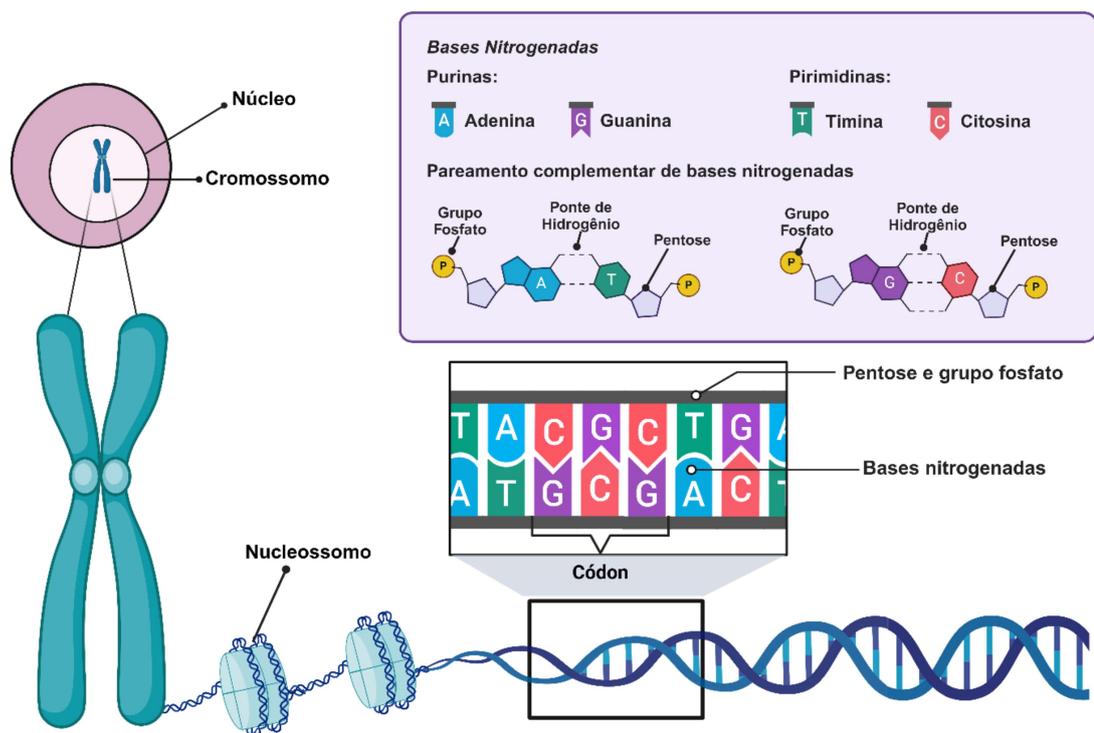
2.1 O DNA

No interior do núcleo encontram-se as moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA) (Alberts *et al.*, 2017a). O enovelamento desta molécula ocorre em vários níveis, visando acomodar o vasto comprimento da molécula em um pequeno espaço. O DNA se enovela em torno de proteínas histonas para formar nucleossomos, que estruturas que precedem os cromossomos, a última etapa de compactação do DNA (Griffiths *et al.*, 2024; Menck, 2017).

Cada nucleossomo consiste em um segmento de DNA enovelado em torno de um octâmero de histonas, o que confere a estabilidade estrutural e regula a exposição da molécula de DNA. Os nucleotídeos, são os componentes básicos

do DNA, sua estrutura é composta por uma base nitrogenada, um açúcar (desoxirribose) e um grupo fosfato; a união de uma sequência de três nucleotídeos é denominada códon, conforme indicado na **Figura 1**. Os códons do DNA são transcritos em moléculas de ácido ribonucleico (RNA), que por sua vez são traduzidos em aminoácidos e, posteriormente, em proteínas, as principais executoras das funções celulares (Menck, 2017; Saini, 2021; Watson *et al.*, 2015).

Figura 1: Representação da estrutura do DNA



Fonte: Elaboração própria, 2024

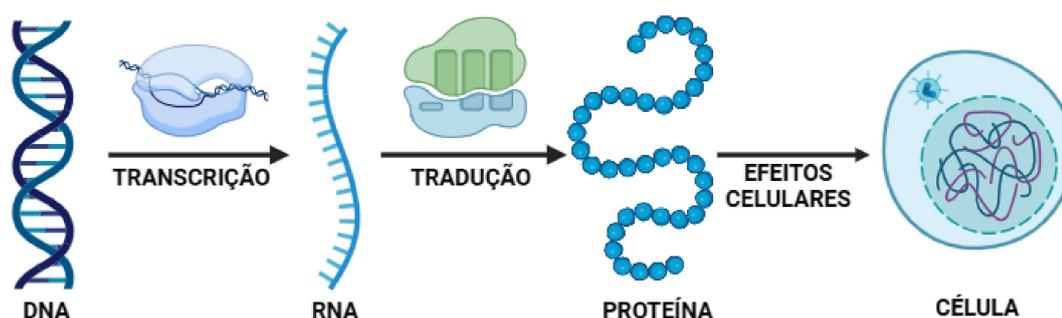
2.2 OS GENES

Os genes são segmentos de DNA presentes nos cromossomos de uma célula e fornecem o código para a conversão do RNA em proteínas, as unidades funcionais e estruturais do corpo humano. Portanto, um gene é um modelo para proteínas e estas, por sua vez, determinam as propriedades e função das células (Alberts, 2017a ; Saini, 2021).

Com a elucidação do dogma central, representado na **Figura 2**, tornou-se

claro, em meados da década de 1960, que a estrutura genética representada pela sequência nucleotídica poderia determinar o fenótipo. Com isso, é possível associar que as informações essenciais em relação à natureza e a sua evolução podem ser reveladas a partir das sequências de DNA (Griffiths *et al.*, 2024; Watson *et al.*, 2015).

Figura 2: Representação esquemática do dogma central



Fonte: Elaboração própria, 2024

2.3 ALTERAÇÕES GENÉTICAS

O conjunto de genes de determinado indivíduo denomina-se genótipo e contribui para evidenciar as características observáveis – características denominadas fenotípicas ou fenótipo. Todo organismo que exibe uma forma diferente de seus ascendentes, é denominado mutante. Quando alterações nos genes são observadas, ocorrem as mutações, assim, é possível definir mutação como qualquer alteração súbita e hereditária no conjunto gênico de um organismo, a qual não é possível explicar pela recombinação da variabilidade genética preexistente (Watson *et al.*, 2015; Zaha ; Passaglia, 2014).

Existem diversos tipos de mutação, considerando a estrutura de enovelamento do DNA as mutações podem atuar em um único ou poucos nucleotídeos (mutações gênicas), envolvendo a estrutura de cromossomos (mutações cromossômicas estruturais), ou, ainda, alterar a quantidade dos cromossomos de uma célula (mutações cromossômicas numéricas) (Alberts *et al.*, 2017b; Zaha ; Passaglia, 2014).

As mutações gênicas podem ocorrer por meio de mutações pontuais, sem alterar a quantidade de material genético, ou podem envolver modificações na

quantidade de pares de bases, como nas deleções e inserções. Ainda pode haver uma substituição de um único nucleotídeo (ou mutação de ponto) em uma sequência de DNA, denominada transição ou transversão. Estas mutações podem acarretar em efeitos biológicos ou não, a depender do local afetado (Griffiths *et al.*, 2024; Menck ; Sluys, 2017).

As mutações cromossômicas podem ser classificadas em estruturais e numéricas. As estruturais não alteram a quantidade total de cromossomos, e incluem deleções (perda de fragmentos cromossômicos), inversões (rotação de um fragmento cromossômico), duplicações (presença de duas cópias de uma região do cromossomo) e translocações (transferência de segmentos entre cromossomos não homólogos). Já as mutações numéricas resultam em aumento ou redução do número total de cromossomos, levando a células com um múltiplo do número haploide (euploidia) ou com falta ou excesso de cromossomos (aneuploidia) (Alberts, 2017a ; Menck ; Sluys, 2017).

No caso da mutação gênica, são necessários dois ciclos de replicação para que a mutação se estabeleça. No primeiro ciclo, pode ocorrer a inserção de um nucleotídeo errado diante da lesão, em razão da natureza semiconservativa da replicação, no segundo ciclo, esse nucleotídeo erroneamente incorporado será usado como molde, resultando ao final dos dois ciclos de replicação é o estabelecimento da mutação nas próximas gerações (Menck ; Sluys, 2017; Zaha ; Passaglia, 2014).

As mutações genéticas podem refletir em um fenótipo alterado, como observado na anemia falciforme, uma doença genética hereditária causada por uma mutação no gene da beta-globina (HBB), conforme representado na **Figura 3**. Com a alteração estrutural, ocorre a produção de hemoglobina S (HbS), que, em condições de hipóxia, distorce a forma dos glóbulos vermelhos e resultando em vaso-occlusão, hemólise e subsequente anemia (Hoffbrand ; Moss, 2018).

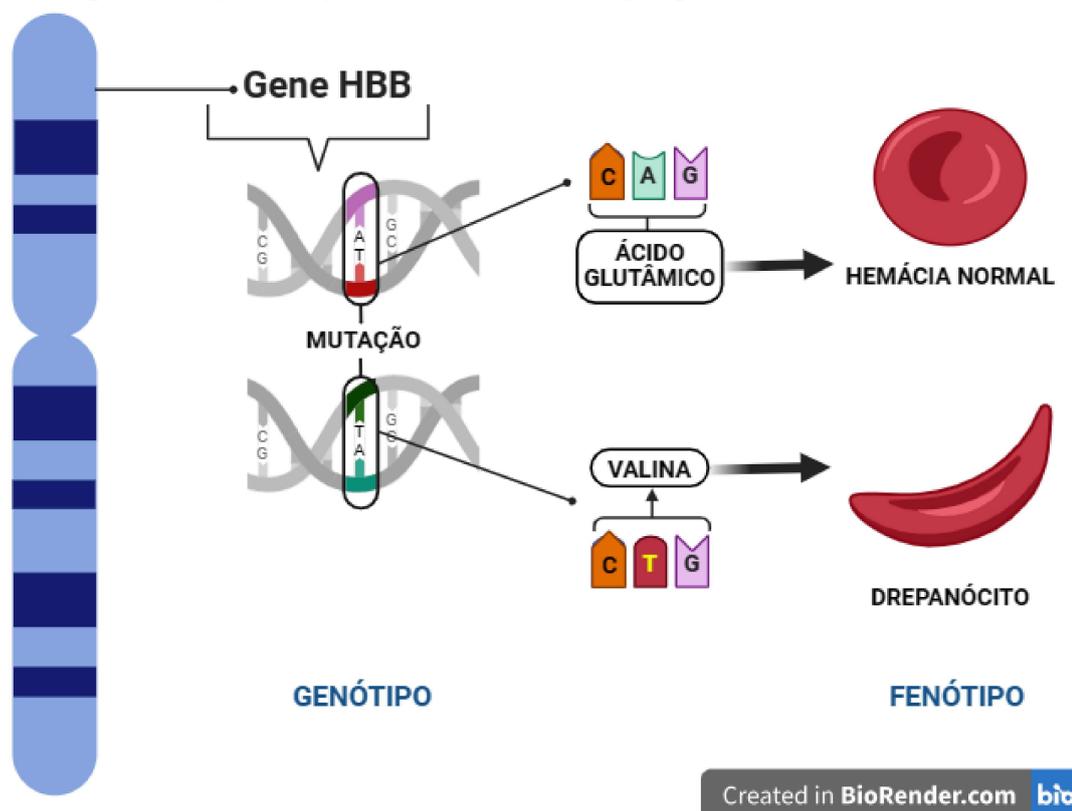
Embora muitas mutações estejam associadas a doenças genéticas, como citado anteriormente, há uma diferença na ocorrência de uma mutação genética e a detecção de tal evento no fenótipo (Zaha ; Passaglia, 2014). Muitas mutações pontuais em sequências não codificantes provocam pouca ou nenhuma alteração fenotípica; essas mutações podem ocorrer em sítios funcionalmente irrelevantes, ou outros sítios dentro do gene que pode duplicar sua função (Griffiths *et al.*,

2024).

Identificar mutações gênicas e seu reflexo em um fenótipo adoecido, possibilita o rastreamento de condições de saúde, a identificação de variantes genéticas associadas a um risco aumentado de desenvolver certas condições de saúde permite intervenções precoces, como mudanças no estilo de vida ou monitoramento regular, para prevenir ou estagnar o desenvolvimento da doença (Manolio, 2010).

Ademais, elucidar a origem e reflexos das alterações genéticas em uma população pode amparar estudos acerca da patogênese de doenças, identificação de alvos terapêuticos e biomarcadores de resposta ao tratamento (Hardy ; Singleton, 2009).

Figura 3: Representação do processo de mutação gênica na Anemia falciforme



Fonte: Elaboração própria, 2024

2.4 PROCESSAMENTO TECIDUAL E INCLUSÃO EM PARAFINA

O processamento tecidual utilizado na análise em microscopia óptica inicia-se pelo processo de fixação química em formalina, uma solução aquosa de

formaldeído a 37%, em várias diluições e combinada com outras substâncias químicas e tampões (Pawlina, 2021), na rotina laboratorial do laboratório de realização das análises desta padronização, o processo de fixação utilizado é o de formalina tamponada à 10%.

A formalina é o fixador mais comum no processo de conservação da morfologia celular em tecidos, pois evitar a digestão dos tecidos por autólise e preservar, o melhor possível, a sua estrutura e sua composição molecular (Junqueira ; Carneiro, 2023; Lohne-Seiler *et al.*, 2016) e é frequentemente associado ao processo de inclusão em parafina, o que denomina estes tecidos como espécimes fixadas em formol e incluídas em parafina (FFIP) (Lohne-Seiler *et al.*, 2016).

Após a fixação, as amostras devem ser infiltradas com substâncias que as aumentem a consistência dos tecidos moles geralmente a parafina, que permite a obtenção de secções delgadas por um micrótomo, a fim de possibilitar a observação em espessura ideal no microscópio. (Pawlina, 2021) conforme representado na **Figura 4**.

Para isto, as amostras já depositadas em cassetes histológicos necessitam antes passar pela etapa de processamento tecidual, que consiste em duas etapas principais: desidratação e clareamento. Na desidratação, a água contida nas amostras necessita ser extraída pela imersão das amostras em sucessivos banhos de soluções de concentrações crescentes de etanol (geralmente, desde etanol 70% em água até etanol 100%) (Junqueira ; Carneiro, 2023) conforme representado na **figura 4**.

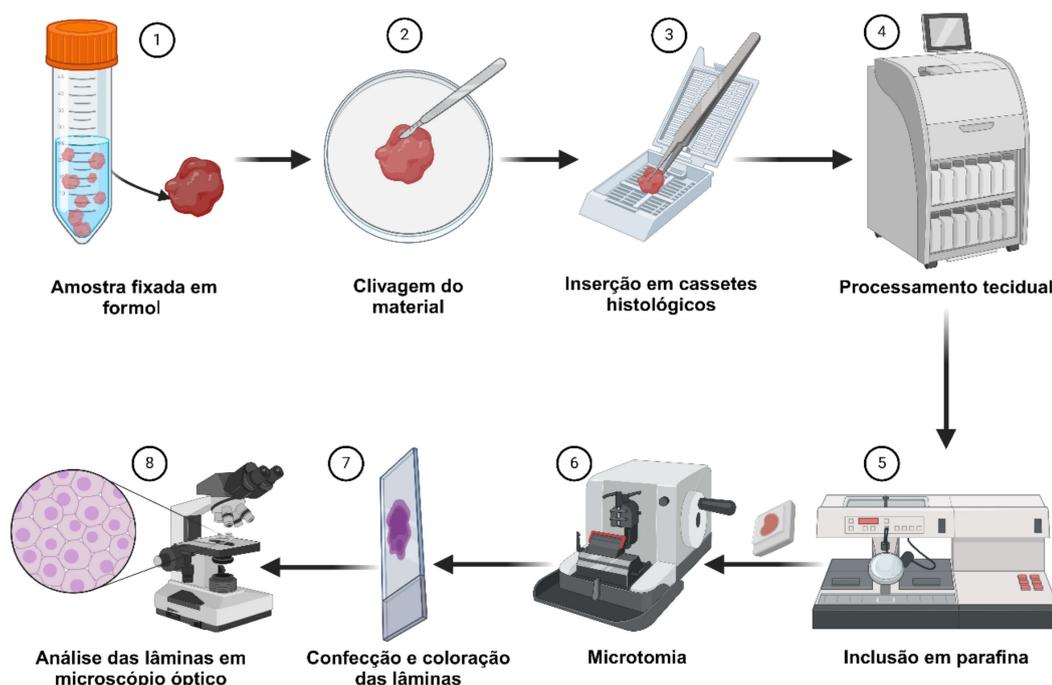
Após a desidratação, os fragmentos de tecidos serão imersos em Xilol, ficando em aspecto transparentes ou translúcidos, e, por esse motivo, essa etapa é denominada clareamento. Em seguida, as amostras serão emblocadas em contato com parafinalíquida com temperatura por volta de 56 a 60°C. A essa temperatura, o Xilol evapora e as amostras ficam preenchidas ou embebidas com parafina. (Junqueira ; Carneiro, 2023).

Depois que os fragmentos retornam à temperatura ambiente, a parafina **solidifica** e as amostras se tornam rígidas e prontas para serem congeladas e submetidas a microtomia. Após microtomia, esse tecido será pescado em lâmina e submetido a reações histoquímicas, como pela Hematoxilina e Eosina, para

evidenciar as estruturas celulares e seus componentes, como o núcleo (Junqueira ; Carneiro, 2023; Pawlina, 2021) conforme representado na **figura 4**.

Apesar do armazenamento a longo prazo dos tecido tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina (FFIP) à temperatura ambiente ser mais rentável e simples (Kokkat *et al.*,2013), vários fatores influenciam a eficiência da formalina fixação, incluindo tamanho do tecido, temperatura de fixação e período de duração de fixação da amostra (Srinivasan *et al.*, 2002). A falta de procedimentos padronizados para coletar e processar amostras de tecido resulta em diversos tipos e qualidades de FFIP, que podem ser ainda influenciados pelo tempo de armazenamento do bloco de tecido (A Steiert *et al.*, 2023).

