



Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial

ISSN: 1676-2444

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

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial

Rodrigues Gouveia, Gisele; Cleusa Ferreira, Suzete; Cerdeira Sabino, Ester; Coelho Siqueira, Sheila Aparecida; Pereira, Juliana
Comparação de três protocolos distintos para extração de RNA de amostras fixadas em formalina e emblocadas em parafina
Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, vol. 47, núm. 6, diciembre, 2011, pp. 649-654
Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial
Rio de Janeiro, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=393541963012>

- 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

Comparação de três protocolos distintos para extração de RNA de amostras fixadas em formalina e emblocadas em parafina

Primeira submissão em 13/03/11
Última submissão em 15/06/11
Aceito para publicação em 16/06/11
Publicado em 20/12/11

Comparison of three different protocols for extracting RNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues

Gisele Rodrigues Gouveia¹; Suzete Cleusa Ferreira²; Ester Cerdeira Sabino³; Sheila Aparecida Coelho Siqueira⁴; Juliana Pereira⁵

unitermos	resumo
Tecidos	<p>Introdução: Tecidos fixados em formalina e emblocados em parafina (FFEP) são importantes fontes de amostras para estudos retrospectivos. Apesar de sua capacidade de preservação de proteínas e morfologia celular, a formalina interfere negativamente em testes de biologia molecular por fragmentar e modificar quimicamente os ácidos nucleicos, particularmente o ácido ribonucleico (RNA). Objetivo: Comparar a eficiência de três diferentes protocolos de extração de RNA para análise de expressão gênica de tecidos FFEP. Material e métodos: Amostras de linfonodo humano FFEP foram submetidas à extração de RNA utilizando-se os kits Ambion e Arcturus Bioscience e o método clássico de Trizol. Após a extração, o RNA foi quantificado e testado quanto à sua capacidade de amplificação pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) utilizando <i>primers</i> do gene endógeno gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (GAPDH). Discussão/conclusão: Todos os protocolos testados produziram quantidades adequadas e suficientes de RNA total, entretanto, somente os protocolos com uso dos kits Ambion e Arcturus produziram RNA capaz de ser amplificado pela PCR.</p>
Formalina	
Parafina	
RNA	
Expressão gênica	

abstract	key words
<p>Introduction: Formalin fixed paraffin embedded (FFPE) tissues are an important sample source for retrospective studies. Despite its ability to preserve proteins and cell morphology, formalin hinders Molecular Biology tests once it fragments and chemically modifies nucleic acids, particularly RNA. Objective: To compare the efficiency of three different RNA extraction protocols for gene expression analysis of FFPE tissues. Material and methods: RNA was extracted from FFPE samples of human lymph by means of Ambion and Arcturus Bioscience kits and the classical Trizol method. After extraction, RNA was quantified and tested for amplification through real time polymerase chain reaction (RT-PCR) using glyceraldehydes-3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) endogenous gene primers. Discussion/conclusion: All the protocols produced sufficient and adequate amounts of total RNA. However, only protocols using Arcturus and Ambion kits generated suitable RNA for PCR amplification.</p>	<p>Tissues Formalin Paraffin RNA Gene expression</p>

1. Especialização em Hematologia; técnica de laboratório; mestranda da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

2. Mestra em Ciências pela FMUSP; bióloga do Departamento de Biologia Molecular da Fundação Pró-Sangue do Hemocentro de São Paulo.

3. Livre-docente da disciplina de Hematologia da FMUSP; chefe do Departamento de Biologia Molecular da Fundação Pró-Sangue do Hemocentro de São Paulo.

4. Doutora em Patologia da USP; médica do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas (HC) da FMUSP.

5. Livre-docente da disciplina de Hematologia da FMUSP; coordenadora de Hematologia do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP); médica assistente do Serviço de Hematologia do Instituto Central (IC) do HC/FMUSP.

Introdução

Tecidos fixados em formalina e emblocados em parafina (FFEP) são importantes fontes de amostras para estudos retrospectivos⁽⁸⁾. Estudos de expressão gênica de células malignas e microambiente tumoral têm contribuído para o entendimento da patogênese e do prognóstico das doenças, assim como para aperfeiçoar a classificação das mesmas^(1, 6).

