

Eficiência de protocolos de extração de DNA de lâminas histológicas arquivadas: Uma abordagem sistemática para aplicações moleculares

Letícia da Costa Martins; Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM); letmartinsvida@gmail.com;

Larissa Trajano Lima; Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus-AM, Brasil;

Mateus de Souza Barros; Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus-AM, Brasil;

Izabela Cabral de Freitas; Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus-AM, Brasil;

Larissa Silva dos Santos; Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus-AM, Brasil;

Glenda Menezes Nogueira; Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus-AM, Brasil;

Fabíola Silva Alves Hanna; Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus-AM, Brasil;

Allyson Guimarães da Costa; Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus-AM, Brasil;

1. Introdução

O uso de lâminas arquivadas tem se mostrado uma alternativa importante para estudos moleculares e de mutações, sobretudo em amostras armazenadas por longos períodos(1). Entretanto, fatores como tempo de armazenamento, idade da amostra e tipo de coloração podem comprometer a qualidade do DNA, resultando em degradação ou limitações na sua aplicação. Nesse cenário, diversos métodos de extração têm sido testados para otimizar a qualidade e o rendimento do material genético, viabilizando análises moleculares e amplificação por PCR. A principal dificuldade na utilização dessas lâminas decorre da degradação associada ao armazenamento prolongado, o que reduz a confiabilidade das análises(2,3). Além disso, falhas na amplificação por PCR podem resultar de contaminantes ou da adoção de métodos de extração pouco eficientes, que geram DNA de baixa qualidade e inviável para estudos subsequentes(4–6).

Diante desse cenário, o objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia de diferentes métodos de extração de DNA em lâminas coradas e não coradas. Adicionalmente, buscou-se comparar os valores de rendimento e o desempenho na amplificação resultante de cada protocolo, com vistas à sua aplicação em estudos retrospectivos e à ampliação das possibilidades de análise molecular em contextos nos quais o acesso a amostras frescas seja limitado(7). Os resultados obtidos possuem relevância prática, uma vez que contribuem para a seleção de protocolos mais adequados ao aproveitamento de lâminas arquivadas, fortalecendo sua utilização em investigações futuras.

2. Material e Métodos

2.1 Estratégia de busca: A busca foi realizada nas bases de dados PubMed, Google Acadêmico utilizando os seguintes descritores combinados: “DNA extraction”, “nucleic acid isolation”, “archived slides”, “histological slides”, “bone marrow”, “peripheral blood” e “DNA extraction protocol”. Não houve restrições de idioma na estratégia de busca, e todos os estudos publicados antes de 31 de Julho de 2025 foram considerados. Nós analisamos os resumos dos estudos encontrados, bem como suas referências para identificar potenciais estudos adicionais.

2.2 Critérios de inclusão e exclusão: Neste estudo, os artigos foram incluídos seguindo os seguintes critérios: a) estudos originais que avaliassem a extração de DNA de lâminas

histológicas da medula óssea e sangue periférico arquivadas b) de pacientes com leucemia, b) e que avaliassem a viabilidade para PCR/NGS. Foram excluídos estudos com base na leitura na íntegra dos artigos, aqueles com tecidos frescos ou não arquivados, que realizaram a extração de RNA e microRNA, que demonstrassem as análises morfológicas das lâminas ou que fossem revisões, cartas, editoriais ou estudos sem dados laboratoriais com nenhuma informação acerca da quantidade da amostra e o processo de extração.

2.3 Avaliação da qualidade dos estudos: Dois revisores (LCM e FSAH) avaliaram independentemente a qualidade metodológica dos estudos incluídos, com foco na extração de DNA a partir de lâminas histológicas arquivadas. A avaliação considerou critérios como: Clareza da descrição do protocolo (0-2), Material utilizado (0-2), Quantidade de lâminas (0,2), Tempo de armazenamento (0-2), Rendimento de DNA (0,2), Técnica de amplificação (0-2) e Taxa de sucesso de amplificação (0-2). A escala, com pontuação variando de 0 a 15, foi baseada em parâmetros epidemiológicos tradicionais e em aspectos relevantes para o estudo. A qualidade dos estudos foi classificada conforme a pontuação obtida, variando de baixa (pior qualidade) a alta (melhor qualidade).

