



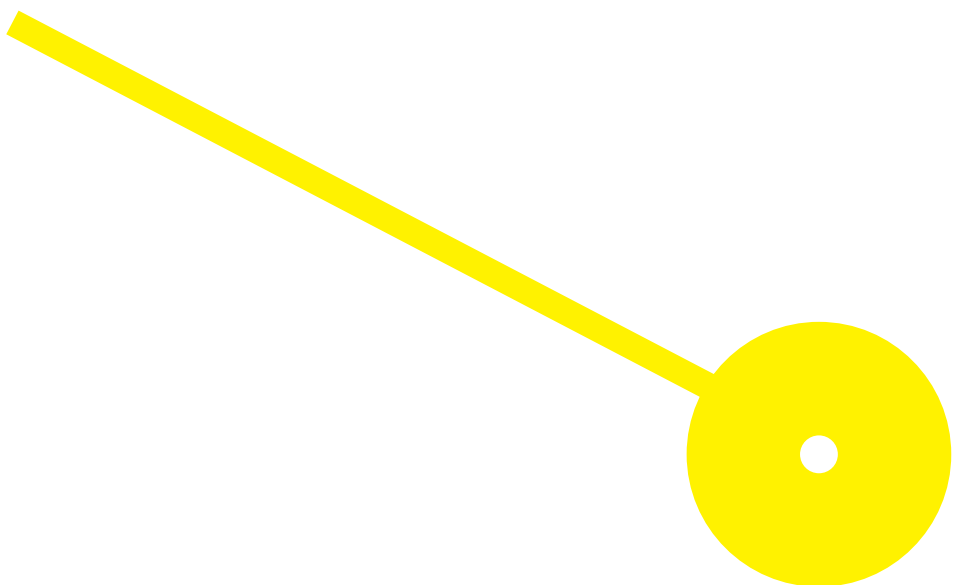
MESTRADO

Mestrado de Técnicas laboratoriais em Biopatologia - Ramo de Patologia Molecular

Fatores pré-analíticos que influenciam a Sequenciação de Nova Geração (NGS): Experiência IPO Coimbra

Ana Luísa Vilas Boas Guimarães Moreira

09/2023



P. PORTO

**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, EPE

**Fatores pré-analíticos que influenciam a sequenciação de nova geração (NGS): Experiência
do IPO Coimbra**

Autor

Ana Luísa Vilas Boas Guimarães Moreira

Orientador(es)

Doutora Marta Susana de Almeida Viegas

Técnica Superior de Saúde no Serviço de Anatomia Patológica - Instituto Português de Oncologia
de Coimbra Francisco Gentil

Professor Doutor Hugo Daniel Carvalho de Azevedo Rocha

Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge - Escola Superior de Saúde do Instituto
Politécnico do Porto

Doutora Sara Costa Granja

Professora Adjunta Convidada - Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Técnicas Laboratoriais em Biopatologia** Ramo **Patologia Molecular** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a todo o corpo docente e coordenação, com especial atenção à Professora Regina Silva, por me terem proporcionado as condições necessárias para a realização deste mestrado e por todos os ensinamentos que me transmitiram.

Ao Professor Hugo Rocha, e Professora Sara Granja, meus orientadores, por todo o apoio e dedicação.

A Professora Sandra Alves pelo apoio e orientação na análise estatística deste trabalho, e que tantas dúvidas me tirou.

Ao IPOC por me ter permitido a execução do trabalho laboratorial no meu local de trabalho.

Aos anatomopatologistas do IPOC pela disponibilidade e apoio.

Ao Dr. Paulo Figueiredo pelas horas passadas ao M.O. Muito Obrigada!!!

Aos Assistentes Operacionais e Assistentes Técnicas pela ajuda no levantamento de dados e amostras.

A Marta Viegas, minha orientadora, que foi incansável ao longo deste ano para me auxiliar na concretização deste projeto.

A Vera Gonçalves, a minha mentora de laboratório, que tanto tempo dispensou ao longo deste ano, agradeço todo o suporte, dedicação e conhecimento que me transmitiu.

A todas as minhas "Histopessoas", por toda a paciência, carinho, e muito mais que não se descreve por palavras, durante estes dois anos. Muito obrigada!

Aos meus irmãos cunhadas e sobrinhos, por todo o apoio dado.

Aos meus Pais que estão sempre presentes. O vosso apoio é fundamental em todas as etapas da minha vida.

Ao Zahir, por todas as horas de colinho que teve durante a minha estadia à frente do computador.

Por último, ao melhor do mundo, Pedro Pala, por tudo e tudo!!!!

Resumo

A Sequenciação de nova geração (*Next-generation sequencing* (NGS)) refere-se a uma tecnologia de sequenciação de alto rendimento. O uso da NGS especificamente aplicada à caracterização de tumores sólidos, enfrenta desafios significativos devido à natureza dos tecidos disponíveis para análise. O Tecido Fixado em Formol e Impregnado em Parafina (TFFIP) é o método mais utilizado para preservar a morfologia histológica, os ácidos nucleicos e as proteínas para fins de diagnóstico. O objetivo deste trabalho foi a avaliação da influência dos fatores pré-analíticos a que os tecidos estão sujeitos no Laboratório de Histologia do Instituto Português de Oncologia de Coimbra (IPOC). Os resultados deste estudo mostraram que a duração de fixação, o tipo de processamento, a área tumoral e o período de arquivo dos blocos de parafina impactam na quantidade e qualidade de ADN recuperado de TFFIP. Desta experiência conclui-se que a duração de fixação dos tecidos não deve ultrapassar os quatro dias. O processamento que menos compromete a quantidade e qualidade de ADN foi aquele em que o agente diafanizador foi o xilol e deve ser utilizada parafina com ponto de fusão que não ultrapasse os 62°C. Efetivamente, os fatores pré-analíticos devem, sem qualquer dúvida, ser bem controlados de modo a garantir que estudos moleculares posteriores não sejam comprometidos.

Palavras-chave: Sequenciação de Nova Geração (NGS), Ácido desoxirribonucleico (ADN), Tecido Fixado em Formol e Impregnado em Parafina (TFFIP), Fatores pré-analíticos

Abstract

Next-generation sequencing (NGS) refers to massive high-performance sequencing technology. The use of NGS, specifically for solid tumors, faces significant challenges due to the very nature of tissues available for analysis. The Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded (FFPE) is the method of choice when it concerns preserving histological morphology, nucleic acids, and proteins for diagnostic purposes. Our aim was to evaluate which and how pre-analytic factors impact on the quantity and quality of the recovered DNA in the context of our lab. Our results showed that time of fixation, tissue processing, tumoral area and period of archive play a role on both the quantity and quality of the recovered DNA. We found that time of fixation should not be longer than four days. Using xylol and paraffin with a fusion point not higher than 62°C produced the best results in terms of quantity and quality of recovered DNA. Altogether, our results showed that pre-analytic factors do play an important role and should be tightly controlled to assure that downstream molecular analysis is not compromised.

Keywords: New Generation Sequencing (NGS), Deoxyribonucleic acid (DNA), Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded (FFPE), Preanalytical Factors

Índice

1.	Introdução	1
1.1.	Sequenciação de Nova Geração – A Técnica	1
1.2.	Sequenciação de Nova Geração – Tumores sólidos	3
1.3.	Sequenciação de Nova Geração – Fatores pré-analíticos	4
1.4.	Qualidade e quantidade dos ácidos nucleicos recuperados de TFFIP para NGS	11
2.	Objetivo	12
3.	Material e métodos	13
3.1.	Amostras	13
3.2.	Obtenção de material para estudo de ADN	14
3.3.	Extração de ADN	14
3.4.	Integridade do ADN recuperado	14
3.5.	Análise estatística	15
4.	Resultados	17
4.1.	Caracterização da amostra	17
4.2.	Concentração de ADN recuperado	17
4.3.	Integridade do ADN recuperado	19
4.4.	Fatores pré-analíticos na quantidade e qualidade do ADN recuperado	21
4.4.1.	Duração da fixação: impacto na quantidade e qualidade do ADN recuperado	21
4.4.2.	Tipo de processamento de tecidos na qualidade e quantidade de ADN recuperado	24
4.4.3.	Área tumoral: impacto na quantidade de ADN recuperado mas não na qualidade	27
4.4.4.	Necrose abaixo dos 20% não tem impacto na quantidade e qualidade do ADN recuperado	29
4.4.5.	Tempo no arquivo dos blocos de parafina e o seu impacto na quantidade e qualidade do ADN recuperado	30
4.4.6.	Tipo de tecido pode impactar a quantidade e qualidade do ADN recuperado	32
5.	Discussão	35
6.	Conclusão	43
7.	Referências Bibliográficas	44
8.	Anexos	52

Índice de Abreviaturas

A – Adenina

ACMG – American College of Medical Genetics

ADN – Ácido desoxirribonucleico

BAM – *Binary Alignment Map*

CNV – *Copy Number Variation*

C – Citosina

EDTA – *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*

FASTQ – *Text-based Format for storing both a biological Sequence and its corresponding Quality scores*

G – Guanina

HE – Hematoxilina-Eosina

LBM – Laboratório de Biologia Molecular

LH – Laboratório de Histopatologia

NGS – *Next Generation Sequencing*

pb – pares de bases

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

SAP – Serviço de Anatomia Patológica

SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*

T – Timina

TFFIP – Tecido Fixado em Formol e Impregnado em Parafina

VCF – *Variant Call Format*

WES – *Whole Exome Sequencing*

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Concentrações dos reagentes necessários para a PCR por cada reação	15
Tabela 2 - Caracterização das amostras com quantidade mais elevada de ADN recuperado	18
Tabela 3 - Caracterização das amostras com concentração de ADN recuperado menor que 10ng/ μ l.....	19
Tabela 4 - Concentração ADN recuperado em função dos intervalos de fixação	22
Tabela 5 - Relação da classificação das bandas com 260pb do gene <i>housekeeping</i> β -globina obtidas do ADN recuperado com os intervalos de fixação.....	24
Tabela 6 - Concentração ADN recuperado em função do tipo de processamento	25
Tabela 7 - Relação da classificação das bandas com 260pb do gene <i>housekeeping</i> β -globina obtidas do ADN recuperado com o tipo de processamento.....	26
Tabela 8 - Concentração ADN recuperado em função da área tumoral.....	27
Tabela 9 - Área tumoral em relação com o tipo de banda com 260pb do gene <i>housekeeping</i> β -globina obtidas do ADN recuperado	28
Tabela 10 - Concentrações do ADN recuperado em relação com a percentagem de necrose	29
Tabela 11 - Relação da classificação das bandas com 260pb do gene <i>housekeeping</i> β -globina obtidas do ADN recuperado com as percentagens de necrose.....	30
Tabela 12 - Concentração do ADN recuperado em relação aos anos de arquivo	31
Tabela 13 - Relação da classificação das bandas com 260pb do gene <i>housekeeping</i> β -globina obtidas do ADN recuperado com os anos de arquivo	32
Tabela 14 - Relação da concentração do ADN recuperado com o tipo de tecido.....	33
Tabela 15 - Relação da classificação das bandas com 260pb do gene <i>housekeeping</i> β -globina obtidas do ADN recuperado com o tipo de tecido	34

Índice de Figuras

Figura 1 – Etapas da NGS	2
Figura 2 – Fatores pré-analíticos que influenciam a NGS.....	4
Figura 3 – Fases do processamento de tecidos.....	8
Figura 4 – Distribuição das amostras por processamento e tecido.....	17
Figura 5 – Frequência das amostras por classificação da banda de 260pb do gene <i>housekeeping</i> β -globina	20
Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose a 2% da banda 260pb do gene <i>housekeeping</i> β -globina obtida das amostras TFFIP	20
Figura 7 – Frequência de amostras por intervalo de fixação	21
Figura 8 – Relação entre a concentração média de ADN recuperado e os intervalos de fixação	23
Figura 9 – Frequência da classificação das bandas com 260pb do gene <i>housekeeping</i> β -globina obtidas do ADN recuperado por intervalo de fixação	24
Figura 10 – Relação entre concentração de ADN recuperado e tipo de processamento	26
Figura 11 – Frequência da classificação das bandas com 260pb do gene <i>housekeeping</i> β -globina obtidas do ADN recuperado e tipo de processamento.....	27
Figura 12 – Gráfico de dispersão entre a área tumoral e a concentração de ADN recuperado.....	28
Figura 13 – Concentração do ADN recuperado em relação aos anos de arquivo	31
Figura 14 – Concentração de ADN recuperado em relação com tipo de tecido.....	33

1. Introdução

O aumento do conhecimento da biologia tumoral e a constatação que, de facto, as alterações moleculares são modeladoras do crescimento tumoral e podem levar a resistência e suscetibilidade às terapêuticas, fez com que a identificação e caracterização das mesmas seja pertinente.

A Sequenciação de nova geração (*Next-Generation Sequencing* (NGS)) foi rapidamente adotada nos laboratórios clínicos pois permite o estudo de vários genes, ou regiões de genes, num único teste de uma forma simples, rápida e económica, quando comparada com a Sequenciação de Sanger. Outra vantagem desta técnica é de necessitar de quantidades mínimas de Ácido Desoxirribonucleico (ADN), podendo ser obtido de diferentes amostras biológicas, incluindo Tecido Fixado em Formol e Impregnado em Parafina (TFFIP) (1–4).

A NGS é uma tecnologia de sequenciação massiva de alto rendimento que permite realizar e recolher dados de milhares de reações de sequenciação simultâneas gerando uma quantidade sem precedentes de informação genética. Posteriormente, a informação genética obtida é submetida a uma análise bioinformática realizada através da comparação com sequências referência do genoma. Esta análise permite inferir se as variantes detetadas são válidas e qual o seu significado clínico (1,5,6).

1.1. Sequenciação de Nova Geração – A Técnica

O fluxo de trabalho da técnica NGS compreende 3 etapas: (i) construção da biblioteca; (ii) reação de sequenciação; (iii) análise de dados (Figura 1). Todos estes passos são de extrema importância e devem ser feitos de uma forma rigorosa uma vez que a NGS é uma técnica muito sensível.

Embora os protocolos de construção da biblioteca variem consoante o tipo de plataforma NGS a ser utilizada, esta envolve dois passos principais: a fragmentação do ADN molde em fragmentos de tamanho adequado (normalmente 200–500 pares de base (pb)); e a ligação de um adaptador que contém uma cadeia de ADN modificada associada a um *barcode*. Este último permite que a sequenciação ocorra, identifica a origem da amostra e que várias amostras sejam reunidas e sequenciadas simultaneamente (3). A fragmentação pode ser feita por métodos físicos, enzimáticos ou químicos (7). O tamanho dos fragmentos de ADN-alvo na biblioteca final é um parâmetro importante para a construção da biblioteca NGS e depende da plataforma de sequenciação (3,7).

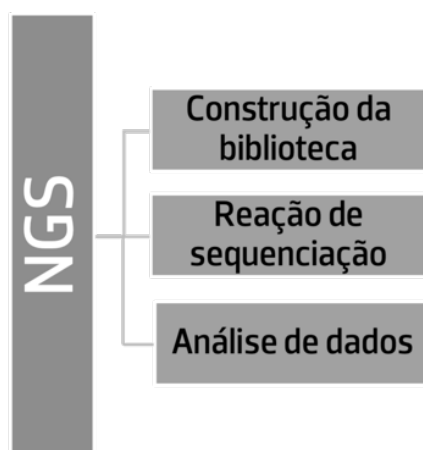


Figura 1 - Etapas da NGS

Antes da reação de sequenciação a biblioteca deve ser purificada. Este processo envolve a remoção de fragmentos de tamanhos indesejados que irão interferir com as etapas de sequenciação e de análise de dados. A quantificação e avaliação da qualidade da biblioteca são passos importantes e necessários (3,5).

Antes da sequenciação a biblioteca é convertida em moléculas de ADN de cadeia simples. A maioria das plataformas NGS requer ainda uma amplificação clonal antes da sequenciação. A amplificação clonal permite obter milhares de cópias idênticas de um fragmento de ADN garantindo que o sinal possa ser distinguido do ruído de fundo (7). A amplificação clonal implica a imobilização da molécula em cadeia simples seguida por uma reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* (PCR)) da mesma. A quantificação de ADN após esta fase é de grande importância e deve ser realizada com equipamento especializado, uma vez que excesso de ADN pode levar a que haja inibição da reação, enquanto que quantidade insuficiente de ADN pode levar a falhas na PCR o que pode resultar em desequilíbrio de alelos ou mesmo falha de amplificação de alelos específicos (5).

A sequenciação baseia-se no princípio de sintetizar uma nova cadeia complementar a partir de uma molécula molde em cadeia simples. A sequência é determinada à medida que as bases são incorporadas na nova cadeia. Este método é designado como sequenciação por síntese (3).

Uma quantidade enorme de dados é gerada pela NGS e a sua correta interpretação é um grande desafio. Após a sequenciação é produzido um ficheiro de texto que não só armazena a sequência de nucleótidos como atribui uma pontuação de qualidade para cada base (*text-based format for storing both a biological sequence and its corresponding quality scores*(FASTQ)). Esta pontuação reflete a probabilidade da base estar corretamente identificada. A sequência obtida é então

mapeada e alinhada automaticamente recorrendo a ferramentas bioinformáticas, que efetuam a sua comparação com sequências de referência, resultando num ficheiro mapa de alinhamento binário (*Binary Alignment Map* (BAM)). O *software* produz um segundo ficheiro com as variantes identificadas (*Variant Call Format* (VCF)) que contém informações sobre a variante detetada, a sua localização e o número de leituras realizadas desse local contendo sequências *wild-type* e mutadas. Existem diferentes tipos de variantes, cada uma exigindo uma abordagem computacional diferente para uma identificação fiável e específica (3,7).

A interpretação destes dados requer conhecimento prévio da região de interesse, ou seja, qual a percentagem da sequência alvo que foi efetivamente sequenciada (amplitude de cobertura) e quantas vezes foi sequenciada cada base (profundidade de cobertura ou de leitura). Existem muitas ferramentas de anotação disponíveis e todas fornecem uma descrição do que é conhecido sobre a variante identificada, disponibilizando hiperligações para outras bases de dados curadas de variantes conhecidas (3,7).

