

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE FIXAÇÃO NA ANÁLISE DE DNA *IN VITRO* – REVISÃO

Beatriz Rego^{1,*}, Cláudia Duarte^{1,*}, Inês Canhoto^{1,*}, Ana Marques-Ramos^{1,§}

¹ Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, (ESTeSL), Instituto Politécnico de Lisboa, Av. D. João II, Lote 4.69.01, 1990-096 Lisboa, Portugal.

*Estes autores contribuíram igualmente para este trabalho.

§ Autor correspondente - Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, (ESTeSL), Instituto Politécnico de Lisboa, Av. D. João II, Lote 4.69.01, 1990-096 Lisboa, Portugal, ana.ramos@estesl.ipl.pt.

Introdução

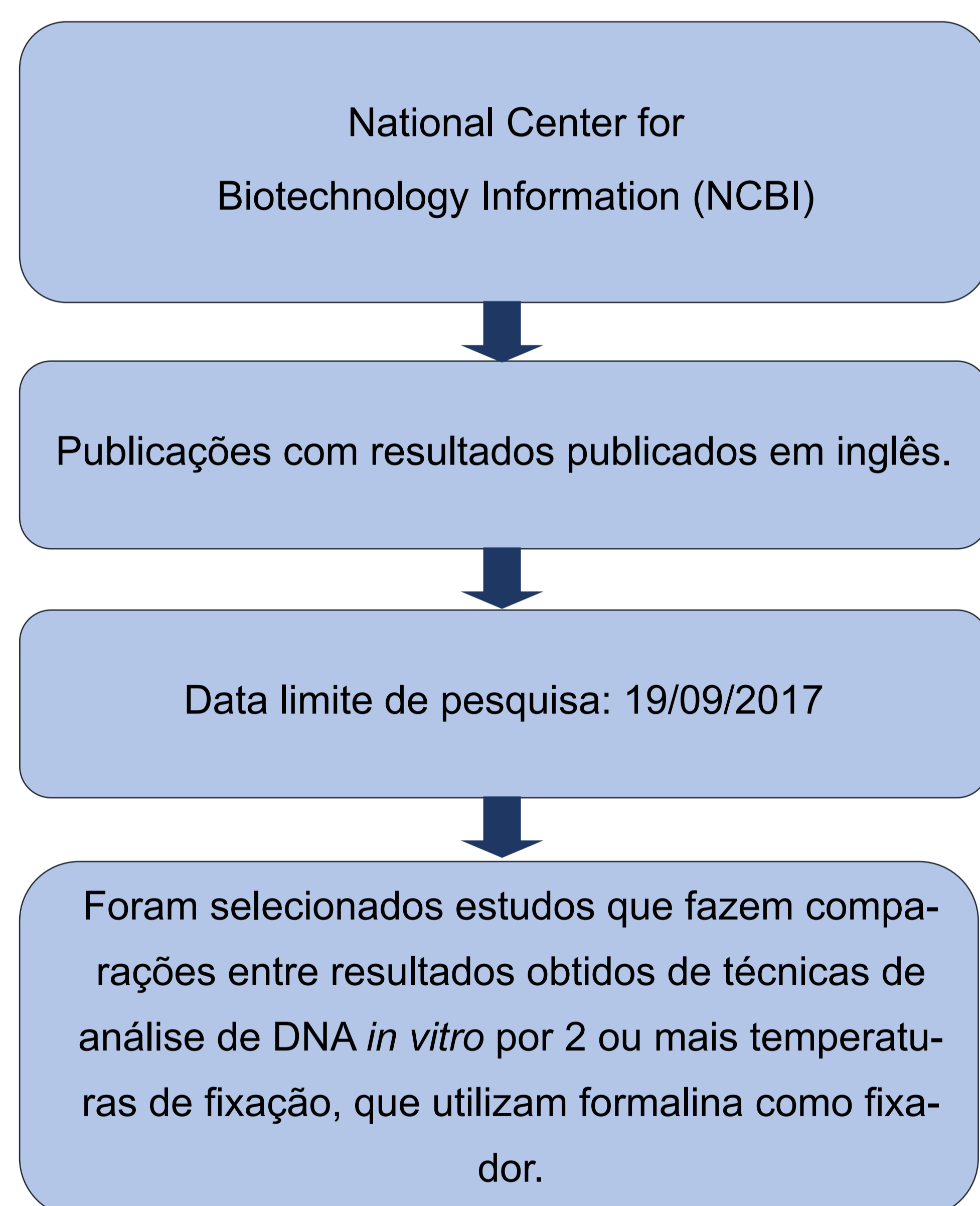
Uma vez que os tecidos fixados em formalina e impregnados em parafina (FFIP) fazem parte da rotina laboratorial em histopatologia, existindo em grande número, estes constituem uma fonte importante de material biológico para estudos moleculares (1). O DNA extraído destes tecidos pode, no entanto, encontrar-se degradado, sendo a fixação uma das etapas em que a degradação poderá ocorrer. Isto irá depender de vários fatores, como o tipo de fixador, o seu pH, tempo e temperatura de fixação (1,2). Uma vez que existe uma crescente necessidade de DNA para a realização de técnicas moleculares, úteis para a caracterização de mutações em tumores e escolha de terapêuticas mais eficazes, vários autores têm testado os efeitos da fixação na qualidade do DNA extraído, nomeadamente da temperatura (1-7).

Nesta revisão, iremos procurar compreender se existe uma temperatura ideal de fixação para tecidos FFIP quando se pretendem realizar técnicas de análise de DNA *in vitro*.

