

RELATO DE CASO: EXTRAÇÃO DE DNA DE MATERIAL PARAFINADO EM UM CASO DE CÂNCER DE MAMA

MARINI, M. C.*, BARBOSA, C. A.*, FARIA, R. A.*

* Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica – PPGEB
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – Curitiba – Paraná – Brasil

email: mchmarini@gmail.com

Resumo: A rápida detecção de células neoplásicas através dos diversos exames disponíveis, pode ser, muitas vezes, determinante para a sobrevivência de um paciente. Algumas vezes os hospitais, responsáveis em manter a Cadeia de Custódia das peças biológicas destinadas a exames diagnósticos de doenças como o câncer, possuem amostras com etiquetas trocadas, ou contaminadas, podendo levar a um tratamento desgastante, mutilante e desnecessário. Uma solução científica para a total certificação de que uma amostra não foi trocada é o exame de vínculo genético de verossimilhança entre a amostra e o sangue do paciente. Para isso é necessário desparafinizar a amostra biológica, previamente tratada formando blocos de parafina, e posteriormente seguir os protocolos de extração, quantificação, amplificação e análise de fragmentos desta amostra. É importante salientar que a parafinização muitas vezes inibe a PCR (reação em cadeia da polimerase). Desta forma, é necessário um protocolo para a preparação desta amostra. Este trabalho irá relatar um caso real, onde a paciente foi instruída, por seu médico, a realizar o exame de vínculo genético da amostra de câncer de mama, supostamente retirada de seu corpo e do próprio sangue, por estar em dúvida quanto ao resultado da biópsia e a procedência da amostra.

Palavras-chave: PCR, vínculo genético, DNA, câncer de mama.

Abstract: *The fast detection of neoplastic cells through of several tests available can be often to define about the patient survival. Sometimes hospitals, responsible for keep the Chain of Custody of biological samples used for diagnostic tests in diseases such as cancer, have exchanged labels, or contaminated samples, can lead to an exhausting, mutilating and unnecessary treatment. A scientific solution to complete assurance that a sample was not changed is the examination of genetic linkage likelihood between the sample and the patient's blood. This requires deparaffinization of biological sample, previously treated to form paraffin blocks, and after keep the protocols for extraction, quantitation, amplification and fragment analysis of this sample. Importantly: the paraffinization often inhibits PCR (polymerase chain reaction). Thus, a protocol for preparing this sample are required. This paper will report on a real case, where the*

patient received medical advice to make the genetic linkage of the breast cancer sample, because have doubts about the result of the biopsy and the origin sample.

Keywords: PCR, genetic linkage, DNA, breast cancer.

Introdução

O câncer no Brasil vem atingindo um número cada vez maior de mulheres, numa faixa etária cada vez menor, com taxas de mortalidade cada vez mais elevadas [1].

Para o Brasil, em 2014, são esperados 57.120 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres [2].

As neoplasias são atualmente a segunda causa de morte entre mulheres brasileiras, sendo que, o câncer de mama ocupa o primeiro lugar, seguido do câncer de pulmão, de cólon e reto e de colo uterino [3].

Desta maneira, novas práticas de diagnóstico precoce e o consequente tratamento são de extrema necessidade diante da atual estatística levantada pelas autoridades de saúde [4].

Mesmo existindo, hoje, métodos diagnósticos altamente avançados, ainda o mais recomendado pelos especialistas é o autoexame das mamas, seguido do diagnóstico por imagem, que propicia a detecção precoce do câncer de mama, permitindo a visualização de pequenas lesões ainda em sua fase inicial [5].

Se constatado nos exames físicos ou nos exames de imagem, alterações suspeitas nas mamas, o próximo passo pode ser a realização de uma biópsia.

A biópsia pode ser feita por punção, guiada por imagem ou biópsia cirúrgica quando se faz uma pequena incisão removendo toda a massa de tecido mamário suspeito ou uma amostra representativa, dependendo do seu tamanho e localização [6].

O material é encaminhado ao laboratório para que seja preparada a emblocagem em parafina e a realização das avaliações histológicas da peça, sendo possível determinar a presença de células neoplásicas [7].