Assim que o conjunto de sequências esteja completo, e as variantes tenham sido identificadas, é importante interpretar os dados tendo em conta o contexto clínico. Se uma variante for encontrada, é importante saber qual o seu valor clínico. A presença de uma variante não é suficiente para assumir que é clinicamente patogénica e a sua interpretação vai continuar a depender do contexto clínico (3). Para uniformizar a interpretação dos dados obtidos, foram desenvolvidas orientações internacionais, como por exemplo, os critérios do *American College of Medical Genetics* (ACMG) (8).

1.2. Sequenciação de Nova Geração – Tumores sólidos

O uso da NGS, especificamente para a identificação de variantes em tumores sólidos, enfrenta desafios significativos devido à natureza dos tecidos disponíveis para análise. O TFFIP é o método mais utilizado para preservar a morfologia histológica do tecido, os ácidos nucleicos e as proteínas para fins de diagnóstico.

Variáveis pré-analíticas, abrangendo todas as fases desde a obtenção da amostra até à análise, podem influenciar os resultados obtidos por métodos de diagnóstico moleculares afetando, em última análise, as decisões de tratamento e, por sua vez, os resultados clínicos (9). Os erros na fase pré-analítica são a fonte mais comum de todos os erros ocorridos nos laboratórios clínicos. De facto, 60 a 70% dos erros associados ao laboratório são devidos a erros pré-analíticos (10).

Identificar e minimizar os efeitos introduzidos pela variabilidade pré-analítica é difícil, uma vez que os mesmos podem ser específicos do tipo de amostra biológica, da plataforma analítica utilizada e do alvo molecular/proteico de interesse (11). A implementação de recomendações para otimização dos procedimentos pré-analíticos na rotina do laboratório, como por exemplo, a etiquetagem na colheita, transporte para o laboratório, análise, processamento e arquivo da amostra, podem garantir a qualidade das amostras biológicas dos pacientes fornecendo um novo nível de confiança e precisão nos resultados da análise molecular (10).

1.3. Sequenciação de Nova Geração – Fatores pré-analíticos

Os fatores pré-analíticos que estão associados ao sucesso da análise tanto histológica como molecular, incluindo a NGS, nos TFFIP são: o tempo total de isquemia, o tipo de amostra, duração da fixação dos tecidos, processamento dos tecidos, descalcificação dos tecidos ósseos, área tumoral, fração celular tumoral, viabilidade tumoral, tempo e condições de arquivo dos blocos de parafina TFFIP (figura 2) (2,12,13). Um outro fator que pode afetar os resultados da NGS, e que deriva dos anteriores, é a quantidade e qualidade dos ácidos nucleicos inicial para a construção da biblioteca, a primeira e crucial etapa da NGS (13).

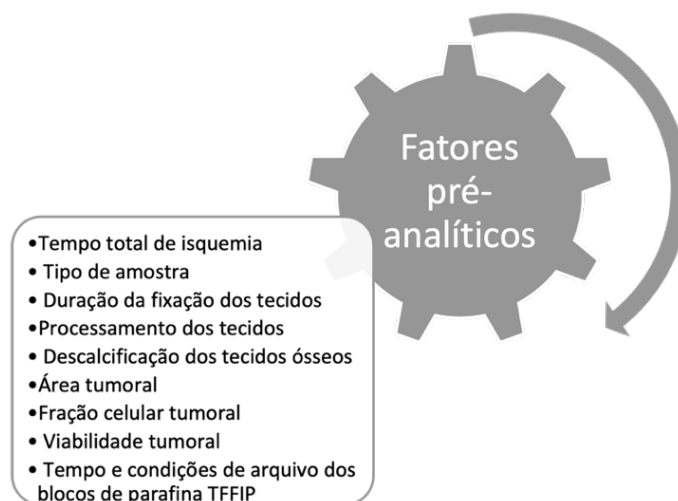


Figura 2 – Fatores pré-analíticos que influenciam a NGS

Duração total de isquemia

Isquemia é definida como sendo a interrupção do fluxo sanguíneo nos tecidos. A duração total de isquemia compreende o período de isquemia a quente e o período de isquemia a frio. A isquemia a quente começa quando ocorre a interrupção do fornecimento de sangue ao tecido, no decorrer da cirurgia, para a sua ressecção. A isquemia a frio corresponde ao tempo entre a ressecção do

tecido e o início da fixação (10,14,15). A duração total de isquemia é amplamente aceita como uma variável importante na análise de macromoléculas, tais como ADN, a partir de amostras de tecidos. Os efeitos demonstráveis de um atraso na fixação podem depender da plataforma utilizada para a análise dos ácidos nucleicos. Os resultados de amplificação dos ácidos nucleicos, por PCR, em TFFIP, não são alterados com um tempo de isquemia a frio até 24 horas (17). Uma vez que nenhuma recomendação para o tempo de isquemia a frio é o ideal para todos os tecidos, todas as classes de moléculas, ou todas as plataformas de análise, a recomendação de uma hora é considerada como uma orientação prudente e exequível (10,12,16,17).

Tipo de amostra

As amostras tumorais podem ser obtidas por ressecção cirúrgica, biópsias excisionais, biópsia por agulha fina e citologias aspirativas por agulha fina. As amostras cirúrgicas de ressecção e biópsias excisionais geralmente fornecem grandes secções tumorais sendo possível a obtenção de uma maior quantidade de ácidos nucleicos quando comparadas com amostras de biópsias por agulha fina, estando associadas a melhores resultados de NGS (12,13,18). Goswami et al. (2016) mostraram que as amostras provenientes de ressecção cirúrgica e biópsias excisionais apresentaram as maiores taxas de sucesso de NGS (97%). A taxa foi reduzida para 80% em amostras de biópsia por agulha fina e para 50% nas amostras citológicas (18).

Fixação dos tecidos

Idealmente, os tecidos devem ser fixados imediatamente e completamente após serem ressecados cirurgicamente. A fixação adequada dos tecidos é fulcral tanto para estudos histológicos como moleculares, pois sem este processo todos os tecidos se degradariam e a análise seria inútil. A fixação dos tecidos é o processo pelo qual as células do tecido são fixadas de um modo físico e químico. Deste modo, as atividades bioquímicas e proteolíticas das células são bloqueadas para que as células e/ou tecidos possam não só resistir ao processo natural de degradação, mas também a alterações morfológicas, distorções ou decomposições que advenham do tratamento subsequente a que são sujeitos (19,20).

Os objetivos da fixação consistem em: (i) preservar o tecido o mais próximo do seu estado em vida; (ii) evitar alterações na constituição química das células; (iii) fixar as proteínas e inativar enzimas proteolíticas responsáveis pelo fenómeno de autólise; (iv) prevenir qualquer alteração de forma e tamanho do tecido no momento do processamento; (v) tornar o tecido firme e duro;

(vi) prevenir qualquer crescimento bacteriano no tecido; (vii) tornar possível uma coloração ótima de modo a manter as relações microscópicas originais entre células, componentes celulares e material extracelular com a menor interrupção da organização do tecido (19,21).

A fixação depende do coeficiente de difusão do fixador e da taxa à qual este reage com os componentes do tecido. O coeficiente de difusão em uma hora é a distância em milímetros em que o fixador penetra no tecido e está inversamente relacionado com a raiz quadrada do tempo. Na rotina laboratorial os tecidos são fixados durante 24 a 72 horas. No entanto, para as análises moleculares é recomendado um intervalo de 6 a 24 horas (19,20,22). Uma fixação ineficiente pode levar à degradação dos ácidos nucleicos ou a uma alteração na expressão genética em locais do tecido que não foram penetrados pelo fixador, enquanto que uma fixação prolongada pode resultar em *crosslinking* extenso e fragmentação dos ácidos nucleicos (2,9).

Ao escolher um fixador tem de se ter em conta os efeitos que cada fixador causa nos tecidos. Estes incluem alterações moleculares ou perdas nos tecidos fixados, tumefação ou retração dos tecidos, variações na qualidade da coloração histoquímica e imunohistoquímica, efeito na análise molecular e capacidade de manter a estrutura dos organelos celulares. Até à data, não foi identificado um fixador universal ou ideal (23). Na Anatomia Patológica, o fixador de escolha para a maioria dos laboratórios tem sido formaldeído tamponado a 10%.

As reações do formaldeído com as macromoléculas são numerosas e complexas. No que diz respeito ao ADN, o formaldeído inicia a desnaturação da molécula quebrando as pontes de hidrogénio entre as cadeias nas regiões ricas em Adenina-Timina (AT) do ADN de cadeia dupla, criando locais de interação química (22). Existem quatro possíveis interações do formaldeído com o ADN: (i) reação de adição, em que o formaldeído é adicionado à base do ADN para formar um grupo de hidroximetilo (metilol -CH₂ OH); (ii) reação electrofílica lenta de N-metilol numa base de amino para formar uma ponte de metileno entre dois grupos amino; (iii) formação de locais apurínicos e apirínicos (sítios AP) através da hidrólise das ligações N-glicosídicas, deixando resíduos livres de purina e pirimidina, respetivamente; (iv) pode causar uma hidrólise lenta das ligações fosfodiéster, principalmente as ligações curtas de polideoxirribose com pirimidina intacta (22). Todos estes danos interferem tanto com a amplificação como com a sequenciação, e podem levar a artefactos na sequenciação, tais como a desaminação de citosina para uracilo resultando num aumento de alterações Citosina>Timina/Guanina>Adenina (C>T/G>A) (24).

Williams et al. (1999), com o objetivo de determinar a presença e frequência de artefactos na sequência de ADN, provocados pela fixação em formaldeído, compararam os resultados obtidos

na amplificação por PCR e sequenciação de amostras de cancro de células basais com variantes descritas. Para tal, colheram em espelho amostras de tecido fresco congelado e tecido TFFIP. Estes autores demonstraram que nas amostras de tecido congelado todos os exões estudados foram amplificados, ao contrário do observado nos TFFIP, em que não houve amplificação num dos exões em estudo. Em relação à sequenciação verificaram que nas amostras congeladas não foram detetadas variantes para além das já descritas, enquanto que nas amostras TFFIP foram detetadas alterações não descritas. Os autores sugerem que estas últimas possam ter sido devidas a ligações cruzadas nos nucleótidos de citosina causadas pela fixação com formaldeído e que a Taq-polimerase durante a amplificação não reconheça a citosina. Deste modo, em vez de uma guanina foi incorporada uma adenina (25). Bonnet et al. (2018) obtiveram resultados semelhantes. Estes autores comparam substituições C>T e G>A entre amostras de tecido fresco congelado e tecido TFFIP, em que o número de substituições foi maior nos TFFIP do que nas amostras de tecido fresco congelado (26).

Processamento de tecidos

O processamento dos tecidos é um processo físico que envolve soluções químicas que reagem com os espécimes biológicos. O princípio do processamento é a remoção da água do tecido, e a sua impregnação por outro meio (geralmente parafina) capaz de fornecer o suporte adequado ao tecido, com a rigidez suficiente para que a microtomia seja possível. Os passos principais são desidratação, diafanização e impregnação (Figura 3).

A desidratação remove as moléculas de água livres do tecido uma vez que o meio de impregnação (parafina) não é miscível com água. As capacidades hidrofílicas do agente desidratante combinadas com um aumento gradual da sua concentração vão resultar num deslocamento lento e constante de água livre e a remoção de água estrutural ligada (moléculas de água ligadas a proteínas por pontes de hidrogénio e que fazem parte da configuração estrutural dos aminoácidos). Estes agentes desidratantes vão competir com as moléculas do tecido pela disponibilidade de moléculas de água. O período de imersão nos agentes de desidratação varia de acordo com o tamanho e a permeabilidade do tecido. Se o tecido estiver exposto durante muito tempo a uma concentração elevada de agente desidratante pode sofrer uma retração significativa. No entanto, se a desidratação for incompleta o agente de impregnação não vai infiltrar adequadamente no tecido o que vai levar a que haja artefactos nos TFFIP que ficam sujeitos à degradação (19,20).



Figura 3 - Fases do processamento de tecidos

A diafanização tem como objetivo a remoção do agente desidratante para facilitar a impregnação. Os agentes de diafanização devem ser miscíveis tanto com os reagentes desidratantes, para os remover eficazmente, como com o agente impregnador para permitir a sua infiltração completa.

O xilol é o agente de diafanização mais utilizado no processamento de tecidos. É um líquido inflamável incolor com um odor aromático característico. Este agente remove rapidamente o álcool dos tecidos tornando-os incolores. A sobre-exposição dos tecidos a este agente diafanizador durante o processamento pode provocar endurecimento dos tecidos. Apesar de ser o agente diafanizador mais utilizado, o xilol é tóxico. Alguns dos efeitos tóxicos do xilol incluem neurotoxicidade aguda, lesões cardíacas e renais, discrasias sanguíneas, eritema cutâneo, pele seca e descamação e infeções secundárias (27). Na tentativa de eliminar o xilol dos laboratórios de anatomia patológica surgiram muitos agentes diafanizadores alternativos, incluindo reagentes de limoneno, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, óleos vegetais (28).

Um destes agentes alternativos é o isopropanol. Este reagente tem baixa acidez, é miscível com água, álcoois e é menos tóxico que o xilol. Adicionalmente, não compromete a qualidade dos tecidos para o estudo histológico. Metgud et al. (2013) compararam amostras de tecido fixadas em formaldeído processadas em dois protocolos de processamento diferentes, um que usava como agente diafanizador o xilol e outro o isopropanol. A avaliação dos tecidos revelou que as pontuações médias para a qualidade do tecido foram semelhantes (28). Num outro estudo foi

avaliada a qualidade do processamento de amostras de cérebro, usando quatro protocolos diferentes, dois com xilol e dois com isopropanol. Foram avaliados 23 parâmetros de qualidade dos tecidos e concluíram que em todos os protocolos eram obtidos resultados semelhantes (29). A impregnação tem como objetivo fornecer suporte ao tecido removendo o agente de diafanização. O agente de impregnação, através de um processo de difusão, infiltra-se nos espaços do tecido onde estavam as moléculas de água. O tecido é embebido com o meio de impregnação que forma uma matriz prevenindo a distorção da estrutura tecidual durante a microtomia (19,20). A parafina é o meio de impregnação universalmente aceite para o processamento de tecidos. O seu ponto de fusão varia entre 47°C e 70°C.

O passo de desparafinação das amostras na extração de ácidos nucleicos é um passo crucial na quantidade e qualidade de ácidos nucleicos recuperados (30). O uso de parafina com ponto fusão elevado faz com que a desparafinação das amostras na extração dos ácidos nucleicos seja mais difícil (31). Evers et al. (2011) demonstraram que existe uma diminuição do rendimento de ácido ribonucleico (ARN) obtido após o passo de impregnação na parafina, com uma redução de 10x quando comparado com os restantes passos do processamento (32).

Para uma melhor qualidade de resultados, tanto a nível morfológico como a nível molecular, devem ser documentados dados sobre os tempos, temperaturas, presença de vácuo, o tipo de processador, o tipo de processamento e os reagentes utilizados aquando do processamento de tecidos (33).

Descalcificação dos tecidos ósseos

Para que se possa examinar histologicamente o tecido ósseo ou calcificado, deve fazer-se a descalcificação depois da fixação e antes do processamento dos tecidos e da microtomia. A descalcificação é o processo pelo qual os iões de cálcio presentes nos tecidos são removidos. É uma etapa essencial para que avaliação histológica de rotina seja possível.

A descalcificação tem um impacto significativo nos resultados da NGS nas amostras ósseas. Geralmente, os agentes descalcificadores contêm ácidos fortes que degradam os ácidos nucleicos e diminuem a sua taxa de recuperação das amostras (18). Ácidos fracos e agentes quelantes, como o ácido fórmico e o ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid* (EDTA)) respetivamente, são mais lentos do que os agentes ácidos fortes no processo de descalcificação mas são muito mais suaves e menos propensos a interferir com os ácidos nucleicos (11). Singh et al. (2013) demonstraram que existe uma diminuição significativa

na quantidade e integridade do ADN obtido de amostras submetidas a uma descalcificação com ácidos fortes (clorídrico, nítrico) quando comparados com 14% EDTA e ácido fórmico (34).

Área tumoral, fração celular tumoral e viabilidade tumoral

O tamanho da área tumoral determina o rendimento de ADN/ARN, sendo este um fator pré-analítico fundamental para que o resultado da NGS seja fiável (12). A taxa de sucesso da NGS é muito menor em amostras com área tumoral menor que 10mm², do que em amostras com áreas tumorais entre 10 a 60mm² (18).

A avaliação da fração de células neoplásicas nos tecidos é vital para a correta interpretação dos resultados da NGS. A fração celular tumoral consiste na proporção entre a quantidade de células tumorais e células normais no estroma da amostra. A amostra deve incluir o maior número possível de células tumorais. A amostra selecionada deve ter uma fração tumoral mínima entre 10% a 20% (13). Uma fração tumoral baixa pode afetar a fiabilidade dos diagnósticos moleculares, que pode originar resultados falsos negativos (2).

A fração celular tumoral depende do tipo de tumor, alguns tendem a ter baixa celularidade ou podem conter regiões necróticas que podem afetar a quantidade e qualidade dos ácidos nucleicos. No entanto, isto pode ser parcialmente resolvido recorrendo à macrodissecção. Para tal, recomenda-se que seja feita uma marcação, por um anatomopatologista, do tecido tumoral na lâmina de Hematoxilina-Eosina (HE). Deste modo, aumenta-se o rendimento da área para extração, e conseqüentemente a quantidade de células neoplásicas necessárias para análises posteriores (35).

A viabilidade do tecido tumoral é essencial para o sucesso da NGS. Os tecidos tumorais podem ter áreas de necrose associadas. A necrose é um processo fisiológico caracterizado pela rutura irreversível da membrana plasmática, organelos e núcleo, devido a danos celulares graves e disfunção, incluindo a cariólise, o que dificulta o sucesso da sequenciação (13). Deste modo, a quantidade de área necrótica deve ser mínima.