2.4 Análise descritiva: Para a análise descritiva, os dados extraídos dos estudos incluídos foram organizados e tabulados em planilhas do Microsoft Excel®, permitindo a sistematização das informações e a visualização clara das variáveis analisadas. Foram utilizados valores absolutos e percentuais para caracterizar os estudos quanto ao tipo de material biológico utilizado (sangue periférico, medula óssea ou ambos), protocolos de extração aplicados, tempo de arquivamento das lâminas, rendimento de DNA obtido e taxa de sucesso na amplificação por PCR ou NGS. As variáveis categóricas foram representadas por gráficos de pizza e barras, facilitando a interpretação da frequência relativa dos principais métodos e características técnicas observadas nos estudos revisados.

3. Resultados e Discussão

Como observado na **Figura 1**, foram inicialmente identificados 24 artigos por meio das buscas em bases de dados, sem inclusão de outras fontes adicionais. Após a leitura de títulos e resumos, 6 artigos foram considerados inelegíveis, sendo três por tratarem de extração de RNA, dois por se referirem à extração/avaliação de microRNA e um por análise morfológica. Dessa forma, 18 artigos seguiram para avaliação do texto completo. Na etapa seguinte, 1 artigo foi excluído por não apresentar dados laboratoriais, restando 17 artigos elegíveis, que foram incluídos no resumo integrativo final da revisão sistemática.

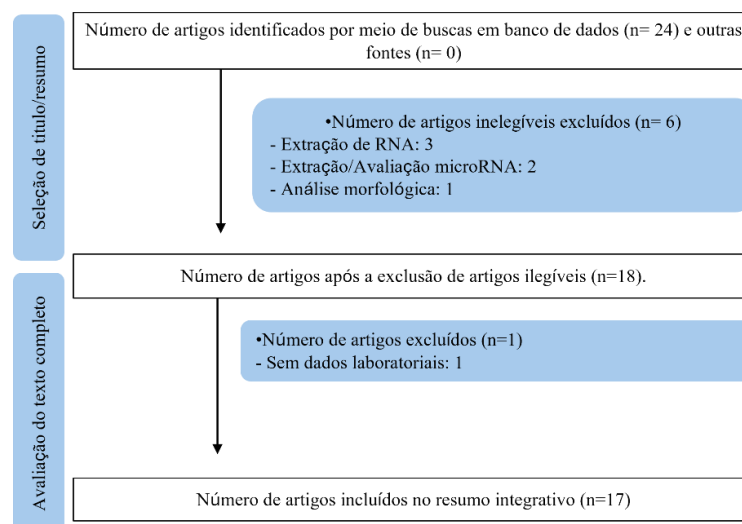


Figura 1. Fluxograma de seleção dos estudos.

A **Tabela 1** apresenta os principais estudos que utilizaram lâminas arquivadas para extração de DNA, abrangendo diferentes materiais, tempos de armazenamento, protocolos empregados e taxas de sucesso na amplificação.

Tabela 1. Características dos artigos incluídos no estudo.

Autor	Ano	Local	Material	Quantidade de lâminas	Protocolos	Tempo de Armazenamento	Rendimento	PCR/NGS	Taxa de Sucesso na Amplificação (em %)	Score
Frey	1987	Inglaterra	MO	17	Fenol-Clorofórmio	10 a 15 anos	16µg	N/D	N/D	8
Asada	1991	Japão	MO e SP	N/D	Fenol-Clorofórmio	<5 anos	N/D	PCR/NGS	100%	7
Melô	1992	Brasil	MO e SP	N/D	Métodos modificados	<5 anos	N/D	PCR	100%	6
Brisco	1994	Austrália	MO	N/D	N/D	N/D	0,03 µg	PCR	N/D	4
Boyle	1998	USA	MO	17	Métodos modificados+ Fenol-Clorofórmio+ Kits Comerciais	N/D	N/D	PCR	N/D	8
Vince	1998	Eslovênia	MO	120	Métodos Modificados+ Kits Comerciais	5 a 10 anos	N/D	PCR	100%	12
Davies	2000	Estados Unidos	MO	N/D	Fenol-Clorofórmio	N/D	N/D	PCR	100%	7
Aplenc	2002	Estados Unidos	MO	80	Kits Comerciais	>20 anos	N/D	PCR	N/D	8
Mori	2003	Japão	MO	N/D	N/A	N/D	N/D	PCR	N/D	2
Tsukamoto	2003	Japão	MO	N/D	Fenol-Clorofórmio	10 a 15 anos	20µg	PCR/NGS	N/D	9
Xiao	2004	USA	MO	N/D	Fenol-Clorofórmio	N/D	N/D	PCR	N/D	5
Zanssen	2004	Alemanha	MO	N/D	Fenol-Clorofórmio+ Métodos Modificados	<5 anos	N/D	PCR	80%	9
Wong	2012	Austrália	MO	N/D	Fenol-Clorofórmio	N/D	N/D	PCR	N/D	5
Takamatsu	2013	Japão	MO	50	Kits Comerciais	5 a 10 anos	2,3 µg	PCR	70%	14
Nadimi	2016	Irã	MO	145	Kits Comerciais	10 a 15 anos	N/D	PCR-RFLP	100%	12
Naseem	2020	Índia	MO e SP	N/D	Kits Comerciais	N/A	6 µg	ARMS-PCR	100%	9
Gari	2019	Arábia Saudita	MO	105	Kits Comerciais	10 a 15 anos	0,601 µg	PCR	81,50%	14