Figura 4: Sequência esquemática das etapas de processamento histológico e inclusão em parafina de tecidos utilizados em laboratório de histopatologia



Fonte: Elaboração própria, 2024

Em tecido ósseo ou calcificado, além da fixação e inclusão em parafina, é necessário fazer a descalcificação- remoção do cálcio tecidual sem alterações na morfologia celular. Várias substâncias podem ser empregadas como descalcificadores (todas de natureza ácida): ácidos nítrico, fórmico, clorídrico, acético, entre outros (Tolosa, 2003). A utilização desses ácidos consiste no fato de

que a precipitação do cálcio ocorre sempre em pH baixos e, sendo o ácido, mais forte que o pH tecidual, o cálcio precipita na solução, descalcificando o material (Alers *et al.*; 1999). O ponto adequado de descalcificação é atingido quando é possível transpassar o tecido com uma agulha, sem que haja resistência ou dureza, indicando que o tecido está pronto para ser processado e incluído em parafina (Junqueira ; Carneiro, 2023; Tolosa, 2003).

2.5 AÇÃO DA FORMALINA NOS TECIDOS E NO DNA

A formalina é um composto de formaldeído (metano) a 35-38% e contém metanol como agente estabilizador (<15%) (Takayasu *et al.*, 2013; Wehmas *et al.*, 2020). O formaldeído, é altamente reativo e cria várias ligações cruzadas entre macromoléculas intracelulares, como proteínas e DNA (Feldman *et al.*, 1973). As alterações induzidas pela formalina podem ser classificadas em cinco processos diferentes: Modificação de base, pontes metilênicas, excisão de base, lenta hidrólise de ligações fosfodiéster, inativação de enzimas de reparo (A Steiert *et al.*, 2023), cada processo está esquematizado na **Figura 5**.

As bases nitrogenadas modificadas também podem formar uma ligação cruzada covalente com outro grupo nucleofílico na sua proximidade, através das pontes de metileno e, tais modificações podem alterar localmente as características de emparelhamento de bases (A Steiert *et al.*, 2023; McGhee ; Von Hippel, 1977).

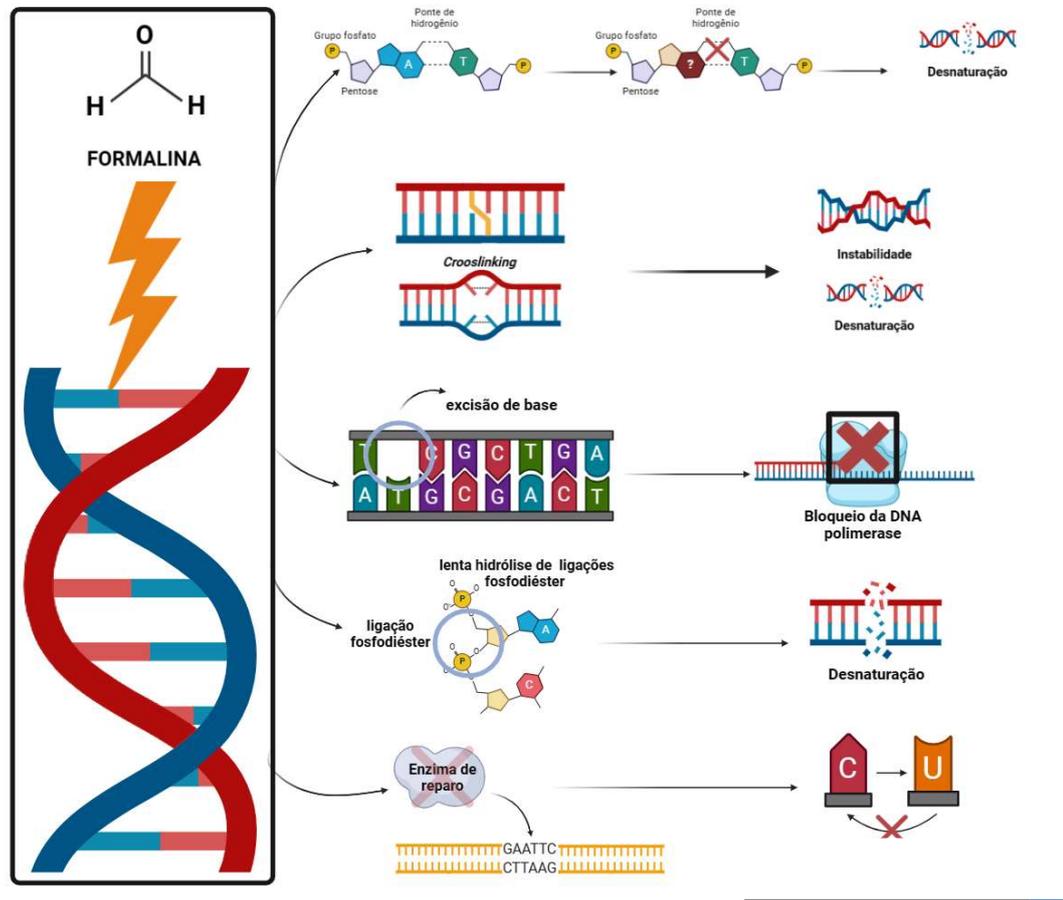
Também é possível observar a excisão de base pela hidrólise da ligação N-glicosídica, o que acarreta em um estado de transição contendo um íon altamente reativo que reage com a água, geralmente afetando no desempenho da DNA polimerase (A Steiert *et al.*, 2023; Sikorsky *et al.*, 2007).

A Lenta hidrólise das ligações fosfodiéster promovida pelo formaldeído também leva à fratura estrutural e conseqüente desnaturação do DNA, além disso, como as enzimas de reparo da glicosilase são inativadas pela fixação, a desaminação espontânea da citosina, convertendo a citosina em uracila, não é mais corrigida, gerando uma alteração na formação de pares de bases (A Steiert *et al.*, 2023; Chen *et al.*, 2014).

Estes processos de interação do formaldeído e o DNA induzem na modificação covalente das bases do DNA e, portanto, as bases modificadas são impedidas de realizar o emparelhamento de bases e promovem uma maior

desnaturação do DNA (Do *et al.*, 2015; Doty *et al.*, 1971; Hoffman *et al.*, 2015) o que afeta significativamente o desempenho das análises moleculares mais robustas.

Figura 5: Alterações no DNA induzidas pela formalina



Fonte: Elaboração própria, 2024

2.6 AÇÃO DOS DESCALCIFICADORES NO DNA

Em tecidos calcificados, antes do processamento histológico convencional é necessário a etapa de descalcificação, para isso, são utilizados agentes quelantes como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) que se ligam aos íons de cálcio e formam um complexo insolúvel; ou até ácidos inorgânicos fortes, como ácido clorídrico ou nítrico que não apenas descalcificam como também destroem componentes celulares e ácidos nucleicos, tendo em vista que o ácido é hidrolítico e afeta na estabilidade do DNA, limitando análises moleculares adicionais. (Bauer, 1988; Zoledziewska *et al.*, 2002).

2.7 EXTRAÇÃO DE DNA

O desenvolvimento e a aplicação do sequenciamento de DNA em pesquisa e medicina clínica aumentaram significativamente a quantidade e variedade de tecidos sobre os quais as extrações de DNA são realizadas (Frazer *et al.*, 2020). Considerando, a ampla quantidade de material contido nas espécimes de tecidos FFIP, os métodos de extração de DNA devem ser selecionados levando em consideração sua eficiência, custo, facilidade de execução e viabilidade para aplicações moleculares subsequentes. Neste contexto, diversos métodos manuais de extração são apontados como ideais, dos quais citam-se: kit comercial, fenol-clorofórmio, *salting out* e micro-ondas (Potluri *et al.*, 2015; Sengüven *et al.*, 2014).

2.7.1 Método fenol clorofórmio

A extração por fenol clorofórmio envolve uma série de etapas químicas, conforme demonstrado na Figura 6. Inicialmente, o sódio dodecilsulfato (SDS) e a proteinase K são adicionados para romper as membranas celulares e desfazer as proteínas que envolvem o DNA nos cromossomos. Em seguida, uma mistura de fenol/clorofórmio é adicionada para separar as proteínas do DNA, pois o DNA é mais solúvel na parte aquosa da mistura (Ausubel *et al.*, 1987; Butler *et al.*, 2012; Green ; Sambrook, 2012).

A solução bruta de DNA é então misturada com uma solução de clorofórmio/álcool isoamílico para remover resíduos de fenol. Finalmente, o DNA é concentrado através de precipitação com etanol ou isopropanol na presença de acetato de sódio, acetato de amônio ou cloreto de sódio e ressuspenso em água *Dnase free* ou tampão (Green ; Sambrook, 2012) .

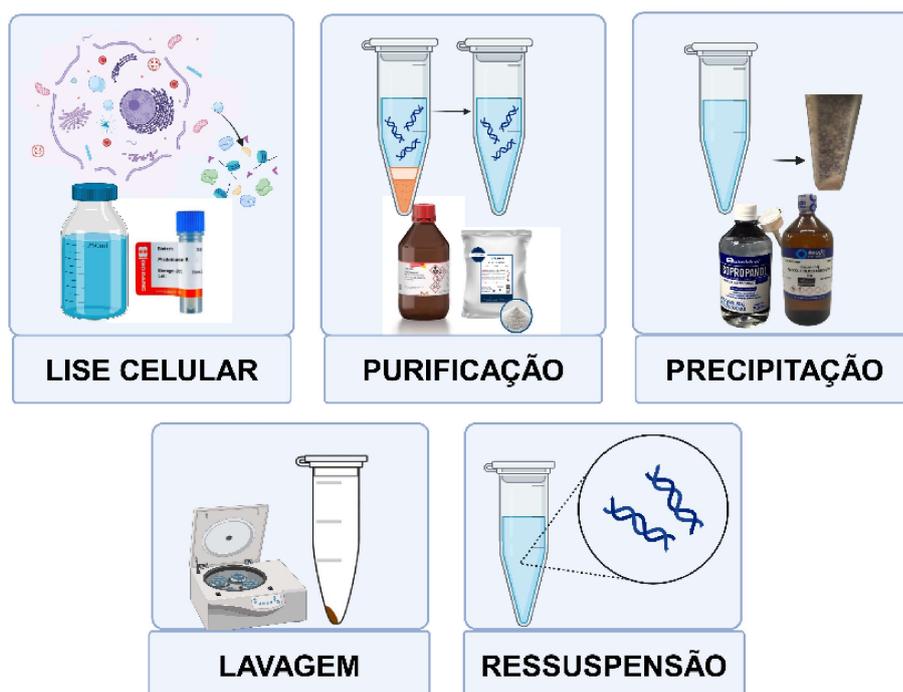
Apesar de produzir DNA de alta pureza, concentração e rendimento, o método de extração com fenol-clorofórmio é trabalhoso e requer experiência devido ao uso de reagentes químicos tóxicos. No entanto, ele pode ser adaptado para processar diversas amostras, desde tecidos embebidos em parafina até fluidos corporais, tornando-o um método confiável para ensaios diagnósticos moleculares (Butler *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2010).

2.7.2 Método *Salting-out*

Como alternativa ao procedimento de extração com fenol-clorofórmio, o método de *salting-out* tem a vantagem de não utilizar produtos químicos tóxicos. Este procedimento utiliza uma combinação de sais, detergentes e solventes orgânicos para separar o DNA das proteínas e outras impurezas presentes nas amostras de tecido FFIP, isto baseia-se no princípio de que proteínas e outros contaminantes celulares precipitarão em um solução salina saturada devido à sua relativa hidrofobicidade, enquanto o DNA não (Miller *et al.*, 1988).

Esta técnica oferece uma extração robusta e compatível com diversas técnicas moleculares, com a vantagem de ser relativamente simples e econômica. No entanto, requer um tempo de execução mais longo e pode resultar em baixos rendimentos de DNA em algumas amostras (Mirica *et al.*, 2012).

Figura 6: Esquemática das principais etapas da Extração de DNA



Fonte: Elaboração própria, 2024

2.7.3 Método utilizando micro-ondas

O método de extração de DNA assistida por micro-ondas é uma abordagem mais recente que utiliza o calor gerado pelas micro-ondas para acelerar o processo de lise celular e extração de DNA (Singh *et al.*, 2020; Taglia *et al.*, 2022).

Esta técnica é associada com outro método, seja *salting out* ou fenol-clorofórmio, e é conhecida por sua rapidez e eficiência, produzindo altos rendimentos de DNA em um tempo significativamente reduzido em comparação com métodos convencionais (Singh *et al.*, 2020). No entanto, requer equipamento especializado e pode ser mais custoso devido ao investimento inicial em um sistema de micro-ondas adaptado para uso laboratorial (Sethi *et al.*, 2018).

2.8 EXTRAÇÃO DE DNA EM TECIDOS FFIP

A extração de DNA de tecidos é uma etapa fundamental em muitos estudos moleculares e diagnósticos, fornecendo informações essenciais sobre a genética e a patologia das doenças. No entanto, a extração de DNA em tecidos convencionais frescos apresentam DNA mais intacto e menos danificado em comparação com tecidos FFIP, facilitando a extração de DNA usando protocolos padrão de extração (Frazer *et al.*, 2020; Sethi *et al.*, 2018).

De modo mais específico, a extração de DNA de tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina (FFIP) apresenta diferenças significativas em comparação com tecidos convencionais frescos, bem como tecidos descalcificados, devido às variações em sua composição e processamento prévio com formalina, parafina e descalcificador ácido (A Steiert *et al.*, 2023; Potluri *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2013).

Métodos como o uso de detergentes e enzimas de digestão proteica são frequentemente empregados para facilitar a liberação e a purificação do DNA das amostras FFIP (Singh *et al.*, 2013). Quando há a comparação dos métodos manuais utilizados para a extração de DNA em amostras FFIP, é possível adaptar as técnicas de fenol-clorofórmio, *salting-out* e micro-ondas para efetiva extração do material genético (Fernandes *et al.*, 2004; Pereira, *et al.*, 2009; Rivero *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2013; Souza, *et al.*, 2018).

Entretanto, visando um melhor acesso ao DNA, uma etapa crucial da extração deste tipo de tecido é a desparafinização, que consiste na remoção da parafina incluída nestes tecidos durante o processamento histológico, geralmente isto ocorre por meio do aquecimento das amostras em solventes orgânicos, como xileno ou tolueno, seguido de centrifugação para remover a parafina derretida (Shi *et al.*, 2005).

Este processo é fundamental porque a parafina pode interferir na eficiência da extração de DNA, formando uma barreira física que impede a penetração eficaz dos reagentes de extração nos tecidos, além disso, a parafina pode conter contaminantes que prejudicam a qualidade e a integridade do DNA extraído, resultando em resultados de análise moleculares menos confiáveis (Lucena-Aguilar et al., 2016).

A extração de DNA de tecidos FFIP requer protocolos adaptados que visem a quebra das ligações cruzadas entre o DNA e as proteínas, bem como a reversão da fragmentação do DNA, devido ao processo de fixação em formol, já que a formalina induz diversas modificações químicas no DNA potencialmente levando à identificação incorreta da base, o que pode levar a detecção de variantes falso-positivas (A Steiert *et al.*, 2023) ou ainda no caso dos tecidos descalcificados (Zoledziwska *et al.*, 2002). A utilização de protocolos de extração de DNA otimizados e validados para tecidos FFIP é essencial para garantir resultados confiáveis em estudos moleculares e diagnósticos.

Deste modo, durante o processo de extração de DNA em tecidos FFIP e descalcificados, na qual esta extração precede uma análise genética mais robusta, é necessário realizar uma padronização pré analítica da qualidade das amostras, seja ela em relação ao tempo de fixação em formol ou no método de descalcificação empregado, bem como, uma padronização da desparafinização dos tecidos já que a parafina pode conter contaminantes que afetam na análise final do material genético extraído.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar a extração de DNA em tecidos parafinados e descalcificados

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Padronizar a técnica de desparafinização dos tecidos fixados em formol e incluídos em parafina;
- b) Padronizar a técnica de extração de DNA em tecidos parafinados não-

- descalcificados;
- c) Padronizar a técnica de extração de DNA em tecidos parafinados e descalcificados.

METODOLOGIA

4.1. ORIGEM DOS BLOCOS DE PARAFINA UTILIZADOS

Foram selecionados blocos de tecidos fixados em formol e incluídos em parafina oriundos de projetos realizados no Laboratório de Imunopatologia Experimental (LABIPEX) localizado na Universidade Federal da Paraíba (UFPB). As amostras incluem espécimes de tecidos parafinados (baço, cérebro, fígado e rim) e tecidos parafinados e descalcificados (mandíbula).

4.2 MICROTOMIA E CLIVAGEM

Os blocos de parafina foram cortados no micrótomo em cortes coronais de espessura 30 μm (micrômetros), conforme adaptação da metodologia estabelecida por Shi *et al.* (2002) ou clivados manualmente com auxílio de um bisturi estéril e padronização das quantidades, após a desparafinização, por meio do uso de uma balança analítica.

4.3 PROTOCOLO DE DESPARAFINIZAÇÃO DOS TECIDOS

O protocolo de desparafinização utilizado foi desenvolvido por Kawatta *et al.* (2010) e está disposto no **ANEXO A**.

4.4 PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO I

O primeiro protocolo de extração baseia-se na extração pelo método de fenol-clorofórmio e foi descrito por Pereira *et al.* (2008). O protocolo está disposto no **ANEXO B**.

4.5 PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO II

O segundo protocolo de extração baseia-se na extração pelo método de

fenol-clorofórmio e foi descrito por Souza (2018). O protocolo está disposto no **ANEXO C**.

4.6 PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO III

O terceiro protocolo de extração baseia-se na extração pelo método *salting-out* e foi descrito por Fernandes *et al.* (2004), o protocolo utiliza o método simultâneo de desparafinização e extração com auxílio do micro-ondas. O protocolo está disposto no **ANEXO D**.

4.7 PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO IV

O quarto protocolo de extração baseia-se na extração pelo método *salting-out* e foi descrito por Rivero *et al.* (2006). O protocolo está disposto no **ANEXO E**.