Tempo de arquivo dos blocos de parafina TFFIP

Os TFFIP devem ser mantidos em condições secas, isentas de pragas e à temperatura ambiente. O tecido após ser impregnado com parafina, fica estável por períodos prolongados (10,31). O ADN recuperado dos blocos de parafina mantidos nestas condições são comparáveis em qualidade ao

longo de um período de 1 a 12 anos (18). No entanto, a quantidade diminui em TFFIP arquivados com mais 3 anos (36).

1.4. Qualidade e quantidade dos ácidos nucleicos recuperados de TFFIP para NGS

Para a NGS, à semelhança de outras técnicas de biologia molecular, é essencial garantir uma boa qualidade e quantidade de ácidos nucleicos, seja ADN ou ARN. A quantidade inicial de ácidos nucleicos utilizada para a construção da biblioteca é extremamente importante, uma vez que a fraca qualidade da amostra inicial pode levar a erros de sequenciação (32). Devido à sensibilidade e especificidade desta técnica, e à quantidade limitada de material biológico disponível, a escolha do método mais apropriado de extração para a obtenção de ácidos nucleicos com quantidade e qualidade satisfatórias deve ser feita com o máximo cuidado (37).

Vários estudos já determinaram que a NGS pode ser realizada em ácidos nucleicos a partir de amostras TFFIP (26,38–41). Num estudo foram colhidas amostras de tecido fresco congelado e tecido TFFIP em espelho de tumores gastrointestinais. Neste estudo, foram comparados os resultados da sequenciação de todo o exoma (*Whole Exome Sequencing* (WES)) destas amostras, sendo demonstrado que o WES é viável nas amostras TFFIP e com resultados obtidos comparáveis aos obtidos nas amostras de tecido fresco congelado (38). Num outro estudo foram analisadas amostras, colhidas em espelho de tecido fresco congelado e tecido TFFIP a partir de seis tipos diferentes de tecidos humanos, a fim de averiguar a potencial utilização de amostras de TFFIP em estudos clínicos retrospectivos e prospetivos baseados em NGS. A análise dos dados da sequenciação de ADN mostrou concordância para 70–80% das variantes nas amostras de tecidos frescos congelados e TFFIP arquivadas por menos de três anos (39).

A quantidade mínima necessária de ADN para estudos NGS vai variar, entre outros fatores, do tipo de plataforma de NGS, da qualidade do ADN, do limite de deteção necessário e da escolha do protocolo de preparação da biblioteca. A quantidade mínima de ADN em cadeia dupla necessária para a maioria das plataformas de NGS é de 50 a 200ng (24). No entanto, é possível obter bons resultados com quantidades inferiores, tal como demonstrado por Goswami et al. (2016) e Singh et al. (2013) (18,42).

A integridade do ADN extraído não pode ser subestimada, pois esta pode afetar a qualidade da sequenciação e conseqüentemente dos resultados obtidos. O intervalo de tamanho de fragmento inicial do ADN, depende da plataforma a utilizar (43).

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi a avaliação da influência de alguns fatores pré-analíticos a que os tecidos estão sujeitos no Laboratório de Histopatologia (LH) do Serviço de Anatomia Patológica (SAP) do Instituto Português de Oncologia de Coimbra (IPOC), na quantidade e integridade do ADN obtido. Pretende-se, com este estudo, definir um guia de referência para minimizar os efeitos dos fatores pré-analíticos durante a fase de processamento dos tecidos para que a NGS permita obter resultados confiáveis em todo o tipo de amostras.

No âmbito deste trabalho foi avaliado o impacto dos fatores pré-analíticos na quantidade e integridade do ADN recuperado dos TFFIP. Foram avaliados: (i) duração da fixação dos tecidos, (ii) processamento dos tecidos, (iii) área tumoral (iv) fração celular tumoral, (v) viabilidade tumoral, (vi) tempo e condições de arquivo dos blocos de parafina.

3. Material e métodos

3.1. Amostras

Para este estudo foram selecionadas amostras de tecido TFFIP processadas nos anos de 2019 e de 2021, incidindo em tecidos provenientes de ressecções cirúrgicas de tumores malignos de mama e cólon. Foram selecionadas 451 amostras.

Numa primeira fase foi consultada a base de dados do SAP. Para cada amostra foi recolhida a data de entrada no LH e a data de processamento de tecidos. As amostras foram divididas em 3 intervalos de fixação: (i) intervalo 1: 1 a 4 dias de fixação; (ii) intervalo 2: 5 a 10 dias; (iii) intervalo 3: superior a 11 dias. Os dias de fixação foram calculados a partir data de entrada no LH e da data de processamento de tecidos.

O passo seguinte foi o levantamento das lâminas coradas por HE de cada amostra do arquivo para avaliação microscópica da fração tumoral, viabilidade tumoral e medição da área tumoral. A fração tumoral foi calculada recorrendo ao cálculo da razão entre os campos óticos observados com células tumorais e o número total de campos observados. De forma a otimizar a quantidade e qualidade do ADN obtido, as amostras com fração tumoral menor que 10% e com necrose superior a 25% foram excluídas deste estudo, uma vez que autores propõem uma percentagem mínima de fração tumoral para a NGS de 10% (44,45) e que a percentagem de células necróticas presente no tecido seja a menor possível (33). Assim, foram excluídas do estudo 127 amostras, resultando um total de 324 amostras (217 amostras do ano de 2019 e 107 do ano de 2021).

Seguidamente, as amostras selecionadas foram agrupadas de acordo com o protocolo de processamento: processamento A (desidratação com álcool etílico, diafanização com xilol e impregnação com parafina a 62°C); processamento B (desidratação com álcool etílico, diafanização com isopropanol e impregnação com parafina a 70°C e 65°C) (Anexo 1 e 2).

Apenas foram utilizadas amostras consideradas excedentárias pelos anatomopatologistas de modo a não comprometer revisões histológicas nem estudos futuros. Todas as amostras foram anonimizadas. Foi obtida a aprovação da Comissão de Ética do Instituto Português de Oncologia de Coimbra (IPOC).

3.2. Obtenção de material para estudo de ADN

As 324 amostras de tecido TFFIP validadas foram levantadas do arquivo do SAP.

Foram realizadas, por microtomia, 10 secções a 10µm para tubo de microcentrífuga 1,5ml.

Nas amostras em que a fração tumoral era entre 10 e 20% foi efetuada macrodissecção. Nestas amostras foram efetuadas 5 secções de 10µm para lâminas adesivadas. Após marcação da área tumoral, a zona selecionada foi recuperada para um tubo de microcentrífuga 1,5ml.

3.3. Extração de ADN

A extração de ADN foi feita pelo método fenol-clorofórmio, segundo o protocolo do LBM (Anexo 3).

A quantificação foi feita pelo método de fluorometria utilizando o *kit AccuGreen High Sensivity dsDNA Quantification Kit* (Biotium, Fremont, CA) e o fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Waltham, MA, USA). O protocolo seguido foi o fornecido pelo fabricante do *kit* (Anexo 4). A concentração de ADN de cada amostra foi calculada segundo a fórmula fornecida pelo fabricante:

$$Cf = (\text{leitura Qubit} \times V_{\mu\text{l}} \text{ reação}) / V_{\mu\text{l}} \text{ amostra}$$

3.4. Integridade do ADN recuperado

A integridade do ADN recuperado foi avaliada por PCR, de acordo com o protocolo do LBM.

Para tal, foi feita a amplificação do gene *housekeeping* β-globina, com os seguintes *primers*: β-globina GH20 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'; (20µM, Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany) β-globina PC04 5'-CAACTTCATCCACGTTACC-3' (20µM Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany).

As concentrações dos reagentes necessários para a PCR por reação, estão descritos na Tabela 1.

O programa para a PCR incluiu uma desnaturação inicial a 94°C por 9 minutos; seguido por 40 ciclos constituídos por 1 minuto a 94°C; 1 minuto a 57°C; 1 minuto a 72°C; e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Tabela 1 – Concentrações dos reagentes necessários para a PCR por cada reação

Reagente	Concentração final
H ₂ O	Perfazer um volume final de 50µl
<i>Taq Buffer</i>	1x
MgCl ₂	2mM
d.NTPs	200µM
<i>Primer Foward</i>	10p.moles
<i>Primer Reverse</i>	10p.moles
Taq ADN polimerase II	2,5U
ADN molde	50ng

Foi dada uma classificação para a integridade do ADN obtido: 1 – banda definida; 2 – banda presente; 3 – banda ausente.

Nas amostras de TFFIP com uma concentração de ADN recuperado menor que 10ng/µl não foi feita a avaliação de integridade do ADN recuperado.

3.5. Análise estatística

Os dados foram tratados estatisticamente no *software IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)* para o MacOS versão 28.0 (SPSS Inc, Illinois, Chicago). Foi feita uma análise descritiva para análise de medida de tendência central (média), medidas de dispersão (mínimo e máximo) e distribuição de frequências. Os resultados foram estimados usando o intervalo de confiança 95% e o nível de significância foi de 0,05 (**p-value*<0,001; ***p-value*<0,05).

Foram verificadas as possíveis associações, relações e diferenças entre os resultados de quantificação e integridade do ADN recuperado com os fatores pré-analíticos: duração da fixação, tipo de processamento, área tumoral na amostra, fração tumoral, tempo de arquivo da amostra, tipo de tecido.

De forma a avaliar se a quantidade de ADN recuperado era diferente entre os intervalos de fixação realizou-se o teste de hipóteses não paramétrico *Kruskal-Wallis* seguido de Teste *Sheffé* para comparações múltiplas. O teste *Kruskal-Wallis* foi também realizado para avaliar se a percentagem de necrose tinha impacto na quantidade do ADN, bem como, para avaliar se a área do tumor tinha impacto na qualidade de ADN recuperado. Foi feito o teste de hipóteses paramétricas Teste *t* para amostras independentes para avaliar se a quantidade de ADN era diferente entre tipo de processamento, tempo no arquivo e tipo de tecidos. A avaliação do

impacto na qualidade do ADN recuperado dos fatores: duração da fixação; tipo de processamento; percentagem de necrose; tempo de arquivo e tipo de tecido, foi feita por intermédio do teste de independência do *Qui-quadrado* de hipóteses não-paramétricas. A correlação de *Pearson* foi usada para avaliar se a quantidade de ADN recuperado estava relacionada com o tamanho da área tumoral.

4. Resultados

4.1. Caracterização da amostra

Foram selecionadas 324 amostras de tecido TFFIP dos anos 2019 e 2021 que preencheram os critérios de inclusão definidos. Das 324 amostras selecionadas, 125 amostras foram sujeitas ao processamento A e 199 amostras ao processamento B. Das 125 amostras de tecido TFFIP sujeitas ao processamento A, 64 amostras eram de cólon e 61 amostras de mama. Das 199 amostras submetidas ao processamento B, 69 amostras eram de cólon e 130 amostras eram de mama (Figura 4).

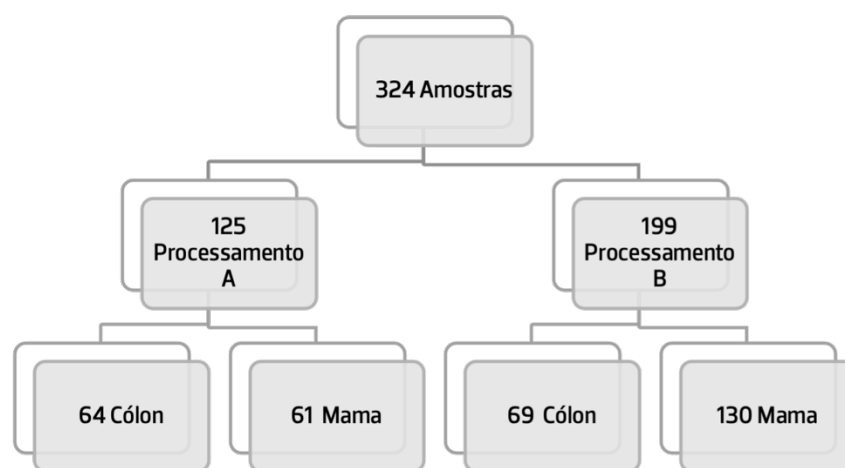


Figura 4 - Distribuição das amostras por processamento e tecido

4.2. Concentração de ADN recuperado

A quantificação da concentração de ADN obtido das amostras de tecido TFFIP foi feita pelo método de fluorometria.

A concentração média de ADN recuperado nas 324 amostras de tecido TFFIP foi de $90,2\text{ng}/\mu\text{l} \pm 55,0$ (mín. $0,7\text{ng}/\mu\text{l}$ e máx. $200\text{ng}/\mu\text{l}$). Em 304 amostras obteve-se concentração de ADN superior a $10\text{ng}/\mu\text{l}$, e, destas, 233 amostras obtiveram concentrações acima de $50\text{ng}/\mu\text{l}$.

Observou-se que oito amostras obtiveram concentração mais elevada ($200\text{ng}/\mu\text{l}$). Estas foram processadas no ano de 2021, sujeitas ao processamento A e foram submetidas a fixação com formol até quatro dias. A fração tumoral variou entre 40% e 90% e a área tumoral entre $0,8\text{cm}^2$ e $2,5\text{cm}^2$. Destas amostras, cinco apresentavam áreas de necrose (Tabela 2).

Tabela 2 – Caracterização das amostras com quantidade mais elevada de ADN recuperado

Nº estudo	Ano	Tecido	Proc.	Fracção Tumoral (%)	Necrose (%)	Colheita	Área tumor (cm ²)	Conc ADN (ng/μl)	Intervalo Fixação (dias)
C58	2021	Cólon	A	48,1	10	EPP	0,8	200	1- 4
C59	2021	Cólon	A	51,4	0	EPP	0,8	200	1- 4
C71	2021	Cólon	A	48,2	5	EPP	2	200	1- 4
C83	2021	Cólon	A	47,8	5	EPP	1,6	200	1- 4
C92	2021	Mama	A	90	5	EPP	1	200	1- 4
C168	2021	Cólon	A	40	0	EPP	0,9	200	1- 4
C177	2021	Cólon	A	52,1	0	EPP	2,5	200	1- 4
C190	2021	Mama	A	64	5	EPP	2,1	200	1- 4

Proc. – processamento; EPP – Colheita para tubo microcentrifuga 1,5ml; Conc ADN – Concentração de ADN obtido

Quanto às amostras com concentração de ADN recuperado menor que 10ng/μl observou-se que 18 amostras foram processadas no ano de 2019 e duas no ano de 2021. Das amostras do ano de 2019, três amostras eram de cólon e 15 de mama. As três amostras de cólon foram submetidas ao processamento B. Das 15 amostras de mama, duas foram submetidas ao processamento A e 13 amostras foram submetidas ao processamento B. No que respeita ao ano de 2021, as duas amostras eram de mama, submetidas ao processamento B. A fracção tumoral destas amostras variou entre 25% e 100% e a área tumoral entre 0,1cm² e 1,5cm². Apenas três amostras apresentavam necrose. 12 amostras foram fixadas até 4 dias, quatro amostras tiveram entre 5 a 10 dias de fixação e quatro amostras foram sujeitas a mais de 11 dias de fixação (Tabela 3).

Tabela 3 – Caracterização das amostras com concentração de ADN recuperado menor que 10ng/μl

Nº Estudo	Ano	Tecido	Proc.	Fração Tumoral (%)	Necrose (%)	Colheita	Área tumor (cm ²)	Conc ADN (ng/μl)	Intervalo Fixação (dias)
A51	2019	Mama	B	80	0	MD	0,3	7,1	>11
A56	2019	Mama	B	58,8	10	EPP	0,9	8,5	>11
A88	2019	Mama	B	100	0	MD	0,2	4,6	>11
A89	2019	Mama	A	25	0	EPP	0,2	8,2	1-4
A111	2019	Cólon	B	100	0	MD	1,5	5,5	5-10
A124	2019	Mama	A	37,5	0	EPP	1,3	8,6	1-4
A167	2019	Mama	B	70	0	MD	0,4	9,3	1-4
A186	2019	Mama	B	100	0	MD	0,6	4,9	1-4
A196	2019	Mama	B	100	0	MD	0,2	8,4	5-10
A208	2019	Mama	B	30,2	5	EPP	1	9,6	1-4
A209	2019	Mama	B	100	0	MD	0,1	2,5	5-10
A217	2019	Mama	B	100	0	MD	0,5	9,3	1-4
A234	2019	Cólon	B	38,9	5	EPP	1,5	5,7	5-10
A253	2019	Cólon	B	100	0	MD	0,4	5,9	>11
A258	2019	Mama	B	36,4	0	EPP	0,4	9,2	1-4
A263	2019	Mama	B	31,3	0	EPP	0,3	3,1	1-4
A289	2019	Mama	B	100	0	MD	0,3	9	1-4
A290	2019	Mama	B	100	0	MD	0,2	3,4	1-4
C5	2021	Mama	B	90	0	MD	0,3	0,7	1-4
C39	2021	Mama	B	100	0	MD	0,3	4,9	1-4

Proc. – processamento; EPP – Colheita para tubo microcentrífuga 1,5ml; MD – Macrodissecção; Conc ADN – Concentração de ADN obtido

4.3. Integridade do ADN recuperado

A integridade do ADN recuperado foi avaliada pela presença de uma banda com 260pb que amplifica parte do gene *housekeeping β*-globina. Foi dada uma classificação para a integridade do ADN recuperado segundo a banda obtida: 1 – banda definida; 2 – banda presente; 3 – banda ausente.

As 20 amostras que não obtiveram 10ng/μl de concentração de ADN recuperado não foram avaliadas para a integridade, uma vez que esta é a quantidade mínima necessária para a execução da NGS, como proposto por Chen et al. (2015) e Goswani et al. (2016) (13,18).

Das 304 amostras de tecido TFFIP que obtiveram concentração de ADN superior a 10ng/μl, 16,8% das amostras obtiveram banda definida; 17,7% das amostras tiveram banda presente e 65,5% das amostras não apresentaram banda (Figura 5).

