

EXTRAÇÃO DE DNA DE BIÓPSIAS DE PELE FIXADAS EM FORMALINA TAMPONADA E EMBEBIDAS EM PARAFINA E AMPLIFICAÇÃO POR PCR

Ana Carla Pereira^{1*}

Vânia Brito de Souza²

Ida Maria Foschiani Dias-Baptista³

DNA extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies and PCR amplification

RESUMO

Biópsias de pele oriundas dos serviços de diagnóstico da hanseníase podem ser grande fonte de material para estudos retrospectivos em genética humana e do *Mycobacterium leprae*. No entanto, os procedimentos de fixação e inclusão em parafina podem dificultar a obtenção de DNA de qualidade para amplificação por PCR. Assim, estas amostras requerem protocolos especiais para a extração do material genético. O objetivo deste trabalho é apresentar um método alternativo para extração de DNA com base na combinação de calor e digestão enzimática. Para tanto, os cortes foram aquecidos a 120°C em solução tampão de pH 9,0, submetidos à digestão enzimática com proteinase K e o DNA foi extraído por meio de solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. A amplificação por PCR para as regiões dos genes humanos TNF e LTA foi bem sucedida para 85,4% dos espécimes. Considerando o DNA do *M. leprae*, obtivemos amplificação em 67,6%, 48,5%, 36,7% e 64,8% para os marcadores TA18, GTA9, TTC e RLEP, respectivamente. Concluímos que este é um método de baixo custo que proporcionou um rendimento satisfatório de DNA de boa qualidade para emprego em PCR a partir de biópsias parafinadas de pele.

Palavras-chave: epidemiologia molecular; banco de DNA; PCR; dermatologia; hanseníase.

Pereira AC, Souza VB, Dias-Baptista IMF. Extração de DNA de biópsias de pele fixadas em formalina tamponada e embebidas em parafina e amplificação por PCR. Hansen int. 2008; 33 (2): 25-30.

ABSTRACT

Skin biopsies from leprosy diagnostic services can be great sources of material for retrospective studies concerning human and *Mycobacterium leprae* genetic. However, fixation and paraffin embedding procedures make difficult to obtain good quality DNA to PCR amplification. Thus, paraffin-embedded samples require special protocols to DNA extraction. The aim of this paper is to present an alternative method for DNA extraction based on the combination of heat and enzymatic digestion. The sections were heated at 120°C at pH 9.0, submitted to enzymatic digestion with proteinase K and the DNA was extracted by using phenol:chlorophorm:isoamilic alcohol. PCR amplification for regions in TNF and LTA human genes was successful for 85.4 % of specimens. Regarding *M. leprae* DNA, we obtained amplification in 67.6%, 48.5%, 36.7% and 64.8% for the TA18, GTA9, TTC and RLEP markers, respectively. We conclude that this is an inexpensive method which provided a satisfactory yield of a good quality DNA for PCR from paraffin- em-

Recebido em 20/06/2009.

Última correção em 28/07/2009.

Aceito em: 26/08/2009.

1 Doutor em Ciências Farmacêuticas; Equipe de Farmacologia-Bioquímica, Instituto Lauro de Souza Lima; anacarlap@gmail.com

2 Doutor em Genética e Biologia Molecular; Equipe de Imunologia, Instituto Lauro de Souza Lima; vbrito@iisl.br

3 Doutor em Biologia Celular e Molecular; Equipe de Microbiologia, Instituto Lauro de Souza Lima; ifoschiani@gmail.com

* Endereço de correspondência:

Ana Carla Pereira - Inst. Lauro de Souza Lima, Rod. Com. João Ribeiro de Barros, Km 225/226 - CEP 17034-971 - Caixa Postal 3021, Bauru - SP - BR
e-mail: anacarlap@gmail.com - Telefone: 14 31035944 - Fax: 14 31035907

bedded skin biopsies.

Key words: molecular epidemiology; DNA databank; PCR; dermatology; leprosy.

INTRODUÇÃO

Estima-se que apenas 0,1-1% das pessoas expostas ao *Mycobacterium leprae* desenvolvam hanseníase, sendo que fatores ambientais e genéticos - humanos e micobacterianos - são importantes para a interação patógeno-hospedeiro e influenciam decisivamente o aparecimento da doença, bem como a sua forma clínica e evolução. Assim, a investigação do *background* genético dos indivíduos acometidos torna-se uma importante ferramenta para a identificação de marcadores de susceptibilidade da doença e fornece subsídios para o melhor entendimento das bases fisiopatológicas da hanseníase (revisto por Alter et al. 2007) ¹. A persistente prevalência da hanseníase no Brasil torna estes estudos de epidemiologia genética extremamente relevantes para a nossa população.