4.8 ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXTRAÇÃO DE DNA

A análise quantitativa foi realizada utilizando o espectrofômetro modelo *nanodrop 2000*. O grau de purificação da amostra com relação à contaminação por proteínas foi obtido pelo cálculo da relação entre as absorvâncias em 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}), a partir da análise de 1 μL de amostra, com valores de inclusão 260/280 correspondentes a 1.8 ± 0.2 (Abdulla *et al.*, 2022; Lucena-Aguilar *et al.*, 2016).

4.9 ANÁLISE QUALITATIVA DA EXTRAÇÃO DE DNA

Os produtos de extração de DNA total foram submetidos a uma análise por eletroforese em gel de agarose para confirmação da presença e da integridade do DNA. Para tanto, foi utilizado um sistema de eletroforese horizontal de gel de agarose submerso, em concentração de 2,0%, preparados com tampão TBE 2,0 X e com a adição de corante para ácidos nucleicos.

O volume de amostra aplicado nas canaletas do gel foi de 5 μL . Utilizou-se um padrão de peso molecular com bandas de 50 pb (1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen). A voltagem aplicada foi de 80 V, potência de 120 W e o tempo de corrida variou de 60 a 80 minutos. Após a corrida, os géis foram visualizados e

fotografados sobre um transluminador de luz ultravioleta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As metodologias realizadas foram adaptadas e padronizadas de acordo com os materiais e espécimes biológicas utilizadas no Laboratório de Imunopatologia Experimental (LABIPEX), seguindo modificações frente à realidade do laboratório e a otimização das metodologia. As alterações foram realizadas durante a realização dos experimentos iniciais intitulados como protocolos “piloto”.

5.1 ALTERAÇÕES DO PROTOCOLO DE DESPARAFINIZAÇÃO

Com base na execução do protocolo de desparafinização proposto por Kawatta *et al.* (2010), foi padronizado um protocolo de desparafinização seguindo modificações que visavam a remoção de toda a parafina impregnada nos tecidos e remoção completa do Xilol e do álcool absoluto. As principais alterações estão dispostas no **Quadro 1** e o protocolo padronizado está disposto no **APÊNDICE A**.

Quadro 1: Comparação entre o método de Kawatta *et al.* (2010) e o método padronizado

Etapa da desparafinização	Protocolo de Desparafinização	
	Kawatta <i>et al.</i> (2010)	Padronização
Método de obtenção das secções	Microtomia: 10 cortes histológicos de aproximadamente 3-10 µm.	Clivagem: A parafina foi derretida e o tecido foi clivado em fragmentos de aproximadamente 15-30 mg.
Lavagens com Xilol	1.200 µL de xilol na estufa por 30 minutos. 3 lavagens realizadas.	1.000 µL de xilol aquecido em banho maria por 30 minutos. 3 lavagens realizadas.
Lavagens com álcool absoluto	1.200 µL de álcool absoluto. 3 lavagens realizadas.	1.000 µL de álcool absoluto. 3 lavagens realizadas.
Lavagens com outra gradação de álcool	-----	3 lavagens com álcool a 90%, 80% e 70%, respectivamente.
Evaporação do álcool	os tubos permaneceram abertos na estufa a 37°C por 10 minutos.	Inversão dos tubos em papel toalha e última lavagem com água destilada estéril, com inversão dos tubos.

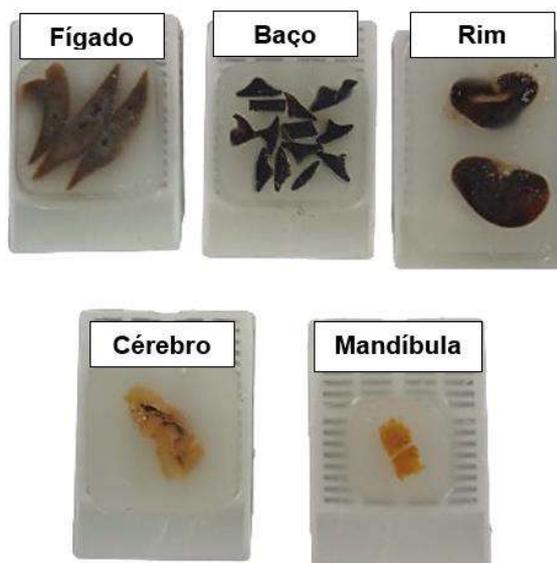
Fonte: Elaboração própria, 2024

A desparafinização consiste na remoção eficiente da parafina da amostra, permitindo o acesso ao tecido subjacente e liberando o DNA para extração subsequente (Shi *et al.*, 2002). Neste trabalho, foi utilizada a metodologia combinada de desparafinização com solvente orgânico, neste caso o xilol, com a metodologia de desparafinização com calor. O Xilol foi utilizado para dissolver a parafina e permitir a remoção mecânica do excesso desta, além disso, a remoção do xilol foi realizada com etapas sequenciais de lavagens com álcool absoluto e álcoois em gradação decrescente até o momento da lavagem com água destilada autoclavada, conforme exposto no **APÊNDICE A**.

As primeiras modificações foram acerca da forma de obtenção dos cortes das amostras incluídas em parafina. Muitos autores que realizaram o processo de desparafinização, como Kawatta *et al.* (2010), Shi *et.al* (2002) e Vitošević *et.al* (2020) demonstram a preferência por realizar a padronização em micrômetros (μm), ou seja, utilizando o micrótomo para realizar estes cortes. Considerando a rotina de um laboratório de patologia, é possível observar que ao incluir as amostras em parafina, cada espécime tecidual apresenta uma diferença de área, ao observar o bloco de parafina macroscopicamente, conforme indicado na **Imagem 1**, para além disso, ainda existe a diferença de celularidade para cada órgão.

Deste modo, um corte com 30 μm , teria concentrações e peso seco diferente para cada tipo de espécime utilizado, logo, seria necessário a adição de etapas de limpeza da lâmina de corte do micrótomo, com uso de xilol e alvejante a cada corte de espécime, conforme descrito por Vitošević *et.al* (2020), devido a alta possibilidade de contaminação cruzada nesta fase. Este processo, além de demandar tempo, poderia ocasionar exposição do operador aos componentes tóxicos, já que é um composto orgânico volátil que pode provocar dores de cabeça, dificuldades respiratórias, perda de memória em curto prazo, depressão no sistema nervoso central, irritação ocular e dermatites (Costa *et al.*, 2007), devendo o Xilol ser manipulado em capela exaustora.

Imagem 1: Aspecto macroscópico dos blocos de tecidos incluídos em parafina



Fonte: Elaboração própria.

Portanto, houve a padronização desta etapa, que consistia em derreter o bloco completo contendo a amostra, remover o tecido e clivar, com auxílio de bisturi, as secções do tecido, posteriormente, o tecido clivado foi distribuído em microtubos, conforme demonstrado na **Imagem 2**. Esta alteração, também facilitou o processo de desparafinização ao passo que removeu a parafina externa ao tecido, pelo calor, numa temperatura de aproximadamente 60 °C.

A diferença de espécimes utilizadas também permitiu observar que para cada tipo de amostra utilizada, a desparafinização apresentava tempos e etapas adicionais diferentes. Por exemplo, em algumas espécimes, a parafina ainda era possível ser observada macroscopicamente, mesmo após 3 lavagens de Xilol aquecido e incubação no banho maria a 56°C, sendo necessário mais 2 lavagens para observar uma remoção completa.

Em contrapartida, no caso específico das amostras de cérebro, apenas uma lavagem com xilol, já apresentava uma remoção completa da parafina, isso talvez se justifique porque o xilol possui natureza lipofílica, assim, quando o tecido adiposo é exposto ao xilol, os lipídios são extraídos das células adiposas e se dissolvem no solvente (Junqueira ; Carneiro, 2023) e ao considerar que o sistema nervoso central (SNC) é caracterizado pela presença de quantidades elevadas e uma ampla variedade de lipídios (Chaves-filho *et al.*, 2019), o processo de

desparafinização tenha ocorrido de maneira mais rápida e eficaz nesta espécie, devido a sua característica constitutiva.

Imagem 2: Seguimento do processo inicial de clivagem do material para desparafinização



Fonte: Elaboração própria, 2024

As lavagens com xilol aquecido e as amostras incubadas em banho maria demonstraram maior eficiência na remoção da parafina, visto que era necessário que houvesse o derretimento da parafina, processo que não foi observado de forma eficiente ao utilizar a estufa a 56°C, talvez porque ao submergir os tubos na água, a temperatura se mantinha constante e garantia que a parafina fosse eluída pelo xilol, garantindo sua remoção completa. Ademais, durante os processos de centrifugação dos tubos durante as lavagens com xilol, era necessário que a temperatura não variasse bruscamente, pois em pouco tempo a parafina já solidificava novamente, impedindo a sua separação da amostra.

A desparafinização tem como protocolo base a lavagem com xilol e posteriormente com álcool absoluto, já que o xilol é miscível em álcool, ou álcool a 70%, como descrito por Jillwin *et.al* (2021) e Kawatta *et.al* (2010). Outro protocolo, descrito por Shi *et al* (2002) ainda acrescenta o tempo de 30 minutos de espera em cada etapa e, após a remoção do xilol, acrescenta uma etapa de lavagem com álcool absoluto e álcool a 75% em seguida. Deste modo, foram adicionadas as etapas de lavagem do álcool absoluto residual, com valores decrescentes de

álcool, conforme descrito no **APÊNDICE A**, este processo visou garantir a remoção do álcool e promover a reidratação do tecido.

5.2 ALTERAÇÕES DOS PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO

Conforme foram realizados os protocolos, foi necessário a modificação das metodologias, para adaptar ao contexto do laboratório e das amostras utilizadas, a esquematização dos protocolos e variações por etapa de extração foram desempenhadas em experimentos denominados “piloto” e as alterações estão dispostas no **Quadro 2**.

Quadro 2: Resumo da metodologia empregada em cada protocolo padronizado.

Etapas da Extração de DNA	PROTOCOLOS			
	Protocolo I Fenol-clorofórmio	Protocolo II Fenol-clorofórmio	Protocolo III <i>Salting-out</i> com micro-ondas	Protocolo IV <i>Salting-out</i>
Lise Celular	Tris-HCl 100 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM pH 8,0 e SDS a 20%	Tris HCL- 100mM, MgCl ₂ - 5mM , KCl- 50 mM, Tween 0,45% e Triton X- 100 a 1%	Tris-HCl 100 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM pH 8,0 e Triton X- 100 a 0,5%	Tris-HCl 100 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM pH 8,0 e SDS a 20%
Purificação	Fenol-clorofórmio- álcool isoamílico 25:24:1	Fenol-clorofórmio- álcool isoamílico 25:24:1	Acetato de amônio 4M e 8M	Acetato de amônio 4M
Precipitação	Isopropanol e acetato de sódio 3M	Álcool absoluto	Isopropanol	Isopropanol
Lavagem	Álcool a 70%	-----	Álcool a 70%	Álcool a 70%
Ressuspensão	50 µl de água nuclease free	50 µl de água nuclease free	150 µl de água nuclease free	150 µl de água nuclease free

Fonte: Elaboração própria, 2024

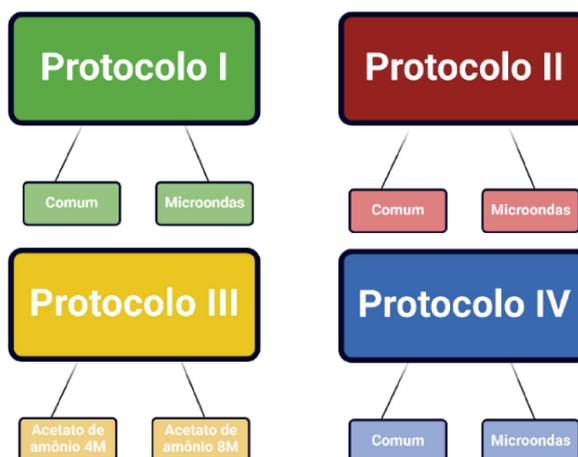
Além disso, conforme descrito por Fernandes *et.al* (2004) e Taglia *et.al* (2022), a utilização de micro-ondas atua como uma forma adjuvante de extração de DNA, deste modo, houve a subdivisão metodológica dos protocolos após a padronização conforme esquematizado na **Imagem 1**. Os dados obtidos em cada protocolo de extração, incluindo os protocolos piloto, uso de micro-ondas nas

extrações e tempo de lise estão dispostos nos **APÊNDICES F a J**.

As principais modificações nos protocolos abordaram a composição do tampão de lise, a concentração da proteinase K, o método de precipitação, etapa de lavagem do *pellet*, quantidade de volume a ser eluído e composição da eluição. As modificações foram feitas com base nos resultados obtidos nos protocolos piloto e na revisão de literatura sobre composição de reagentes para extração de DNA em tecido FFIP.

Para os protocolos que previamente não faziam uso de micro-ondas (protocolos I, II e IV), foram divididos em duas estratégias metodológicas, conforme esquematizado na **Figura 7**, assim, uma das amostras da espécie utilizada passaria por uma etapa antes da incubação, na qual o tubo seria submetido a uma potência de 360W por 40 segundos, determinado conforme adaptação do protocolo estabelecido de acordo com o estudo de Taglia *et al.* (2022), no qual o pulso era de 300W para o modelo de micro-ondas utilizado, a adaptação realizada foi necessária devido ao micro-ondas disponível no laboratório possuir outra configuração de potência.

Figura 7: Esquematização das subdivisões metodológicas para cada protocolo desenvolvido

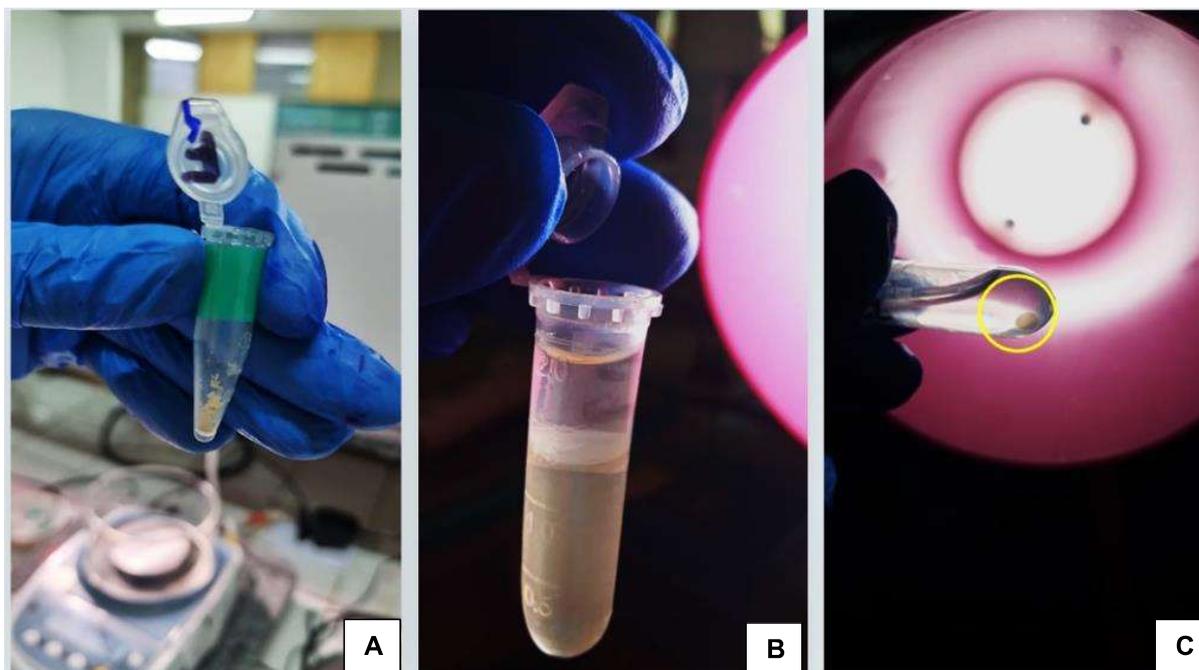


Fonte: Elaboração própria, 2024

Durante o processo de extração, muitos protocolos não especificaram a necessidade de macerar o tecido, talvez em virtude de seus cortes serem realizado no micrótomo, em contrapartida, o material clivado apresenta um tamanho mais robusto e considerando que é necessário um aumento na superfície de contato para a maior penetração do tampão de lise e proteinase K, foi adicionado aos

métodos de extração a etapa de maceração dos tecidos, conforme indicado na **Imagem 3-A**, com auxílio de uma pinça previamente autoclavada para cada espécime.

Imagem 3: Representação das etapas de extração



A: Aspecto do tecido macerado no interior do microtubo, após desparafinização. B: Divisão em três fases, após adição do fenol clorofórmio. C: Aspecto do *pellet* formado após precipitação do DNA (destacado no círculo amarelo).

Fonte: Elaboração própria, 2024

5.2.1 Protocolo de extração I

Com base na execução do protocolo de de extração proposto por Pereira *et al.* (2008), baseado no método fenol-clorofórmio, foi padronizado um protocolo de extração que visava um rendimento adequado para análises moleculares futuras, bem como, uma adaptação metodológica frente a otimização do método. As principais alterações estão dispostas no **Quadro 3** e o protocolo padronizado está disposto no **APÊNDICE B**.

Quadro 3: Comparação entre o método de Pereira *et al.* (2008) e o método padronizado

Etapa da Extração	Protocolo de Extração	
	Pereira <i>et al.</i> (2008)	Padronização

Lise Celular	Tris-HCl 100 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM pH 8,0 e SDS a 10% e proteínase K a 20 mg/mL	Tris-HCl 100 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM pH 8,0 e SDS a 20% e proteínase K a 20 mg/mL
Purificação	Fenol-clorofórmio-álcool isoamílico 25:24:1	Fenol-clorofórmio-álcool isoamílico 25:24:1
Precipitação	Isopropanol e acetato de sódio 3M	Isopropanol e acetato de sódio 3M
Lavagem	Álcool a 70%	Álcool a 70%
Ressuspensão	50 µl de água ultrapura (<i>MilliQ</i>)	50 µl de água nucleáse free

Fonte: Elaboração própria, 2024

5.2.2 Protocolo de extração II

Com base na execução do protocolo de extração proposto por Souza (2018), baseado no método fenol-clorofórmio, foi padronizado um protocolo de extração que visava um rendimento adequado para análises moleculares futuras, bem como, uma adaptação metodológica frente a otimização do método. As principais alterações estão dispostas no **Quadro 3** e o protocolo padronizado está disposto no **APÊNDICE C**.