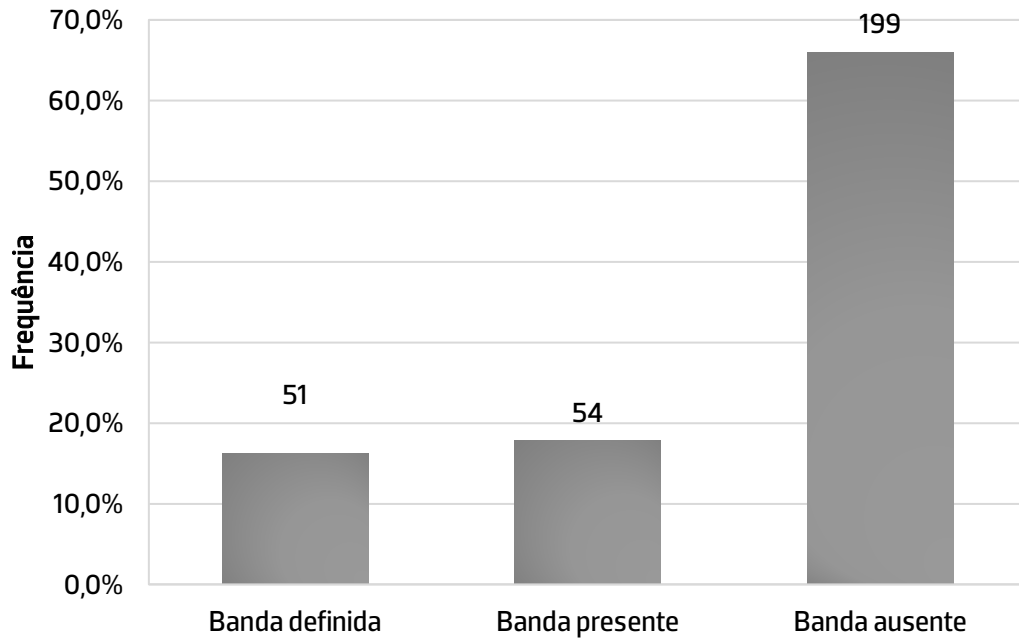


Figura 5 – Número de amostras por classificação da banda de 260pb do gene *housekeeping* β -globina

Na Figura 6 está representado o tipo de bandas que foram obtidas por eletroforese em gel de agarose a 2% da banda 260pb do gene *housekeeping* β -globina.

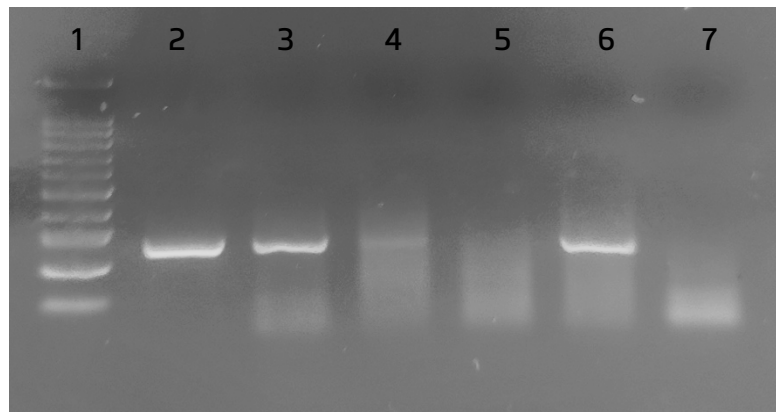


Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose a 2% da banda 260pb do gene *housekeeping* β -globina obtida das amostras TFFIP

Linha 1 – Marcador de pesos moleculares de 100pb; Linha 2 – Banda definida (1); Linha 3 – Banda definida (1); Linha 4 – Banda presente (2); Linha 5 – banda ausente (3); Linha 6 – Banda definida (1); Linha 7 – Banda ausente (3)

Estes resultados mostram que das 304 amostras avaliadas, apenas 105 amostras apresentaram uma qualidade adequada para a execução da NGS.

4.4. Fatores pré-analíticos na quantidade e qualidade do ADN recuperado

4.4.1. Duração da fixação: impacto na quantidade e qualidade do ADN recuperado

A duração de fixação das amostras foi dividida em 3 intervalos: intervalo 1) 1 a 4 dias de fixação; intervalo 2) 5 a 10 dias; intervalo 3) superior a 11 dias. O intervalo de fixação de cada amostra foi calculado a partir da data de entrada da amostra no LH e data em que foi submetida ao processamento de tecidos.

Das 324 amostras avaliadas para a quantidade de ADN recuperado, 59,0% das amostras tiveram uma duração de fixação 1 a 4 dias (intervalo 1); 22,5% das amostras foram submetidas a 5 a 11 dias de fixação (intervalo 2) e 18,5% das amostras tiveram uma fixação superior a 11 dias (intervalo 3) (Figura 7).

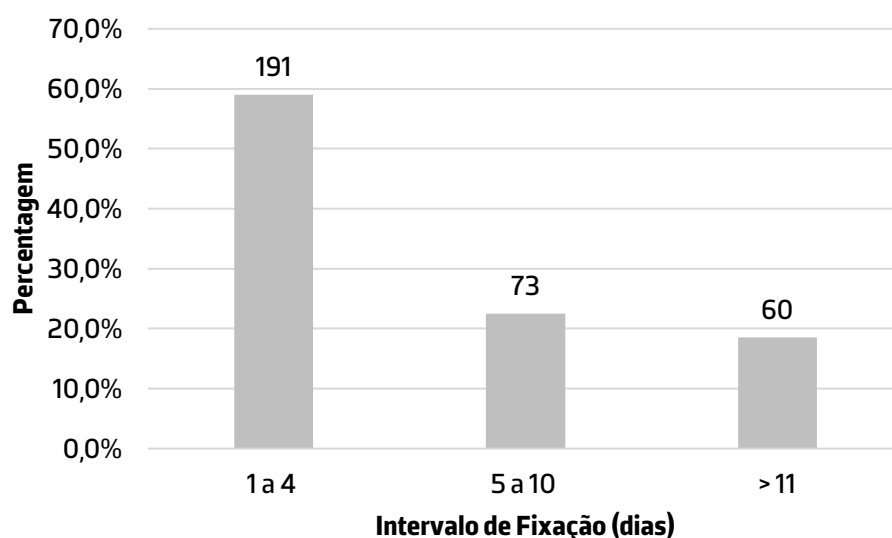


Figura 7 - Número de amostras por intervalo de fixação

A concentração média de ADN recuperado para cada intervalo foi: 104,2ng/ μ l \pm 58,8 nas amostras fixadas até 4 dias; 68,7 ng/ μ l \pm 40,7 nas amostras com 5 a 10 dias de fixação e 71,5 ng/ μ l \pm 43,7 nas amostras com mais de 11 dias de fixação (Tabela 4). A diferença entre a concentração média do intervalo de 1 a 4 dias de fixação e do intervalo 5 a 10 dias foi de 35,3 ng/ μ l, e entre o intervalo superior a 11 dias foi 32,7ng/ μ l. Existe uma diferença estatisticamente significativa entre a média de concentração de ADN recuperado nas amostras com fixação entre 1 a 4 dias e a média de ADN recuperado nas amostras fixadas durante 5 a 10 dias e mais de 11 dias (teste *Scheffé* p-value <0,001). Entre os intervalos 5 a 10 dias de fixação e mais de 11 dias de fixação não

houve diferenças estatisticamente significativas (teste *Scheffé* p -value > 0,05) (Tabela 4). Efetivamente, houve uma redução de cerca de 30% na concentração de ADN recuperado das amostras com fixação entre 5 a 10 dias e com fixação superior a 11 dias quando comparada com a concentração média obtida das amostras com 1 a 4 dias de fixação (Figura 8).

Tabela 4 - Concentração ADN recuperado em função dos intervalos de fixação

	Intervalo de fixação (dias)		
	1 a 4	5 a 10	>11
n	191	73	60
Concentração (ng/□l)			
Média	104,2±58,8	68,7±40,7	71,5±43,7
Mínima	0,7	2,5	4,6
Máxima	200	190	164
Diferença da concentração média (ng/□l)			
1 a 4 dias de fixação		35,3	32,7
5 a 10 dias de fixação	-35,3		-2,6
>11 dias de fixação	-32,7	2,6	
Intervalo de confiança 95%			
1 a 4 dias de fixação		[17,5;53,0]	[13,6; 51,8]
5 a 10 dias de fixação	[-53,1; -17,5]		[-25,1;20,0]
>11 dias de fixação	[-51,8; -13,6]	[-20,0; 25,1]	
<i>p</i>-value (Teste <i>Kruskal-Wallis</i>)		<0,001*	
<i>p</i>-value (Teste <i>Scheffé</i>)			
1 a 4 dias de fixação		<0,001*	<0,001*
5 a 10 dias de fixação	<0,001*		>0,05
>11 dias de fixação	<0,001*	>0,05	

*Teste *Kruskal-Wallis* p -value <0,001 – Existe diferença estatisticamente significativa entre as médias dos 3 intervalos de fixação para um intervalo de confiança de 95%

*Teste *Scheffé* p -value <0,001 – Existe uma diferença estatisticamente significativa, para um intervalo de confiança de 95%, entre a concentração média de ADN recuperado nas amostras fixadas de 1 a 4 dias quando comparada com a média de concentrações das amostras sujeitas a uma fixação entre 5 a 10 dias e superior a 11 dias de fixação

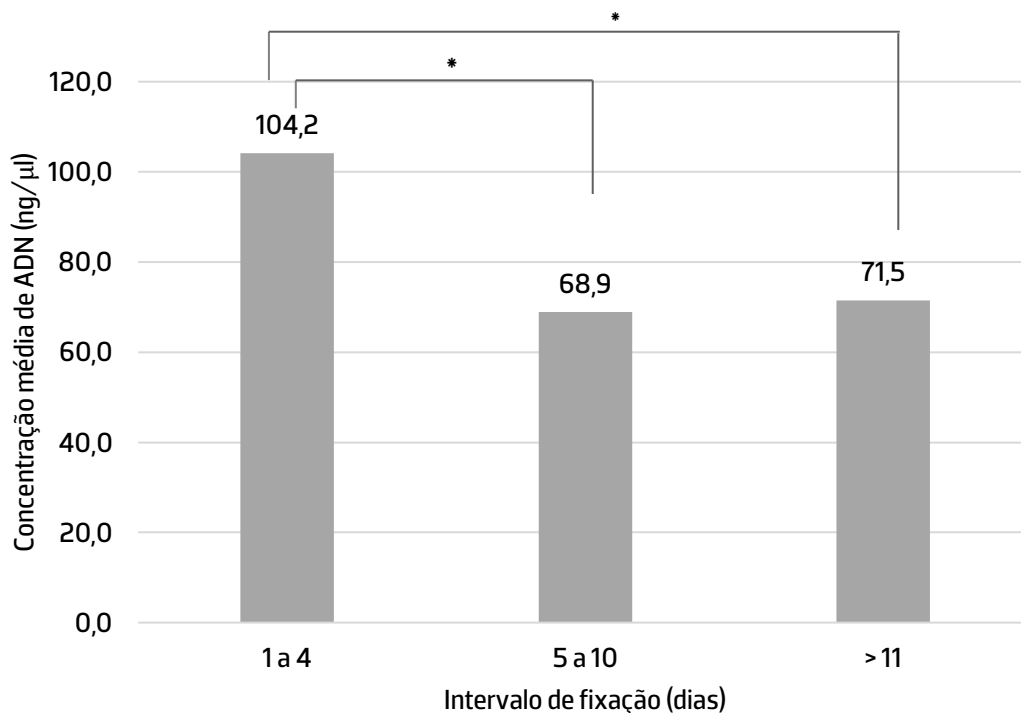


Figura 8 - Relação entre a concentração média de ADN recuperado e os intervalos de fixação

*Teste *Scheffé* p -value < 0,001 - Existe uma diferença estatisticamente significativa, para um intervalo de confiança de 95%, entre a concentração média de ADN obtida das amostras fixadas de 1 a 4 dias quando comparada com a média de concentrações das amostras sujeitas a uma fixação entre 5 a 10 dias e com mais de 11 dias de fixação

No que concerne à integridade do ADN recuperado de TFFIP, das 304 amostras avaliadas, 179 amostras tiveram uma duração de fixação até 4 dias; 69 amostras de 5 a 10 dias de fixação e 56 amostras mais de 11 dias de fixação.

Das amostras com duração de fixação de 1 a 4 dias, 26,2% das amostras apresentavam banda definida; 21,8% das amostras banda presente e em 52% das amostras não se observou banda. Nas amostras com 5 a 10 dias de fixação, 2,9% das amostras tiveram banda definida; 7,2% das amostras apresentaram banda presente e 89,9% das amostras não apresentavam banda. Nas amostras sujeitas a uma fixação com mais de 11 dias, em 3,6% das amostras observaram-se bandas definidas; 17,9% das amostras tinham banda presente e 78,6% das amostras não obtiveram banda (Tabela 5). Existe uma relação estatisticamente significativa entre a duração da fixação e a integridade do ADN recuperado (Teste χ^2 p -value < 0,001) (Tabela 5). De facto, observou-se que em todos os intervalos de fixação mais de 50% das amostras apresentam banda ausente. Apesar disso, no intervalo de 1 a 4 dias de fixação 83 amostras apresentaram banda definida ou presente comparativamente com 7 amostras no intervalo de 5 a 10 dias de fixação e 12 amostras no intervalo superior a 11 dias de fixação (Figura 9).

Tabela 5 – Relação da classificação das bandas com 260pb do gene *housekeeping* β -globina obtidas do ADN recuperado com os intervalos de fixação

Intervalos de fixação (dias)	n	Banda			p-value
		Definida	Presente	Ausente	
1 a 4	179	26,2% (n=47)	21,8% (n=39)	52,0% (n=93)	<0,001*
5 a 10	69	2,9% (n=2)	7,2% (n=5)	89,9% (n=62)	
> 11	56	3,5% (n=2)	17,9% (n=10)	78,6% (n=44)	

*Teste χ^2 p-value <0,001 - Existe uma relação estatisticamente significativa, ao nível de 0,05, entre a integridade de ADN recuperado das amostras e a duração da fixação

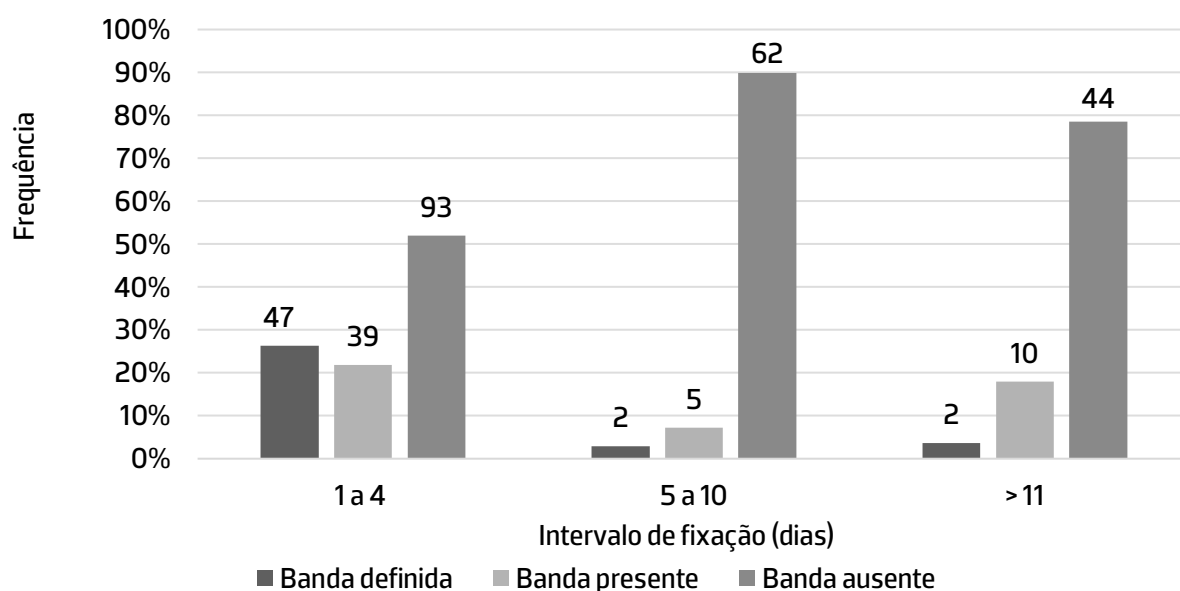


Figura 9 – Número de tipo de bandas com 260pb do gene *housekeeping* β -globina obtidas do ADN recuperado por intervalo de fixação

O número de bandas definidas e presentes no intervalo de 1 a 4 dias de fixação é superior ao número de bandas definidas e presentes no intervalo de 5 a 10 dias de fixação e ao intervalo superior a 11 dias de fixação

Estes resultados sugerem que uma fixação superior a 4 dias tem um impacto negativo tanto na quantidade como na qualidade do ADN recuperado de TFFIP.

4.4.2. Tipo de processamento de tecidos na qualidade e quantidade de ADN recuperado

Para estudar se o tipo de processamento de tecidos teria impacto na concentração de ADN recuperado para estudos moleculares, foram selecionadas amostras submetidas a dois protocolos diferentes de processamento: processamento A e processamento B.

Das 324 amostras, 125 amostras foram sujeitas ao processamento A e 199 amostras ao processamento B.

A média da concentração de ADN recuperado das amostras sujeitas ao processamento A foi $122,6\text{ng}/\mu\text{l}\pm 49,7$ enquanto que das amostras processadas pelo protocolo B foi de $69,8\text{ng}/\mu\text{l}\pm 48,0$. Existe uma diferença estatisticamente significativa entre a concentração de ADN recuperado das amostras sujeitas ao processamento A e ao processamento B (Teste t p -value $<0,001$) (Tabela 6). De facto, as amostras sujeitas ao processamento A tiveram uma concentração média de ADN recuperado cerca de 50% superior quando comparada com a concentração média de ADN obtido nas amostras processadas com o processamento B e essa diferença foi de $52,8\text{ng}/\mu\text{l}$ (Figura 10).