Não menos relevante é a melhor compreensão da diversidade genética do *M. leprae* que pode ser aplicada para fins diagnósticos, epidemiológicos e para o entendimento da história natural da doença. O monitoramento da estrutura prevalente da população de *M. leprae*, permitirá a geração de uma base de dados robusta, incluindo explicações clínicas, demográficas e informações genotípicas, relações filogenéticas e associações entre tipo de doença e genótipo. Outrossim, a comparação dos genótipos das cepas de *M. leprae* do passado e presente favorece a investigação pormenorizada dos casos com suspeita de recidiva, ou seja, avaliar se ela é decorrente de re-infecção, persistência bacilar ou resistência às drogas.

Nesse contexto, os arquivos de biópsias de centros de referência em hanseníase, são importantes fontes de material para estudos sobre o papel dos fatores relacionados à genética humana e do bacilo na doença.

Cabe, entretanto, considerar que o processo de fixação do tecido com formalina produz efeitos deletérios nas amostras devido às ligações com macromoléculas e fragmentação do material genético que dificultam a sua extração e amplificação por PCR, os quais ocorrem mesmo com o emprego formalina tamponada no processamento do tecido¹. Dessa forma, a quantidade e a integridade do DNA obtido a partir destas biópsias ficam comprometidas, sendo necessária a elaboração de protocolos especiais visando otimização das técnicas de extração¹⁻⁶. Alguns protocolos que se propõem a esta finalidade têm sido descritos, sendo que grande parte destes são obtidos de material parafinado de mucosas e tecidos tumorais^{3,5,7,8}. Na pele, a depender do local da biópsia, o problema descrito acima é agravado, uma vez que este tecido pode apresentar menor densidade de

células e maior quantidade de proteínas, inibindo, por conseguinte a reação de amplificação.

Dentre os protocolos para otimização da extração de DNA de biópsias, Shi et al.³ avaliaram o uso do método de recuperação antigênica por meio de calor em faixa de pH distintos, concluindo que em 120°C e em solução tampão de pH 9,0 o DNA pode ser obtido satisfatoriamente em qualidade e quantidade. Entretanto, estes autores não utilizaram digestão enzimática em seu protocolo, o que no caso da pele poderia ajudar a solucionar o problema supracitado.

Este artigo descreve um protocolo de extração de DNA de material parafinado de arquivo de biópsia de pele com diagnóstico de hanseníase empregando o método de recuperação antigênica, por meio de aquecimento em tampão de Britton and Robinson, associado à digestão enzimática, que foi validado pela amplificação por PCR de regiões genômicas humana e do *M. leprae*.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

A extração de DNA foi feita em 192 biópsias de pele com diagnóstico de hanseníase do arquivo do Serviço de Patologia do Instituto Lauro de Souza Lima. Os espécimes foram obtidos por meio de procedimento usando *punch* de 5mm, e imediatamente submetidas à fixação em formalina tamponada por no mínimo 24 horas. Em seguida estas amostras foram desidratadas em gradiente de etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina, conforme procedimento padrão. O tempo de arquivo destas amostras variou de 1 a 11 anos.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica do Instituto Lauro de Souza Lima.

Método de Extração

O procedimento foi realizado partindo de cinco secções de 20 µm, que foram colocadas em microtubos autoclaváveis contendo 500 µl de tampão de Britton & Robinson (KH₂PO₄, H₃PO₃, ácido cítrico e ácido dietilbarbitúrico a 28,6mM) em pH 9,0 e submetidos à autoclavação em 120°C por 20 minutos, de acordo com o método proposto por Shi *et al.*³. Após resfriamento, foram adicionados 500µl de solução tampão de extração (Tris-HCl 100 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; EDTA 10 mM pH 8,0), 100 µl SDS a 10% e 1 mg/ml de proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), sendo feita a digestão a 56°C por 72 horas ou até a clarificação da amostra. Subseqüentemente, foi feita a inativação da proteinase K por aquecimento em 95°C por 10 minutos.

