



Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial

ISSN: 1676-2444

jbpm1@sbpc.org.br, adagmar.andriolo@gmail.com

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial

Estevam Simonato, Luciana; Garcia, José Fernando; Maroni Nune, Cárís; Issamu Miyahara, Glauco

Avaliação de dois métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação em PCR

Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, vol. 43, núm. 2, abril, 2007, pp. 121-127

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial
Rio de Janeiro, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=393541934008>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Avaliação de dois métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação em PCR

Primeira submissão em 17/07/06
Última submissão em 27/10/06
Aceito para publicação em 18/01/07
Publicado em 20/04/07

Evaluation of two methods of DNA extraction from paraffin-embedded material for PCR amplification

Luciana Estevam Simonato¹, José Fernando Garcia², Cárís Maroni Nunes³, Glauco Issamu Miyahara⁴

unitermos	resumo
DNA	Introdução: Diversos métodos para extração de DNA a partir de tecidos biológicos inclusos em parafina encontram-se descritos na literatura, sendo o sucesso desse procedimento de grande importância para a realização de métodos moleculares de diagnóstico empregando a reação em cadeia da polimerase (PCR). Objetivo: Este estudo avaliou dois métodos de extração de DNA de material parafinado, visando à amplificação do DNA genômico pela técnica da PCR. Material e método: Foram utilizadas 35 amostras de casos de carcinoma epidermóide de assoalho bucal diagnosticados e tratados no Centro de Oncologia Bucal da Universidade Estadual Paulista (Unesp). Os métodos de extração de DNA avaliados incluíram: 1. digestão com proteinase K seguida por purificação com Chelex 100® (BioRad); e 2. sistema QIAamp DNA minikit® (Qiagen). O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria e amplificado pela técnica da PCR, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores para betaglobina. Resultados: A concentração de DNA obtido do material extraído com o primeiro método apresentou média de 120,62 ng/μl com razão entre as leituras das absorbâncias 260/280 variando de 0,8 a 1,41. Para as amostras extraídas com o segundo procedimento, o rendimento médio foi de 67,38 ng/μl, no entanto a razão 260/280 variou entre 1,11 e 2,53. O material foi submetido à PCR e, das 35 amostras extraídas com cada método, respectivamente, 29 e 30 apresentaram sinal positivo. Conclusão: Os dois métodos utilizados para obtenção de DNA de material parafinado apresentaram desempenho semelhante, revelando que ambos têm potencial para auxiliar na prática da biologia molecular diagnóstica, assim como no estudo diagnóstico retrospectivo em material parafinado.
Reação em cadeia da polimerase	
Tecido parafinado	

abstract	key words
Background: There are several methods for DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues reported in the literature. High success rate on this procedure is important for the use of molecular diagnostic methods based on the polymerase chain reaction (PCR). Objective: Two methods of DNA extraction from paraffin-embedded samples were tested aiming at PCR amplification of genomic DNA. Material and method: Thirty-five samples were obtained from patients with squamous cell carcinoma of mouth floor treated at the Oral Oncology Center in Universidade Estadual Paulista. The DNA extraction methods included: 1. proteinase K digestion followed by Chelex 100® (BioRad) purification and 2. QIAamp DNA minikit® system (Qiagen). Purified DNA was quantified by spectrophotometry and a beta-globin gene fragment was amplified using PCR. Results: The DNA concentration from samples applied to the first method presented an average of 120.62 ng/μl and absorbance ratio 260/280 varying between 0.8 and 1.41. From the samples extracted using the second procedure, the mean DNA concentration was 67.38 ng/μl, with absorbance ratio varying between 1.11 and 2.53. DNA samples were submitted to PCR and from 35 samples extracted with both methods, respectively, 29 and 30 were successfully amplified for the beta-globin gene. Conclusion: Both methods used to obtain genomic DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues presented similar performance, revealing their potential to be included in diagnosis of molecular biology, as well as in retrospective studies using archived paraffin-embedded samples.	DNA Polymerase chain reaction Paraffin-embedded tissue

1. Mestranda em Odontologia, área de Estomatologia, Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista (Unesp).
2. Professor-assistente-doutor do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal; responsável pelo Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal da Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária de Araçatuba (Unesp).
3. Professora-assistente-doutora do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária de Araçatuba (Unesp).
4. Professor-assistente-doutor do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (Unesp).
Trabalho realizado no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal da Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária de Araçatuba (Unesp) e no Centro de Oncologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (Unesp).
Apoio financeiro: Fundação para o Desenvolvimento da Unesp (Fundunesp) (00017/05).