A fixação em formalina é o método mais utilizado na preservação de tecidos para estudos de anatomia patológica. É custo-efetiva, de fácil manuseio, preserva as características morfológicas celulares adequadamente e tem compatibilidade com os anticorpos utilizados em reações de imuno-histoquímica⁽⁶⁾. Entretanto, a formalina interfere na qualidade e na integridade estrutural e química dos ácidos nucleicos, sobretudo o ácido ribonucleico (RNA)^(3, 8). As condições de tempo, a temperatura e o tipo de fixador influenciam na preservação desses ácidos. Fixações em formalina acima de uma semana induzem ligações cruzadas entre ácidos nucleicos, proteínas e outros componentes teciduais produzindo ácidos nucleicos fragmentados e resistentes à extração^(3, 6).

Usualmente, o RNA mensageiro (RNAm), obtido por extração de amostras FFEP, encontra-se fragmentado em unidades com número de pares de bases inferior a 300⁽⁷⁾. Contudo, Hamatani *et al.* observaram que 80% das amostras de RNA de até 60 pares de bases podem ser amplificadas adequadamente pela reação em cadeia da polimerase (PCR), mesmo com RNA extraído de amostra armazenada por longo tempo⁽⁴⁾.

Em geral, a degradação do RNA se inicia imediatamente após a retirada do material por ação das ribonucleases (RNases) do meio ambiente. Subsequentemente, em virtude da fixação em formalina ocorrem modificações químicas secundárias às ligações cruzadas entre RNA e proteínas. Além disso, grupos monometilol são adicionados ao grupo amino nas bases nitrogenadas, principalmente na adenina, reduzindo a eficiência da amplificação do RNA^(3, 8). A contaminação da amostra também é crítica para a qualidade do RNA. É necessária a higienização do ambiente de trabalho e dos instrumentos utilizados, desde a execução dos cortes dos blocos de parafina até a extração do RNA, os quais não devem conter RNases⁽⁶⁾.

A primeira extração de RNA de amostras FFEP bem sucedida foi descrita por Rupp e Lucker em 1988. No entanto, ainda não há consenso acerca do melhor procedimento de extração de RNA com qualidade suficiente para estudos de biologia molecular⁽⁸⁾. A maioria dos protocolos envolve procedimentos básicos, como obtenção dos cortes com

micrótomo descontaminado e desparafinização com sucessivos banhos de xilol e reidratação com etanol.

A desparafinização incompleta resulta em RNA de baixa qualidade. Entretanto, Lehmann e Kreipe⁽⁶⁾ observaram que a omissão dessa etapa evita a degradação e a contaminação do RNA. A proteinase K é usada para degradar proteínas ligadas aos ácidos nucleicos e a incubação entre 60°C e 70°C remove os grupos metilol que foram adicionados pela formalina. O isolamento do RNA por agente desnaturante impede a ação das RNases e a incubação com desoxirribonuclease (DNAse) é necessária para remover o ácido desoxirribonucleico (DNA) da amostra. Ao final, a purificação do RNA por precipitação com álcool em coluna porosa remove possíveis resíduos e contaminantes⁽⁸⁾.

Objetivo

Comparar a eficiência de três diferentes protocolos de extração de RNA para análise de expressão gênica de amostras fixadas em formalina e emblocadas em parafina.

Material e métodos

Preparo das amostras

Foram utilizadas amostras de linfonodo humano, selecionadas ao acaso, provenientes do arquivo do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP). Todas as amostras foram FFEP, e destas obtiveram-se três cortes de espessura de 10 µm com micrótomo convencional. Os cortes foram colocados em tubos de *ependorf* de 1,5 ml desprovidos de RNases e armazenados em temperatura ambiente (TA) até o momento da extração de RNA.

Extração de RNA

Cada protocolo de extração do RNA foi realizado de acordo com as instruções do fabricante em condições e equipamentos adequados, livres de RNases, conforme **Tabela 1**.