Tabela 6 - Concentração ADN recuperado em função do tipo de processamento

	Processamento	
	A	B
n	125	199
Concentração de ADN (ng/□l)		
Média	$122,6\pm 49,7$	$69,8\pm 48,0$
Mínima	8,2	0,7
Máxima	200	190
Diferença da concentração de ADN média (ng/□l)	52,8	
Intervalo de confiança 95%	[41,9;63,8]	
<i>p</i> -value (Teste t)	$<0,001^*$	

*Teste t p -value $<0,001$ - Existe uma diferença estatisticamente significativa, para um intervalo de confiança de 95%, entre a concentração de ADN obtido das amostras submetidas ao processamento A e as amostras processadas com o processamento B

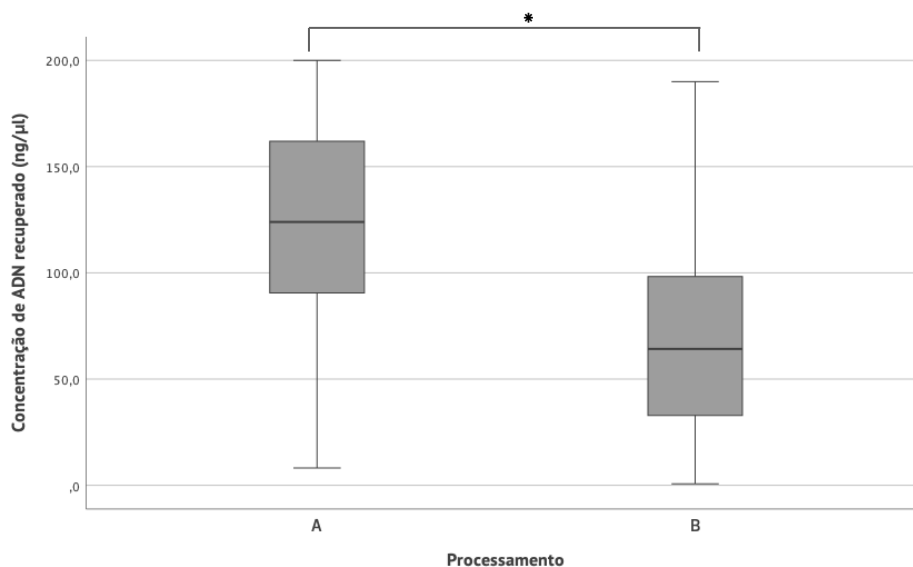


Figura 10 - Relação entre concentração de ADN recuperado e tipo de processamento

* Teste t p -value < 0,001 - Existe uma diferença estatisticamente significativa, para um intervalo de confiança de 95%, entre a concentração de ADN obtido das amostras submetidas ao processamento A e as amostras processadas com o processamento B

Em relação à avaliação da integridade do ADN recuperado (204 amostras) 124 amostras foram sujeitas ao processamento A e 180 amostras foram submetidas ao processamento B. Nas amostras sujeitas ao processamento A, 35,5% das amostras apresentaram bandas definidas, 25,8% bandas presentes e 38,7% amostras não apresentaram banda. Por outro lado, das amostras submetidas ao processamento B observou-se bandas definidas em 3,9% das amostras, bandas presentes em 12,2% das amostras e em 83,9% das amostras não se observou banda (Tabela 7). Existe uma relação estatisticamente significativa entre a integridade do ADN obtido e o tipo de processamento (Teste χ^2 p -value < 0,001) (Tabela 7). As amostras sujeitas ao processamento B apresentaram maior frequência de ausência de banda, do que aquelas submetidas ao processamento A (Figura 11), o que sugere que o ADN recuperado das primeiras poderá estar mais degradado.

Tabela 7 - Relação da classificação das bandas com 260pb do gene *housekeeping* β -globina obtidas do ADN recuperado com o tipo de processamento

processamento	n	Banda			p -value
		Definida	Presente	Ausente	
A	124	35,5% (n=44)	25,8%(n=32)	38,7% (n=48)	<0,001*
B	180	3,9% (n=7)	12,2% (n=22)	83,9% (n=151)	

* Teste χ^2 p -value < 0,001 - Existe uma relação estatisticamente significativa, ao nível de 0,05, entre a integridade do ADN obtido das amostras e o tipo de processamento

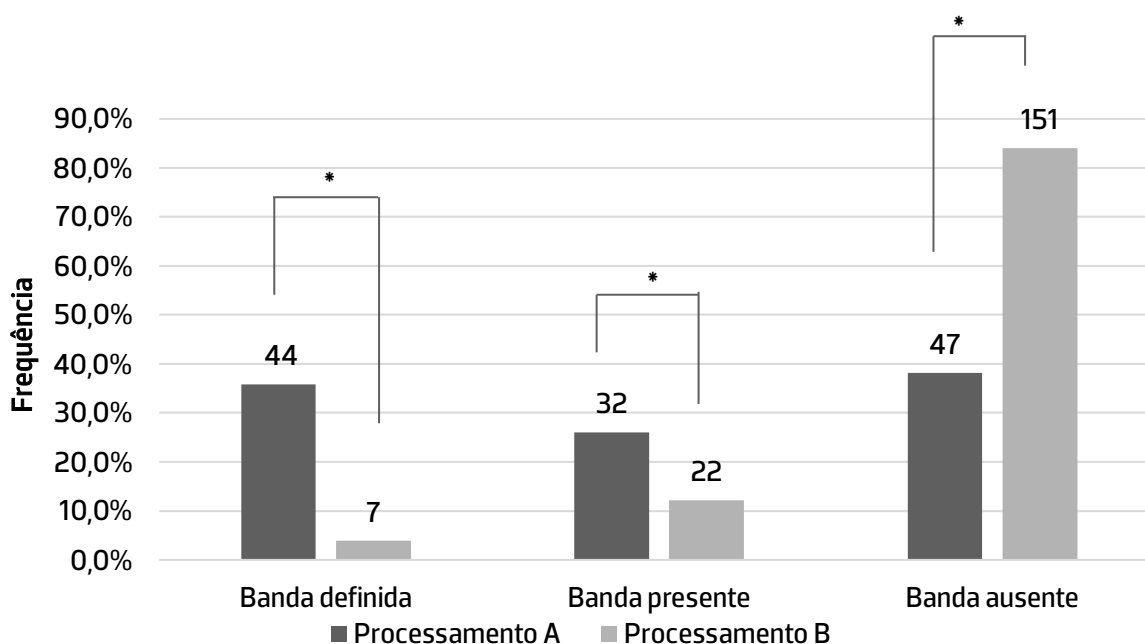


Figura 11 – Frequência da classificação das bandas com 260pb do gene *housekeeping* β -globina obtidas do ADN recuperado e tipo de processamento

* O número de bandas definida e presentes nas amostras sujeitas ao processamento A é superior ao número de bandas definida e presentes nas amostras sujeitas ao processamento B

Estes resultados sugerem que o processamento A permitiu recuperar ADN em maior quantidade e qualidade do que o processamento B.

4.4.3. Área tumoral: impacto na quantidade de ADN recuperado mas não na qualidade

A média da área tumoral das 324 amostras TFFIP foi de $1,3\text{cm}^2 \pm 0,88$ (mín. $0,1\text{cm}^2$ e máx. $4,8\text{cm}^2$). Existem evidências estatísticas significativas para se afirmar que a área tumoral e a concentração de ADN obtido de TFFIP estão relacionadas ($r=0,357$; $p\text{-value}<0,001$) (Tabela 8). De facto, verificou-se que existe uma relação fraca e direta entre as duas, havendo, assim, uma ligeira tendência para a concentração de ADN aumentar com o aumento da área tumoral (Figura 12).

Tabela 8 – Concentração ADN recuperado em função da área tumoral

n	Concentração média (ng/ \square)	Área tumoral (cm^2)		Correlação de Pearson (r)	p-value
324	$90,2 \pm 55,0$	Média	$1,3 \pm 0,88$	0,357	<0,001*
		Mínima	0,1		
		Máxima	4,8		

* $r=0,357$; $p\text{-value}<0,001$ - Existe relação estatisticamente significativa, ao nível de 0,05, entre a concentração de ADN recuperado e a área tumoral das amostras

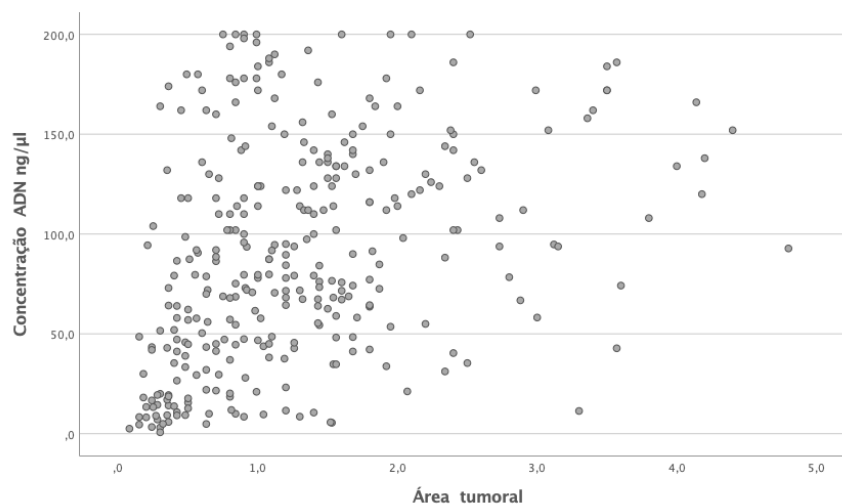


Figura 12 – Gráfico de dispersão entre a área tumoral e a concentração de ADN recuperado

Relativamente à integridade do ADN recuperado, a média da área tumoral nas 304 amostras estudadas foi de $1,3\text{cm}^2 \pm 0,9$ (mín. $0,2\text{cm}^2$; máx. $2,5\text{cm}^2$). Nas amostras que tiveram banda definida a área tumoral variou entre $0,2$ e $4,0\text{cm}^2$; nas amostras com banda presente a área tumoral variou entre $0,2\text{ cm}^2$ e $4,2\text{cm}^2$ e nas amostras sem banda a área tumoral variou entre $0,2\text{cm}^2$ e $4,8\text{cm}^2$ (Tabela 9). Não se observaram diferenças estatísticas significativas entre a área tumoral das amostras e a qualidade do ADN recuperado (Teste *Kruskal-Wallis* $p\text{-value} > 0,05$).

Tabela 9 – Área tumoral em relação com o tipo de banda com 260pb do gene *housekeeping*β-globina obtidas do ADN recuperado

n	Área tumoral (cm ²)		Área tumoral (cm ²) por tipo de banda			p-value
			Definida (n= 51)	Presente (n=54)	Ausente (n=199)	
304	Média	$1,3 \pm 0,9$	$1,4 \pm 0,9$	$1,5 \pm 1,1$	$1,3 \pm 0,8$	>0,05
	Mínima	0,2	0,2	0,2	0,2	
	Máxima	2,5	4	4,2	4,8	

Teste *Kruskal-Wallis* $p\text{-value} > 0,05$ - Não existem evidências estatísticas entre a área tumoral das amostras e a qualidade do ADN recuperado

Estes resultados sugerem que a concentração de ADN recuperado de TFFIP é superior nas amostras com áreas tumorais maiores. O mesmo não acontece para a integridade, não sendo influenciada pelo tamanho da área tumoral.

4.4.4. Necrose abaixo dos 20% não tem impacto na quantidade e qualidade do ADN recuperado

A percentagem de necrose foi calculada através da observação das lâminas coradas por HE no microscópio ótico. Das 324 amostras de tecido TFFIP, 210 amostras não apresentavam focos de necrose; 50 amostras apresentavam 5% de necrose; 37 amostras tinham 10% de necrose; 14 amostras possuíam 15% de necrose e 13 amostras apresentavam 20% de necrose. A média das concentrações de ADN recuperado das amostras sem necrose foi $86,9\text{ng}/\mu\text{l}\pm 55,4$; as amostras com 5% de necrose tiveram uma média de $107\text{ng}/\mu\text{l}\pm 55,1$; as amostras com 10% de necrose obtiveram $91,8\text{ng}/\mu\text{l}\pm 50,0$ de concentração média; as amostras com 15% de necrose apresentaram uma média de $92,3\text{ng}/\mu\text{l}\pm 61,7$ de concentração e as amostras com 20% necrose obtiveram $72,3\text{ng}/\mu\text{l}\pm 13,0$ de concentração média. Não existe impacto estatisticamente significativo entre a percentagem de necrose e a concentração de ADN recuperada dos TFFIP (Teste *Kruskal-Wallis* $p\text{-value}>0,05$) (Tabela 10).

Tabela 10 - Concentrações do ADN recuperado em relação com a percentagem de necrose

Necrose (%)	n	Concentração ADN (ng/ μl)			<i>p-value</i>
		Média	Mínima	Máxima	
0	210 (64,8%)	$86,9\pm 55,4$	0,7	200	>0,05
5	50 (15,4%)	$107\pm 55,1$	5,7	200	
10	37 (11,4%)	$91,8\pm 50,0$	8,5	200	
15	14 (4,3%)	$92,3\pm 61,7$	10,6	186	
20	13 (4,0%)	$72,3\pm 13,0$	10,8	160	

Teste *Kruskal-Wallis* $p\text{-value} > 0,05$ - Não existe impacto estatisticamente significativo entre a % de necrose e a concentração de ADN recuperada dos TFFIP

No que diz respeito à integridade do ADN recuperado (304 amostras) das 194 amostras sem focos de necrose, 32 amostras obtiveram banda definida; 26 amostras apresentaram banda presente e 136 não obtiveram banda. No que concerne às amostras com 5% de necrose (47 amostras), sete amostras obtiveram banda definida; 10 amostras apresentavam banda presente e em 30 amostras a banda estava ausente. Em relação às amostras com 10% de necrose (36 amostras), cinco amostras obtiveram banda definida, sete amostras tinham banda presente e 24 amostras não obtiveram banda. Das 14 amostras com 15% de necrose, apenas duas obtiveram banda definida, enquanto cinco obtiveram banda presente e em sete a banda estava ausente. Em

relação às amostras com 20% de necrose (13 amostras), três amostras tiveram banda definida, seis amostras apresentavam banda presente, enquanto que quatro não apresentaram banda. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados (teste χ^2 ; p -value >0,05) (Tabela 11).

Tabela 11 - Relação da classificação das bandas com 260pb do gene *housekeeping* β -globina obtidas do ADN recuperado com as percentagens de necrose

Necrose %	n	Banda			<i>p</i> -value
		Banda definida	Banda presente	Banda ausente	
0	194	16,5% (n=32)	13,4% (n=26)	70,1% (n=136)	>0,05
5	47	14,9% (n=7)	21,3% (n=10)	63,8% (n=30)	
10	36	13,9% (n=5)	19,4% (n=7)	66,7% (n=24)	
15	14	14,3% (n=2)	35,7% (n=5)	50% (n=7)	
20	13	23,1% (n=3)	46,2% (n=6)	30,7% (n=4)	

Teste χ^2 p -value >0,05 – Não existe relação estatisticamente significativa entre a integridade de ADN recuperado e a percentagem de necrose presente nos TFFIP

Estes resultados sugerem que percentagens de necrose presentes nas amostras de TFFIP que variem entre 5% a 20% não têm impacto na quantidade de ADN recuperado nem na sua qualidade.

4.4.5. Tempo no arquivo dos blocos de parafina e o seu impacto na quantidade e qualidade do ADN recuperado

O tempo no arquivo dos blocos de parafina incidiu nos anos de 2019 e de 2021. Das 324 amostras, 217 amostras eram do ano de 2019 e 107 amostras de 2021.

A média de concentração de ADN recuperado dos TFFIP no ano de 2019 foi de 77,2ng/ μ l \pm 49,1 e no ano de 2021 de 116,4ng/ μ l \pm 57,2, e a diferença entre concentrações médias foi de 39,2ng/ μ l. Existe uma diferença estatisticamente significativa entre as médias de concentração ADN recuperado nas amostras dos dois anos em estudo, 2019 e 2021 (Teste t p -value <0,001) (Tabela 12 e Figura 13).

Tabela 12 – Concentração do ADN recuperado em relação aos anos de arquivo

	Ano de arquivo	
	2019	2021
n	217	107
Concentração (ng/□l)		
Média	77,2±49,1	116,4±57,2
Mínima	2,5	0,7
Máxima	196	200
Diferença da concentração média (ng/□l)	39,2	
Intervalo de confiança 95%	[27,2; 51,3]	
p-value (Teste t)	< 0,001*	

*Teste *t p-value* <0,001– Existe uma diferença estatisticamente significativa, para um intervalo de confiança de 95%, entre as concentrações do ADN recuperado entre os dois anos de arquivo

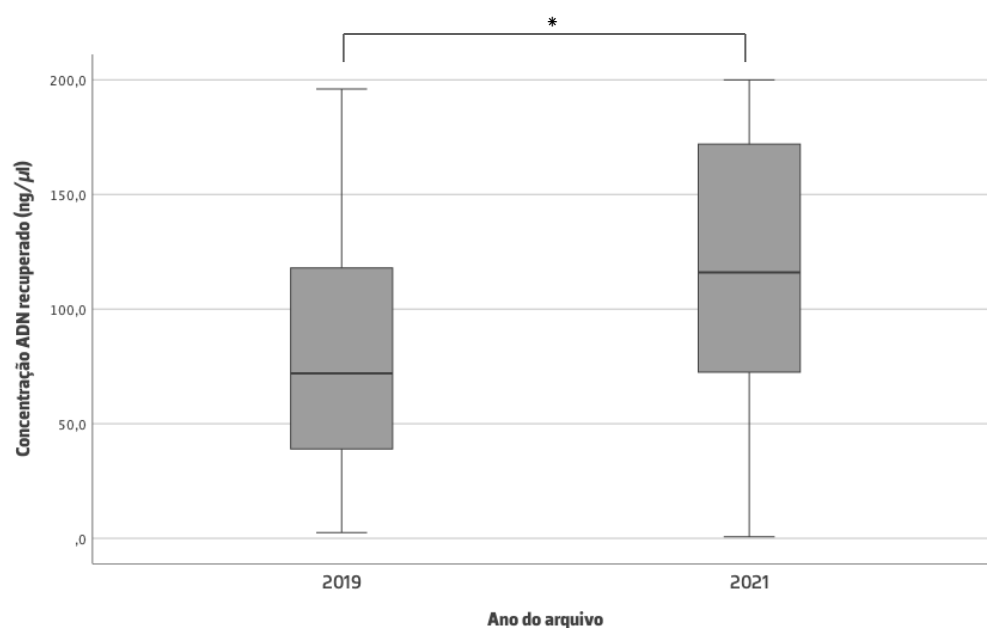


Figura 13 – Concentração do ADN recuperado em relação aos anos de arquivo

*Teste *t p-value* < 0,001 – Existe uma diferença estatisticamente significativa, para um intervalo de confiança de 95%, entre as concentrações do ADN recuperado entre os dois anos de arquivo

Das 304 amostras avaliadas para a integridade do ADN recuperado, 199 amostras eram do ano de 2019 e 105 amostras do ano de 2021. Das 199 amostras do ano 2019, 15,6% das amostras obtiveram banda definida; 18,6% das amostras apresentaram banda presente e 65,8% das amostras não obtiveram banda. Nas amostras do ano 2021, 19,0% das amostras obtiveram banda definida; 16,2% das amostras apresentavam banda presente e 64,8% das amostras não apresentavam banda. Não existem evidências estatísticas para se afirmar que a integridade do

ADN recuperado e o tempo de arquivo das amostras de tecido TFFIP estão relacionadas (Teste χ^2 p -value > 0,05) (Tabela 13).