Quadro 4: Comparação entre o método de Souza (2018) e o método padronizado

Etapa da Extração	Protocolo de Extração	
	Souza (2018)	Padronização
Lise Celular	Tris HCL- 100mM, MgCl ₂ - 5mM , KCl- 50 mM, Tween 0,45% e Triton X-100 a 1% e proteínase K a 10 mg/mL	Tris-HCl 100 mM pH 7,4, MgCl ₂ - 5mM , KCl- 50 mM, Tween 0,45%, Triton X-100 a 1% e proteínase K a 20 mg/mL
Purificação	Fenol-clorofórmio-álcool isoamílico 25:24:1	Fenol-clorofórmio-álcool isoamílico 25:24:1
Precipitação	Álcool absoluto	Isopropanol e acetato de sódio 3M
Lavagem	-	Álcool a 70%
Ressuspensão	500 µl de água ultrapura (<i>MilliQ</i>)	50 µl de água nuclease free

Fonte: Elaboração própria, 2024

5.2.3 Protocolo de extração III

Com base na execução do protocolo de de extração proposto por por Fernandes *et al.* (2004), baseado na extração por micro-ondas e *salting out*, foi padronizado um protocolo de extração que visava um rendimento adequado para análises moleculares futuras, bem como, uma adaptação metodológica frente a otimização do método. As principais alterações estão dispostas no **Quadro 4** e o protocolo padronizado está disposto no **APÊNDICE D**. O protocolo III trata-se de um método simultâneo de desparafinização e de extração por *salting-out* com uso de micro-ondas.

Quadro 5: Comparação entre o método de Fernandes *et al.* (2018) e o método padronizado

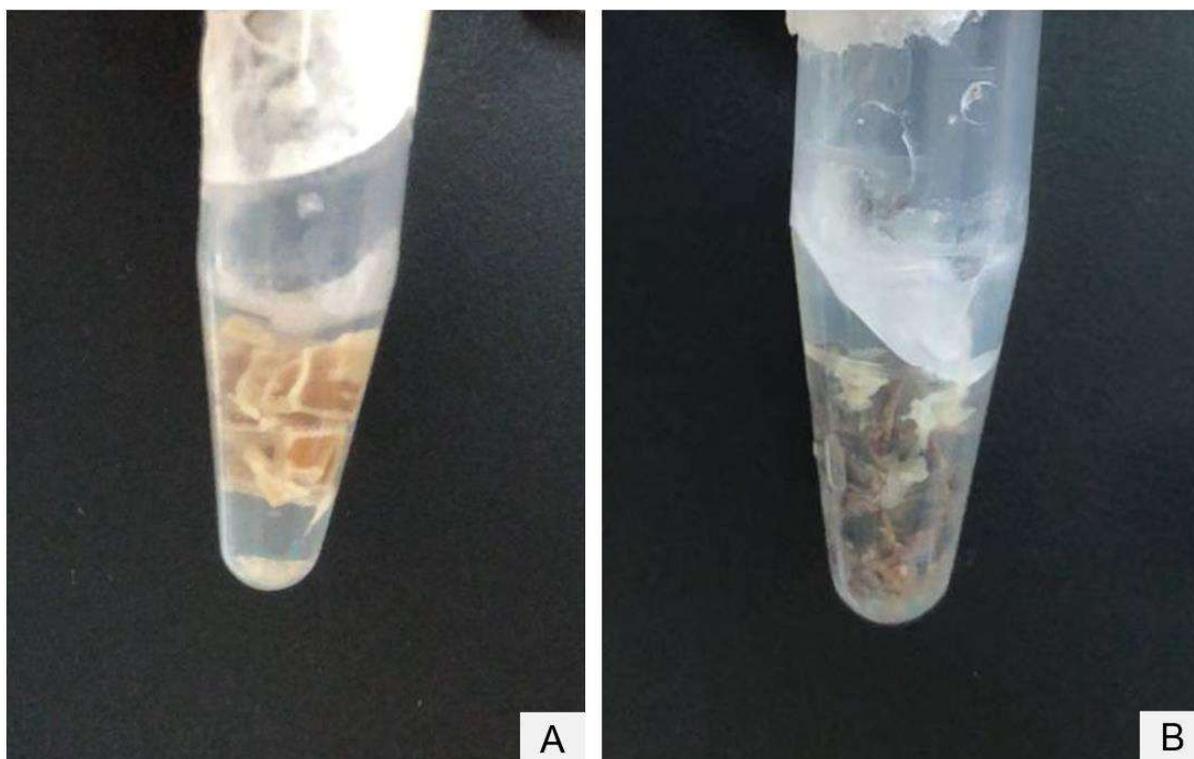
Etapa da Extração	Protocolo	
	Pereira <i>et al.</i> (2008)	Padronização
Lise Celular	Tris-HCl 50mM, pH 8,5, EDTA 1mM e Triton X-100 0,5%	Tris-HCl 100 mM pH 7,4,; EDTA 10 mM pH 8,0 e Triton X-100 a 0,5% e proteinase K (20 mg/mL)
Purificação	Acetato de amônio 6M	Acetato de amônio 8M
Precipitação	Isopropanol	Isopropanol
Lavagem	Álcool a 70%	Álcool a 70%
Ressuspensão	100-200 µL de água (MilliQ)	150 µl de água nuclease free

Fonte: Elaboração própria, 2024

Neste protocolo, o material parafinado e clivado foi depositado em um microtubo de 2,0 mL e adicionou-se de 200 a 400 µL de tampão de extração, a depender, do volume do tecido, o que não poderia ultrapassar mais de 1,5mL do tubo. Os tubos foram bem fechados, vedados com parafilme, levados ao forno de micro-ondas e submetidos a cinco pulsos de 10 segundos cada, numa potência de 720 W, para fundir a parafina.

Em seguida, os tubos foram centrifugados por 10 minutos, a 14.290 rpm, ficando a parafina depositada como um anel nas paredes dos tubos, conforme indicado na **Imagem 2**. O tecido parcialmente digerido, presente no sobrenadante, foi transferido para outro tubo limpo. Posteriormente, as espécimes foram pesadas em balança analítica e o tecido foi macerado e iniciou-se a extração.

Imagem 4: Aspecto dos tecidos após a desparafinização pelo protocolo III



Na letra A está disposto a espécime de fígado e na letra B a espécime de baço.

Fonte: Elaboração própria, 2024

Neste ponto, já foi possível observar que este método tornava o processo de desparafinização incompleto ou dificultava o acesso ao tecido devido ao bloqueio com o anel de parafina, o que poderia acarretar em um resultado insatisfatório da extração de DNA, devido à possível presença de contaminantes em parafina residual (Lucena-Aguilar *et al.*, 2016).

5.2.4 Protocolo de extração IV

Com base na execução do protocolo de de extração proposto por por Rivero *et al.* (2006), foi padronizado um protocolo de extração que visava um rendimento adequado para análises moleculares futuras, bem como, uma adaptação metodológica frente a otimização do método. As principais alterações estão dispostas no **Quadro 5** e o protocolo padronizado está disposto no **APÊNDICE E**.

Quadro 6: Comparação entre o método de Rivero *et al.* (2006) e o método padronizado

Etapa da Extração	Protocolo	
	Rivero <i>et al.</i> (2006)	Padronização
Lise Celular	Tris-HCl 1M, pH 8,0; EDTA 0,5M, pH 8,5; NaCl 1M e proteinase K (0,25 mg/mL)	Tris-HCl 100 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; EDTA 10 mM pH 8,0; SDS a 20% e proteinase K (20 mg/mL)
Purificação	Acetato de amônio 4M	Acetato de amônio 8M
Precipitação	Isopropanol	Isopropanol
Lavagem	Álcool a 70%	Álcool a 70%
Ressuspensão	30-50 µL de água ultrapura (MilliQ)	150 µl de água nuclease free

Fonte: Elaboração própria, 2024

5.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DA INTEGRIDADE DO DNA

Durante e após a padronização do método, foi realizada a análise quantitativa, realizada utilizando o espectrofômetro *Nanodrop Lite*. A análise completa antes da padronização (piloto) e após, encontra-se disponível nos **APÊNDICES F a J**, subdivididos por espécimes utilizadas. A análise quantitativa está disposta conforme as espécimes utilizadas, nas **Tabelas 1 a 5**.

O grau de purificação da amostra com relação à contaminação por proteínas foi obtido pelo cálculo da relação entre as absorbâncias em 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}), com valores de inclusão compreendidos entre 1.8 ± 0.2 , conforme utilizado por Abdulla *et al.* (2022) e Lucena-Aguilar *et al.* (2016).

Além disso, também foram obtidos dados acerca da concentração em ng/µL, bem como a concentração em nanogramas obtidos a partir dos microgramas de tecido recém desparafinado (ng/mg). Os resultados estão dispostos nas tabelas a seguir conforme as espécimes de tecido utilizadas (fígado, baço, rim, cérebro e mandíbula), de acordo com cada protocolo de extração utilizado. É importante destacar, que todos os protocolos de extração passaram pelo mesmo protocolo de desparafinação padronizado, disposto no **APÊNDICE A**.

Tabela 1: Análise em espectrofômetro modelo *Nanodrop Lite* das espécimes de fígado

	CÓDIGO	<i>260 nm</i>	<i>260/280</i>	<i>ng/μl</i>	<i>mg</i>	<i>ng/mg</i>
PROTOCOLO I	FI	13.207	1.73	660,4	13	2540,0
	FII	16.956	1.74	847,8	16	2649,3
	FIII	33.370	1.74	1668,5	16	5214,0
	FIV	20.258	1.73	1012,9	16	3165,3
PROTOCOLO II	FI	36.024	0.56	1801,2	50	1801,2
	FII	27.889	0.00	1394,5	52	1340,8
PROTOCOLO III	F1	23.235	1.70	1161,7	119	1464,3
	F2	29.028	1.67	1451,4	171	1273,1
	FII	11.981	1.60	599	140	641,7
	FI	10.062	1.74	530,11	63	1262,1
PROTOCOLO IV	FII	31.511	1.66	1575,60	64	3692,8

Fonte: Elaboração própria, 2024

Tabela 2: Análise em espectrofômetro modelo *Nanodrop Lite* das espécimes de baço

	CÓDIGO	<i>260 nm</i>	<i>260/280</i>	<i>ng/μL</i>	<i>mg</i>	<i>ng/mg</i>
PROTOCOLO I	BI	24.900	1.74	1245	11	5659,0
	BII	33.352	1.75	1667,6	12	6948,3
	BIII	36.443	1.74	1822,1	12	7592,0
	BIV	13.221	1.72	661,1	8	4131,8
PROTOCOLO II	BI	5.318	0.00	265,9	37	359,3
	BII	27.187	0.00	1359,3	27	2517,2
PROTOCOLO III	B1	0.918	1.37	45,9	69	33,2
	B2	32.841	1.66	1642,0	70	1172,8
	BI	32.431	1.61	1621,6	112	723,9
PROTOCOLO IV	BI	20.860	1.63	1043,00	35	1490,0
	BII	20.582	1.63	1029,10	30	1715,1

Fonte: Elaboração própria, 2024

Tabela 3: Análise em espectrofômetro modelo *Nanodrop Lite* das espécimes de rim

	CÓDIGO	260 nm	260/280	ng/μl	mg	ng/mg
PROTOCOLO I	RI	7.062	1.73	353,1	11	1605,0
	RIII	4.306	1.72	215,3	10	1076,5
PROTOCOLO II	RI	22.405	1.73	1120,3	75	746,9
	RII	34.981	0.54	1749,1	67	1305,2
PROTOCOLO III	R1	6.297	1.53	314,9	154	306,7
	R2	3.620	1.29	181	184	147,5
	RI	16.391	1.76	819,5	169	727,3
	RII	4.973	1.63	248,6	136	274,1
PROTOCOLO IV	RI	19.838	1.64	991,90	84	1771,2
	RII	35.064	1.79	1753,20	84	3130,7

Fonte: Elaboração própria, 2024

Tabela 4: Análise em espectrofômetro modelo *Nanodrop Lite* das espécimes de cérebro

	CÓDIGO	260 nm	260/280	ng/μL	mg
PROTOCOLO I	CI	0.062	1.55	3,1	16
	CII	0.009	1.91	0,4	13
	CIII	0.047	1.34	2,3	13
	CIV	0.171	1.49	8,6	12
PROTOCOLO II	CI	10.060	1.27	503	38
	CII	8.360	1.34	418	45
PROTOCOLO III	C1	2.883	1.23	144,1	125
	C2	0.270	0.97	13,5	168
PROTOCOLO IV	CI	0.021	1.00	1	55
	CI	3.019	1.21	151,00	51
	CII	0.126	1.21	6,30	46

Nesta espécime nenhuma das extrações foi incluída com valores determinados no nanodrop, deste modo o rendimento ng/mg não foi atribuído.

Fonte: Elaboração própria, 2024

Tabela 5: Análise em espectrofômetro modelo *Nanodrop Lite* das espécimes de mandíbula

	CÓDIGO	<i>260 nm</i>	<i>260/280</i>	<i>ng/μl</i>	<i>mg</i>
PROTOCOLO I	MI	0.096	1.50	4,8	13
	MII	0.198	1.47	9,9	16
	MIII	0.065	1.44	3,2	13
	MIV	0.079	1.56	4	15
PROTOCOLO II	MI	2.055	1.42	102.8	37
	MII	2.878	1.41	143.8	32
PROTOCOLO III	MI	0.263	0.95	13,1	68
	MII	0.018	0.70	0,9	41
PROTOCOLO IV	MI	0.114	1.16	5,70	52
	MII	0.066	1.37	3,30	46

Nesta espécie nenhuma das extrações foi incluída com valores determinados no nanodrop, deste modo o rendimento ng/mg não foi atribuído.

Fonte: Elaboração própria, 2024

A análise em espectrofotômetro demonstrou que apenas as espécimes de fígado, baço e rim apresentaram uma extração de DNA satisfatória, com valores da relação 260/280 variando entre 1,6 a 1,9, em todos os quatro protocolos. Em contrapartida, as espécimes de cérebro e mandíbula não apresentaram valores satisfatórios da relação 260/280, ou apesar de valores satisfatórios, a análise qualitativa destas amostras não demonstrou presença de DNA, o que sugere uma contaminação com proteínas.

A relação 260/280 seguiu padrões de escolha com base nos estudos de Abdulla *et al.* (2022), Lucena-Aguilar *et al.* (2016) e Yi *et al.* (2020), deste modo, foi atribuído que os valores considerados para uma boa extração estariam em torno de 1,6 a 1,9, com valores ideais mais próximos de 1,8. Ademais, de acordo com Lucena-Aguilar *et al.* (2016) se a relação 260/280 obtida for de valores inferiores ou iguais a 1,6 ($\leq 1,6$), isto pode indicar a presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes que absorvem fortemente ou próximo de 280 nm.

Os valores selecionados conforme a relação 260/280 condizem com os dados propostos nos estudos de Funabashi *et al.* (2012); Rivero *et al.* (2012) e Yi *et al.* (2020), com valores em torno de $1,8 \pm 0,1$, nas espécimes de rim, fígado e baço. Não foram observados estudos com dados de materiais FFIP de espécimes

de cérebro sem neoplasias ou acometimento por doenças, bem como, espécimes de mandíbula descalcificadas com ácido nítrico à 10%.

Além da relação 260/280, para uma eventual amplificação do DNA através da reação em cadeia da polimerase, é necessário que a concentração do DNA extraído esteja acima de 100 ng/ μ L (Abdulla *et al.*; 2022), valor obtido por todas as extrações consideradas satisfatórias com base na relação 260/280, o que vai de acordo com valores observados nos estudos de Yi *et al.* (2020), com valores entre 150 e 230 ng/ μ L. Vale destacar que neste estudo, a partir das amostras selecionadas, o menor valor de rendimento foi de 248,6 ng/ μ L, observado na amostra de rim (RII) do protocolo III.

Alguns tecidos possuem maior degradação talvez em virtude de não haver uma padronização no processo de fixação com formol a 10%, já que este fixador é descrito como agravante em danos ao DNA (A Steiert *et al.*, 2023; Do *et al.*, 2015; Doty *et al.*, 1971; Douglas *et al.*; 1998; Hoffman *et al.*, 2015) em decorrência da necessidade de fixar os tecidos e imediatamente após a fixação iniciar seu processamento, entretanto, devido a demora natural do processamento, é instituído a necessidade do acúmulo de amostras para então realizar o processamento, neste processo de espera algumas amostras ficam um tempo acima do necessário (>24h) em contato com o formol.

Neste trabalho não foi possível observar valores satisfatórios de extração de DNA nas espécimes de cérebro e mandíbula, a partir da análise da relação 260/280. As espécimes de cérebro utilizadas foram fixadas no formol por tempo não determinado, visto que, especificamente, estes blocos, não possuíam data de obtenção da espécime e tempo de fixação. O que pode acarretar nos danos já previstos, da exposição continuada ao formol (Funabashi *et al.*, 2012; Turashvili *et al.*, 2012), deste, modo, essa variável talvez possibilitou que nenhum dos protocolos fosse capaz de extrair DNA nessas amostras. Além disso, as espécimes de cérebro, ao contrário das demais, são obtidas de órgãos humanos, o que difere ao comparar os dados com as outras espécimes, originadas de modelos murinos.

Em relação à mandíbula, um tecido descalcificado, espécimes que sofrem a descalcificação com ácidos fortes, como a mandíbula, sofrem danos à estrutura do DNA (Alers *et al.*; 1999; Bauer, 1988; Singh *et al.*, 2013; Zoledziwska *et al.*, 2002), além disso Singh *et al.* (2013) já descreve que mesmo o uso do agente

quelante, o EDTA, ao combiná-lo com o ácido clorídrico, um ácido forte; seu desempenho tanto em relação ao rendimento quanto à integridade foi significativamente prejudicado. Deste modo, considerando o contexto do laboratório na qual foi desempenhado este trabalho, a padronização da descalcificação dos tecidos segue o uso do ácido nítrico a 10%, o que afeta consideravelmente nos danos sofridos pelo material genético.