Protocolo 1: kit RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Optimized for FFPE Samples (Ambion, Inc, Austin, Texas, EUA)

Inicialmente, realizou-se a desparafinização das amostras adicionando 1 ml de xilol (Invitrogen, UK), incubando por 5 minutos a 50°C, seguido de centrifugação por 5 minutos em velocidade máxima. Desprezou-se o sobrenadante lavando

Tabela 1 Resumo dos procedimentos dos protocolos

Procedimentos	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3
Desparafinização	1 ml de xilol por 3 minutos a 50°C	Três lavagens com 1 ml de xilol por 3 minutos em TA	Duas lavagens em xilol por 5 minutos a 57°C em TA
Reidratação	Duas lavagens em 1 ml de etanol 100%	NR	Lavagens em 1 ml de etanol 100%, 90% e 75% ou apenas etanol 100%
Digestão com proteinase K	Tampão de digestão + proteinase K do <i>kit</i> por 15 minutos a 50°C e 15 minutos a 80°C	Tampão de digestão contendo proteinase K do <i>kit</i> por 20 horas a 37°C	Tampão de digestão contendo NaCl, Tris, EDTA, SDS 1% e proteinase K por 3 horas a 55°C ou <i>overnight</i> a 45°C com ou sem inativação da proteinase K a 100°C por 7 minutos
Isolamento do RNA	Lavagens sucessivas com tampões contendo etanol e colunas de purificação do <i>kit</i>	Lavagens sucessivas com tampões contendo etanol e colunas do <i>kit</i>	Método do Trizol
Tratamento com DNase	30 minutos em TA	15 minutos a 37°C e 1 minuto a 4°C seguido de inativação com DNase 10 minutos a 70°C e 1 minuto a 4°C	NR
Purificação do RNA	Lavagens com tampões do <i>kit</i> e eluição	NR	NR

TA: temperatura ambiente; NR: etapa não realizada; EDTA: ácido etilenodiaminotetracético; SDS: dodecil sulfato de sódio.

duas vezes com 1 ml de etanol absoluto para reidratação. As proteínas ligadas ao RNA foram degradadas com 200 µl de tampão de digestão e 5 µl de protease, seguido de incubação por 15 minutos a 50°C e 15 minutos a 80°C. A seguir, realizou-se isolamento do RNA com adição de 790 µl de solução tampão contendo etanol absoluto e posterior passagem em coluna de separação. Após a lavagem das reações com os dois tampões do *kit*, realizou-se tratamento com DNase, nova lavagem e eluição do RNA com 60 µl do tampão de eluição do *kit* em TA, de acordo com as instruções do fabricante.

Protocolo 2: kit Paradise® Whole Transcript RT Reagent System (Arcturus Bioscience, Inc, Mountain View, Califórnia, EUA)

Após desparafinização com três lavagens em 1 ml de xilol (Invitrogen, UK) por 3 minutos em TA, a amostra foi incubada com solução tampão de proteinase K por 20 horas a 37°C para digestão das proteínas. Em seguida, o RNA foi isolado por sucessivas lavagens com solução tampão do *kit* contendo etanol e passagem das amostras na coluna de purificação, conforme instruções do fabricante. Depois, as

amostras foram incubadas com soluções tampão contendo DNase a 37°C por 15 minutos e a 4°C por 1 minuto. Posteriormente, a DNase foi inativada incubando-se as amostras por 10 minutos a 70°C e por 1 minuto a 4°C.

Protocolo 3: Método de extração em Trizol (Invitrogen, UK)

Para extração do RNA pelo método do Trizol, testaram-se diferentes possibilidades, conforme Körbler *et al.*⁽⁵⁾. A desparafinização realizou-se lavando a amostra duas vezes com 1 ml de xilol (Invitrogen, UK) ou pela incubação com xilol por 5 minutos a 57°C ou por 15 minutos em TA. As amostras foram centrifugadas por 2 minutos com velocidade máxima entre as incubações.

Durante a reidratação, algumas amostras foram lavadas sucessivamente em etanol 100%, 90% e 75% e centrifugadas por 10 minutos em TA com velocidade máxima, enquanto outras foram lavadas apenas com etanol absoluto. A digestão foi realizada incubando-se as amostras em solução tampão contendo NaCl 10mM, Tris pH 7,6 500 mM, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 20 mM, dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% e proteinase K 500 µg/ml de formas diferentes: na primeira, a amostra foi incubada a 55°C por

3 horas e na segunda a 45°C *overnight* com ou sem inativação da proteinase K pela elevação da temperatura a 100°C por 7 minutos. Ao final, todas as amostras foram submetidas à extração de RNA pelo método de Trizol, conforme descrito previamente por Chomczynski e Sacchi⁽²⁾.