Introdução

As técnicas de otimização de extração de DNA para utilização na reação em cadeia pela polimerase (PCR) permitem a investigação diagnóstica em diferentes amostras biológicas, mesmo quando o DNA está presente em pequenas quantidades. Resquícios de saliva, esfregaço bucal, sangue, bulbos capilares, tecidos incluídos em parafina, ossos, gotas de espermatozoides, entre outros, podem fornecer informações importantes, desde que analisados de forma adequada^(1, 4).

Rotineiramente, amostras de tecidos são removidas do corpo humano para análise visando diagnóstico de doenças, sendo os fragmentos desses materiais fixados em formol, incluídos em parafina e armazenados nos laboratórios. Esses espécimes representam importante fonte de material biológico para pesquisa⁽¹¹⁾. O aperfeiçoamento dos métodos de extração de DNA a partir de tecido parafinado, de forma a torná-los de execução simples e de menor custo, facilita enormemente a utilização desses materiais em estudos retrospectivos, trazendo grande contribuição para a investigação da etiologia e a epidemiologia das patologias^(13, 19).

Segundo Kullmann *et al.*⁽¹⁴⁾, Lehmann e Kreipe⁽¹⁵⁾ e Liu *et al.*⁽¹⁶⁾, o fator que tem maior influência no sucesso da amplificação do DNA obtido de material parafinado é o grau de fragmentação do DNA presente. Falhas também podem ser atribuídas ao efeito direto do fixador e ao tempo e/ou temperatura de fixação utilizada no processamento do material.

Existem na literatura vários protocolos para a extração de DNA a partir de material parafinado, sendo sua obtenção de grande importância para a realização de estudos na área da biologia molecular^(7, 17, 18, 20).

Neste trabalho apresentamos os resultados da extração de DNA de 35 amostras de tecido de casos de carcinoma epidermóide de assoalho bucal que haviam sido fixadas em formol a 10% e conservadas em blocos de parafina, empregando-se dois métodos de extração de DNA. Os métodos avaliados incluíram digestão por proteinase K seguida por purificação com Chelex 100® e o sistema QIAamp DNA minikit®.

Material e método

Foram utilizadas 35 amostras de tecido provenientes de casos de carcinoma epidermóide de assoalho bucal, fixados em formol a 10% e embebidos em parafina, diagnosticados e tratados no Centro de Oncologia Bucal (Unidade Auxiliar)

da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (Universidade Estadual Paulista [UNESP]). Após a limpeza dos blocos e a remoção da parafina externa, foram coletados 25 mg de tecido de cada bloco, utilizando-se micrótomo limpo, com navalhas descartáveis. Após o corte, as fatias foram acondicionadas em tubos de 1,5 ml e mantidas à temperatura ambiente até o momento da extração. Os procedimentos laboratoriais foram realizados por um único pesquisador.

Preparo dos cortes

Antes da extração do DNA, os cortes passaram pelo processo de desparafinização, sendo que cada método requereu procedimentos distintos.

Para purificação com Chelex 100® foram adicionados 100 µl de solução Tween 20 a 0,5% nos tubos contendo os cortes. Após homogeneização, os tubos foram aquecidos a 90°C por 10 minutos e resfriados para 55°C utilizando-se o termociclador.