O DNA foi extraído adicionando-se a esta solução o mesmo volume de solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Esta mistura foi agitada em vortex, centrifugada por 5 minutos a 8.000 rpm e a fase aquosa

recuperada, onde foi adicionado 1 ml de solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) seguido do procedimento anteriormente descrito para recuperação da fase aquosa. Nesta solução foram então acrescentados 100 µl de acetato de sódio 3M e 1 ml de isopropanol resfriado, seguido de agitação vigorosa e armazenamento a -20°C por 24 horas, para otimização da precipitação do DNA. Esta solução foi centrifugada por 30 minutos a 12.000 rpm, sob refrigeração. O pellet obtido foi lavado com 500 µl de etanol 70% refrigerado, centrifugado 15 minutos em 15.000 rpm e, após evaporação do etanol em temperatura ambiente, reconstituído em 50 µl de água ultrapura. A quantificação do DNA destas soluções foi feita por meio de leitura em espectrofotômetro (Ultrospec 2000 Pharmacia Biotech, Cambridge, England) em 260nm e 280 e 320nm para estimar a pureza da solução.

Amplificação do DNA por PCR

As amostras de DNA foram submetidas à amplificação de duas regiões genômicas do cromossomo 6 humano - um fragmento da região promotora do gene TNF (107pb) e um fragmento no gene LTA (246pb) - e das regiões de microssatélite TA18 (100pb), GTA9 (307pb), TTC (201pb) e seqüência repetitiva RLEP (130pb) do *M. leprae* por meio da reação de PCR⁹⁻¹¹. Para amplificação dos genes humanos, as reações de amplificação foram feitas usando 100 ng de DNA genômico, 10 pmol de oligonucleotídeos específicos (seqüências disponíveis mediante solicitação), 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brasil), 0.2 mM de cada dNTP (Invitrogen, Carls-

bad, California, USA) e 1.5 mM de MgCl₂, em um volume final de reação de 25 µl. As reações de amplificação dos microssatélites e RLEP do *M. leprae* foram empreendidas nas biópsias que apresentavam índice baciloscópio (IB) entre 4 e 6+. Todas as reações foram realizadas em termociclador (MJ Research PTC100, Hercules, California, USA) com programa de ciclagem específico para cada PCR (também disponível mediante solicitação). Controles positivos (DNA extraído de leucócitos de sangue total humano por meio da técnica de *salting out* e DNA da cepa referência (Thai-53) e controles negativos (solução de amplificação sem DNA) foram incluídos em todos os lotes de reação. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1.5 % e visualizados em luz ultravioleta em sistema de transiluminador e fotodocumentação (Multidoc-It Digital Imaging System-UVP, Upland, California, USA).

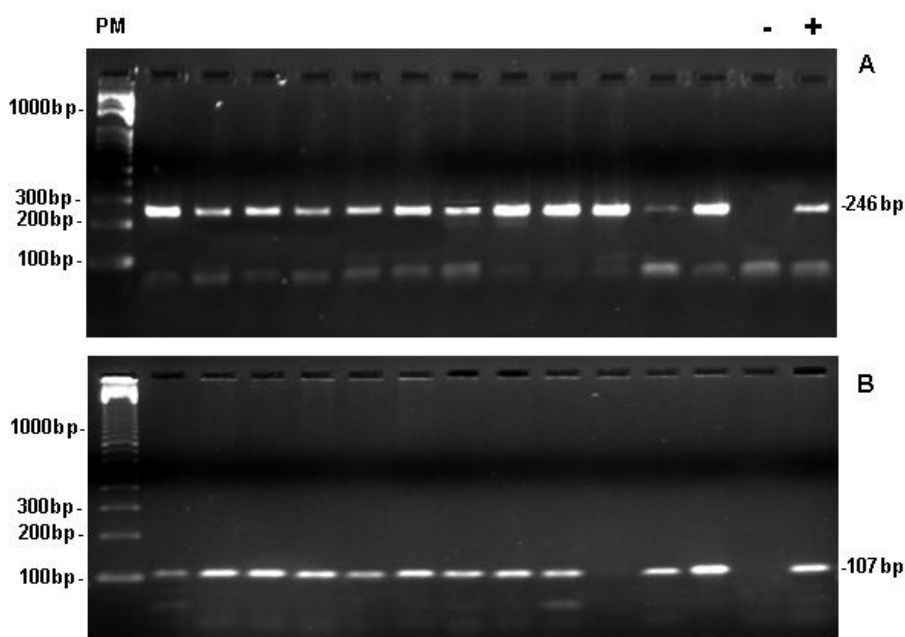
RESULTADOS

A média de rendimento de DNA foi de 21.536 ng (mínimo de 5.000 e máximo de 48.500 ng). A média da razão entre as leituras de absorbância em 260 e 280 nm foi 1,58 (0,82 a 1,97).