A inclusão, ou emblocagem em parafina, consiste na impregnação do tecido a ser preparado, com substância de consistência mais firme e resistente, de modo a permitir que, posteriormente, seja cortada em camadas extremamente delgadas. Este processo se dá com a desidratação do tecido e a substituição deste líquido por

álcool e posteriormente por xilol. O xilol é substituído por parafina fundida e incluída em blocos [8].

Estes blocos são submetidos a cortes em lâminas delgadas e uniformes, com 5 a 7 micrômetros de espessura, em um equipamento de nome micrótomo, para que as células possam ser visualizadas [9].

Este trabalho descreve os procedimentos de desparafinização e posterior genotipagem de uma amostra obtida de uma biópsia, cujo resultado foi, segundo o médico responsável, contraditório ao aspecto clínico do material originalmente removido.

Relato de caso

Uma paciente, jovem, mãe de dois filhos, procurou seu ginecologista com a queixa de um nódulo no seio. O ginecologista pediu uma ecografia mamária. Avaliando as imagens pediu uma nova ecografia e uma mamografia. A partir destes exames, foi sugerida uma biópsia cirúrgica, quando, este mesmo médico, fez a ressecção integral do nódulo. Solicitou uma biópsia, no entanto certificou à paciente que seria um nódulo benigno, frente às suas características clínicas. Assim, o diagnóstico foi carcinoma ductal e lobular.

O ginecologista, agora acompanhado do oncologista, sugeriu nova biópsia, cujo resultado foi o mesmo.

Como a dúvida, neste momento, residia na possibilidade da cadeia de custódia desta amostra ter sido rompida, e esta poderia não pertencer à paciente em questão, foi solicitado que se procedesse ao exame de vínculo genético de verossimilhança, entre a amostra evidenciada e a amostra padrão, respectivamente amostra produto de biópsia e amostra hematológica da paciente. Para isso, foi necessário desparafinizar o bloco onde se encontrava incluído o material biológico da biópsia, fazer a digestão deste material e dar continuidade aos procedimentos de extração de DNA (ácido desoxirribonucleico) da célula, amplificação deste DNA, com prévia quantificação e posterior análise de fragmentos.

Materiais e Métodos

Os métodos utilizados para a preparação de DNA, baseado em amostras previamente fixadas em parafina, são prejudicados quando da amplificação deste DNA por meio da PCR (reação em cadeia da polimerase), devido à baixa quantidade e qualidade do material genético obtido após a desparafinização. Com o processo de desparafinização, o DNA irá se apresentar degradado frente aos solventes e demais métodos utilizados para este fim. Podem ocorrer também, contaminações pelos reagentes utilizados, que poderão atuar como fortes inibidores da polimerase.

O processo de desparafinização e digestão de materiais biológicos emblocados envolvem horas e muitas vezes dias para se chegar a um resultado satisfatório [7]

Desparafinização

Para dar início à extração de DNA da amostra alvo, foi iniciada a desparafinização do bloco, utilizando-se dois tubos idênticos com 200mg de tecido parafinado com 600µL de xileno. Os tubos foram colocados em banho-maria e pré-aquecidos, por 10 minutos, a 65°C, e posteriormente aquecidos por 45 minutos a 67°C. Após a incubação, os tubos ainda quentes, foram centrifugados a 10.000 rpm, por 5 minutos, a uma temperatura de 25°C. Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e ao precipitado foram adicionados 600µL de etanol a 95° GL. Os tubos foram novamente centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos a 25°C. Terminada a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e foi utilizado o precipitado para se proceder à digestão do material biológico [6].

Digestão

Ao precipitado do material biológico obtido, após a desparafinização, adicionou-se 1mL de água destilada mais 200 µL de solução de proteinase K na concentração de 10 mg/mL. O material foi incubado em banho-maria por 3 horas, a 55°C, quando foram adicionados mais 100 µL de solução de proteinase K na concentração de 10 µg/mL, deixando-se os tubos por 9 horas a temperatura de 60°C [6].

Ao final da digestão proteolítica com proteinase K, todo o material foi transferido para tubos novos, com o acréscimo de 400 µL de fenol clorofórmio álcool isoamílico (Merk).