Avaliação da quantidade e da qualidade do RNA extraído

A concentração e a pureza do RNA extraído foram avaliadas no equipamento NanoDrop (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE). Considerou-se adequadas as quantidades de RNA acima de 50 ng/μl com grau de pureza entre 1,7 e 1,9.

Transcrição reversa (cDNA)

Para síntese de cDNA, adicionou-se 2 μl de Randon Primer em 10 μl da amostra do RNA previamente extraído, com posterior aquecimento a 70°C por 10 minutos, seguido de repouso por 5 minutos a 45°C para resfriamento. Adicionou-se 8 μl da solução Mix contendo 4 μl de tampão 5x; 1 μl de DL-ditiotreitol (DTT); 1 μl de desoxirribonucleotídeos fosfatados (DNTP) 10x; 0,5 μl de Super Script; 0,5 μl de inibidor de RNase e 1 μl de água dietilpirocarbonato (DEPC) em cada amostra, incubando-as a 45°C *overnight*. Ao final, as amostras foram homogeneizadas e deixadas por 10 minutos a 70°C com sequencial armazenamento em temperatura de -20°C ou -80°C.

PCR em tempo real (RT-PCR)

A RT-PCR foi realizada com o sistema TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA). Para tanto, foram misturados 12,5 μl de Master Mix 2x; 1,25 μl do *primer* 20x; 10 μl da amostra de cDNA e 1,25 μl de água DEPC. Como controle positivo, utilizou-se o *primer* GAPDH, marcado com sonda VIC-TAMRA (Applied Biosystems, EUA), e como negativo, água DEPC. A amplificação foi realizada no aparelho

iCycler da BioRad, sendo o primeiro ciclo (1x) a 95°C por 10 minutos e o segundo ciclo (45x), a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto. A leitura foi realizada em FAM-490.

Resultados

Os RNAs obtidos pelos três protocolos utilizados apresentaram concentrações e pureza adequadas, de acordo com a **Tabela 2**.

Na RT-PCR, todos os controles utilizados foram negativos e a curva padrão apresentou linha de amplificação adequada. Porém, somente as amostras processadas pelos protocolos 1 (Ambion) e 2 (Arcturus Bioscience) permitiram a amplificação do RNAm do gene endógeno GAPDH; os valores de Cycle Threshold (Ct) médios variaram entre 30 e 31,1 (**Tabela 3 e Figura**).

No protocolo 2, a concentração média das amostras de RNA eluídas em 12 μl (conforme protocolo estabelecido pelo *kit*) foi muito elevada (631,8 ng/μl). Optamos por realizar uma segunda eluição em 50 μl de água DEPC para verificar se o excesso de RNA poderia interferir na amplificação por RT-PCR. O mesmo racional foi utilizado para as amostras extraídas pelo método do Trizol, porém não foram observadas diferenças na amplificação.

Discussão

Neste estudo demonstramos que a extração de RNA de FEEP, utilizando os protocolos 1 e 2, foi eficiente quanto à capacidade de produzir RNA em quantidade e qualidade adequadas para análise de expressão gênica. Por outro lado, o método de Trizol, tradicionalmente utilizado para extração de RNA de amostras frescas, não produziu resultados satisfatórios.

Tabela 2 Concentração e grau de pureza médios das amostras de RNA

Protocolo	Concentração média de RNA (ng/μl)	Grau de pureza médio do RNA (relação 260/280 nM)
1. <i>Kit</i> RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Optimized for FFPE Samples	58,7	1,9
2. <i>Kit</i> Paradise®Whole Transcript RT Reagent System	Eluído em 12 μl: 631,8 Eluído em 50 μl: 202,6	1,9
3. Trizol Reagent	348,05	1,8

Tabela 3 Valores Ct médios da RT-PCR para a expressão do gene GAPDH

Protocolo	Valor Ct médio
1. Kit RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Optimized for FFPE Samples	30
2. Kit Paradise® Whole Transcript RT Reagent System	Eluído em 12 µl: 31,1 Eluído em 50 µl: 30,3
3. Trizol Reagent	Ausência de amplificação

Ct: Cycle Threshold; RT-PCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real; GAPDH: gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase.