Legenda: N/D: não descrito; MO: medula óssea; SP: sangue periférico; µg/: microgramas por microlitro.

Observa-se que a maioria dos trabalhos foi realizada com medula óssea (MO), havendo menor número de estudos com sangue periférico (SP). Embora ambas as fontes contenham material genético viável, a MO costuma apresentar maior concentração celular e melhor preservação nuclear, favorecendo o rendimento da extração. Por outro lado, o SP, apesar de ser de coleta menos invasiva e mais acessível, pode oferecer quantidades reduzidas de DNA e maior suscetibilidade a degradação ao longo do tempo. Essa diferença sugere que o desempenho dos protocolos de extração pode variar de acordo com o material, sendo importante considerar o tipo de lâmina disponível ao planejar análises retrospectivas(7–9). O tempo de armazenamento variou consideravelmente, desde menos de 5 anos(7,8) até mais de 20 anos(10).

Em relação aos protocolos, os métodos clássicos de fenol-clorofórmio foram amplamente utilizados nos estudos mais antigos(2,11,12), enquanto os kits comerciais e métodos modificados passaram a ser empregados em trabalhos mais recentes(3,5,6,9,13). Essa transição metodológica reflete a busca por técnicas que garantam maior rendimento e reprodutibilidade. O uso de fenol-clorofórmio, apesar de apresentar como vantagem a alta pureza do DNA obtido e o baixo custo, traz desvantagens importantes, como o uso de reagentes tóxicos, maior tempo de processamento e maior suscetibilidade à degradação do material caso o protocolo não seja rigorosamente seguido. Esses fatores justificam a adoção progressiva de kits comerciais, que oferecem maior praticidade e padronização.

Quanto ao desempenho, alguns estudos relataram rendimentos satisfatórios mesmo em amostras de longa data, como Tsukamoto (2003), que obteve 20 µg de DNA em lâminas armazenadas por até 15 anos. No entanto, outros autores destacaram que a degradação permanece como um desafio importante, especialmente em amostras acima de 10 anos de armazenamento, o que pode comprometer a amplificação por PCR(4,14). Cabe destacar que a

quantidade e a integridade do DNA extraído são fatores cruciais para a sensibilidade da PCR, uma vez que concentrações muito baixas ou fragmentos degradados podem reduzir a eficiência da reação ou gerar resultados falso-negativos. Ainda assim, a taxa de sucesso de amplificação foi de 70% a 100% na maioria dos trabalhos, sugerindo que, com a escolha adequada do protocolo, as lâminas arquivadas podem ser fontes viáveis de DNA para análises moleculares retrospectivas.

Esses achados estão em consonância com estudos que demonstram a aplicabilidade de lâminas arquivadas em investigações onco-hematológicas, desde que sejam utilizados métodos de extração otimizados e estratégias para minimizar a degradação do material(1,5,13). A utilização adequada dessas amostras permite não apenas a realização de análises retrospectivas em larga escala, como também a reavaliação de casos clínicos antigos sob a ótica de novas técnicas moleculares. Além disso, o aproveitamento de lâminas arquivadas representa uma alternativa estratégica em contextos nos quais o acesso a amostras frescas é limitado, ampliando o potencial de geração de conhecimento científico a partir de acervos históricos já existentes. Nesse sentido, a padronização de protocolos e a validação prévia da qualidade do DNA extraído tornam-se etapas fundamentais para garantir a confiabilidade dos resultados e fortalecer a aplicabilidade clínica e científica desses materiais.

4. Conclusões

Os resultados desta revisão indicam que as lâminas arquivadas constituem uma fonte viável de DNA para análises moleculares, desde que utilizados protocolos adequados de extração. Apesar da degradação associada ao tempo de armazenamento e às técnicas de coloração, estudos demonstraram taxas de sucesso na amplificação variando entre 70% e 100%, o que reforça o potencial do uso desse material em investigações retrospectivas.