5.4 ANÁLISE QUALITATIVA DO RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO

Após a análise quantitativa e qualitativa das amostras piloto, conforme demonstrado nos **Apêndices F a M** foi padronizado que era necessário a utilização do gel de agarose à 2%, com marcador de 50 pares de base (pb), além disso, foi utilizado uma corrente de 100 mA e 80 volts, durante 90 minutos.

As amostras utilizadas foram selecionadas com base nas análises qualitativas (valores da relação 260/280 entre 1,6 e 1,9 e valor em ng/μl acima de 100) e estão dispostas na **Tabela 6**. Os resultados das análises qualitativas estão expostos nas **Imagens 5 e 6**. É importante notar, que o padrão de eletroforese das amostras FFIP é de um tecido fragmentado, com raras aparições de bandas, conforme apontado por Kalmar *et al.*, 2000; Libório *et al.*, 2005; Yi *et al.*, 2020. Os padrões eletroforéticos dos estudos citados, estão dispostos nos **Anexos F, G e H**, respectivamente.

Foram correlacionados os dados da análise quantitativa e qualitativa e foi possível observar que nem sempre, os valores adequados da razão 260/280 iriam refletir em um padrão visível de eletroforese, mesmo que sendo um padrão fragmentado. Isto se justifica no fato de algumas amostras apresentarem um baixo rendimento, seja na proporção ng/μl ou na proporção ng/mg.

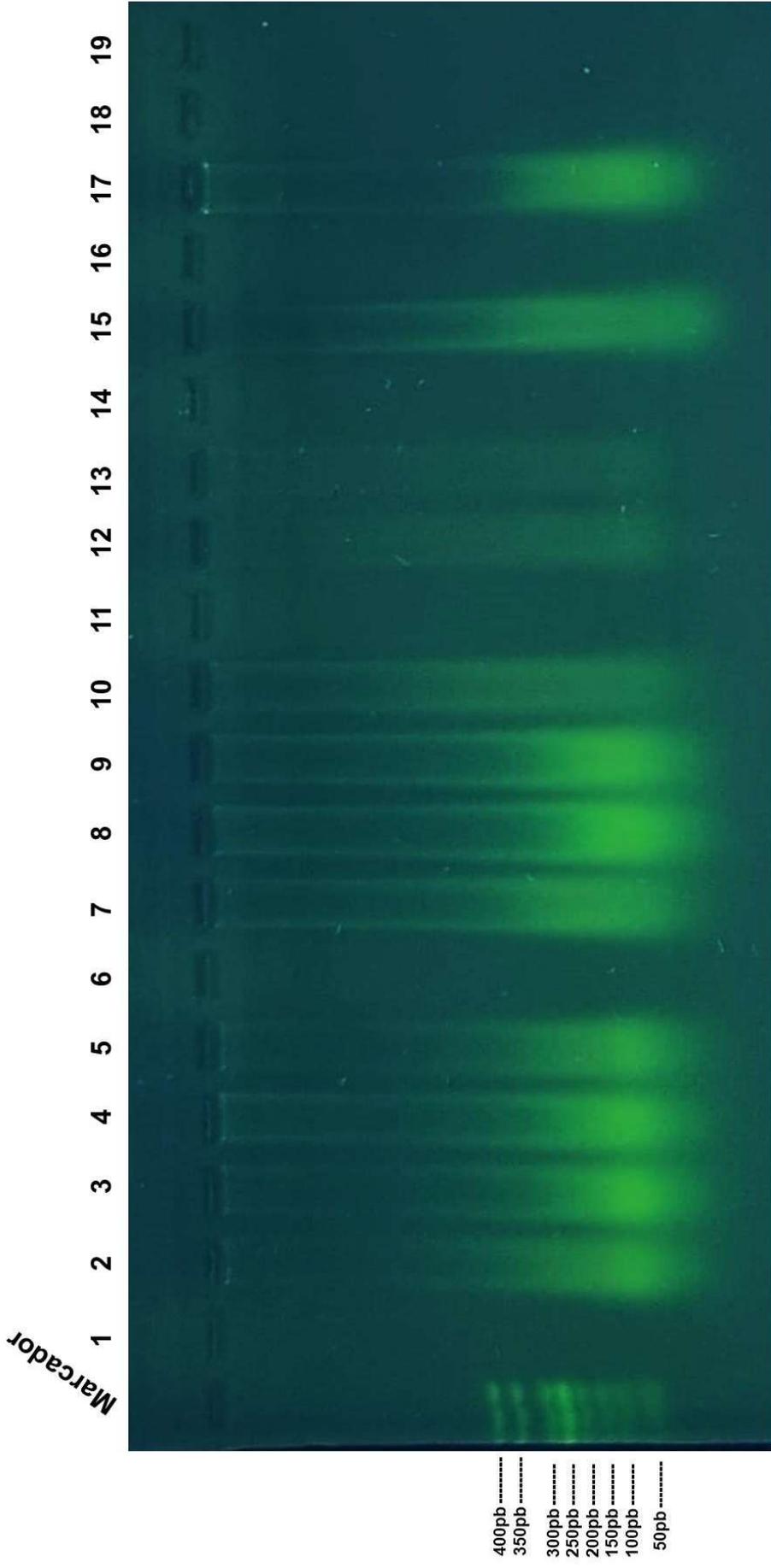
Nesta fase, como esperado, as amostras de cérebro e mandíbula, que não haviam obtidos resultados satisfatórios na análise quantitativa, não obtiveram nenhum padrão eletroforético, considerando-as novamente como amostras sem extração de DNA.

Tabela 6: Amostras selecionadas com base na relação 260/280 e valor em ng/ μ l

Protocolo	Espécime	Código	260/280	ng/μl	ng/mg
<i>Protocolo I</i>	Fígado	FI	1.73	660,4	2540,0
<i>Protocolo I</i>	Fígado	FII	1.74	847,8	2649,3
<i>Protocolo I</i>	Fígado	FIII	1.74	1668,5	5214,0
<i>Protocolo I</i>	Fígado	FIV	1.73	1012,9	3165,3
<i>Protocolo I</i>	Baço	BI	1.74	1245,0	5659,0
<i>Protocolo I</i>	Baço	BII	1.75	1667,6	6948,3
<i>Protocolo I</i>	Baço	BIII	1.74	1822,1	7592,0
<i>Protocolo I</i>	Baço	BIV	1.72	661,1	4131,8
<i>Protocolo I</i>	Rim	RI	1.73	353,1	1605,0
<i>Protocolo I</i>	Rim	RII	1.72	215,3	1076,5
<i>Protocolo II</i>	Rim	RI	1.73	1120,3	746,9
<i>Protocolo III</i>	Fígado	F1	1.70	1161,7	1464,3
<i>Protocolo III</i>	Fígado	F2	1.67	1451,4	1273,1
<i>Protocolo III</i>	Fígado	FII	1.60	599,0	641,7
<i>Protocolo III</i>	Baço	B2	1.66	1642,0	1172,8
<i>Protocolo III</i>	Baço	BI	1.61	1621,6	723,9
<i>Protocolo III</i>	Rim	RI	1.76	819,5	727,3
<i>Protocolo III</i>	Rim	RII	1.63	248,6	274,1
<i>Protocolo IV</i>	Fígado	FI	1.74	530,11	1262,1
<i>Protocolo IV</i>	Fígado	FII	1.66	1575,60	3692,8
<i>Protocolo IV</i>	Baço	BI	1.63	1043,00	1490,0
<i>Protocolo IV</i>	Baço	BII	1.63	1029,10	1715,2
<i>Protocolo IV</i>	Rim	RI	1.64	991,90	1771,3
<i>Protocolo IV</i>	Rim	RII	1.79	1753,20	3130,7

Fonte: Elaboração própria, 2024

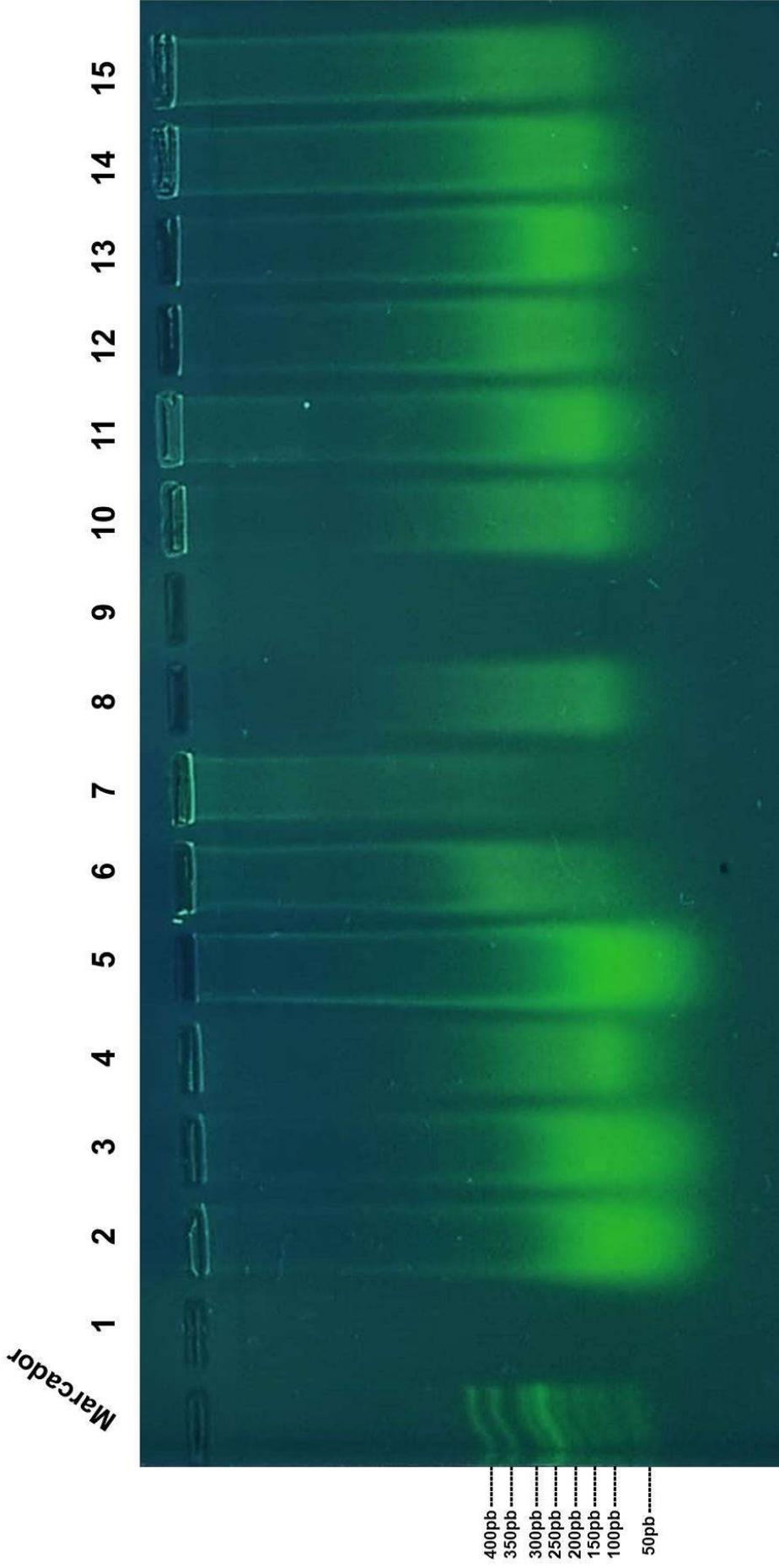
Imagem 5: Eletroforese em gel de agarose a 2% das amostras dos protocolos I e II



Note que o DNA está fragmentado, pois não apresenta banda visível. As amostras indicadas de 2 a 13 foram extraídas pelo protocolo I. A amostra indicada em 15 foi extraída pelo protocolo II. As amostras de 17 a 19 são amostras extraídas pelos protocolos piloto. Nos poços 1, 6, 11 e 14 não foram depositadas amostras.

Fonte:Elaboração própria, 2024

Imagem 6: Eletroforese em gel de agarose a 2% das amostras dos protocolos III e IV



Note que o DNA está fragmentado, pois não apresenta banda visível. As amostras indicadas de 2 a 8 foram extraídas pelo protocolo III. As amostras de 10 a 15 são amostras extraídas pelo protocolo IV. Nos poços 1 e 9 não foram depositadas amostras.

Fonte: Elaboração própria, 2024

Como esperado, as amostras analisadas qualitativamente, apresentaram um padrão de degradação do DNA. No entanto, apesar disto, a maioria das amostras selecionadas durante a avaliação quantitativa, apresentam resultados satisfatórios nesta etapa. As amostras depositadas no gel de agarose da **Imagem 5**, correspondem aos protocolos I e II e as amostras depositadas no gel de agarose da **Imagem 6**, correspondem aos protocolos III e IV.

Na **Imagem 5**, as amostras indicadas de 2 a 13 foram extraídas pelo protocolo I, de 2 a 5, é possível observar as amostras de fígado, de 7 a 10, as amostras de baço e de 12 a 13 as amostras de rim. As amostras de fígado e baço extraídas pelo protocolo I, apresentam o padrão degradado, porém, com uma concentração elevada de material com valores por volta de 100pb (indicado pela intensidade de cor verde), o que se associa com seus valores de rendimento acima de 600 ng/μl.

Em contrapartida, as amostras de rim, indicadas de 12 a 13, demonstraram um padrão degradado, porém sem predominância de intensidade de cor, compatível com uma extração ineficiente e com pouco material, isto se justifica pois seus valores de rendimento estão abaixo de 400 ng/μl. A amostra indicada em 15 foi extraída pelo protocolo II e apresenta o padrão de degradação, porém sem a possibilidade de identificar uma maior prevalência de material em alguma quantidade de pares de base.

Na **Imagem 6** as amostras de 2 a 8, foram extraídas pelo protocolo III, e as amostras de 10 a 15 extraídas pelo método IV. De antemão, sem observar as espécimes, ao comparar os dois protocolos é possível perceber que as amostras do protocolo IV apresentam um padrão eletroforético, com intensidade de cor compatível com valores acima de 100pb. Na imagem, de 10 a 11, é possível observar as amostras de fígado, de 12 a 13, as amostras de baço e de 14 a 15 as amostras de rim.

Por outro lado, as amostras do protocolo III, apresentam padrões diversos de tamanho e intensidade. Ao correlacionar os dados com a análise quantitativa, é possível perceber que os valores da razão 260/280 se aproximam de 1,6, o que Lucena-Aguilar *et al.* (2016) ser uma indicação da presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes. Destaco uma observação feita durante o processo de padronização deste protocolo, era possível observar que processo

de desparafinização por micro-ondas era incompleto e dificultava o acesso ao tecido devido ao bloqueio com o anel de parafina, o que resultou em valores alterados e um padrão não satisfatório nas análises quantitativa e qualitativa, compatível com uma contaminação, possivelmente, por parafina.

5.5 SELEÇÃO DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO

Com base nos dados obtidos e, considerando que todas as amostras passaram pelo mesmo processo de desparafinização, salvo o protocolo III; foi possível determinar que os protocolos com padrão eletroforético mais homogêneo e maior quantidade de amostras extraídas eram os protocolos: I, II e IV. É importante ressaltar que a variação metodológica com auxílio micro-ondas, não obteve diferenças significativas em relação aos protocolos sem seu uso. Seguindo com a análise de dados, os protocolos com valores da razão 260/280 mais próximos de 1,8 e maiores rendimentos em ng/ μ L e ng/mg, encontravam-se nas amostras extraídas pelos protocolos I e IV. A comparação entre estes protocolos está disposta na **Tabela 7**.

Tabela 7: Comparação dos resultados dos Protocolos I e IV

PROTOCOLO I					PROTOCOLO IV				
CÓDIGO	260/280	ng/μL	ng/mg	tempo lise	CÓDIGO	260/280	ng/μL	ng/mg	tempo lise
<i>FI</i>	1.73	660,4	2540,0	18h	<i>FI</i>	1.74	530,1	1262,2	36h
<i>FII</i>	1.74	847,8	2649,4	18h	<i>FII</i>	1.66	1575,6	3692,8	36h
<i>FIII</i>	1.74	1668,5	5214,1	18h	<i>BI</i>	1.63	1043,0	4470,0	36h
<i>FIV</i>	1.73	1012,9	3165,3	18h	<i>BII</i>	1.63	1029,1	5145,5	36h
<i>BI</i>	1.74	1245,0	5659,1	36h	<i>RI</i>	1.64	991,9	1771,3	36h
<i>BII</i>	1.75	1667,6	6948,3	36h	<i>RII</i>	1.79	1753,2	3130,7	36h
<i>BIII</i>	1.74	1822,1	7592,1	36h					
<i>BIV</i>	1.72	661,1	4131,9	36h					
<i>RI</i>	1.73	353,1	1605	18h					
<i>RIII</i>	1.72	215,3	1076,5	18h					

Fonte: Elaboração própria, 2024

Ao analisar e comparar os dados quantitativos e qualitativos das amostras dos protocolos I e IV, conforme exposto nas **Imagens 5 e 6**, foi possível observar

que todas as amostras extraídas apresentaram fragmentação do DNA, conforme esperado para tecidos FFIP. Além disso, o padrão de tamanhos, mesmo fragmentados, se manteve semelhante entre as espécimes extraídas. Por fim, foi possível observar que, mesmo, com a degradação, as amostras dos protocolos I e IV apresentaram padrões de intensidade de cor acima de 50 pb.

A partir disto, foram comparados os resultados destes protocolos, conforme expresso na **tabela 7** e foi possível observar que apesar dos resultados dos protocolos I e IV serem satisfatórios, houve destaque entre eles. Assim, o protocolo I, demonstrou o menor tempo majoritário de etapa de lise em relação ao protocolo IV; o protocolo I possuiu mais valores com proximidade de 1,8 na relação 260/280; o protocolo I possuiu os melhores valores de rendimento ng/ μ L e ng/mg, chegando a cerca de 1822,1 ng/ μ L e 7592,1 ng/mg.