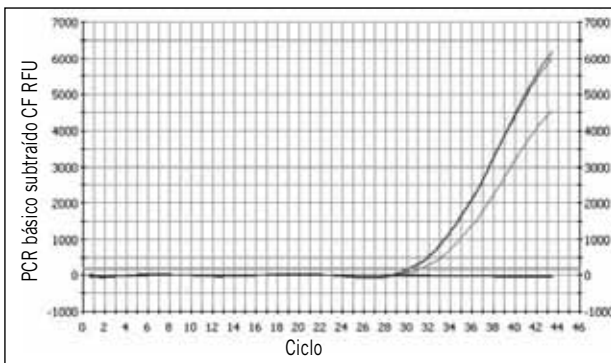


Figura – Curva padrão obtida das amostras amplificadas por RT-PCR para o gene endógeno GAPDH

A curva preta corresponde à amostra obtida pelo protocolo 1; as curvas cinza escuro e cinza claro correspondem às duas amostras obtidas pelo protocolo 2 em diferentes concentrações. As amostras não amplificadas (linha reta) foram obtidas pelo método Trizol.

RT-PCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real; GAPDH: gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase.

Resolvemos descrever nossos resultados em face da escassez da literatura sobre esse assunto (fato que nos levou a gastar cerca de oito meses no processo de padronização da extração de RNA de amostras FFEP). Usualmente, os artigos publicados com enfoque em análise de expressão gênica a partir de amostras de RNA obtidas de material FFEP não são claros em relação à metodologia de extração utilizada. Alguns deles mencionam extração eficaz pelo método de Trizol⁽⁵⁾, entretanto, em nosso estudo, esse método não foi satisfatório, pois não produziu RNA capaz de ser amplificado. Possivelmente, o RNA obtido por esse método estava danificado estruturalmente ou quimicamente ou, ainda, contaminado por substâncias teciduais.

A substituição da formalina por outros fixadores como Bouin, Carnoy, acetona, álcool e *hepes glutamic acid buffer-mediated organic solvent protection effect* (HOPE) seria uma alternativa para a conservação do RNA^(8, 9). Porém, como a formalina é o fixador de escolha da maioria dos centros ao preservar a morfologia e as proteínas celulares, vários grupos têm procurado desenvolver formas de reverter as modificações químicas e estruturais do RNA induzidas por esse fixador^(3, 8).

Hamatani *et al.*⁽⁴⁾ observaram que parte dessas alterações produzidas no RNA poderiam ser revertidas pela incubação da amostra em tampão TE (pH 7) a 70°C por 1 hora. Esse preaquecimento foi utilizado por longo tempo, entretanto os mesmos autores verificaram que o aquecimento das amostras acima de 80°C por 30 minutos promove degradação do RNA. Por outro lado, Li *et al.*⁽⁷⁾ descreveram que a temperatura ideal de incubação para retirar as bandas de proteínas interligadas ao RNA e manter sua integridade era de 70°C por 20 minutos^(4, 7). O pH obtido com tampão citrato entre 3 e 6,5 aumentou a eficiência da amplificação do RNA adquirido de amostras FFEP por RT-PCR, enquanto tampões com pH entre 9 e 10 reduziram a eficiência da amplificação⁽⁴⁾.

Em nosso estudo, utilizamos condições e equipamentos adequados, livres de ribonucleases. De cada amostra foram utilizados três cortes de 10 µm em todos os protocolos, pois essa quantidade mínima de tecido resultou em quantidade de RNA adequado para PCR. Além disso, o protocolo do kit da Ambion preconiza como suficiente para a recuperação de microRNA (miRNA) cortes de espessura de 10 µm. Observamos, ainda, que a eficiência da extração de RNA foi superior quando realizada pouco tempo após a obtenção dos cortes.

A etapa de desparafinização com xilol é sugerida por vários autores e na maioria dos kits específicos para amostras FFEP, pois a retirada incompleta da parafina pode resultar em RNA de qualidade inferior⁽⁸⁾. A incubação das amostras com xilol com aquecimento preconizado nos protocolos 1 e 3 ou em TA nos protocolos 2 e 3 não evidenciaram diferenças quantitativas ou qualitativas significantes no RNA extraído, mas facilitou a formação do *pellet* e o consequente manuseio da amostra.