No contexto da Fundação HEMOAM, onde existe um acervo expressivo de lâminas arquivadas de pacientes com doenças hematológicas, a aplicação desses protocolos pode ampliar significativamente o alcance de pesquisas moleculares, permitindo a recuperação de dados genéticos de amostras históricas. Isso favorece não apenas a validação de achados clínicos e epidemiológicos em longo prazo, mas também a expansão do escopo de estudos em oncogenética e farmacogenômica na Amazônia, especialmente em situações em que amostras frescas são limitadas ou indisponíveis.

Palavras-Chave: Lâminas histológicas, extração de DNA, leucemia

Divulgação

Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, o Congresso Pan-Amazônico de Oncologia detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação deste resumo, por meio eletrônico.

Referências

1. Boyle B, Gutman R, Robison L, Perentesis P. Accuracy of DNA Amplification from Archival Hematological Slides for Use in Genetic Biomarker.
2. Fey MF, Pilkington SP, Summers C, Wainscoat JS. Molecular diagnosis of haematological disorders using DNA from stored bone marrow slides. Br J Haematol. dezembro de 1987;67(4):489–92.

3. Tsukamoto N, Karasawa M, Tanaka Y, Yokohama A, Uchiumi H, Matsushima T, et al. Recurrence of Acute Myelogenous Leukemia with the Same AML1/ETO Breakpoint as at Diagnosis after Complete Remission Lasting 15 Years: Analysis of Stored Bone Marrow Smears. *Int J Hematol.* novembro de 2003;78(4):362–9.
4. Zanssen S. Single cell PCR from archival stained bone marrow slides: A method for molecular diagnosis and characterization. *J Clin Lab Anal.* janeiro de 2004;18(3):176–81.
5. Vince A, Poljak M, Seme K. DNA extraction from archival Giemsa-stained bone-marrow slides: comparison of six rapid methods. *Br J Haematol.* maio de 1998;101(2):349–51.
6. MA Gari, AM Abuzenadah, AG Chaudhary, MH Al-Qahtani, FM Al-Says, G Dmanhour. Pilot study of DNA extraction from archival unstained bone marrow slides: comparison of three rapid methods. 15 de janeiro de 2019;
7. Asada M, Miyashita T, Bessho F, Kobayashi N, Mizutani S. Malignant Cell Detection in Burkitt's Lymphoma Using Third-complementarity-determining Region (CDRIII), Clone-specific Probe Developed by Sequencing DNA from Stored Slides. *Jpn J Cancer Res.* julho de 1991;82(7):848–53.
8. De Melo MB, Sales TSI, Lorand-Metze I, Costa FE. Rapid Method for Isolation of DNA from Glass Slide Smears for PCR. *Acta Haematol.* 1992;87(4):214–5.
9. Naseem S, Gupta O, Binota J, Varma N, Varma S, Malhotra P. BRAF V600E mutation detection in hairy cell leukemia-utility of archival DNA from bone marrow aspirate/imprint smear and amplification refractory mutation system. *Mol Biol Rep.* junho de 2020;47(6):4365–72.
10. Aplenc R, Orudjev E, Swoyer J, Manke B, Rebbeck T. Differential bone marrow aspirate DNA yields from commercial extraction kits. *Leukemia.* 1º de setembro de 2002;16(9):1865–6.
11. Davies SM, Robison LL, Buckley JD, Radloff GA, Ross JA, Perentesis JP. Glutathione S-transferase polymorphisms in children with myeloid leukemia: a Children's Cancer Group study. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* junho de 2000;9(6):563–6.
12. Shu XO, Perentesis JP, Wen W, Buckley JD, Boyle E, Ross JA, et al. Parental Exposure to Medications and Hydrocarbons and *ras* Mutations in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia: A Report from the Children's Oncology Group. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1º de julho de 2004;13(7):1230–5.
13. Nadimi M, Rahgozar S, Moafi A, Tavassoli M, Mesrian Tanha H. Evaluation of rs62527607 [GT] single nucleotide polymorphism located in BAALC gene in children with acute leukemia using mismatch PCR-RFLP. *Cancer Genet.* julho de 2016;209(7–8):348–53.
14. Wong NC, Ashley D, Chatterton Z, Parkinson-Bates M, Ng HK, Halemba M, et al. A distinct DNA methylation signature defines pediatric pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Epigenetics.* junho de 2012;7(6):535–41.