O conteúdo dos tubos foi homogeneizado por 1 minuto e depois centrifugado a 14.000 rpm por 6 minutos à temperatura de 25°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e transferido para um tubo novo e a operação foi repetida por três vezes, até que o sobrenadante estivesse límpido, como descrito na apostila do FBI (*Federal Bureau of Investigation*) [9].

O sobrenadante foi purificado e concentrado através de microconcentradores YM-100 filtros (Millipore) [8].

As amostras, então, foram submetidas ao método de quantificação através do equipamento 7500 Real Time da Applied Biosystem, onde foi obtida uma quantidade de DNA acima de 100ng/µl. O DNA foi diluído na proporção de 1:1000.

Esta amostra, assim diluída, foi submetida à amplificação utilizando-se de conjuntos comerciais Promega, PP16HS®, e seguida de análise em equipamento automatizado de eletroforese capilar e detecção de fluorescência laser induzida em sequenciador ABI 3130 (*Applied Biosystem*).

Resultados

Os resultados obtidos no eletroferograma mostram compatibilidade alelica em todos os locus avaliados, concluindo portanto por INCLUSÃO de VEROSSIMILHANÇA de amostra de sangue da paciente e a amostra da biópsia com um índice de verossimilhança de 11.028.100.585.104.600.000. Tal

resultado indica ser aproximadamente onze quinquilhões de vezes mais provável que os achados genéticos obtidos sejam consequência do fato de amostra de sangue da paciente e a amostra da biopsia possuírem uma origem comum do que serem oriundas de indivíduos aleatoriamente escolhidos da população. Este Índice de Verossimilhança é calculado pela razão entre duas hipóteses mutuamente excludentes, a saber: Hipótese I – o padrão de polimorfismo apresentado pela evidência é decorrente do fato desta ser oriunda da paciente Hipótese II – o padrão de polimorfismo apresentado pela amostra é consequência desta ser oriunda não da paciente e sim de outro indivíduo, não testado e não relacionado ao acusado. Seu resultado indica quantas vezes mais provável é a Hipótese I do que a Hipótese II. Estes dados foram coletados junto ao Laboratório de Genética Molecular Forense – Instituto de Criminalística do Estado do Paraná – 2011.

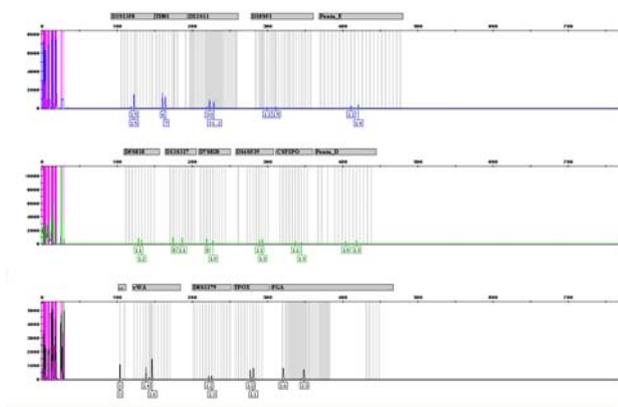


Figura 1 – Eletroferograma obtido da amostra de sangue da paciente, evidenciando os 16 loci analisados pelo Kit PP16HS da Promega, captado de sequenciador 3130® Applied biosystem. Fonte autoria própria.

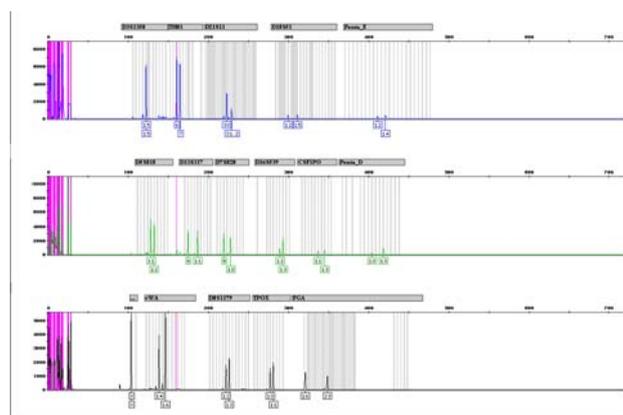


Figura 2– Eletroferograma obtido da amostra do matéria da biopsia, evidenciando os 16 loci analisados pelo Kit PP16HS da Promega, captado de sequenciador 3130® Applied biosystem. Fonte autoria própria.