Para purificação com QIAamp DNA minikit® foram adicionados 1.200 µl de xilol, agitando-se por 15 segundos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 14.000 rotações por minuto (rpm) durante cinco minutos. O sobrenadante foi desprezado e 1.200 µl de etanol foram adicionados ao sedimento. Os tubos foram agitados por 15 segundos e centrifugados a 14.000 rpm durante cinco minutos. Esse procedimento foi repetido e, ao final, os tubos com as tampas abertas foram colocados em centrífuga a vácuo a 37°C durante 15 minutos, objetivando a evaporação do etanol remanescente.

Extração com Chelex 100® (BioRad)

O protocolo para extração de DNA com Chelex 100® foi baseado no método descrito por Coombs *et al.*⁽⁹⁾. Em cada tubo foi adicionado 1 µl de proteinase K (20 mg/ml), sendo as amostras incubadas em banho-maria a 55°C, durante três horas, e agitadas gentilmente a cada hora. Após esse período, a cada tubo foram adicionados 100 µl de Chelex 100® a 5% (diluído em solução de Tris 10 mM e EDTA 1 mM), sendo os mesmos aquecidos a 99°C durante 10 minutos e agitados gentilmente após o término do aquecimento. Seguiu-se a centrifugação a 10.600 rpm durante 15 minutos. Os tubos foram novamente aquecidos a 45°C por cinco minutos e, posteriormente, foram adicionados 100 µl de clorofórmio. Realizou-se centrifugação a 10.600 rpm durante 15 minutos, recuperando-se o sobrenadante contendo o DNA em tubos limpos, que foram armazenados a 20°C negativos.

Extração com QIAamp DNA minikit® (Qiagen)

O protocolo para extração de DNA a partir de material parafinado com o sistema comercial QIAamp DNA minikit® foi realizado de acordo com as normas do fabricante.

Em cada tubo foram adicionados 180 µl de Buffer ATL (Tissue Lysis Buffer), além de 20 µl de proteinase K. Após homogeneização, as amostras foram incubadas em banho-maria a 55°C, durante três horas, e agitadas gentilmente a cada hora. Após esse período, adicionaram-se a cada tubo 200 µl de Buffer AL (fornecido pelo fabricante), sendo os mesmos aquecidos a 70°C durante 10 minutos para a inativação da proteinase residual. Em seguida, foram adicionados 200 µl de etanol, agitando-se durante 15 segundos e centrifugando brevemente.

A solução resultante foi transferida para o dispositivo da coluna QIAamp DNA minikit® e centrifugada a 8.000 rpm por um minuto. O dispositivo com a coluna foi removido do tubo e recolocado em um tubo limpo. Foram adicionados 500 µl de Buffer AW1 (Wash Buffer 1) ao dispositivo com a coluna, que foram centrifugados a 8.000 rpm por um minuto. O procedimento de lavagem foi repetido com 500 µl de Buffer AW2 (Wash Buffer 2), seguido de centrifugação a 14.000 rpm durante três minutos.

O DNA extraído da coluna foi eluído pela adição de 100 µl de Buffer AE (fornecido pelo fabricante). Primeiramente foram adicionados 50 µl, aguardando-se um minuto e centrifugando-se a 8.000 rpm durante um minuto. Em seguida, 50 µl de Buffer AE foram adicionados, aguardando-se cinco minutos e centrifugando-se a 8.000 rpm por um minuto, após as amostras terem sido transferidas do dispositivo para tubo de recuperação. As mesmas foram armazenadas a -20°C.

Quantificação e amplificação do DNA

A quantidade e a pureza do DNA genômico foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis). O DNA genômico foi amplificado utilizando-se a PCR com iniciadores para o gene constitutivo da betaglobina (268 pares de bases [pb]). A sequência dos iniciadores utilizados foi descrita por Bell *et al.*⁽²⁾, sendo GH20 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3 e PC04 5'-CAACTTCATCCACGTTACC-3'. A reação foi realizada em um termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc., Watertown, MS, EUA) adicionando-se os seguintes reagentes a um tubo de 0,2 ml: 1U de Taq DNA polimerase

(Invitrogen Life Technologies®, Brasil); 2,5 µl de tampão de PCR 10X (10 mM de Tris-HCl pH 8 e 50 mM de KCl – Invitrogen Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA), 4mM de MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA), 0,25 mM de dNTP (desorribonucleotídeo 5'-trifosfatado – dATP, dCTP, dGTP e dTTP – GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA), 15 pmol de cada oligonucleotídeo (GH20/PC04 – Invitrogen Life Technologies®, Brasil) e 10,9 µl de água ultrapura q.s.p. (Invitrogen Life Technologies™, Carlsbad, CA, EUA). Após a mistura, foram adicionados 5 µl do DNA de cada amostra, totalizando volume final de 25 µl.