Objetivos

- Sistematizar os estudos existentes sobre a influência da temperatura de fixação no DNA extraído de tecidos fixados em formalina e impregnados em parafina.
- Verificar a existência de um consenso sobre qual a temperatura de fixação ideal para a obtenção de melhores resultados na análise de DNA *in vitro*.

Material e Métodos



Resultados

Tabela 1 - Síntese dos Trabalhos em Análise

Estudo de:	Temperaturas testadas:	Análise de DNA:	Melhor resultado:
L. Atanesyan <i>et al</i> (2017) (1)	4°C; TA	MLPA	TA
Y. Tokuda <i>et al</i> (1990) (3)	4°C; TA	EGA	4°C
M. Koshiba <i>et al</i> (1993) (4)	4°C; TA	EGA	4°C
M. Noguchi <i>et al</i> (1997) (5)	4°C; TA	EGA; PCR	4°C
S. Lassalle <i>et al</i> (2009) (6)	4°C; TA	EGA; PCR	4°C
O'Leary <i>et al</i> (1994) (7)	0-4°C; TA; 37°C	PCR	TA; 37°C

MLPA - *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*
 PCR - *Polymerase Chain Reaction*
 EGA - Eletroforese em Gel de Agarose
 TA - Temperatura Ambiente

Discussão de Resultados

Na maior parte dos estudos, a temperatura de fixação de 4°C foi a que proporcionou melhores resultados, principalmente naqueles trabalhos em que se realizou EGA (3–6), sendo que todos eles utilizaram DNA de elevado peso molecular. Uma revisão de Srinivisan *et al* (2002) sobre os efeitos da fixação na integridade dos ácidos nucleicos indica que a fixação à TA não preserva bem o DNA de elevado peso molecular, e que a fixação a 4°C resulta numa menor degradação dos ácidos nucleicos (2). Noutros trabalhos sobre preservação de DNA de forma global, 4°C é também apontada como a temperatura que induz menor degradação (8), e já foi demonstrado que o aumento de temperatura induz a formação de espécies reativas de oxigénio, que causam lesões no DNA, como quebra das cadeias e hidrólise de ligações (9). Em relação a técnicas de amplificação de DNA não houve um consenso, com metade dos trabalhos apontando 4°C como a melhor temperatura de fixação, e a outra metade indicando a TA, e num dos estudos TA e 37°C em vez de 4°C como as melhores temperaturas de fixação (1,7). Estes trabalhos fizeram a avaliação de fragmentos de DNA mais pequenos, entre os 100 e 1000 pb, pelo que estes resultados permitem levantar a hipótese de que temperaturas mais baixas de fixação podem não ser as mais indicadas para fragmentos destas dimensões, ao contrário do que se verifica com o DNA de elevado peso molecular.

Conclusão

- Com a literatura existente até à data, não é possível indicar inequivocamente uma temperatura de fixação como mais adequada para análise de DNA *in vitro*.
- São necessários mais trabalhos a fazer estas comparações de temperatura de fixação para se definir qual permitirá a obtenção de melhores resultados para análise de DNA *in vitro*.

Referências Bibliográficas

1. Atanesyan L, Steenkamer MJ, Horstman A, Moelans CB, Schouten JP, Savola SP. Optimal fixation conditions and DNA extraction methods for MLPA analysis on FFPE tissue-derived DNA. *Am J Clin Pathol*. 2017;147(1):60–8.
2. Srinivisan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. *Am J Pathol* [Internet]. 2002 Dec [cited 2017 Sep 6];161(6):1961–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12466110>
3. Tokuda Y, Nakamura T, Satonaka K, Maeda S, Doi K, Baba S, et al. Fundamental study on the mechanism of DNA degradation in tissues fixed in formaldehyde. *J Clin Pathol*. 1990;43:748–51.
4. Koshiba M, Ogawa K, Hamazaki S, Sugiyama T, Ogawa O, Kitajima T. The Effect of Formalin Fixation on DNA and the Extraction of High-molecular-weight DNA from Fixed and Embedded Tissues. *Pathol Res Pract* [Internet]. 1993;189(1):66–72. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0344-0338\(11\)80118-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0344-0338(11)80118-4)
5. Noguchi M, Furuya S, Takeuchi T, Hirohashi S. Modified formalin and methanol fixation methods for molecular biological and morphological analyses. *Pathol Int*. 1997;47(10):685–91.
6. Lassalle S, Hofman V, Marius I, Gavric-Tanga V, Brest P, Havet K, et al. Assessment of morphology, antigenicity, and nucleic acid integrity for diagnostic thyroid pathology using formalin substitute fixatives. *Thyroid* [Internet]. 2009;19(11):1239–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19888862>
7. O'Leary JJ, Browne G, Landers RJ, Crowley M, Healy IB, Street JT, et al. The importance of fixation procedures on DNA template and its suitability for solution-phase polymerase chain reaction and PCR in situ hybridization. *Histochem J*. 1994;26(4):337–46.
8. Permenter J, Ishwar A, Rounsavall A, Smith M, Fiske J, Sailey CJ, et al. Quantitative analysis of genomic DNA degradation in whole blood under various storage conditions for molecular diagnostic testing. *Mol Cell Probes* [Internet]. 2015 Dec [cited 2017 Oct 15];29(6):449–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26166695>
9. Bruskov VI, Malakhova L V, Masalimov ZK, Chernikov A V. Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2002 Mar 15 [cited 2017 Oct 15];30(6):1354–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11884633>