A amplificação do DNA para as regiões genômicas do cromossomo 6 humano (genes TNF e LTA) foi positiva em 85,4% das amostras para ambos os sistemas testados (Figura 1). Quanto à pesquisa de marcadores do *M. leprae*, foram avaliados um total de 68 amostras com índice baciloscópio entre 4+ e 6+ sendo a amplificação

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos de PCR. A: fragmento de 246bp do gene LTA. B: fragmento de 107bp do gene TNF. PM: peso molecular, -: controle negativo, +: controle positivo.

Figure 1. Agarose 2% gel electrophoresis of PCR products. A: 246bp product from LTA gene. B: 107bp product from TNF gene. MW: molecular weight, -: negative control, +: positive control.



positiva em 67,6%, 48,5%, 36,7% e 64,8% para os marcadores TA18, GTA9, TTC e RLEP, respectivamente.

DISCUSSÃO

Grande parte dos protocolos já descritos para extração de DNA a partir de material parafinado emprega sistemas de extração comerciais, que encarecem o procedimento e terminam por inviabilizar o uso em larga escala para construção de grandes bancos de DNA a partir de arquivos de serviços de diagnóstico. Assim, este trabalho se dedica à descrição de um protocolo de extração de DNA que combina o método de recuperação antigênica com emprego de calor, conforme descrito por Shi et al.³ e a digestão enzimática com proteinase K.

O emprego de desparafinação com xilol antecedendo o protocolo aqui testado não resultou em melhora do rendimento de DNA. Além disso, estas amostras não se mostraram adequadas para amplificação por meio de PCR, provavelmente devido ao efeito inibidor de resíduos de xilol⁵.

Nesse contexto, o uso do método de recuperação antigênica se mostrou essencial para a obtenção de bons resultados de amplificação, provavelmente devido ao rompimento de ligações com macromoléculas que tornaram o DNA disponível para a reação de amplificação. No entanto, o uso somente de calor, como proposto originalmente por Shi et al.³ não forneceu bons resultados de amplificação, o que pode ser atribuído a presença de resíduos de proteínas, que também podem inibir a amplificação do DNA por meio de PCR. Sendo assim, os melhores resultados de amplificação foram alcançados com a combinação de calor e digestão enzimática.

Não foram observadas diferenças quanto ao rendimento de DNA e sucesso na amplificação de acordo com o tempo de arquivo da biópsia, o que já tem sido relatado por outros autores¹².

Adicionalmente, cuidados especiais relacionados ao protocolo de amplificação devem ser considerados para a obtenção de melhores resultados. O primeiro deles é no desenho dos primers, uma vez que fragmentos menores são mais fáceis de serem amplificados, principalmente quando o DNA se apresenta degradado, o que já tem sido relatado por outros autores^{12,13}. Dessa forma, para o sistema de amplificação do polimorfismo LTA+252, quando utilizamos primers flanqueando uma região de 752pb, estas amostras não apresentaram boa amplificação, o que foi resolvido quando este fragmento foi reduzido para 246pb. Outro aspecto importante é o tempo de anelamento utilizado no programa da reação, que deve ser estendido facilitando a ocorrência da ligação dos primers.

Um ponto a ser ressaltado é a região genômica a ser amplificada, enquanto outros artigos descrevem a amplificação de seqüências repetidas nosso protocolo

avaliou dois fragmentos oriundos de regiões de cópia única no genoma humano o que reforça a eficácia deste método de extração quanto à integridade do DNA recuperado^{5,7}. Quanto à análise de seqüências genômicas do *M. leprae*, quando submetemos amostras com índice bacilosκόpico entre 4+ e 6+ à amplificação de regiões com seqüências repetitivas, observamos que estas apresentaram bons resultados, principalmente para os fragmentos menores que 140pb, como no caso do AT18 e RLEP. Assim, acreditamos que a metodologia aqui proposta é eficiente na recuperação de material genômico do *M. leprae*. Isto é de especial importância para os casos de recidiva, já que torna possível a comparação dos genomas do patógeno identificado na ocasião do primeiro diagnóstico da doença e do episódio de recidiva, o que permite a distinção entre re-infecção e persistência bacilar e auxilia os estudos que objetivam o melhor entendimento deste assunto bastante controverso.