Os ciclos de temperatura consistiram de desnaturação inicial a 94°C/10 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C/1 minuto, anelamento a 65°C/1 minuto e extensão a 72°C/2 minutos, seguidos de extensão final a 72°C/7 minutos. O sucesso da amplificação do DNA foi verificado por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado em brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta e documentado com auxílio do sistema Kodak Digital Science 1D.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio do teste t pareado, com nível de significância de 1%.

Resultados

A quantidade e a pureza do DNA genômico obtido por ambas as técnicas avaliadas foram satisfatórias para a realização da PCR. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, tanto na quantidade ($p = 0,0003$) como na pureza ($p < 0,0001$) do DNA obtido.

A concentração de DNA obtido do material extraído com o Chelex 100® apresentou média de 120,62 ng/µl com razão entre as leituras das absorbâncias 260/280 entre 0,8 e 1,41. Para as amostras extraídas com o QIAamp DNA minikit® o rendimento médio foi de 67,38 ng/µl, no entanto a razão entre as leituras 260/280 variou entre 1,11 e 2,53 (**Tabela**).

A amplificação por PCR do gene da betaglobina a partir do DNA genômico obtido pelos dois métodos de extração é apresentada nas **Figuras 1 e 2**. Das 35 amostras processadas para extração do DNA, 29 (82,85%) foram positivas quando submetidas à extração com Chelex 100® e 30 (85,7%) pelo QIAamp DNA minikit®.

Tabela **Quantidade e pureza do DNA genômico obtido com duas técnicas de extração (Chelex 100® e QIAamp DNA minikit®)**

Amostras	ng/ul	260/280	Amostras	ng/ul	260/280
Chelex 01	275,54	1,27	QIAamp 01	88,33	1,89
Chelex 02	42,08	0,94	QIAamp 02	61,83	1,71
Chelex 03	58,42	0,91	QIAamp 03	68,13	1,81
Chelex 04	38,89	1,01	QIAamp 04	45,03	2,02
Chelex 05	103,53	0,95	QIAamp 05	95,22	1,86
Chelex 06	199,40	1,07	QIAamp 06	72,59	2,08
Chelex 07	243,04	1,17	QIAamp 07	33,92	2,26
Chelex 08	147,97	1,13	QIAamp 08	66,56	1,94
Chelex 09	200,20	1,08	QIAamp 09	87,16	1,96
Chelex 10	53,52	0,93	QIAamp 10	59,56	1,85
Chelex 11	156,36	1,07	QIAamp 11	115,89	2,08
Chelex 12	174,07	1,01	QIAamp 12	13,76	2,53
Chelex 13	215,59	1,17	QIAamp 13	118,54	1,92
Chelex 14	236,88	1,26	QIAamp 14	90,96	1,84
Chelex 15	99,31	1,01	QIAamp 15	92,72	1,98
Chelex 16	179,03	1,08	QIAamp 16	35,05	1,78
Chelex 17	52,71	0,92	QIAamp 17	28,06	1,91
Chelex 18	61,17	0,8	QIAamp 18	25,21	2,19
Chelex 19	26,75	0,99	QIAamp 19	13,33	1,92
Chelex 20	57,84	0,96	QIAamp 20	196,34	2,07
Chelex 21	161,57	1,41	QIAamp 21	92,98	1,85
Chelex 22	74,37	1,14	QIAamp 22	7,82	1,42
Chelex 23	94,78	1,23	QIAamp 23	20,25	2,43
Chelex 24	54,93	1,09	QIAamp 24	29,9	2,09
Chelex 25	187,76	1,34	QIAamp 25	66,6	1,9
Chelex 26	109,5	1,24	QIAamp 26	51,37	1,56
Chelex 27	37,55	0,99	QIAamp 27	30,5	1,62
Chelex 28	95,85	1,05	QIAamp 28	204,47	1,93
Chelex 29	119,03	1,13	QIAamp 29	27,16	1,8
Chelex 30	97,09	1,14	QIAamp 30	61,02	2,06
Chelex 31	222,36	1,23	QIAamp 31	70,82	2,05
Chelex 32	85,71	1,18	QIAamp 32	79,81	2,1
Chelex 33	46,54	0,9	QIAamp 33	91,84	1,11
Chelex 34	55,71	0,99	QIAamp 34	43,04	2,4
Chelex 35	156,82	1,28	QIAamp 35	72,47	1,72
Média	120,62			67,38	
Desvio padrão	70,57			44,59	