Com essas interpretações, o Protocolo I, método de extração por fenol-clorofórmio, foi padronizado e escolhido como melhor método para extração de DNA em tecidos FFIP, de acordo com as condições experimentais do laboratório de Imunopatologia experimental (LABIPEX). Destaca-se a necessidade de ensaios futuros com reação em cadeia da polimerase (PCR).

6 CONCLUSÃO

- Foi possível padronizar a técnica de desparafinização em tecidos fixados em formol e incluídos em parafina (FFIP);
- Foi possível padronizar a técnica de extração de DNA em tecidos parafinados não-descalcificados;
- Não foi possível padronizar a técnica de extração de DNA em tecidos parafinados e descalcificados.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, Bruce. **Biologia molecular da célula**. Grupo A, 2017. E-book. ISBN 9788582714232. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582714232/>. Acesso em: 09 mai. 2023.

ALBERTS, Bruce. **Fundamentos da biologia celular**. Grupo A, 2017. E-book. ISBN 9788582714065. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582714065/>. Acesso em: 09 mai.2023.

ALERS, Janneke C. et al. Effect of Bone Decalcification Procedures on DNA In Situ Hybridization and Comparative Genomic Hybridization: edta is highly preferable to a routinely used acid decalcifier. **Journal Of Histochemistry & Cytochemistry**, [S.L.], v. 47, n. 5, p. 703-709, maio 1999. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/002215549904700512>.

A STEIERT, Tim et al. A critical spotlight on the paradigms of FFPE-DNA sequencing. *Nucleic Acids Research*, [S.L.], v. 51, n. 14, p. 7143-7162, 23 jun. 2023. **Oxford University Press (OUP)**. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkad519>.

AUSUBEL, *et al.* (1987). **Current Protocols in Molecular Biology**.

BAUER, Henrik C. F. DNA cytometry of osteosarcoma. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, [S.L.], v. 59, n. 228, p. 1-39, jan. 1988. **Medical Journals Sweden AB**. <http://dx.doi.org/10.3109/17453678809154175>.

BUTLER, John M. *et al.* DNA Extraction Methods. **Advanced Topics In Forensic Dna Typing**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 29-47, 2012. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-374513-2.00002-6>.

CHAVES-FILHO, Adriano Britto *et al.* Alterations in lipid metabolism of spinal cord linked to amyotrophic lateral sclerosis. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-14, 12 ago. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-48059-7>.

CHEN, Guoli; MOSIER, Stacy; GOCKE, Christopher D.; LIN, Ming-Tseh; ESHLEMAN, James R.. Cytosine Deamination Is a Major Cause of Baseline Noise in Next-Generation Sequencing. **Molecular Diagnosis ; Therapy**, [S.L.], v. 18, n. 5, p. 587-593, 5 ago. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s40291-014-0115-2>.

COHEN, Sarah *et al.* Interacting organelles. **Current Opinion In Cell Biology**, [S.L.], v. 53, n. 1, p. 84-91, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2018.06.003>.

COSTA *et al.* Avaliação dos riscos associados ao uso do xilol em laboratórios de anatomia patológica e citologia. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, [S.L.],

v. 32, n. 116, p. 50-56, dez. 2007. FapUNIFESP (SciELO).
<http://dx.doi.org/10.1590/s0303-76572007000200007>.

DO, Hongdo *et al.* Sequence Artifacts in DNA from Formalin-Fixed Tissues: causes and strategies for minimization. **Clinical Chemistry**, [S.L.], v. 61, n. 1, p. 64-71, 1 jan. 2015. Oxford University Press (OUP).
<http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2014.223040>.

DOTY, Paul *et al.* Kinetic studies of denaturation and reaction with formaldehyde on polydeoxyribonucleotides. **Biochemistry**, [S.L.], v. 10, n. 7, p. 1254-1264, 1 mar. 1971. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi00783a024>.

DOUGLAS, Michael P *et al.* DNA damage caused by common cytological fixatives. Mutation Research/**Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis**, [S.L.], v. 401, n. 1-2, p. 77-88, jun. 1998. Elsevier BV.
[http://dx.doi.org/10.1016/s0027-5107\(97\)00314-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0027-5107(97)00314-x).

FELDMAN, M.Ya. *et al.* Reactions of Nucleic Acids and NucleoDroteins with Formaldehyde. **Progress In Nucleic Acid Research And Molecular Biology**, [S.L.], p. 1-49, 1973. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0079-6603\(08\)60099-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0079-6603(08)60099-9).

FERNANDES, José Veríssimo *et al.* Comparação de três protocolos de extração de DNA a partir de tecido fixado em formol e incluído em parafina. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [S.L.], v. 40, n. 3, p. 141-146, jun. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1676-24442004000300003>.

FRAZER, Z. *et al.* (2020). Efeito de diferentes protocolos de digestão de proteinase K e métodos de desparafinização sobre o rendimento e a integridade do DNA extraído de tecido fixado em formalina e incorporado à parafina. **The journal of histochemistry and cytochemistry**, 68(3), 171–184.
<https://doi.org/10.1369/0022155420906234>

FUNABASHI, Karina Silva *et al.* DNA extraction and molecular analysis of non-tumoral liver, spleen, and brain from autopsy samples: the effect of formalin fixation and paraffin embedding. **Pathology - Research And Practice**, [S.L.], v. 208, n. 10, p. 584-591, out. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2012.07.001>.

GREEN ; SAMBROOK (2012). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th edition. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**.

GRIFFITHS, Anthony J F.; DOEBLEY, John; PEICHEL, Catherine; *et al.* **Introdução à Genética**. Grupo GEN, 2022. *E-book*. ISBN 9788527738682. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527738682/>. Acesso em: 16 abr. 2024

HARDY, John; SINGLETON, Andrew. Genomewide Association Studies and Human Disease. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 360, n. 17, p. 1759-1768, 23 abr. 2009. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmra0808700>.

HEDEGAARD, Jakob *et al.* Next-Generation Sequencing of RNA and DNA Isolated from Paired Fresh-Frozen and Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Samples of

Human Cancer and Normal Tissue. **Plos One**, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 98-187, 30 maio 2014. Public Library of Science (PLoS).
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0098187>.

HOFFBRAND, A V.; MOSS, P. A H. **Fundamentos em hematologia de Hoffbrand**. Grupo A, 2018. E-book. ISBN 9788582714515. Disponível em:
<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582714515/>. Acesso em: 02 mai. 2024.

HOFFMAN, Elizabeth A. *et al.* Formaldehyde Crosslinking: a tool for the study of chromatin complexes. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 290, n. 44, p. 26404-26411, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.r115.651679>.

IYAVOO, S. *et al.* Evaluation of decalcification for recovery of DNA from bone. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, [S.L.], v. 6, p. 270-272, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.087>.

JILLWIN, Joseph *et al.* Molecular identification of pathogenic fungi in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. **Journal Of Medical Microbiology**, [S.L.], v. 70, n. 2, p. 01-08, 1 fev. 2021. Microbiology Society.
<http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.001282>.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos U.; CARNEIRO, José. **Histologia Básica: Texto e Atlas**. GEN, 2023. E-book. ISBN 9788527739283. Disponível em:
<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527739283/>. Acesso em: 02 mai. 2024.

KALMAR, T. *et al.* A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 28, n. 12, p. 67-67, 15 jun. 2000. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/28.12.e67>

KELLY, Rachel *et al.* RNA and DNA Integrity Remain Stable in Frozen Tissue After Long-Term Storage at Cryogenic Temperatures: a report from the ontario tumour bank. **Biopreservation And Biobanking**, [S.L.], v. 17, n. 4, p. 282-287, ago. 2019. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/bio.2018.0095>.

KOKKAT, Theresa J. *et al.* Archived Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) Blocks: a valuable underexploited resource for extraction of dna, rna, and protein. **Biopreservation And Biobanking**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 101-106, abr. 2013. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/bio.2012.0052>.

LIBÓRIO, Tatiana Nayara *et al.* Evaluation of the genomic DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded oral samples archived for the past 40-years. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [S.L.], v. 41, n. 6, p. 1-1, dez. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1676-24442005000600006>

LOHNE-SEILER, H. *et al.* Musculoskeletal fitness and balance in older individuals (65–85 years) and its association with steps per day: a cross sectional study. **Bmc Geriatrics**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 125-145, 12 jan. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12877-016-0188-3>.

LUCENA-AGUILAR, Gema et al. DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. **Biopreservation And Biobanking**, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 264-270, ago. 2016. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/bio.2015.0064>.

MANOLIO, Teri A.. Genomewide Association Studies and Assessment of the Risk of Disease. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 363, n. 2, p. 166-176, 8 jul. 2010. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmra0905980>.

MCGHEE, James D.; VON HIPPEL, Peter H.. Formaldehyde as a probe of DNA structure. Equilibrium denaturation of DNA and synthetic polynucleotides. **Biochemistry**, [S.L.], v. 16, n. 15, p. 3267-3276, 26 jul. 1977. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi00634a001>.

MENCK, Carlos F M.; SLUYS, Marie-Anne V. **Genética molecular básica: dos genes ao genomas**. Grupo GEN, 2017. E-book. ISBN 9788527732208. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527732208/>. Acesso em: 09 abr. 2023.

MILLER, S.A. et al. A simple *salting out* procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 1215-1215, 1988. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>

MIQUELESTORENA-STANDLEY, Elodie *et al.* Effect of decalcification protocols on immunohistochemistry and molecular analyses of bone samples. **Modern Pathology**, [S.L.], v. 33, n. 8, p. 1505-1517, ago. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1038/s41379-020-0503-6>.

MIRICA, Katherine A. et al. Selective Precipitation and Purification of Monovalent Proteins Using Oligovalent Ligands and Ammonium Sulfate. **Bioconjugate Chemistry**, [S.L.], v. 23, n. 2, p. 293-299, 26 jan. 2012. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bc200390q>.

OBA, Utako et al. An efficient procedure for the recovery of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. **Biology Methods And Protocols**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-38, 1 jan. 2022. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/biomethods/bpac014>.

PAWLINA, Wojciech. **Ross Histologia - Texto e Atlas**. Grupo GEN, 2021. E-book. ISBN 9788527737241. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527737241/>. Acesso em: 02 mai. 2024.

PEREIRA, Ana Carla et al. Extração de DNA de biópsias de pele fixadas em formalina tamponada e embebidas em parafina e amplificação por PCR. **Hansenologia Internationalis**, São Paulo, v. 2, n. 33, p. 25-30, maio 2008. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/porta/resource/pt/lil-789335>. Acesso em: 02 abr. 2023.

POTLURI, Keerti *et al.* Genomic DNA extraction methods using formalin-fixed paraffin-embedded tissue. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 486, n. 1, p. 17-23, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2015.06.029>.

RIVERO, Elena R.C. *et al.* Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Pathology - Research And Practice**, [S.L.], v. 202, n. 7, p. 523-529, jul. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2006.02.007>.

SAINI, Deepti. Gene therapy. **Advances In Animal Genomics**, [S.L.], v. -, n. -, p. 165-183, nov. 2021. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-820595-2.00011-4>.

SENGÜVEN, Burcu *et al.* Comparison of Methods for the Extraction of DNA from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Archival Tissues. **International Journal Of Medical Sciences**, [S.L.], v. 11, n. 5, p. 494-499, 2014. Ivyspring International Publisher. <http://dx.doi.org/10.7150/ijms.8842>.

SETHI, Waleed Tariq *et al.* In vitro analysis of a microwave sensor for noninvasive glucose monitoring. **Microwave And Optical Technology Letters**, [S.L.], v. 61, n. 3, p. 599-604, 12 dez. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mop.31629>.

SHI, Shan-Rong *et al.* DNA Extraction from Archival Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue Sections Based on the Antigen Retrieval Principle: heating under the influence of ph. **Journal Of Histochemistry ; Cytochemistry**, [S.L.], v. 50, n. 8, p. 1005-1011, ago. 2002. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/002215540205000802>.

SIKORSKY, Jan A.; PRIMERANO, Donald A.; FENGER, Terry W.; DENVER, James. DNA damage reduces Taq DNA polymerase fidelity and PCR amplification efficiency. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 355, n. 2, p. 431-437, abr. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.01.169>.

SINGH, Hanspal *et al.* A novel approach for extracting DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissue using microwave. **Medical Journal Armed Forces India**, [S.L.], v. 76, n. 3, p. 307-311, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mjafi.2019.02.007>.

SINGH, Veena M. *et al.* Analysis of the effect of various decalcification agents on the quantity and quality of nucleic acid (DNA and RNA) recovered from bone biopsies. **Annals Of Diagnostic Pathology**, [S.L.], v. 17, n. 4, p. 322-326, ago. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2013.02.001>

SOUZA, Augusto Monteiro de. **Análise de polimorfismos Genéticos na região de ilhas CpG do gene SMO em amostras de carcinoma basocelular do Estado da Paraíba**. 2018. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

SRINIVASAN, Mythily *et al.* Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. **The American Journal Of Pathology**, [S.L.], v. 161, n. 6, p. 1961-1971, dez. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64472-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64472-0).

SUN, Weimin *et al.* Nucleic Extraction and Amplification. **Molecular Diagnostics**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 35-47, 2010. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-369428-7.00004-5>.

TAGLIA, Fabiana *et al.* Development of a microwave-based extraction for forensic biological samples. **Forensic Science International: Synergy**, [S.L.], v. 5, 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsisyn.2022.100291>.

TAKAYASU, T. *et al.* Toxicological Analyses of Medications and Chemicals in Formalin-Fixed Tissues and Formalin Solutions: a review. **Journal Of Analytical Toxicology**, [S.L.], v. 37, n. 9, p. 615-621, 14 jul. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jat/bkt055>.

TOLOSA, Erasmo Magalhães Castro de *et al.* **Manual de técnicas para histologia: normal e patológica**. São Paulo: Manole. Acesso em: 02 maio 2024. 2003

TURASHVILI, Gulisa *et al.* Nucleic acid quantity and quality from paraffin blocks: defining optimal fixation, processing and dna/rna extraction techniques. **Experimental And Molecular Pathology**, [S.L.], v. 92, n. 1, p. 33-43, fev. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2011.09.013>.

VITOŁEVIĆ, Katarina *et al.* DNA isolated from formalin-fixed paraffin-embedded healthy tissue after 30 years of storage can be used for forensic studies. **Forensic Science, Medicine And Pathology**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 47-57, 7 nov. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12024-020-00327-z>.

WATSON, James D.; BAKER, Tania A.; BELL, Stephen P.; *et al.* **Biologia Molecular do Gene**. Grupo A, 2015. E-book. ISBN 9788582712092. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582712092/>. Acesso em: 14 mar. 2024.

WEHMAS, Leah C. *et al.* Direct formalin fixation induces widespread transcriptomic effects in archival tissue samples. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-11, 2 set. 2020. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-71521-w>.

YI, Qing-Qing *et al.* Effect of preservation time of formalin-fixed paraffin-embedded tissues on extractable DNA and RNA quantity. **Journal Of International Medical Research**, [S.L.], v. 48, n. 6, p. 1-10, jun. 2020. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0300060520931259>.

ZAHA, Arnaldo; FERREIRA, Henrique B.; PASSAGLIA, Luciane M P. **Biologia molecular básica**. Grupo A, 2014. E-book. ISBN 9788582710586. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582710586/>. Acesso em: 09 mai. 2023.