A etapa de reidratação remove o xilol remanescente da etapa de desparafinização, mas a ausência de reidratação preconizada no protocolo 2 não interferiu na qualidade e na amplificação do RNA extraído por PCR, corroborando o descrito por Körbler *et al.* que não observaram diferenças significantes quanto a realização ou não da etapa de reidratação⁽⁵⁾.

A proteinase K é utilizada em todos os protocolos para remover as proteínas interligadas ao RNA. De acordo com Ribeiro-Silva e Garcia, o calor pode ser um dos responsáveis por reverter parte das alterações químicas induzidas pela formalina⁽⁸⁾.

Apesar de ter produzido grandes quantidades de RNA suficientes, o método do Trizol resultou em RNA com grau de pureza inferior e não foi amplificado. Isso ratifica os resultados de Witchell *et al.*⁽⁹⁾, que também não conseguiram amplificar o RNA extraído pelo método do Trizol obtido de amostras FFEP. Contudo, nossos resultados não confirmaram os dados obtidos por Körbler *et al.*⁽⁵⁾.

O sucesso alcançado com os protocolos 1 e 2 corroboram os resultados de Li *et al.*⁽⁷⁾, os quais observaram que protocolos baseados na digestão com proteinase K, seguidos de tratamento com DNase, purificação em coluna e eluição do RNA, produziram bons resultados em amostras FFEP. Os mesmos autores demonstraram que o papel da proteinase K foi essencial para degradar proteínas

covalentemente ligadas entre si, para a liberação do RNA da matriz celular e para inativar RNases que tendem a ser estáveis.

Conclusão

Os resultados obtidos por meios dos protocolos usando os kits Ambion (protocolo 1) e Arcturus Bioscience (protocolo 2) foram eficientes para obtenção de RNA suficiente e de qualidade adequada para estudos de expressão gênica a partir de amostras FFEP. O método de Trizol não produziu resultados satisfatórios.

Agradecimentos

Agradecemos à empresa Applied Biosystem pela colaboração com o nosso estudo mediante o fornecimento do kit RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Optimized for FFPE Samples (Ambion, Inc, Austin, Texas, EUA).

Referências

1. CHEN, J.; BYRNE JR, G. E.; LOSSOS, I. S. Optimization of RNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded lymphoid tissues. *Diagn Mol Pathol*, v. 16, n. 2, p. 61-72, 2007.
2. CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single step method of RNA isolation by acidic guanidium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. *Anal Biochem*, v. 162, p. 156-9, 1988.
3. DOLESHAL, M. *et al.* Evaluation and validation of RNA extraction methods for MicroRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Journal of Molecular Diagnostics*, v. 10, n. 3, p. 203-11, 2008.
4. HAMATANI, K. *et al.* Improved RT-PCR amplification for molecular analyses with long-term preserved formalin-fixed, paraffin-embedded tissues specimens. *J Histochem Cytochem*, v. 54, n. 7, p. 773-80, 2006.
5. KÖRBLER, T. *et al.* A simple method for RNA isolation from formalin-fixed and paraffin-embedded lymphatic tissues. *Experimental and Molecular Pathology*, v. 74, p. 336-40, 2003.
6. LEHMANN, U.; KREIPE, H. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods*, v. 25, p. 409-18, 2001.
7. LI, J. *et al.* Improved RNA quality and TaqMan®Pre-amplification method (PreAmp) to enhance expression analysis from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) materials. *BMC Biotechnology*, v. 8, p. 1-11, 2008.
8. RIBEIRO-SILVA, A.; GARCIA, S. B. Estudo comparativo de três diferentes procedimentos para extração de RNA a partir de amostras fixadas em parafina e embebidas em parafina. *J Bras Patol Med Lab*, v. 44, n. 2, p. 123-30, 2008.
9. WITCHELL, J. *et al.* RNA isolation and quantitative PCR from HOPE- and formalin-fixed bovine lymph node tissues. *Pathology: research and practice*, v. 204, p. 105-111, 2008.

Endereço para correspondência

Gisele Rodrigues Gouveia
Hospital das Clínicas da FMUSP
Laboratório de Imunopatologia
Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 155/ 1º andar
Cerqueira César
CEP: 05403-000 – São Paulo-SP
e-mail: gisele.gouveia@usp.br