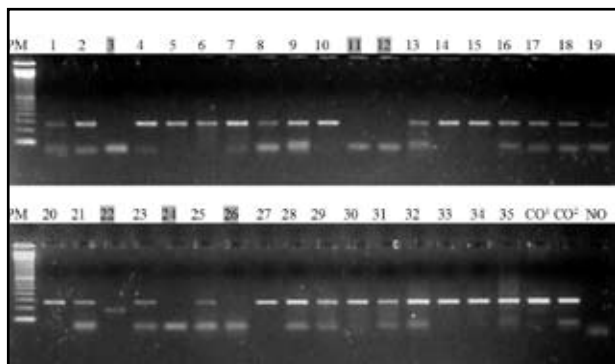


Figura 1 – Fotografia do gel de agarose a 2% com resultado da amplificação do gene da betaglobina (268 pb) em 35 amostras parafinizadas de carcinoma epidermóide de assoalho bucal extraídas com o Chelex 100®. PM = peso molecular de 100 pb; CO¹ = controle (DNA extraído de sangue humano); CO² = controle (DNA extraído de biópsia de condiloma acuminado); NO = controle (sem DNA).

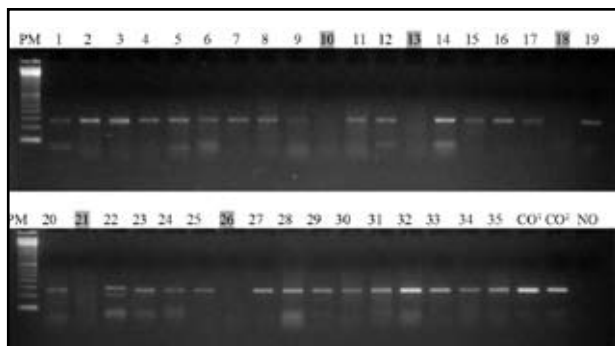


Figura 2 – Fotografia do gel de agarose a 2% com resultado da amplificação do gene da betaglobina (268 pb) em 35 amostras parafinizadas de carcinoma epidermóide de assoalho bucal extraídas com o QIAamp DNA minikit®. PM = peso molecular de 100 pb; CO¹ = controle (DNA extraído de sangue humano); CO² = controle (DNA extraído de biópsia de condiloma acuminado); NO = controle (sem DNA).

Discussão

A fixação de tecidos com formol a 10% é um método prático e eficiente para sua preservação, sendo, portanto, largamente utilizado em anatomia patológica. Contudo esse tipo de fixação resulta no enovelamento de proteínas nucleares, na formação de ligações entre proteínas e DNA e na fragmentação do DNA, o que dificulta a extração dessa classe de moléculas de tecidos fixados⁽¹²⁾. Além disso, vários outros passos podem influenciar a obtenção de amplificações positivas, a começar pela forma de obtenção dos cortes⁽⁷⁾; a desparafinização, que além de poder ser opcional^(8, 17) pode ser realizada através de calor^(3, 5, 8) ou lavagens com solventes, como xilol^(3, 6, 9); o tempo de digestão em proteinase K e a concentração desta no tampão de digestão^(13, 18). No nosso trabalho, todas as amostras utilizadas foram fixadas em formol a 10%, seguindo protocolo de fixação de tecidos em rotina, além de terem sido desparafinadas e digeridas em proteinase K por três horas.