Uma importante limitação do protocolo descrito é a suscetibilidade do DNA à degradação depois de repetidos descongelamentos. Entretanto, não podemos afirmar ser este um problema exclusivo deste protocolo, uma vez que os artigos que apresentam outros protocolos descrevem resultados de amplificação para apenas um sistema de PCR. Assim, este é o primeiro artigo que descreve a utilização repetida das amostras para vários sistemas de amplificação.

Por fim, a principal diferença do protocolo aqui descrito é a combinação do uso de calor em pH alcalino e digestão enzimática, os quais foram avaliados separadamente por Shi et al.³. Os resultados mostram a eficiência do método por alcançar um bom rendimento de DNA, extraído a partir de amostras de tecido com pequena quantidade de célula e grande quantidade de proteína, com boa qualidade para emprego em PCR, podendo ser utilizado para estudos retrospectivos tanto de genética humana quanto do patógeno, a partir de arquivos de serviços de diagnóstico de hanseníase. Cabe ressaltar ainda o baixo custo deste protocolo em comparação a outros que empregam o uso de kits e/ou resinas comerciais.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos a Osmar de Abreu Francisco pelo suporte técnico.

Endereço para correspondência:

Instituto Lauro de Souza Lima
Rodovia Com. João Ribeiro de Barros, Km 225/226
CEP 17034-971, Caixa Postal 3021 - Bauru, São Paulo, Brasil.
e-mail: anacarlap@gmail.com
Telefone: 14 31035944
Fax: 14 31035907

REFERÊNCIAS

- 1 Alter A, Alcaïs A, Abel L, Schurr E. Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. *Hum Genet* 2008 Apr;123(3):227-35.
- 2 Schewe C, Goldmann T, Grosse M, Zink A, Schlüns K, Pahl S, Ulrichs T, Kaufmann SH, Nerlich A, Baretton GB, Dietel M, Vollmer E, Petersen I. Inter-laboratory validation of PCR-based detection of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Virchows Arch* 2005 447(3):573-85.
- 3 Shi SR, Cote RJ, Wu L, Liu C, Datar R, Shi Y, Liu D, Lim H, Taylor CR. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. *J Histochem Cytochem* 2002 50(8):1005-11.
- 4 Coombs NJ, Gough AC, Primrose JN. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Res* 1999 27(16): e12.
- 5 Coura R, Prolla JC, Meurer L, Ashton-Prolla P. An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol* 2005 58:894-5.
- 6 Faulkner SW, Leigh DA. Universal amplification of DNA isolated from small regions of paraffin-embedded, formalin-fixed tissue. *Biotechniques* 1998 24(1):47-50.
- 7 Simonato, Luciana Estevam; Garcia, José Fernando; Nunes, Cárís Maroni; Miyahara, Glauco Issamu. Evaluation of two methods of DNA extraction from paraffin-embedded for PCR amplification. *J Bras Patol Med Lab* 2007 43(2):121-7.
- 8 Mesquita RA, Anzai EK, Oliveira RN, Nunes FD. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. *Pesqui Odontol Bras* 2001 15(4):314-9.
- 9 Santos AR, Suffys PN, Vanderborght PR, Moraes MO, Vieira LM, Cabello PH, Bakker AM, Matos HJ, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Sampaio EP, Sarno EN. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis* 2002 Dec 1;186(11):1687-91.
- 10 Truman R, Fontes AB, De Miranda AB, Suffys P, Gillis T. Genotypic variation and stability of four Variable-Number Tandem Repeats and their suitability for discriminating strains of *Mycobacterium leprae*. *J Clin Microbiol* 2004 Jun; 42(6):2558-65.
- 11 Goulart IM, Cardoso AM, Santos MS, Gonçalves MA, Pereira JE, Goulart LR. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. *Arch Dermatol Res* 2007 299(5-6):267-271.
- 12 Frank TS, Svoboda-Newman SM, Hsi ED. Comparison of methods for extracting DNA from formalin-fixed paraffin sections for nonisotopic PCR. *Diagn Mol Pathol* 1996 5(3):220-4.
- 13 Crisan D, Mattson JC. Retrospective DNA analysis using fixed tissue specimens. *DNA Cell Biol* 1993 12(5):455-64.