ZOLEDZIEWSKA, Magdalena *et al.* Comparison of various decalcifiers in preparation of DNA from human rib bones. **Anthropological Review** [S.L.], v. 65, p. 75-80, 30 jun. 2002. Uniwersytet Lodzki (University of Lodz). <http://dx.doi.org/10.18778/1898-6773.65.07>

APÊNDICE A: PROTOCOLO DE DESPARAFINIZAÇÃO PADRONIZADO

1. Derreta a parafina incluída no tecido, remover o tecido do cassete e clivar em pequenos tramanhos
2. Adicione 1000 µL de Xilol aquecido em banho maria a 60°C
3. Coloque tubos no banho maria a 60°C por 15 minutos
4. Agite rapidamente em vórtex e centrifugar a 14.000 rpm por 5 minutos
5. Verta o tubo cuidadosamente
6. Realize os passos de 2 a 5 mais 2 vezes, totalizando 3 lavagens
7. Adicione 1000 µL de álcool absoluto à temperatura ambiente
8. Agite em vórtex por 1 minuto e centrifugue à 14.000 rpm por 5 minutos
9. Despreze o sobrenadante
10. Realize os passos de 7 a 9 mais 2 vezes, totalizando 3 lavagens
11. Adicione 1000 µL de álcool 90° à temperatura ambiente
12. Agite em vórtex e centrifugue a 14.000 rpm por 5 minutos
13. Despreze o sobrenadante
14. Adicione 1000 µL de álcool 80° à temperatura ambiente
15. Agite em vórtex e centrifugue a 14.000 rpm por 5 minutos
16. Despreze o sobrenadante
17. Adicione 1000 µL de álcool 70° à temperatura ambiente
18. Agite em vórtex e centrifugue a 14.000 rpm por 10 minutos
19. Despreze sobrenadante
20. Remova o máximo de álcool residual com pipeta e inverta em papel toalha
21. Adicione 1000 µL de água destilada estéril
22. Agite em vórtex e centrifugue a 14.000 rpm por 10 minutos
23. Despreze o sobrenadante
24. Inverta o tubo em papel toalha até sair o máximo de água e inicie a extração

APÊNDICE B: PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO I PADRONIZADO

1. Adicione 1000 µl de solução tampão de extração
2. Agite em vórtex vigorosamente e centrifugue a 12.000 rpm por 3 minutos
3. Descarte o sobrenadante
4. Adicione 1000 µl de tampão de extração
5. Adicione 100 µl SDS 20%
6. Adicione 20 µl de proteinase K (20 mg/mL)
7. Coloque tubos no banho maria a 56°C por 12 a 24h ou até clarificar amostra
8. Incube a 95°C, durante 10 minutos, para a inativação da proteinase K residual e de proteínas contaminantes.
9. Adicione 500 µl de fenol clorofórmio-álcool isoamílico
10. Agite em vórtex vigorosamente
11. Mantenha os tubos à temperatura ambiente por 15 minutos
12. Centrifugue a 8000 rpm por 15 minutos
13. Recupere a fase aquosa e adicione 500 µl de clorofórmio-álcool isoamílico
14. Centrifugue a 8000 rpm por 15 minutos
15. Recupere a fase aquosa e transfira para novo tubo e repita as etapas 13 a 15 novamente
16. Adicione 100 µl de acetato de sódio 3M à temperatura ambiente
17. Adicione 1000 µl de isopropanol resfriado
18. Misture por inversões suaves e armazene a -20°C por 1 hora ou *overnight*
19. Centrifugue a 15.000 rpm por 5 minutos e despreze o sobrenadante (verter)
20. Adicione 1000 µl de álcool a 70° resfriado
21. Agite em vórtex e centrifugue a 15.000 rpm por 10 minutos
22. Despreze o sobrenadante e evapore o álcool residual invertendo o tubo em papel toalha
23. Ressuspenda o *pellet* em 50 µl de água nuclease *free* e armazene em a -18°C

APÊNDICE C: PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO II PADRONIZADO

1. Adicione 1000 µl de solução tampão de extração
2. Agite em vórtex vigorosamente e centrifugue a 12.000 rpm por 3 minutos
3. Descarte o sobrenadante
4. Adicione 1000 µl de tampão de extração e 100 µl SDS 20%
5. Adicione 20 µl de proteinase K (20 mg/mL)
6. Coloque tubos no banho maria a 56°C por 12 a 24h ou até clarificar amostra
7. Incube a 95°C, durante 10 minutos, para a inativação da proteinase K residual e de proteínas contaminantes.
8. Adicione 500 µl de fenol clorofórmio-álcool isoamílico
9. Agite em vórtex vigorosamente
10. Mantenha os tubos à temperatura ambiente por 15 minutos
11. Centrifugue a 8000 rpm por 15 minutos
12. Recupere a fase aquosa e adicione 500 µl de clorofórmio-álcool isoamílico
14. Centrifugue a 8000 rpm por 15 minutos
15. Recupere a fase aquosa e transfira para novo tubo e repita as etapas 13 a 15 novamente
16. Adicione 100 µl de acetato de sódio 3M à temperatura ambiente
17. Adicione 1000 µl de isopropanol resfriado
18. Misture por inversões suaves e armazene a -20°C por 1 hora ou *overnight*
19. Centrifugue a 15.000 rpm por 5 minutos e despreze o sobrenadante (verter)
20. Adicione 1000 µl de álcool a 70° resfriado
21. Agite em vórtex e centrifugue a 15.000 rpm por 10 minutos
22. Despreze o sobrenadante e evapore o álcool residual invertendo o tubo em papel toalha
23. Ressuspenda o *pellet* em 50 µl de água nuclease *free*
24. Armazene em congelador a -18°C

APÊNDICE D: PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO III PADRONIZADO

- O material desparafinado e clivado foi depositado em um microtubo de 2,0 mL
 1. Adicione 1.200 μ L do tampão de lise feche e vede os tubos com parafilme
 2. Leve os tubos ao micro-ondas, submetendo-os a cinco pulsos de 10 segundos cada, na potência máxima (720W), para fundir a parafina
 3. Centrifugue por 10 minutos a 15.000 rpm, ficando a parafina depositada como um anel nas paredes dos tubos
 4. Transfira o tecido, presente no sobrenadante, para outro tubo limpo
 5. Adicione 200 μ L do tampão de lise e incube os tubos a 42°, durante 24 horas e mais 3 horas a 56°C.
 6. Após a digestão completa do tecido e clarificação da amostra, os tubos devem ser incubados a 95°C, durante 10 minutos
 7. Adicione 200 μ L de solução de acetato de amônio 8M, pH 8,5, a cada tubo
 8. Agite durante 20 segundos por inversão e centrifugue a 15.000 rpm durante 5 minutos, à temperatura ambiente, para a precipitação das proteínas.
 9. Transfira sobrenadante para um tubo limpo e repita as etapas 7 a 9
 10. Adicione 600 μ L de isopropanol gelado
 11. Agite suavemente e incube *overnight* a -20°C.
 12. Centrifugue a 15.000 rpm durante 10 minutos, para precipitação do DNA
 13. Despreze o sobrenadante e inverta os tubos sobre papel-toalha para retirar o líquido residual.
 14. Adicione 600 μ L de etanol a 70% gelado
 15. Centrifugue a 15.000 rpm durante 10 minutos, para purificar o DNA
 16. Inverta os tubos sobre o papel toalha para secar.
 17. Ressuspender o precipitado contendo o DNA purificado em 150 μ L de água DNase *free*, incubando por 30 minutos a 65°C para dissolução completa.
 18. Armazene a -18°C

APÊNDICE E: PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO IV PADRONIZADO

1. Adicione 1.000 μL do tampão de de extração
2. Agite em vórtex e centrifugue a 10.000 rpm (desprezando o sobrenadante ao final)
3. Adicione 500 μL de tampão de extração com 20 μL de proteinase K (20mg/mL) ao tecido previamente macerado e agite os tubos em vórtex
4. Incube à 56 °C por pelo menos 3 horas ou overnight, com adição eventual de 20 μL de proteinase K a cada 24 horas.
5. Após a digestão completa do tecido e clarificação da amostra, os tubos devem ser incubados a 95°C, durante 10 minutos, para a inativação da proteinase K residual e de proteínas contaminantes.
6. Adicione 500 μL de solução de acetato de amônio 8M, pH 8,5, a cada tubo e homogeneize durante 20 segundos por inversão.
7. Centrifugue a 15.000 rpm durante 5 minutos, à temperatura ambiente, para a precipitação das proteínas.
8. Adicione 600 μL de isopropanol gelado ao sobrenadante obtido, agitando suavemente e incubando overnight a -20°C.
9. Após este período, centrifugue os tubos a 15.000 rpm durante 10 minutos, para precipitação do DNA, o sobrenadante deve ser desprezado e os tubos invertidos sobre papel-toalha para retirar o líquido residual.
10. Adicione 600 μL de etanol a 70% gelado e centrifugue os tubos a 15.000 rpm durante 10 minutos e inverta-os sobre o papel-toalha a fim de evaporar o álcool residual.
11. Ressuspenda o precipitado em 150 μl de água nuclease free incubado por 30 minutos a 65°C para dissolução completa do pellet
12. Armazene a -18°C

APÊNDICE F: ANÁLISE QUANTITATIVA DOS PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA AMOSTRAS DE FÍGADO

PROTOCOLO	CÓDIGO	MICRO	260 nm	260/280	ng/μL	mg
<i>PILOTO I</i>	F1	NÃO	48.795	1,15	2439,7	56
<i>PILOTO I</i>	F2	NÃO	37.498	0,64	1874,9	80
<i>PILOTO I</i>	F3	NÃO	34.168	0,55	1708,4	79
<i>PILOTO II</i>	F1	SIM	47.770	1,36	2388,5	51
<i>PILOTO II</i>	F2	SIM	33.169	0,54	1658,4	61
<i>PILOTO II</i>	F3	SIM	41.680	1,73	2084	52
<i>PILOTO III</i>	F1	NÃO	45.517	1,52	2275,8	64
<i>PILOTO III</i>	F2	NÃO	16.161	0,3	808	64
<i>PILOTO III</i>	F3	NÃO	0.627	0,01	31,4	77
<i>PROTOCOLO I</i>	FI	SIM	13.207	1.73	660,4	13
<i>PROTOCOLO I</i>	FII	SIM	16.956	1.74	847,8	16
<i>PROTOCOLO I</i>	FIII	NÃO	33.370	1.74	1668,5	16
<i>PROTOCOLO I</i>	FIV	NÃO	20.258	1.73	1012,9	16
<i>PROTOCOLO II</i>	FI	SIM	36.024	0.56	1801,2	50
<i>PROTOCOLO II</i>	FII	NÃO	27.889	0.00	1394,5	52
<i>PROTOCOLO III</i>	F1	SIM	23.235	1.70	1161,7	119
<i>PROTOCOLO III</i>	F2	NÃO	29.028	1.67	1451,4	171
<i>PROTOCOLO III</i>	FII	NÃO	11.981	1.60	599	140
<i>PROTOCOLO IV</i>	FI	SIM	10.062	1.74	530,11	63
<i>PROTOCOLO IV</i>	FII	NÃO	31.511	1.66	1575,60	64

APÊNDICE G: ANÁLISE QUANTITATIVA DOS PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA AMOSTRAS DE CÉREBRO

PROTOCOLO	CÓDIGO	MICRO	260 nm	260/280	ng/µL	mg
PILOTO I	C1	NÃO	16.352	1,93	817,6	56
PILOTO II	C1	-	-	-	-	-
PILOTO III	C1	NÃO	23.239	1,57	1161,9	70
PROTOCOLO I	CI	SIM	0.062	1.55	3,1	16
PROTOCOLO I	CII	SIM	0.009	1.91	0,4	13
PROTOCOLO I	CIII	NÃO	0.047	1.34	2,3	13
PROTOCOLO I	CIV	NÃO	0.171	1.49	8,6	12
PROTOCOLO II	CI	SIM	10.060	1.27	503	38
PROTOCOLO II	CII	NÃO	8.360	1.34	418	45
PROTOCOLO III	C1	SIM	2.883	1.23	144,1	125
PROTOCOLO III	C2	NÃO	0.270	0.97	13,5	168
PROTOCOLO III	CI	SIM	0.021	1.00	1	55
PROTOCOLO IV	CI	SIM	3.019	1.21	151,00	51
PROTOCOLO IV	CII	NÃO	0.126	1.21	6,30	46

APÊNDICE H: ANÁLISE QUANTITATIVA DOS PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA AMOSTRAS DE BAÇO

PROTOCOLO	CÓDIGO	MICRO-ONDAS	260 nm	260/280	ng/µL	mg	ng/mg	tempo de lise
PROTOCOLO I	B1	NÃO	10.325	1,65	516,2	-	-	36h
PROTOCOLO II	B2	NÃO	14.008	1,75	700,4	-	-	36h
PROTOCOLO III	B3	NÃO	10.325	1,65	516,2	-	-	36h
PROTOCOLO I	BI	SIM	24.900	1,74	1245,0	11	5659,1	36h
PROTOCOLO I	BII	SIM	33.352	1,75	1667,6	12	6948,3	36h
PROTOCOLO I	BIII	NÃO	36.443	1,74	1822,1	12	7592,1	36h
PROTOCOLO I	BIV	NÃO	13.221	1,72	661,1	8	4131,9	36h
PROTOCOLO II	BI	SIM	5.318	0,00	265,9	37	359,3	60h
PROTOCOLO II	BII	NÃO	27.187	0,00	1359,3	27	2517,2	60h
PROTOCOLO III	B1	NÃO	0.918	1,37	45,9	69	33,2	36h
PROTOCOLO III	B2	NÃO	32.841	1,66	1642	70	1172,9	36h
PROTOCOLO III	BI	NÃO	32.431	1,61	1621,6	112	723,9286	36h
PROTOCOLO IV	BI	SIM	20.860	1,63	1043,00	35	1490	36h
PROTOCOLO IV	BII	NÃO	20.582	1,63	1029,10	30	1715,167	36h

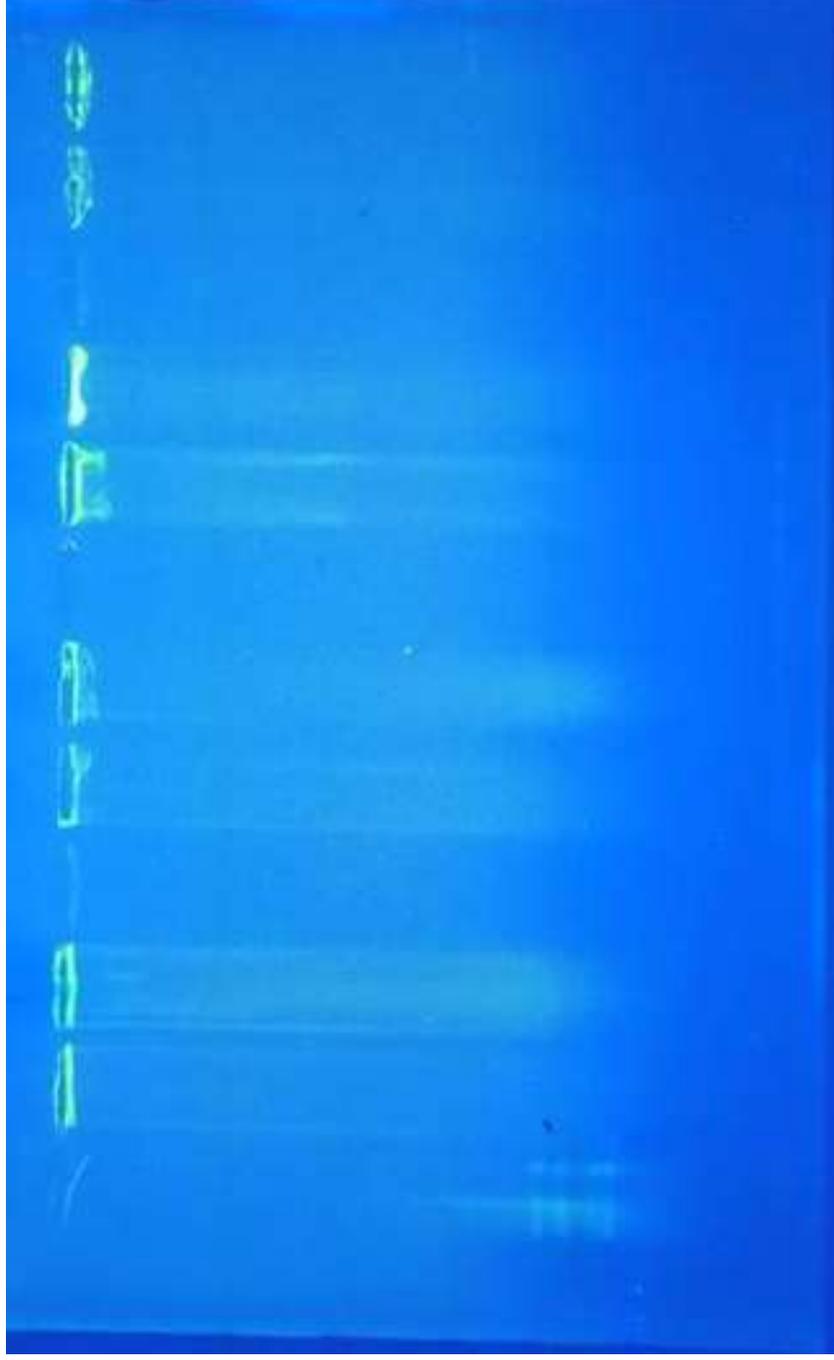
APÊNDICE I: ANÁLISE QUANTITATIVA DOS PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA AMOSTRAS DE RIM

<i>PROTOCOLO</i>	<i>CÓDIGO</i>	<i>MICRO-ONDAS</i>	<i>260 nm</i>	<i>260/280</i>	<i>ng/µL</i>	<i>mg</i>	<i>ng/mg</i>	<i>tempo de lise</i>
<i>PROTOCOLO I</i>	RI	SIM	7.062	1.73	353,1	11	1605,0	18h
<i>PROTOCOLO I</i>	RIII	NÃO	4.306	1.72	215,3	10	1076,5	18h
<i>PROTOCOLO II</i>	RI	SIM	22.405	1.73	112,3	75	74,9	36h
<i>PROTOCOLO II</i>	RII	NÃO	34.981	0.54	1749,1	67	1305,3	36h
<i>PROTOCOLO III</i>	R1	NÃO	6.297	1.53	314,9	154	306,7	36h
<i>PROTOCOLO III</i>	R2	NÃO	3.620	1.29	181	184	147,6	36h
<i>PROTOCOLO III</i>	RI	NÃO	16.391	1.76	819,5	169	727,4	36h
<i>PROTOCOLO III</i>	RII	NÃO	4.973	1.63	248,6	136	274,2	36h
<i>PROTOCOLO IV</i>	RI	SIM	19.838	1.64	991,90	84	1771,3	36h
<i>PROTOCOLO IV</i>	RII	NÃO	35.064	1.79	1753,20	84	3130,7	36h