Mesmo assim, a maioria se mostrou positiva para o gene da betaglobina quando amplificada pela PCR.

Segundo Coombs *et al.*⁽⁹⁾, os principais obstáculos à obtenção de DNA de material parafinado para amplificação por PCR são a remoção da parafina e a purificação do DNA. Dessa forma, em nosso estudo verificamos dois métodos de extração de DNA de material parafinado. O primeiro consistiu na purificação com Chelex 100® após desparafinização através de calor e digestão enzimática, enquanto no segundo método a purificação foi feita com QIAamp DNA minikit®, após a remoção da parafina com xilol e a digestão enzimática das proteínas com proteinase K. Ambos os métodos descritos proporcionaram a obtenção do DNA, o que está de acordo com diversos trabalhos descritos na literatura^(9, 10, 12, 17, 20).

O bom desempenho de técnicas de isolamento de ácidos nucleicos a partir de tecidos parafinados em quantidade, pureza e integridade adequadas é uma fase essencial na prática da biologia molecular diagnóstica^(3, 21). As técnicas utilizadas no presente trabalho mostraram que ambos os métodos de extração do DNA genômico utilizados apresentaram desempenho semelhante na obtenção de DNA em condições de ser amplificado por PCR, mesmo havendo diferença estatisticamente significativa na concentração e no grau de pureza das amostras obtidas com os dois métodos.

No nosso estudo obtivemos elevado sucesso na amplificação do DNA extraído com Chelex 100®, já que 82,85% das amostras de DNA obtidas foram amplificadas por PCR, da mesma forma que Coombs *et al.*⁽⁹⁾, De Lamballerie *et al.*⁽¹⁰⁾ e Sepp *et al.*⁽²⁰⁾, que determinaram que o melhor método de extração de DNA de tecidos incluídos em parafina é aquele que utiliza o Chelex 100®, no qual é feita a purificação com resinas quelantes após a desparafinização do material.

Chan *et al.*⁽⁶⁾ avaliaram métodos de extração de material parafinado para amplificação por PCR de DNA humano e viral. Os resultados mostraram que a taxa de amplificação mais alta do gene da betaglobina pela PCR ocorreu nas amostras extraídas pelo método fenol/clorofórmio. Por outro lado, o QIAamp DNA minikit® foi o mais eficiente para o DNA de HPV. No entanto, Bielawski *et al.*⁽³⁾ realizaram um estudo avaliando três métodos de desparafinização e três métodos de purificação de DNA de material parafinado, cujo resultado apresentou-se maior amplificação das amostras extraídas com o QIAamp DNA minikit®, que apresentaram maior grau de pureza, à semelhança do resultado observado no nosso estudo.

Dessa forma, apesar de o segundo método ter se mostrado eficiente, de execução simples e de grande praticidade, apresenta restrição financeira, tendo em vista que o

sistema apresenta elevado custo. Além disso, o método de extração de DNA com desparafinização através do calor e purificação com Chelex 100® não utiliza solvente orgânico, pois durante todo o processo utilizam-se apenas dois tubos plásticos para cada amostra, não sendo necessário transferir o sobrenadante inúmeras vezes como no método com o sistema, dessa forma diminuindo o consumo de reagentes, otimizando os procedimentos e reduzindo a possibilidade de contaminação das amostras.

Conclusão

Os dois métodos utilizados para obtenção de DNA de material parafinado neste estudo apresentaram desem-

penho semelhante em condições locais, revelando que ambos os métodos descritos têm potencial para extrair DNA genômico de boa qualidade. No entanto, o Chelex 100® apresenta custo menos elevado, sendo uma alternativa viável para o uso de rotina.