Discussão

A responsabilidade dos hospitais em manter a cadeia de custódia das peças biológicas destinadas a exames diagnósticos de doenças como o câncer é de extrema importância.

Em ocasiões onde pode ocorrer algum tipo de questionamento por parte dos envolvidos exige-se um rastreamento cuidadoso para a sua confirmação das origens reais das amostras questionadas.

Uma solução científica para a total certificação de que uma amostra não foi trocada é o exame de vínculo genético de verossimilhança entre a amostra e o sangue do paciente. Para tal aplicar protocolos de extração, quantificação, amplificação e análise são primordiais neste caso, salientando que a parafinização muitas vezes inibe a PCR (reação em cadeia da polimerase), é preciso, então, um protocolo para a preparação desta amostra.

Este relato de caso mostra que uma paciente foi instruída por seu médico, a realizar o exame de vínculo genético .

Conclusão

A utilização do exame de vínculo genético, neste caso, comprovou portanto, que não houve a quebra da cadeia de custódia da amostra analisada.

No caso concreto a amostra biológica pertencia a paciente em questão, que foi então, submetida ao tratamento proposto de retirada do quadrante da mama e posteriores seções de quimioterapia.

O presente trabalho mostra viabilidade na implementação de marcadores moleculares em amostras fixadas e emblocadas em parafina e desta forma identifica-las por meio de avaliação de perfil genético.

Agradecimentos

Especiais agradecimentos à Polícia Científica do Estado do Paraná, e à Fundação Araucária pelo fomento financeiro à esta pesquisa.

Referências

- [1] C.F.P., Ferreira, J.M.O. Lima, R.J.C., Oliveira, J.F.P., Rebelo, M.S., Reis, R.S., Santos, M.O. Evolução Temporal da Mortalidade por Câncer no Brasil; Ministério da Saúde - Instituto Nacional e Câncer Coordenação de Prevenção e Vigilância – Divisão de Informação. Disponível: http://www1.inca.gov.br/vigilancia/docs/Epi202008/Evolucao_Temporal_da_Mortalidade_por_cancer_no_Brasil.
- [2] Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva, Estimativa da Incidência de Câncer no Brasil 2014. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/index.asp?ID=1>.

- [3]. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Controle do câncer de mama: documento de consenso. Brasília; 2004. [Citado em 23 jun. 2008]. Disponível:
<http://www.inca.gov.br/publicacoes/ConsensoIntegra.pdf>
- [4] R.C.B. Lotti; A.A. Barra; R.C. Dias; A.S.D. Makluf; Impacto do Tratamento de Câncer de Mama na Qualidade de Vida; Revista Brasileira de Cancerologia 2008, 54 (4): 367-371
- [5] BRASIL; Ministério da Saúde; Mamografia: da Prática ao Controle; Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2007.
- [6] P.C. Bortolon; E. O. S. Melo; J. G. Tomazelli; C. M. Ribeiro; M. Assis; Informativo Quadrimestral do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Disponível:
http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_controle_cancer_mama/deteccao_precoce
- [7] L. L. Timm; Técnicas Rotineiras de Preparo e Análises de Lâminas Histológicas; Centro Universitário La Salle; Museu de Ciências Naturais La Salle; Caderno La Salle XI, Canoas, v.2, nº 1, 231 - 239, 2005.
- [8] M.J. HELLER, et al; An Efficient Method for the Extraction of DNA From Formalin-fixed Paraffin-Embedded Tissue by Sonication. BioTechniques, v.11, n.3, p.372-375. 1991
- [9] C. A. S. V. Costa; J. B. Nóbrega; R. Souto; Extração e Purificação de DNA em Material Biológico Parafinado Estudos, Goiânia, v. 35, n. 1/2, p. 143-152, jan./fev. 2008.
- [10] PCR-BASED TYPING PROTOCOLS FBI LABORATORI; SWGDAM; Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing by Forensic DNA Testing Laboratories Scientific Working Group on DNA Analysis Methods; SWGDAM APPROVED 1/14/10.