Tabela 13 - Relação da classificação das bandas com 260pb do gene *housekeeping* β -globina obtidas do ADN recuperado com os anos de arquivo

Ano de arquivo	N	Banda			p -value
		Definida	Presente	Ausente	
2019	199	15,6% (n=31)	18,6% (n=37)	65,8% (n=131)	>0,05
2021	105	19% (n=20)	16,2% (n=17)	64,8% (n=68)	

Teste χ^2 p -value > 0,05 - Não existem evidências estatísticas para se afirmar que a integridade do ADN recuperado e o tempo de arquivo das amostras de tecido TFFIP estão relacionadas

Estes resultados sugerem que o tempo de arquivo tem impacto na quantidade de ADN recuperado das amostras. Quanto à qualidade do ADN recuperado esta não é influenciada pelo tempo de arquivo.

4.4.6. Tipo de tecido pode impactar a quantidade e qualidade do ADN recuperado

A escolha das amostras TFFIP incidiu sobre tecido tumoral de cólon e mama. Das 324 amostras, 133 eram de cólon e 191 de mama.

A média da concentração de ADN recuperado das amostras de tecido de cólon foi de 112,6ng/ μ l \pm 50,1 e a concentração de ADN recuperado das amostras de mama foi de 74,6ng/ μ l \pm 53,0. Existem evidências estatísticas para se afirmar que as médias de concentração do ADN recuperado das amostras TFFIP de cólon são diferentes da média de concentração de ADN obtida a partir das amostras de mama (Teste t p -value < 0,001) (Tabela 14). De facto, houve uma diferença de 38,0ng/ μ l entre a concentração de ADN recuperado a partir das amostras de cólon e das de mama (Figura 14).

Tabela 14 - Relação da concentração do ADN recuperado com o tipo de tecido

	Tipo de tecido	
	Cólon	Mama
n	133	191
Concentração (ng/□l)		
Média	112,6±50,1	74,6±53,0
Mínima	5,5	0,7
Máxima	200	200
Diferença da concentração média (ng/□l)	38,0	
Intervalo de confiança 95%	[26,4; 49,5]	
<i>p</i>-value (Teste <i>t</i>)	< 0,001*	

* Teste *t p*-value < 0,001 - Existe uma diferença estatisticamente significativa, para um intervalo de confiança de 95%, entre as concentrações do ADN recuperado entre os dois tipos de tecido

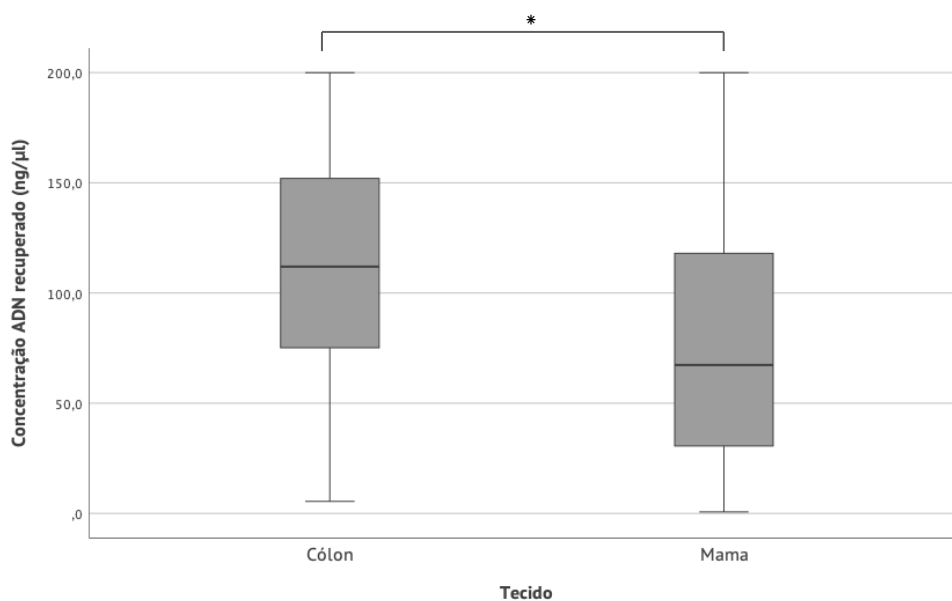


Figura 14 - Concentração de ADN recuperado em relação com tipo de tecido

* Teste *t p*-value < 0,001 - As concentrações de ADN recuperado das amostras de cólon são diferentes da concentração de ADN obtido a partir das amostras de mama

Relativamente à integridade de ADN recuperado, 130 amostras eram de cólon e 174 amostras eram de mama, perfazendo um total de 304 amostras. Das 130 amostras de cólon, 21,6% das amostras obtiveram banda definida; 19,2% das amostras apresentavam banda presente e 59,2% das amostras não apresentavam banda. Em relação às amostras de mama, 12,0% de amostras apresentaram banda definida; 16,7% amostras obtiveram banda presente e 71,3% das amostras não apresentavam banda (Tabela 15). Existe uma relação estatisticamente significativa entre a integridade do ADN recuperado das amostras de tecido TFFIP e o tipo de tecido (Teste χ^2 p -value < 0,05) (Tabela 15). Efetivamente, as amostras de cólon apresentaram quase o dobro da percentagem de bandas definidas quando comparada com a percentagem de bandas definidas nas amostras de mama.

Tabela 15 - Relação da classificação das bandas com 260pb do gene *housekeeping* β -globina obtidas do ADN recuperado com o tipo de tecido

Tipo de tecido	N	Banda			<i>p</i> -value
		Definida	Presente	Ausente	
Cólon	130	21,6% (n=28)	19,2% (n=25)	59,2% (n=77)	0,043**
Mama	174	12,0% (n=21)	16,7% (n=29)	71,3% (n=124)	

**Teste χ^2 p -value = 0,043 < 0,05 – existe uma relação estatisticamente significativa, ao nível 0,05, entre a integridade do ADN recuperado e o tipo de tecido

Estes resultados sugerem que o tipo de tecido tem impacto na quantidade e qualidade de ADN recuperado.

5. Discussão

No estado de arte em que a medicina oncológica atualmente se encontra, de terapia de precisão e medicina personalizada, a avaliação molecular dos tumores malignos tornou-se cada vez mais importante. A NGS é uma tecnologia de sequenciação massiva de alta execução que tem a capacidade de rastrear simultaneamente diferentes tipos de variantes em múltiplos genes e em múltiplas amostras e que necessita de pequenas quantidades de material genético. Por este motivo foi rapidamente implementada na área da medicina oncológica com o propósito de contribuir para o diagnóstico, prognóstico e orientação terapêutica. Os TFFIP são a fonte de material genético de tumores sólidos mais utilizada para a análise molecular por NGS (12,18,37). Estes apresentam algumas vantagens em relação aos tecidos frescos congelados, nomeadamente serem de fácil manuseio, apresentarem baixo custo de armazenamento a longo prazo e permitirem o estudo retrospectivo, possibilitando avaliar características histológicas do cancro, incluindo lesões pré-cancerosas (41,46). No entanto, a quantidade e qualidade dos ácidos nucleicos extraídos dos TFFIP é variável e depende de vários fatores pré-analíticos, o que pode impactar os resultados da NGS (2,11,12,36,38–41). Uma quantidade e qualidade insuficiente de ácidos nucleicos pode levar a falhas na preparação da biblioteca e levar a uma baixa profundidade de leitura (24). Por conseguinte, é de extrema importância assegurar que o ADN obtido dos TFFIP seja suficiente e de boa qualidade antes da análise por NGS (50).

Neste estudo foi feita a avaliação da quantidade e qualidade do ADN recuperado de 324 TFFIP de amostras tumorais de mama e cólon, colhidos nos anos de 2019 e de 2021, fixados com intervalos de tempo diferentes e processados com dois protocolos distintos. O estudo iniciou-se com a avaliação da quantidade e qualidade de ADN recuperado. Observou-se que das 324 amostras TFFIP avaliadas neste estudo, 304 (93,8%) amostras obtiveram concentração igual ou superior a 10 ng/ μ l, atingindo assim a quantidade mínima necessária para NGS, de acordo com o proposto por Singh et al. (2014) e Goswani et al (2016) (18,51).

Em relação à avaliação da qualidade do ADN recuperado das 304 amostras analisadas, no presente estudo, 105 (34,5%) amostras apresentaram integridade adequada para a execução da NGS.

Tal como referido anteriormente, os fatores pré-analíticos têm impacto na quantidade e qualidade do ADN recuperado de amostras TFFIP. Este trabalho teve como objetivo avaliar qual o impacto destes fatores no contexto do LH e do LBM do IPOC. Foram avaliados a duração de

fixação, o tipo de processamento, o tempo de arquivo dos blocos de parafina e área, fração e viabilidade tumoral.

O primeiro fator que foi avaliado foi a duração da fixação. As amostras ressecadas são enviadas para o LH a fresco. O tempo que decorre desde a ressecção até serem colocadas no fixador corresponde ao tempo de isquemia a que o tecido está sujeito. Este tempo não é controlado pelo laboratório, uma vez que o transporte da amostra depende do serviço onde foi executada a ressecção do tecido. A amostra depois de recebida no laboratório é então preparada para a fixação.

A fixação é um processo químico e físico pelo qual as células do tecido são fixadas para que possam resistir a qualquer alteração morfológica, distorção ou decomposição. O formaldeído tamponado a 10% é o fixador mais utilizado na histopatologia, para a preservação da morfologia tecidular. A fixação com formaldeído provoca danos no ADN (9,52–54). Estas reações podem comprometer a obtenção de ADN com quantidade e de qualidade adequada para estudos moleculares (24).

A fixação tem que ter a duração necessária para que o tecido esteja em boas condições para as análises morfológicas e moleculares (10). Uma fixação incompleta pode levar a uma maior fragmentação do ADN. Se a fixação for em excesso, esta pode resultar num *crosslinking* mais extenso, o que compromete a obtenção de ADN (9,31,52). A duração da fixação depende do tipo de tecido e do tamanho da amostra a fixar. Em amostras mais pequenas, como biópsias por agulha fina, o tempo de fixação ideal será 6h, no entanto, em peças mais complexas a fixação ideal poderá ir até 3 dias (17,19,20). No laboratório de histologia do IPOC a fixação pode ir de 24h até mais de 11 dias de fixação, dependendo do tipo de amostra, do seu tamanho e do tipo de tecido. Neste estudo foi avaliado o impacto da duração da fixação na quantidade e integridade de ADN recuperado dos TFFIP nas amostras selecionadas. Observou-se que uma fixação superior a 4 dias impactava tanto na quantidade como na qualidade do ADN recuperado. De facto, nas amostras com fixação por períodos mais prolongados a concentração média de ADN recuperado foi reduzida em cerca de um terço. De igual modo, em relação à qualidade observou-se uma diminuição nas amostras submetidas a um tempo de fixação mais longo. Os resultados obtidos estão em alinhamento com os reportados por outros autores (41,55–58). Todorović et al. (2020) comparam a quantidade e a integridade de ADN recuperado de diferentes tecidos saudáveis que foram fixados por diferentes períodos. A quantidade e a integridade de ADN diminuiu em todos os tecidos avaliados com o aumento do tempo da fixação (56). Nam et al. (2014) fizeram a

comparação da integridade entre tecidos tumorais, fixadas por períodos que variaram de 3 a 180 dias. Os resultados mostraram que a integridade do ADN obtido diminuiu com o aumento do tempo da fixação (58).

Após a fixação, as amostras são submetidas ao processamento de tecidos. Este processo compreende três fases: desidratação, diafanização e impregnação (19,20).

A desidratação consiste na remoção das moléculas de água do tecido. Na rotina laboratorial, o agente desidratante usualmente utilizado é o álcool etílico. O tempo de desidratação é importante, uma vez que, uma desidratação incompleta pode levar à degradação molecular dos tecidos devido à hidrólise e uma desidratação em excesso pode levar à retração dos tecidos. (19)

A diafanização consiste na remoção do agente desidratante para facilitar a impregnação da parafina no tecido. Esta etapa é de extrema importância, uma vez que o meio de impregnação não é miscível com o álcool. Desta forma, é fundamental a completa remoção deste agente do interior dos tecidos, para que a preservação das macromoléculas seja adequada (19,20). O agente diafanizador mais utilizado na rotina histológica é o xilol. No entanto, este é altamente tóxico, o que levou à procura de novos agentes diafanizadores, como o isopropanol (29).

A impregnação tem como objetivo providenciar um meio de suporte que seja adequado para fornecer a rigidez adequada ao tecido (20). O agente impregnador utilizado na rotina histológica é a parafina. A impregnação deve ser completa de modo a remover o diafanizador dos tecidos. Uma impregnação incompleta leva a que os tecidos se tornem quebradiços e uma impregnação em excesso leva a uma retração do tecido (19).

No LH do IPOC, existem dois protocolos de processamento de tecidos. Neste estudo, estes processamentos foram designados processamento A e processamento B. No processamento A a desidratação é feita com álcool etílico, a diafanização com xilol e a impregnação com parafina a 62°C. No processamento B a desidratação é feita com álcool etílico, a diafanização com isopropanol e a impregnação com parafina a 70°C nos primeiros passos da impregnação e a 65°C nos últimos.

Neste estudo foi avaliado o impacto que os dois tipos de processamento poderiam ter na quantidade e qualidade de ADN recuperado dos TFFIP. Os resultados obtidos mostraram uma redução de quase 50% na quantidade de ADN recuperado quando as amostras foram submetidas ao processamento B. Resultados semelhantes foram obtidos aquando da avaliação da integridade do ADN. No seu conjunto, os resultados deste estudo mostraram que nas

amostras sujeitas ao processamento A obtiveram-se melhores resultados, ou seja, foi recuperada maior quantidade de ADN com melhor qualidade.

Em ambos os processamentos é utilizado como agente desidratante álcool etílico, num primeiro passo a 70% e nos restantes a 99,9%. No entanto, enquanto que no processamento A o agente diafanizador é o xilol, no processamento B é o isopropanol. Estes dois processamentos também diferem no passo da impregnação: no processamento A este é feito com parafina a 62°C, enquanto que no processamento B a temperatura da parafina varia entre 70°C e 65°C.

Neste estudo, a diferença de resultados do ADN recuperado, tanto na quantidade como na qualidade, pode ser devida à utilização de agentes diafanizadores diferentes, bem como à diferença de temperatura da parafina durante a impregnação.

Foram feitos estudos para avaliar se existiam diferenças entre a morfologia de tecidos processados com xilol e isopropanol (28,29,59). Smith et al. (2008) avaliou critérios de qualidade quer a nível de processamento, como de microtomia e coloração por HE em amostras de tecido submetidas a processamento com xilol ou com isopropanol. Os resultados que este autor obteve foram semelhantes para os dois tipos de processamento (59). De modo semelhante, no LH do IPOC no que diz respeito à imunohistoquímica em TFFIP processados pelos dois protocolos, também não foram observadas diferenças na marcação das proteínas entre os tecidos processados pelos dois protocolos (resultados não publicados). No entanto, Caramelo et al. (2023) tiveram resultados diferentes quando avaliaram a expressão do anticorpo PD-L1 por imunohistoquímica. Estes autores, demonstraram que as amostras de tecido sujeitas a um processamento que usa como diafanizador isopropanol tinham uma menor intensidade de marcação e menor percentagem de casos positivos para PD-L1, do que as amostras sujeitas a um processamento que utiliza como diafanizador o xilol (60). O isopropanol altera o enovelamento de proteínas e pode comprometer a disponibilidade e locais de ligação do anticorpo o que pode explicar a marcação mais fraca (61). A utilização de isopropanol no processamento de tecidos está associado à utilização de equipamentos com tecnologia de vácuo e aquecimento (62). O isopropanol finaliza a desidratação iniciada pelo álcool absoluto com recurso a temperaturas elevadas, sendo evaporado dos tecidos para permitir a impregnação pela parafina (62). No processamento B o isopropanol é aquecido entre 55°C e 65°C. Temperaturas altas podem influenciar as propriedades do ADN aumentando a taxa de degradação (63,64). A diferença dos resultados obtidos na quantidade e qualidade de ADN recuperado entre os dois

processamentos pode ter estado na utilização de isopropanol, no processamento B, a temperaturas elevadas, enquanto que no processamento A o xilol está à temperatura ambiente. Como referido anteriormente, a temperatura das parafinas durante a impregnação é diferente entre os dois processamentos, o que pode explicar, em parte, a diminuição da quantidade e qualidade do ADN recuperado das amostras processadas com o processamento B. Autores aconselham o uso de parafinas com ponto de fusão baixo na etapa de impregnação no processamento de tecidos (10,31). Adicionalmente, o uso de parafina com um ponto de fusão elevado poderá estar associado a desparafinação incompleta aquando da extração de ADN, o que pode levar a uma redução da quantidade de ADN recuperado do tecido TFFIP (10). No presente estudo, a desparafinação das amostras para extração de ADN, foi feita em simultâneo com o passo de digestão enzimática, em banho-maria a 56°C durante a noite, segundo o protocolo instituído no LBM. A desparafinação, feita por este método, pode não ter sido completa nas amostras sujeitas ao processamento B, uma vez que este usa parafina com ponto de fusão mais elevado do que no processamento A.