Agradecimentos

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio na concessão de bolsa de estudo, e à Fundação para o Desenvolvimento da Unesp (Fundunesp), pelo apoio financeiro (processo nº 00017/05).

Referências

1. BAREA, J.A.; PARDINI, M.I.M.C.; GUSHIKEN, T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). *Rev Bras Hematol Hemoter*, v. 26, n. 4, p. 274-81, 2004.
2. BELL, D.A. et al. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*, v. 85, n. 14, p. 1159-64, 1993.
3. BIELAWSKI, K. et al. The suitability of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for double differential polymerase chain reaction analysis. *Int J Mol Med*, v. 8, n. 5, p. 573-8, 2001.
4. BUENO, V. DNA e aperfeiçoamento das técnicas de extração. *Rev Bras Hematol Hemoter*, v. 26, n. 4, p. 233-4, 2004.
5. CAO, W. et al. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. *Cancer Detect Prev*, v. 27, n. 5, p. 397-404, 2003.
6. CHAN, P.K. et al. Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral DNA. *J Clin Pathol*, v. 54, n. 5, p. 401-3, 2001.
7. CHEN, B.; CLEJAN, S. Rapid preparation of tissue DNA from paraffin-embedded blocks and analysis by polymerase chain reaction. *J Histochem Cytochem*, v. 41, n. 5, p. 765-8, 1993.
8. COATS, P.J. et al. Simplified procedures applying the polymerase chain reaction to routinely fixed paraffin-wax sections. *J Clin Pathol*, v. 44, n. 2, p. 115-8, 1991.
9. COOMBS, N.J.; GOUGH, A.C.; PRIMROSE, J.N. Optimization of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Res*, v. 27, n. 16, p. e12, 1999.
10. DE LAMBALLERIE, X. et al. Improved current methods for amplification of DNA from routinely processed liver tissue by PCR. *J Clin Pathol*, v. 47, n. 5, p. 466-7, 1994.
11. FERNANDES, J.V. et al. Comparação de três protocolos de extração de DNA a partir de tecido fixado em formol e incluído em parafina. *J Bras Patol Med Lab*, v. 40, n. 3, p. 141-6, 2004.
12. ISOLA, J. et al. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol*, v. 145, n. 6, p. 1301-8, 1994.
13. JACKSON, D.P. et al. Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol*, v. 43, n. 6, p. 499-504, 1990.
14. KULLMAN, F. et al. A comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissue for microsatellite instability analysis by PCR. *Acta Biotech*, v. 18, n. 1, p. 77-83, 1998.
15. LEHMANN, U.; KREIPE, H. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 409-18, 2001.
16. LIU, L. et al. Rearrangement of the BCL-2 gene in follicular lymphoma. Detection by PCR in both fresh and fixed tissue samples. *Diagn Mol Pathol*, v. 2, n. 4, p. 241-7, 1993.
17. MATIZONKAS, L.F. et al. Extração rápida de DNA para uso no diagnóstico histopatológico e estudos retrospectivos: comparação de quatro métodos. *RPG Rev Pós Grad*, v. 9, n. 2, p. 137-41, 2002.
18. MESQUITA, R.A. et al. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. *Pesqui Odontol Bras*, v. 15, n. 4, p. 314-9, 2001.

19. PINTO, A.P.; VILLA, L.L. A spin cartridge system for DNA extraction from paraffin wax-embedded tissues. *Mol Pathol*, v. 51, n. 1, p. 48-9, 1998.
20. SEPP, R. *et al.* Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. *J Clin Pathol*, v. 47, n. 4, p. 318-23, 1994.
21. WALKER, M.R.; RAPLEY, R. *Guia de rotas na tecnologia do gene*. São Paulo: Atheneu Editora, 1999.

Endereço para correspondência

Glauco Issamu Miyahara
Rua José Bonifácio, 1.193 – Cx Postal 261
CEP 16015-050 – Araçatuba-SP
Tel: (18) 3636-3275/Fax: (18) 3636-3332
e-mail: miyahara@foa.unesp.br ou
lucianasimonato@hotmail.com