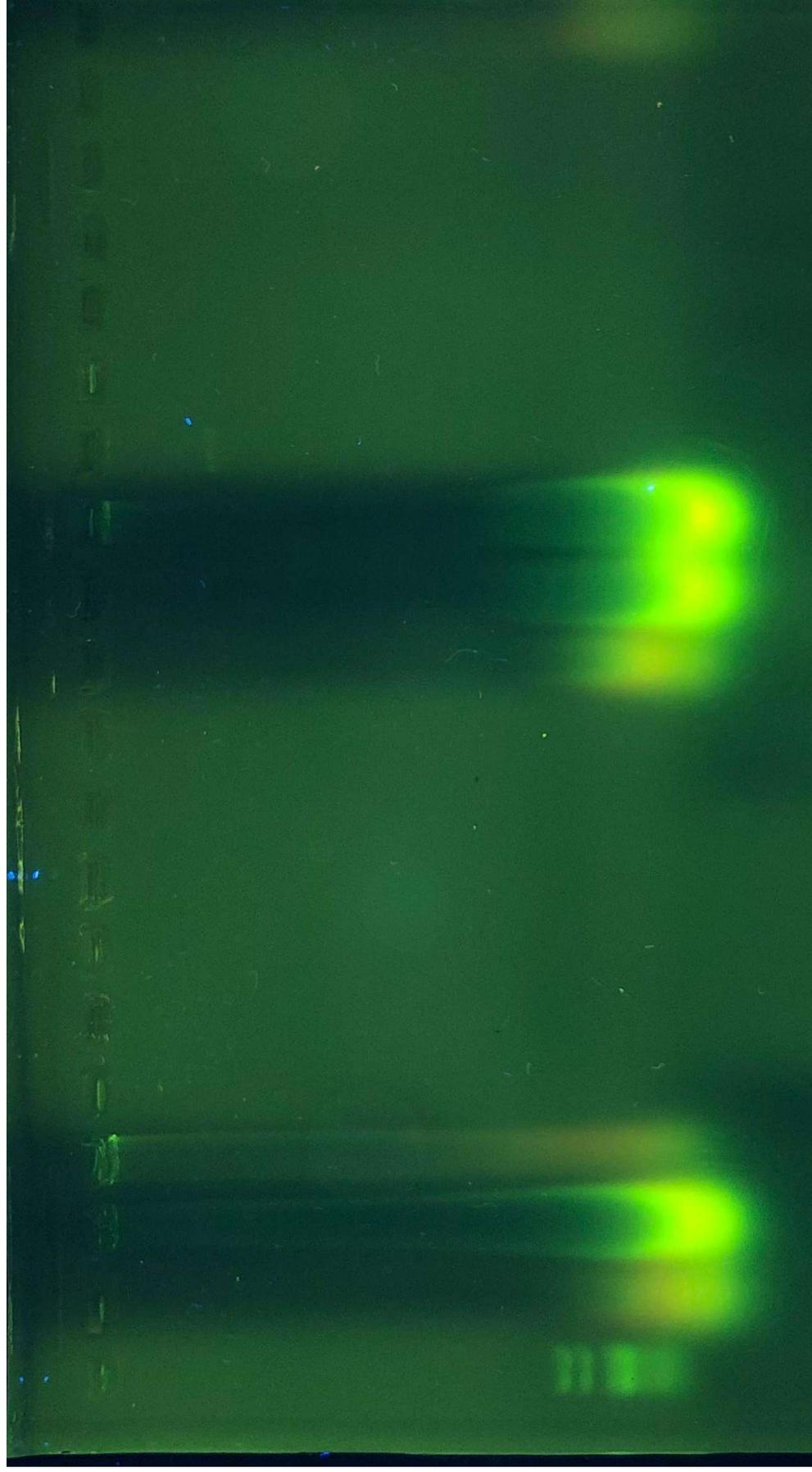
APÊNDICE J: ANÁLISE QUANTITATIVA DOS PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA AMOSTRAS DE MANDÍBULA

PROTOCOLO	CÓDIGO	MICRO-ONDAS	260 nm	260/280	ng/μL	mg	ng/mg	tempo de lise
PILOTO I	M1	NÃO	1.133	1,33	56,6	29	21,8	60h
PILOTO I	M4	NÃO	29.258	2,14	1462,9	47	21,9	60h
PILOTO I	M5	NÃO	30.168	2,12	1508,4	22	10,3	36h
PILOTO I	M6	NÃO	7.383	1,61	369,2	18	11,1	60h
PILOTO II	M1	SIM	6.637	1,69	331,9	33	19,5	60h
PILOTO II	M2	SIM	0.995	1,48	49,8	48	32,4	60h
PILOTO II	M3	SIM	0.850	1,25	42,5	42	33,6	60h
PILOTO II	M5	SIM	5.438	1,52	271,9	19	12,5	60h
PILOTO II	M6	SIM	15.624	1,53	781,2	26	16,9	60h
PILOTO III	M1	NÃO	32.762	2,63	1638,1	24	9,12	24h
PILOTO III	M2	NÃO	30.448	2,47	1522	82	33,1	60h
PILOTO III	M3	NÃO	41.779	2,35	2089	37	15,7	24h
PILOTO III	M4	NÃO	42.222	2,62	2111,1	43	16,4	24h
PILOTO III	M5	NÃO	40.465	2,7	2023,3	15	5,55	24h
PILOTO III	M6	NÃO	37.896	2,71	1894,8	23	8,48	24h
PROTOCOLO I	MI	SIM	0.096	1.50	4,8	13	18,5	36h
PROTOCOLO I	MII	SIM	0.198	1.47	9,9	16	30,9	36h
PROTOCOLO I	MIII	NÃO	0.065	1.44	3,2	13	12,3	36h
PROTOCOLO I	MIV	NÃO	0.079	1.56	4	15	13,3	36h
PROTOCOLO II	MI	SIM	2.055	1.42	102,8	37	138,9	36h
PROTOCOLO II	MII	NÃO	2.878	1.41	143,8	32	224,7	36h
PROTOCOLO III	MI	NÃO	0.263	0.95	13,1	68	28,9	36h
PROTOCOLO III	MII	NÃO	0.018	0.70	0,9	41	3,3	36h
PROTOCOLO IV	MI	SIM	0.114	1.16	5,70	52	16,4	36h
PROTOCOLO IV	MII	NÃO	0.066	1.37	3,30	46	10,8	36h

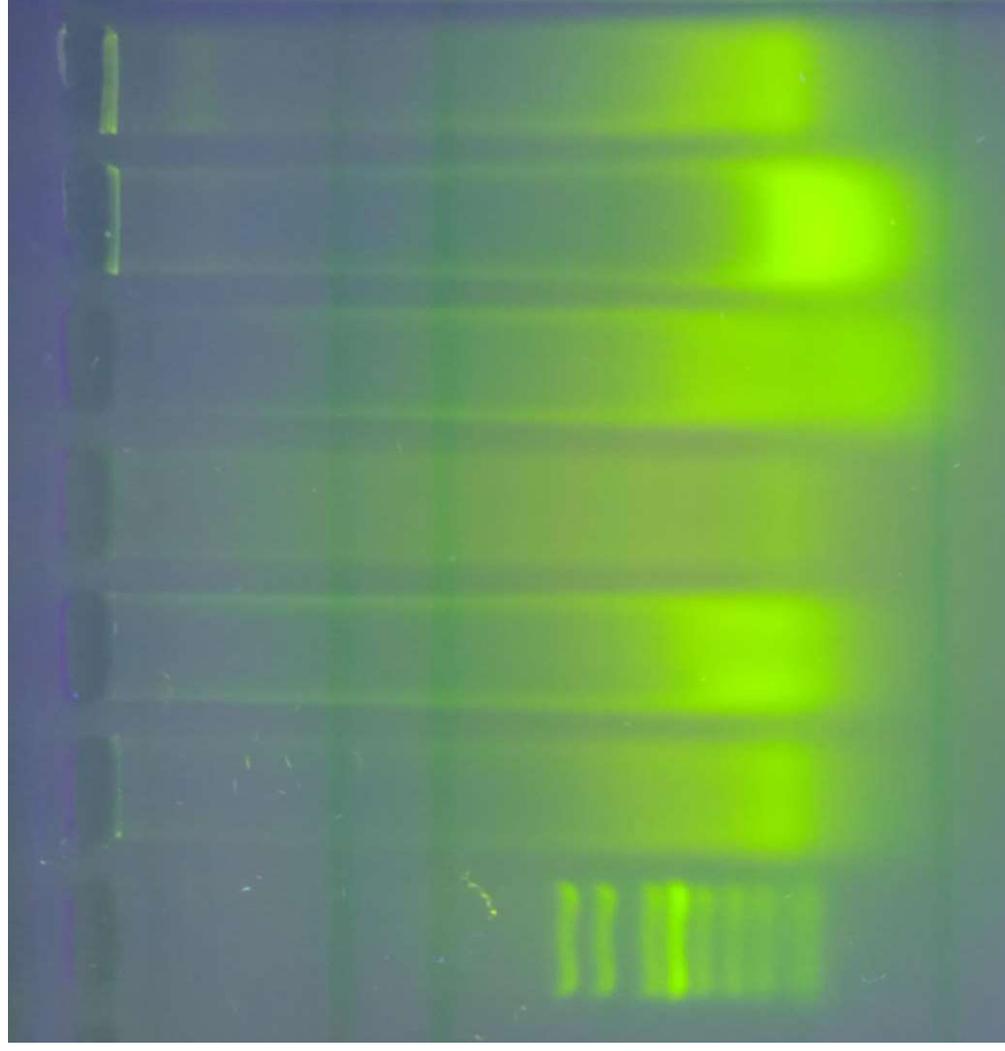
APÊNDICE K: ANÁLISE QUALITATIVA ANTES DA PADRONIZAÇÃO: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 1,0 %



APÊNDICE L: ANÁLISE QUALITATIVA ANTES DA PADRONIZAÇÃO: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 1,5 %



APÊNDICE M: ANÁLISE QUALITATIVA ANTES DA PADRONIZAÇÃO: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 2,0 %



ANEXO A: PROTOCOLO DE DESPARAFINIZAÇÃO DESCRITO POR Kawatta et al. (2010)

1. Realizar 10 cortes histológicos de aproximadamente 3-10 μm e inserir cortes em microtubo de 2 mL
2. Adicionar 1200 μL de Xilol
3. Colocar os tubos 15 minutos à 37°C na estufa
4. Agitar em vórtex por 1 minuto
5. Centrifugar à 14000 rpm por 5 minutos
6. Desprezar sobrenadante
7. Repetir os passos 2 a 6 mais duas vezes, totalizando 3 lavagens
8. Adicionar 1200 μL de álcool absoluto
9. Agitar em vórtex por 1 minuto
10. Centrifugar à 14000 rpm por 5 minutos
11. Remover Álcool com Pipeta
12. Repetir os passos 8 a 11 mais duas vezes, totalizando 3 lavagens
13. Deixar os tubos abertos na estufa à 37°C por 10 minutos

ANEXO B: PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO I DESCRITO POR Pereira *et al.* (2009)

1. Realize a microtomia de 5 secções de 20 µm e realize a desparafinização
2. Após resfriamento, foram adicionados 500µl de solução tampão de extração
3. Adiciona-se 100 µl SDS a 10%
4. Adiciona-se 1 mg/ml de proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, California, USA),
5. Aguardar a digestão a 56°C por 72 horas ou até a clarificação da amostra → Subsequentemente, foi feita a inativação da proteinase K por aquecimento em 95°C por 10 minutos.
6. O DNA foi extraído adicionando-se a esta solução o mesmo volume de solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1).
7. Esta mistura foi agitada em vórtex e centrifugada por 5 minutos a 8.000 rpm
9. A fase aquosa foi recuperada, onde foi adicionado 1000µl de solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) seguido do procedimento anteriormente descrito para recuperação da fase aquosa.
10. Foram acrescentados 100 µl de acetato de sódio 3M
11. Foram acrescentados 1000 µl de isopropanol resfriado
12. Agitar vigorosamente em vórtex e armazenar a -20°C por 24 horas
13. Centrifugar solução por 30 minutos a 12.000 rpm, sob refrigeração.
14. O pellet obtido foi lavado com 500 µl de etanol 70% refrigerado, centrifugado 15 minutos em 15.000 rpm
15. Após evaporação do etanol em temperatura ambiente, o *pellet* foi reconstituído em 50 µl de água ultrapura.

ANEXO C: PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO II DESCRITO POR Souza (2018)

1. Utilizar 5-8 cortes histológicos de 3 micrômetros cada
2. Adicionar cortes a microtubos de 1,7 mL
3. Utilizar método de desparafinização
4. Adicionar a amostra seca 1000 µL de tampão de extração
5. Adicionar 5 µL de proteinase K (10mg/mL)
6. Manter as amostras aquecidas a 55°C por 3 horas
7. Adicionar 1500 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:21)
8. Inverter suavemente por 5 minutos
9. Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos
10. Transferir sobrenadante para outro tubo
11. Adicionar 1500 µL de clorofórmio-álcool isoamílico ao sobrenadante
12. Inverter suavemente por 5 minutos
13. Adicionar 1000 µL de álcool gelado
14. Centrifugar a 10.000 rpm por 5 minutos
15. Desidratar DNA na estufa a 60°C
16. Ressuspender DNA em 500 µL água Milli-Q estéril

ANEXO D: PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO III DESCRITO POR Fernandes *et al.* (2004)

1. 200 µL de tampão de lise foram adicionados aos tubos contendo os espécimes de tecido parafinado.
2. Os tubos foram bem fechados, vedados com parafilme, levados ao forno de micro-ondas e submetidos a cinco pulsos de 10 segundos cada, na potência máxima, para fundir a parafina (700W)
3. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 10 minutos, a 14.290 rpm, ficando a parafina depositada como um anel nas paredes dos tubos.
4. O tecido parcialmente digerido, presente no sobrenadante, foi transferido para outro tubo limpo.
5. Adicionar 200 µL de tampão de lise e os tubos foram incubados em banho-maria, durante 24 horas, a 42°C, e mais 3 horas a 56°C.
6. Após a digestão completa do tecido, os tubos foram incubados a 95°C, durante 10 minutos, para a inativação da proteinase K residual e de proteínas contaminantes.
7. Adicionar 200 µL de solução de acetato de amônio 6M, pH 8,5, a cada tubo
8. Agitar durante 20 segundos por inversão e centrifugar a 14.290 rpm durante 5 minutos, à temperatura ambiente, para a precipitação das proteínas.
9. Transferir sobrenadante para um tubo limpo
10. Adicionar 600 µL de isopropanol gelado, agitar suavemente e incubar durante a noite a -20°C.
11. Centrifugar a 14.290 rpm durante 10 minutos, a 4°C, para precipitação do DNA
12. Desprezar o sobrenadante
13. Inverter os tubos sobre papel-toalha para retirar o líquido residual.
14. Adicionar 600 µL de etanol a 70% gelado
15. Centrifugar a 14.290 rpm durante 10 minutos, a 4°C, para purificar o DNA
16. Inverter os tubos sobre o papel-toalha e deixar abertos por 15 minutos para secar.
17. Ressuspender o precipitado contendo o DNA purificado em 100-200 µL de

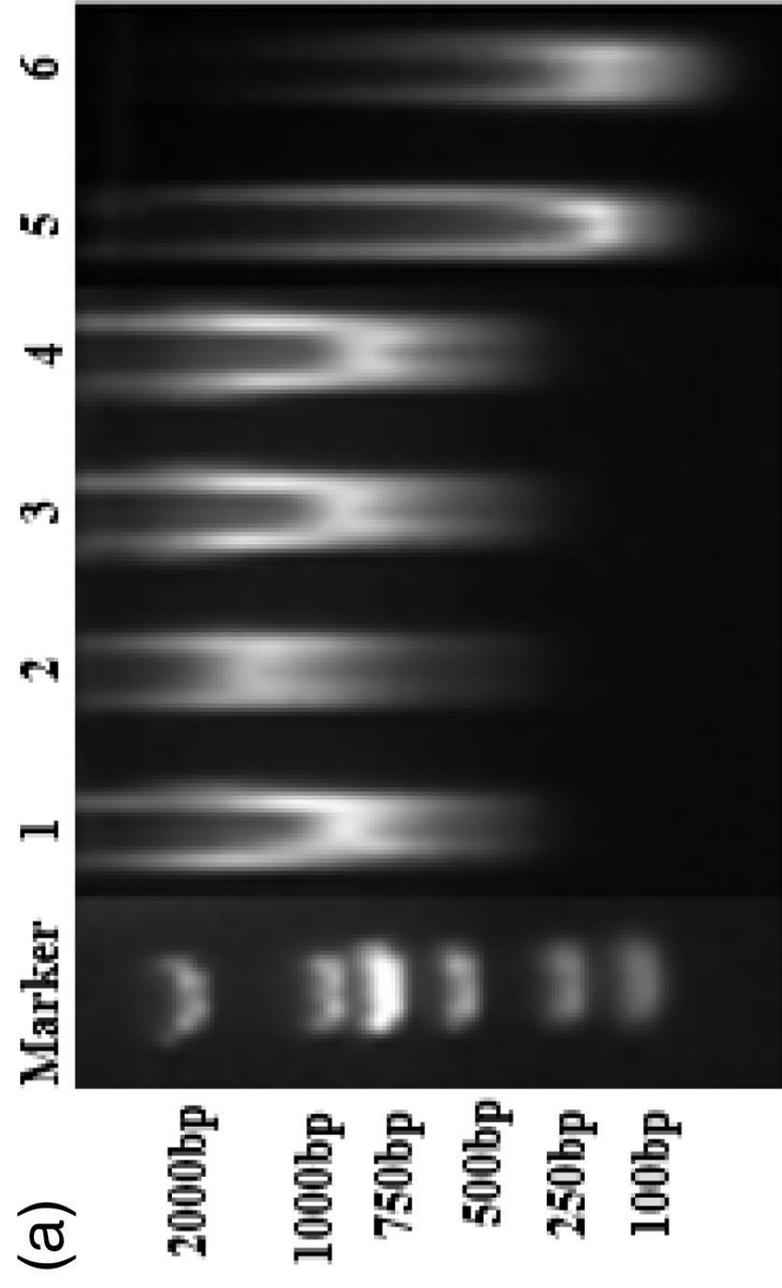
água ultrapura (MilliQ) estéril, incubando por 30 minutos a 65°C para dissolução completa.

18. Armazenar a -20°C.

ANEXO E: PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO IV DESCRITO POR Rivero *et al.* (2006)

1. Após a desparafinização, as amostras foram colocadas em 200–400 μL de tampão de digestão e proteinase K a (0,5mg/mL)
2. A digestão foi realizada por 3–5 dias a 55–60 $^{\circ}\text{C}$, com substituição diária de proteinase K
3. Quando a digestão de proteínas foi considerada adequada, a proteinase K foi inativada por calor a 95 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos
4. Após a inativação da proteinase K, os microtubos receberam 200 μL de solução estoque de acetato de amônio a 4M
5. Os microtubos foram agitados vigorosamente por 20 segundos em alta velocidade, incubados em gelo por 5 minutos
6. Centrifugados a 10.000 rpm por 3 minutos
7. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, e 600 μL de isopropanol foram adicionados.
8. Centrifugados a 12.000 rpm por 5 minutos
9. O pellet de DNA foi lavado em etanol a 70%.
10. Centrifugados a 12.000 rpm por 1 minutos
11. O sobrenadante foi descartado.
12. O DNA foi dissolvido em 30–50 μL de solução TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 e EDTA 1 mM, pH 8) e mantido a 4 $^{\circ}\text{C}$

ANEXO G: PADRÃO DE ELETROFORESE DE DNA DE TECIDOS FFIP (Yi *et al.*, 2020)



ANEXO H: PADRÃO DE ELETROFORESE DE DNA DE TECIDOS FFIP (Kalmar et al., 2000)