Por outro lado, a diferença nos resultados pode dever-se a outros fatores pré-analíticos, como a duração da fixação. Nas 324 amostras avaliadas, 125 foram submetidas ao processamento A e 199 ao processamento B. Todas as amostras submetidas ao processamento A tiveram uma fixação de 1 a 4 dias. No entanto, as 199 amostras submetidas ao processamento B tiveram intervalos de fixação diferentes: 33,2% (n=66) das amostras tiveram uma fixação até 4 dias enquanto que 66,8% (n=133) das amostras foram sujeitas a uma fixação superior a 4 dias (resultados não apresentados). Como foi demonstrado neste estudo e amplamente descrito na literatura, uma fixação superior a 4 dias tem impacto na quantidade e qualidade do ADN recuperado. Como referido, o principal efeito do formaldeído no ADN está associado à formação de grupos metilol nos grupos amino das bases e ao estabelecimento de *crosslinking* de grupos metileno, podendo levar à fragmentação do ADN (56).

Após a finalização dos estudos, os blocos de parafina são armazenados no arquivo do SAP do IPOC. O tempo de arquivo dos blocos de parafina e as condições de armazenamento em que estes se encontram, tal como temperatura e humidade, podem ter impacto na qualidade e quantidade do ADN recuperado dos TFFIP (58).

Neste estudo foi avaliado se o tempo de arquivo poderia ter impacto na quantidade e integridade do ADN recuperado dos TFFIP. Para tal foram selecionadas amostras arquivadas dos anos de 2019 e de 2021. A média de concentração de ADN recuperado dos TFFIP arquivados há dois anos

foi 30% superior à média de concentração das amostras com quatro anos de arquivo. Estes resultados estão em conformidade com os obtidos por outros autores (57,58). Yi et al. (2020) mostraram que a concentração de ADN foi superior nos tecidos TFFIP com 1 a 3 anos de arquivo quando comparada com tecidos com 8 anos de arquivo. Adicionalmente, não houve diferenças significativas na concentração obtida entre os tecidos com arquivo entre 1 a 3 anos (36). Guyard et al. (2017) compararam a quantidade de ADN recuperado de TFFIP extraído em dois tempos diferentes, com uma média de diferença de 5 anos entre extrações. Demonstraram que há uma diminuição de aproximadamente 47% na quantidade de ADN recuperado após os cinco anos de arquivo (65).

A redução de ADN recuperado nas amostras com tempo de arquivo de 4 anos pode ser explicada por vários fatores. Entre os quais inclui-se o formaldeído residual, que se encontra nos TFFIP, que continua a reagir com o ADN durante o arquivo dos tecidos (66). Alguns autores defendem que o arquivo dos blocos de parafina seja feita a 4°C no escuro, em oposição à temperatura ambiente, para reduzir este efeito do formaldeído residual no ADN (65). Outro fator que poderá ter tido influência neste resultado foi a duração de fixação a que as amostras dos dois anos foram sujeitas. Das amostras selecionadas no ano de 2019, 50,2% (n=109) tiveram uma fixação até 4 dias e 49,8% (n=108) das amostras foram sujeitas a uma fixação superior a 4 dias. Enquanto que, no ano de 2021, 76,6% (n=82) das amostras tiveram fixação até 4 dias e 23,3% (n=25) das amostras tiveram uma fixação superior a 4 dias. Tal como referido anteriormente, o formaldeído provoca danos no ADN levando à sua fragmentação.

Em relação à integridade, os resultados obtidos neste estudo mostraram que a duração de arquivo não influenciou a integridade do ADN recuperado. Estes dados são semelhantes aos obtidos por outros autores (58,66). Nam et al. (2014) avaliaram a amplificação, por PCR, de três genes diferentes em amostras arquivadas com menos de 1 ano e com 1, 3 e 8 anos de arquivo. Os resultados obtidos não foram significativamente diferentes entre as amostras com menos de 1 ano e as amostras com 3 ou 8 anos (58). Kokkat et al. (2013) demonstraram que a qualidade do ADN extraído de amostras com períodos de arquivo entre 1 ano e 12 anos, é comparável à qualidade obtida de amostras com menos de 1 ano (66).

No seu conjunto, os resultados do presente estudo sugerem que a duração de fixação superior a 4 dias e o tipo de processamento têm impacto na quantidade e qualidade de ADN recuperado dos TFFIP. O impacto do tempo de arquivo apenas é observado na quantidade do ADN recuperado dos TFFIP.

A área, a fração e a viabilidade tumoral são também fatores pré-analíticos que têm impacto na quantidade e qualidade de ADN recuperado dos TFFIP (12,13). O tipo de tecido pode também interferir na quantidade de ADN, uma vez que a composição celular é diferente entre os tecidos. Gillooly et al (2015) verificaram que a quantidade de ADN genómico nas células humanas varia com o tamanho das células, células maiores continham mais ADN (67). Embora não passíveis de serem controlados pelo laboratório, estes fatores devem ser tidos em conta aquando da seleção da amostra para os estudos moleculares.

A área do tumor na amostra pode determinar a quantidade de ADN recuperado (12). De uma amostra de tecido que tenha uma área tumoral entre 6 a 10cm² dever-se-á conseguir extrair uma quantidade de ADN adequada para a NGS (13). Neste estudo, a área tumoral teve um impacto na concentração de ADN obtido. Estes resultados vão de encontro aos descritos por Goswami et al. (2022). Estes autores demonstraram que a quantidade de ADN recuperado de amostras com área tumoral menor que 1cm² era significativamente menor quando comparada com a concentração de amostras com áreas tumorais entre 1 a 2 cm², 2 a 6cm² e maiores que 6cm² (18). Cho et al. (2017) obtiveram resultados semelhantes (43). No presente estudo, em relação à integridade do ADN recuperado, a área tumoral não teve impacto.

A avaliação da fração celular tumoral é obtida pelo rácio entre células neoplásicas e células normais do estroma do tecido, através da observação ao microscópio ótico (50). A percentagem mínima de fração tumoral para análise depende da técnica a utilizar, para a NGS foi proposto que seria 10% (44). Amostras com fração tumoral inferior a 10% não são elegíveis para a NGS, uma vez que uma fração tumoral inferior pode causar dificuldade na deteção de variação no número de cópias (*Copy Number Variation* (CNV)) e na distinção entre variantes e artefactos de sequenciação (43). A fração tumoral deve ser incluída no relatório molecular para uma correta interpretação e validação da análise (49). Neste estudo foram selecionadas amostras com fração tumoral até 10 %. Penault-Llorca et al. (2022) aconselham a execução de macrodissecção quando a fração celular de células tumorais é baixa (44). Assim, as amostras que tinham uma fração tumoral entre 10 e 20% foram colhidas por macrodissecção, o que levou ao aumento da fração de células tumorais em relação às restantes células, aumentando o rácio para 80 a 100%. Na avaliação feita quanto à influência da fração tumoral na quantidade de ADN recuperado, esta não teve impacto. O mesmo resultado foi obtido em relação à integridade do ADN.

A viabilidade tumoral é outro fator essencial para o sucesso da NGS, uma vez que as amostras tumorais podem apresentar áreas necróticas. A percentagem de necrose na amostra deve ser

avaliada e interpretada com cuidado (12). Para otimizar a qualidade do ADN obtido, a percentagem de células necróticas presente no tecido deve ser a menor possível (33). Quanto à percentagem de células necróticas, as amostras seleccionadas neste estudo apresentavam até 20% de necrose. Amostras com percentagem maior de necrose foram excluídas. A escolha desta percentagem como fator de exclusão teve como base a percentagem de necrose adotada pelo LMB derivada da experiência. Os resultados mostraram que tanto a qualidade como a quantidade de ADN recuperado não foram influenciadas pela presença de células necróticas no tecido.

Tal como foi referido anteriormente, o tipo de tecido deve ser tido em conta, uma vez que os tecidos são compostos por células diferentes (67). Deste modo, foi avaliada a influência do tipo de tecido no ADN recuperado. Para tal, foram seleccionadas amostras de tecido tumoral de mama e cólon. Obteve-se maior quantidade de ADN nas amostras de cólon quando comparadas com as amostras de mama. Esta diferença de resultados pode estar associada ao tamanho da área tumoral. De facto, havia uma diferença de $0,4\text{cm}^2 \pm 0,1$ entre a área média das amostras de cólon e de mama. Estes resultados podem também ser explicados pelo impacto da duração da fixação, tempo de arquivo ou tipo de processamento, fatores pré-analíticos já demonstrados terem impacto na quantidade do ADN recuperado. De modo semelhante, o tipo de tecido teve impacto na integridade do ADN recuperado das amostras de tecido TFFIP.

Pelos resultados obtidos neste estudo pode-se inferir que os fatores pré-analíticos devem, sem qualquer dúvida, ser bem controlados de modo a garantir que estudos moleculares posteriores não sejam comprometidos.

6. Conclusão

A NGS é uma tecnologia que permite a sequenciação massiva de ácidos nucleicos obtendo-se uma enorme quantidade de informação genética. Devido à sua especificidade e sensibilidade está rapidamente a estabelecer-se na prática clínica, predominantemente na área oncológica, como um meio de diagnóstico e orientador de terapêuticas. Os tecidos TFFIP representam um recurso valioso para obtenção de material biológico. No entanto há diversos fatores pré-analíticos que podem influenciar a quantidade e qualidade dos ácidos nucleicos recuperados, e, conseqüentemente a taxa de sucesso da NGS.

Os resultados deste estudo mostraram que a duração de fixação, o tipo de processamento, a área tumoral e o período de arquivo dos blocos de parafina impactam na quantidade e qualidade de ADN recuperado dos TFFIP. Desta experiência conclui-se que a duração de fixação dos tecidos não deve ultrapassar os 4 dias. O processamento que menos compromete a quantidade e qualidade de ADN foi aquele em que o agente diafanizador foi o xilol. A parafina a ser utilizada deve ter um ponto de fusão que não ultrapasse os 62°C. O arquivo dos blocos deve ser feito de preferência num local fresco, arejado e sem humidade. Por fim, deve-se utilizar, sempre que possível, a amostra mais recente. Adicionalmente, embora não passíveis de decisão laboratorial, devem ser tidos em conta o tempo de isquemia, área, fração e viabilidade tumoral. Um registo rigoroso de todos estes fatores permite, não só, garantir a qualidade das amostras como obter uma melhor correlação com os resultados moleculares.

Perspetivas futuras

De forma a completar o presente trabalho deverá ser feita uma avaliação prática destes fatores pré-analíticos na sequenciação por NGS, nomeadamente na fidelidade dos resultados obtidos. Como a NGS também pode ser realizada tendo como amostra ARN, uma proposta seria a avaliação do impacto que os fatores pré-analíticos poderão ter na quantidade e qualidade do ARN recuperado de TFFIP.

7. Referências Bibliográficas

1. Yohe S, Thyagarajan B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2017;141(11):1544–57. Disponível em: <http://10.5858/arpa.2016-0501-RA>
2. Ascierto PA, Bifulco C, Palmieri G, Peters S, Sidiropoulos N. Preanalytic Variables and Tissue Stewardship for Reliable Next-Generation Sequencing (NGS) Clinical Analysis. *J Mol Diagn* [Internet]. 2019;21(5):756–67. Disponível em: <http://10.1016/j.jmoldx.2019.05.004>
3. Ilyas M. Next-Generation Sequencing in Diagnostic Pathology. *Pathobiology* [Internet]. 2017;84(6):292–305. Disponível em: <http://10.1159/000480089>
4. Akkari Y, Smith T, Westfall J, Lupo S. Implementation of cancer next-generation sequencing testing in a community hospital. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* [Internet]. 2019;6(3):a003707. Disponível em: <https://10.1101/mcs.a003707>
5. Yin Y, Butler C, Zhang Q. Challenges in the application of NGS in the clinical laboratory. *Hum Immunol* [Internet]. 2021;82(11):812–9. Disponível em: <http://10.1016/j.humimm.2021.03.011>
6. Xuan J, Yu Y, Qing T, Guo L, Shi L. Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges. *Cancer Lett* [Internet]. 2013;340(2):284–95. Disponível em: <http://10.1016/j.canlet.2012.11.025>
7. Morganti S, Tarantino P, Ferraro E, D'Amico P, Duso BA, Curigliano G. Next Generation Sequencing (NGS): A Revolutionary Technology in Pharmacogenomics and Personalized Medicine in Cancer. Em: Ruiz-Garcia E, Astudillo-de la Vega H, editores. *Translational Research and Onco-Omics Applications in the Era of Cancer Personal Genomics* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 9–30. (Advances in Experimental Medicine and Biology). Disponível em: http://10.1007/978-3-030-24100-1_2
8. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet* [Internet]. 2015;17(5):405–24. Disponível em: <https://10.1038/gim.2015.30>
9. Arreaza G, Qiu P, Pang L, Albright A, Hong LZ, Marton MJ, et al. Pre-Analytical Considerations for Successful Next-Generation Sequencing (NGS): Challenges and Opportunities for Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tumor Tissue (FFPE) Samples. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2016;17(9). Disponível em: <http://10.3390/ijms17091579>

10. Compton CC, Robb JA, Anderson MW, Berry AB, Birdsong GG, Bloom KJ, et al. Preanalytics and Precision Pathology: Pathology Practices to Ensure Molecular Integrity of Cancer Patient Biospecimens for Precision Medicine. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2019;143(11):1346–63. Disponível em: <http://10.5858/arpa.2019-0009-SA>
11. Agrawal L, Engel KB, Greytak SR, Moore HM. Understanding Preanalytical Variables and their Effects on Clinical Biomarkers of Oncology and Immunotherapy. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2018;52(Pt 2):26–38. Disponível em: <http://10.1016/j.semcancer.2017.12.008>
12. Teixeira MR, Oliveira J, Borralho P, Fernandes MGO, Almodovar T, Fernandes I, et al. Portuguese Consensus Recommendations for Next-Generation Sequencing of Lung Cancer, Rare Tumors, and Cancers of Unknown Primary Origin in Clinical Practice. *Acta Med Port Internet* [Internet]. 2022; Disponível em: <http://10.20344/amp.17680>
13. Chen H, Luthra R, Goswami RS, Singh RR, Roy-Chowdhuri S. Analysis of Pre-Analytic Factors Affecting the Success of Clinical Next-Generation Sequencing of Solid Organ Malignancies. *Cancers Basel* [Internet]. 2015;7(3):1699–715. Disponível em: <http://10.3390/cancers7030859>
14. Mertins P, Yang F, Liu T, Mani DR, Petyuk VA, Gillette MA, et al. Ischemia in Tumors Induces Early and Sustained Phosphorylation Changes in Stress Kinase Pathways but Does Not Affect Global Protein Levels. *Mol Cell Proteomics MCP* [Internet]. 2014;13(7):1690–704. Disponível em: <http://10.1074/mcp.M113.036392>
15. Hammond MEH, Hayes DF, Wolff AC, Mangu PB, Temin S. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *J Oncol Pract* [Internet]. 2010;6(4):195–7. Disponível em: <http://10.1200/JOP.777003>
16. Sotoudeh Anvari M, Gharib A, Abolhasani M, Azari-Yam A, Hossieni Gharalari F, Safavi M, et al. Pre-analytical Practices in the Molecular Diagnostic Tests, A Concise Review. *Iran J Pathol* [Internet]. 2021;16(1):1–19. Disponível em: <http://10.30699/ijp.2020.124315.2357>
17. Bass BP, Engel KB, Greytak SR, Moore HM. A Review of Preanalytical Factors Affecting Molecular, Protein, and Morphological Analysis of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) Tissue: How Well Do You Know Your FFPE Specimen? *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2014;138(11):1520–30. Disponível em: 10.5858/arpa.2013-0691-RA
18. Goswami RS, Luthra R, Singh RR, Patel KP, Routbort MJ, Aldape KD, et al. Identification of Factors Affecting the Success of Next-Generation Sequencing Testing in Solid Tumors. *Am J Clin*

- Pathol [Internet]. 2016;145(2):222–37. Disponível em: <http://10.1093/ajcp/aqv023>
19. Suvarna KS, Layton K, Bancroft JD. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. 7a ed. UK: Churchill Livingstone Elsevier; 2019. 79–104 p.
 20. Dey P. *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*. 1ª. Singapore: Springer; 2018. 3–39 p.
 21. Junqueira, L. C.Uchoa. *Histologia básica - Texto & Atlas*. Guanabara koogan; 2017.
 22. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* [Internet]. 2002;161(6):1961–71. Disponível em: [http://10.1016/S0002-9440\(10\)64472-0](http://10.1016/S0002-9440(10)64472-0)
 23. Eltoun I, Fredenburgh J, Myers RB, Grizzle WE. Introduction to the Theory and Practice of Fixation of Tissues. *J Histotechnol* [Internet]. 2001;24(3):173–90. Disponível em: <https://10.1179/his.2001.24.3.173>
 24. Kofanova O, Bellora C, Garcia Frasilho S, Antunes L, Hamot G, Mathay C, et al. Standardization of the preanalytical phase of DNA extraction from fixed tissue for next-generation sequencing analyses. *New Biotechnol* [Internet]. 2020;54:52–61. Disponível em: <http://10.1016/j.nbt.2019.07.005>
 25. Williams C, Pontén F, Moberg C, Söderkvist P, Uhlén M, Pontén J, et al. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol* [Internet]. 1999;155(5):1467–71. Disponível em: [http://10.1016/S0002-9440\(10\)65461-2](http://10.1016/S0002-9440(10)65461-2)
 26. Bonnet E, Moutet ML, Baulard C, Bacq-Daian D, Sandron F, Mesrob L, et al. Performance comparison of three DNA extraction kits on human whole-exome data from formalin-fixed paraffin-embedded normal and tumor samples. *PLoS ONE* [Internet]. 2018;13(4):e0195471. Disponível em: <http://10.1371/journal.pone.0195471>
 27. Buesa RJ, Peshkov MV. Histology without xylene. *Ann Diagn Pathol* [Internet]. 2009;13(4):246–56. Disponível em: <http://10.1016/j.anndiagpath.2008.12.005>
 28. Metgud R, Astekar M, Soni A, Naik S, Vanishree M. Conventional xylene and xylene-free methods for routine histopathological preparation of tissue sections. *Biotech Histochem* [Internet]. 2013;88(5):235–41. Disponível em: <http://10.3109/10520295.2013.764015>
 29. Rolls G. An Evaluation of Xylene-free Processing of Tissues From the Central Nervous System Using the Peloris™ Dual Retort Rapid Tissue Processor. 2005; Disponível em: http://www.leicabiosystems.com/sites/default/files/media_product-download/2021-03/95_7752_rev_b_white_paper_an_evaluation_of_xylene-free_processing.pdf

30. Chung JY, Braunschweig T, Hewitt SM. Optimization of Recovery of RNA From Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue. *Diagn Mol Pathol* [Internet]. 2006;15(4):229. Disponível em: <http://10.1097/01.pdm.0000213468.91139.2d>
31. Hewitt SM, Lewis FA, Cao Y, Conrad RC, Cronin M, Danenberg KD, et al. Tissue Handling and Specimen Preparation in Surgical Pathology: Issues Concerning the Recovery of Nucleic Acids From Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2008;132(12):1929–35. Disponível em: <http://10.5858/132.12.1929>
32. Evers DL, He J, Kim YH, Mason JT, O'Leary TJ. Paraffin Embedding Contributes to RNA Aggregation, Reduced RNA Yield, and Low RNA Quality. *J Mol Diagn JMD* [Internet]. 2011;13(6):687–94. Disponível em: <http://10.1016/j.jmoldx.2011.06.007>
33. Gastman B, Agarwal PK, Berger A, Boland G, Broderick S, Butterfield LH, et al. Defining best practices for tissue procurement in immuno-oncology clinical trials: consensus statement from the Society for Immunotherapy of Cancer Surgery Committee. *J Immunother Cancer* [Internet]. 2020;8(2):e001583. Disponível em: <http://10.1136/jitc-2020-001583>
34. Singh RCS Huang VJ, Tran Y, Erlander M, Plumlee P, Peterson MR, Veena M. Analysis of the effect of various decalcification agents on the quantity and quality of nucleic acid (DNA and RNA) recovered from bone biopsies. *Ann Diagn Pathol* [Internet]. 2013;17(4):322–6. Disponível em: <http://10.1016/j.anndiagpath.2013.02.001>
35. Wisner L, Larsen B, Maguire A. Enhancing Tumor Content through Tumor Macrodissection. *J Vis Exp JoVE* [Internet]. 2022;(180):10.3791/62961. Disponível em: <http://10.3791/62961>
36. Yi QQ, Yang R, Shi JF, Zeng NY, Liang DY, Sha S, et al. Effect of preservation time of formalin-fixed paraffin-embedded tissues on extractable DNA and RNA quantity. *J Int Med Res* [Internet]. 2020;48(6):300060520931259. Disponível em: 10.1177/0300060520931259
37. Muscarella LA, Fabrizio FP, De Bonis M, Mancini MT, Balsamo T, Graziano P, et al. Automated Workflow for Somatic and Germline Next Generation Sequencing Analysis in Routine Clinical Cancer Diagnostics. *Cancers* [Internet]. 2019;11(11):1691. Disponível em: <http://10.3390/cancers11111691>
38. Astolfi A, Urbini M, Indio V, Nannini M, Genovese CG, Santini D, et al. Whole exome sequencing (WES) on formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor tissue in gastrointestinal stromal tumors (GIST). *BMC Genomics* [Internet]. 2015;16:892. Disponível em: <http://10.1186/s12864-015-1982-6>

39. Hedegaard J, Thorsen K, Lund MK, Hein AMK, Hamilton-Dutoit SJ, Vang S, et al. Next-Generation Sequencing of RNA and DNA Isolated from Paired Fresh-Frozen and Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Samples of Human Cancer and Normal Tissue. *PLoS ONE* [Internet]. 2014;9(5):e98187. Disponível em: <http://10.1371/journal.pone.0098187>
40. Weng L, Wu X, Gao H, Mu B, Li X, Wang JH, et al. MicroRNA profiling of clear cell renal cell carcinoma by whole-genome small RNA deep sequencing of paired frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *J Pathol* [Internet]. 2010;222(1):41–51. Disponível em: <http://10.1002/path.2736>
41. Einaga N, Yoshida A, Noda H, Suemitsu M, Nakayama Y, Sakurada A, et al. Assessment of the quality of DNA from various formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues and the use of this DNA for next-generation sequencing (NGS) with no artifactual mutation. Lo AWI, editor. *PLOS ONE* [Internet]. 2017;12(5):e0176280. Disponível em: <http://10.1371/journal.pone.0176280>
42. Dinya D. DNA Library Qualification & Quantification: New Automated CE System Aims to Improve Access to High-Quality Sequence Data. *Genet Eng Biotechnol News* [Internet]. 2012;32(1):28–9. Disponível em: <http://10.1089/gen.32.1.15>
43. Cho M, Ahn S, Hong M, Bang H, Van Vrancken M, Kim S, et al. Tissue recommendations for precision cancer therapy using next generation sequencing: a comprehensive single cancer center's experiences. *Oncotarget* [Internet]. 2017;8(26):42478–86. Disponível em: <http://10.18632/oncotarget.17199>
44. Penault-Llorca F, Kerr KM, Garrido P, Thunnissen E, Dequeker E, Normanno N, et al. Expert opinion on NSCLC small specimen biomarker testing – Part 1: Tissue collection and management. *Virchows Arch* [Internet]. 2022;481(3):335–50. Disponível em: <http://10.1007/s00428-022-03343-2>
45. Deans ZC, Costa JL, Cree I, Dequeker E, Edsjö A, Henderson S, et al. Integration of next-generation sequencing in clinical diagnostic molecular pathology laboratories for analysis of solid tumours; an expert opinion on behalf of IQN Path ASBL. *Virchows Arch* [Internet]. 2017;470(1):5–20. Disponível em: <http://10.1007/s00428-016-2025-7>
46. Ludyga N, Grünwald B, Azimzadeh O, Englert S, Höfler H, Tapio S, et al. Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses. *Virchows Arch* [Internet]. 2012;460(2):131–40. Disponível em: <http://10.1007/s00428-011-1184-9>
47. Nagahashi M, Shimada Y, Ichikawa H, Nakagawa S, Sato N, Kaneko K, et al. Formalin-

fixed paraffin-embedded sample conditions for deep next generation sequencing. *J Surg Res* [Internet]. 2017;220:125–32. Disponible em: <http://10.1016/j.jss.2017.06.077>

48. Begum S, Prabhu V, Mohanty V, Upadhyaya KK, Abdulla R. Unveiling the arcanum of formalin-fixed paraffin-embedded archival tissue blocks: A valuable resource for genomic DNA extraction. *J Oral Maxillofac Pathol JOMFP* [Internet]. 2022;26(2):289. Disponible em: https://10.4103/jomfp.jomfp_424_20

49. Dufraing K, van Krieken JH, De Hertogh G, Hoefler G, Oniscu A, Kuhlmann TP, et al. Neoplastic cell percentage estimation in tissue samples for molecular oncology: recommendations from a modified Delphi study. *Histopathology* [Internet]. 2019;75(3):312–9. Disponible em: <http://10.1111/his.13891>

50. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, Kamel-Reid S, Lubin IM, Pfeifer J, et al. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels. *J Mol Diagn JMD* [Internet]. 2017;19(3):341–65. Disponible em: <http://10.1016/j.jmoldx.2017.01.011>

51. Singh RR, Patel KP, Routbort MJ, Aldape K, Lu X, Manekia J, et al. Clinical massively parallel next-generation sequencing analysis of 409 cancer-related genes for mutations and copy number variations in solid tumours. *Br J Cancer* [Internet]. 2014;111(10):2014–23. Disponible em: <http://10.1016/j.anndiagpath.2013.02.001>

52. Cappello F, Angerilli V, Munari G, Ceccon C, Sabbadin M, Pagni F, et al. FFPE-Based NGS Approaches into Clinical Practice: The Limits of Glory from a Pathologist Viewpoint. *J Med* [Internet]. 2022;12(5). Disponible em: <http://10.3390/jpm12050750>

53. Bonin S, Stanta G. Nucleic acid extraction methods from fixed and paraffin-embedded tissues in cancer diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* [Internet]. 2013;13:271–82. Disponible em: <http://10.1586/erm.13.14>

54. Vitošević K, Todorović M, Varljen T, Slović Ž, Matić S, Todorović D. Effect of formalin fixation on pcr amplification of DNA isolated from healthy autopsy tissues. *Acta Histochem* [Internet]. 2018;120(8):780–8. Disponible em: <http://10.1016/j.acthis.2018.09.005>

55. Carithers LJ, Agarwal R, Guan P, Odeh H, Sachs MC, Engel KB, et al. The Biospecimen Preanalytical Variables Program: A Multiassay Comparison of Effects of Delay to Fixation and Fixation Duration on Nucleic Acid Quality. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2019;143(9):1106–18. Disponible em: <https://10.5858/arpa.2018-0172-OA>

56. Todorovic D, Vitosevic K, Todorovic M, Slovic Z. Formalin Fixation of Human Healthy Autopsied Tissues: The Influence of Type of Tissue, Temperature and Incubation Time on the

Quality of Isolated DNA. *Serbian J Exp Clin Res* [Internet]. 2020;21(4):307–15. Disponível em: <http://10.2478/sjecr-2019-0020>

57. Turashvili G, Yang W, McKinney S, Kalloger S, Gale N, Ng Y, et al. Nucleic acid quantity and quality from paraffin blocks: defining optimal fixation, processing and DNA/RNA extraction techniques. *Exp Mol Pathol* [Internet]. 2012;92(1):33–43. Disponível em: <http://10.1016/j.yexmp.2011.09.013>

58. Nam SK, Im J, Kwak Y, Han N, Nam KH, Seo AN, et al. Effects of Fixation and Storage of Human Tissue Samples on Nucleic Acid Preservation. *Korean J Pathol* [Internet]. 2014;48(1):36–42. Disponível em: <http://10.4132/KoreanJPathol.2014.48.1.36>

59. Smith J. Xylene-free Tissue Processing – An Evaluation of Routine Use. Disponível em: https://www.leicabiosystems.com/sites/default/files/media_product-download/2021-04/95_8025_rev_A_xylene_free_processing_An_Evaluation_Of_Use_online.pdf

60. Caramelo A, Polónia A, Vale J, Curado M, Campelos S, Nascimento V, et al. Demonstrating the interference of tissue processing in the evaluation of tissue biomarkers: The case of PD-L1. *Pathol - Res Pract* [Internet]. 2023;248:154605. Disponível em: <https://10.1016/j.prp.2023.154605>

61. Dwyer DS, Bradley RJ. Chemical properties of alcohols and their protein binding sites. *Cell Mol Life Sci CMLS* [Internet]. 2000;57(2):265–75. Disponível em: <http://10.1007/PL00000689>

62. Viktorov IV, Proshin SS. Use of Isopropyl Alcohol in Histological Assays: Dehydration of Tissue, Embedding into Paraffin, and Processing of Paraffin Sections. *Bull Exp Biol Med* [Internet]. 2003;136(1):105–6. Disponível em: <http://10.1023/A:1026017719668>

63. Żarczyńska M, Żarczyński P, Tomsia M. Nucleic Acids Persistence—Benefits and Limitations in Forensic Genetics. *Genes* [Internet]. 2023;14(8):1643. Disponível em: <http://10.3390/genes14081643>

64. Driessen RPC, Sitters G, Laurens N, Moolenaar GF, Wuite GJL, Goosen N, et al. Effect of Temperature on the Intrinsic Flexibility of DNA and Its Interaction with Architectural Proteins. *Biochemistry* [Internet]. 2014;53(41):6430–8. Disponível em: <https://10.1021/bi500344j>

65. Guyard A, Boyez A, Pujals A, Robe C, Tran Van Nhieu J, Allory Y, et al. DNA degrades during storage in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue blocks. *Virchows Arch* [Internet]. 2017;471(4):491–500. Disponível em: <http://10.1007/s00428-017-2213-0>

66. Kokkat TJ, Patel MS, McGarvey D, LiVolsi VA, Baloch ZW. Archived formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks: A valuable underexploited resource for extraction of DNA,

RNA, and protein. *Biopreserv Biobank* [Internet]. 2013;11(2):101–6. Disponível em: <http://10.1089/bio.2012.0052>

67. Gillooly JF, Hein A, Damiani R. Nuclear DNA Content Varies with Cell Size across Human Cell Types. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2015;7(7):a019091. Disponível em: <https://10.1101/cshperspect.a019091>

8. Anexos

Anexo 1

Processamento de tecidos A

Este protocolo foi efetuado no processador de tecidos Histocore Peloris, (Leica Biosystems Inc., Concord, Ontario, Canadá)

Tabela 1 - Passos do processamento de tecidos A

Passos	Etapas	Reagente	Minutos	Temperatura°C	P/V	Agitador
1	Fixação	Formol	44	Ambiente	Ambiente	Med
2	Desidratação	Etanol 70%	30	Ambiente	Ambiente	Med
3	Desidratação	Etanol 99,9%	30	Ambiente	Ambiente	Med
4	Desidratação	Etanol 99,9%	30	Ambiente	Ambiente	Med
5	Desidratação	Etanol 99,9%	30	Ambiente	Ambiente	Med
6	Desidratação	Etanol 99,9%	60	Ambiente	Ambiente	Med
7	Desidratação	Etanol 99,9%	90	Ambiente	Ambiente	Med
8	Diafanização	Xilol	45	Ambiente	Ambiente	Med
9	Diafanização	Xilol	45	Ambiente	Ambiente	Med
10	Diafanização	Xilol	90	Ambiente	Ambiente	Med
11	Impregnação	Parafina	60	62	V	Med
12	Impregnação	Parafina	60	62	V	Med
13	Impregnação	Parafina	60	62	V	Med

P/V - pressão/Vácuo

Anexo 2

Processamento de tecidos B

Este protocolo foi executado no processador de tecidos Pathos Delta (Milestone Medical, Kalamazoo, MI, USA)

Tabela 2 - Passos do processamento de tecidos B

Passos	Etapas	Reagente	Minutos	Temperatura °C	Pressão mBar
1	Fixação	Formol	20	37	----
2	Fixação	Formol	40	37	----
3	Fixação	Formol	10	50	----
4	Fixação	Formol	50	50	----
5	<i>Flushing</i>	Etanol 70%	10	----	----
6	Desidratação	Etanol 99,9%	10	----	----
7	Desidratação	Etanol 99,9%	10	----	----
8	Desidratação	Etanol 99,9%	10	----	----
9	Desidratação	Etanol 99,9%	55	----	----
10	Diafanização	Isopropanol	15	55	----
11	Diafanização	Isopropanol	35	55	----
12	Diafanização	Isopropanol	15	65	----
13	Diafanização	Isopropanol	50	65	----
14	Vaporização	----	90	----	----
15	Impregnação	Parafina	25	70	500
16	Impregnação	Parafina	15	70	400
17	Impregnação	Parafina	10	70	300
18	Impregnação	Parafina	10	70	200
19	Impregnação	Parafina	10	70	150
20	Impregnação	Parafina	30	65	100
21	Impregnação	Parafina	20	65	800

Anexo 3

Extração de ADN – Protocolo LBM – IPOC

(1) Digestão enzimática

- a. Adicionar um volume final de 500µl, tampão de digestão (10mM TrisHCl, (pH=8); 0,1M EDTA (pH= 8); 0,5%SDS)
- b. Incubar em proteinase K 0,5□g/ml (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) em banho-maria durante a noite a 56°C

(2) Extração de ADN

- a. Centrifugar à temperatura ambiente a 12000 rpm durante 1 minuto
- b. Recuperar a fase aquosa
- c. Adicionar 1:1 volume de fenol-clorofórmio-álcool Isoamilico (PanReac AppliChem, 25:24:1)
- d. Centrifugar à temperatura ambiente a 12000 rpm durante 1 minuto
- e. Repetir os passos “b. “a “e.”
- f. Remover a fase aquosa
- g. Adicionar 1:1 volume de clorofórmio (IMS)
- h. Centrifugar à temperatura ambiente a 12000 rpm durante 1 minuto
- i. Remover a fase aquosa

(3) Precipitação ADN

- a. Adicionar 1:10 volume de acetato de sódio (3M, pH=5,2)
- b. Adicionar 2-3 volumes de etanol frio a 99,9%
- c. Colocar a -20°C durante a noite
- d. Centrifugar a 4°C a 10000rpm durante 30 minutos
- e. Retirar o sobrenadante e adicionar 1000µl de etanol a 70%
- f. Centrifugar a 4°C a 10000rpm durante 20 minutos
- g. Descartar o sobrenadante
- h. Deixar secar à temperatura ambiente

Eluir o ADN recuperado em 50–300µl de Tampão TE (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA; pH=8)

Anexo 4

Protocolo de quantificação de ADN pelo *AccuGreen High Sensivity dsDNA Quantification Kit* (Biotium) e o fluorómetro Qubit 2.0 (*ThermoFisher Scientific*).

1. Colocar todos os reagentes à temperatura ambiente antes de usar
2. Preparar uma solução de trabalho 1:200 *AccuGreen™ Dye:DNA Quantitation Buffer*
3. Para cada amostra e padrões pipetar 190 µl de solução de trabalho num tubo PCR de 0,5ml e adicionar 10 µl de amostra ou padrão
4. Incubar os tubos à temperatura ambiente e de preferência no escuro, durante 2 minutos
5. *Quantificar "S1"* e de seguida *"S2"* para calibração da curva
6. Quantificar as amostras