

Definição e Manuseio das Amostras

Mirian Yumie Nishi

Pesquisadora Científica

Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM42

Hospital das Clínicas da FMUSP

E-mail minishi@usp.br

Tipos de amostras para estudos genéticos

Estudo Cromossômico (Cariótipo)

✓ Obtenção de células para cultura

- Punção Venosa

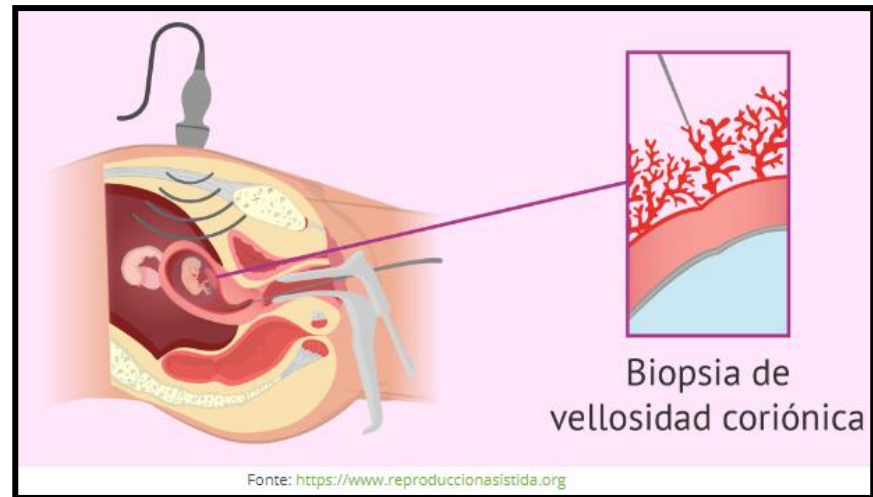


- Biópsia de Pele

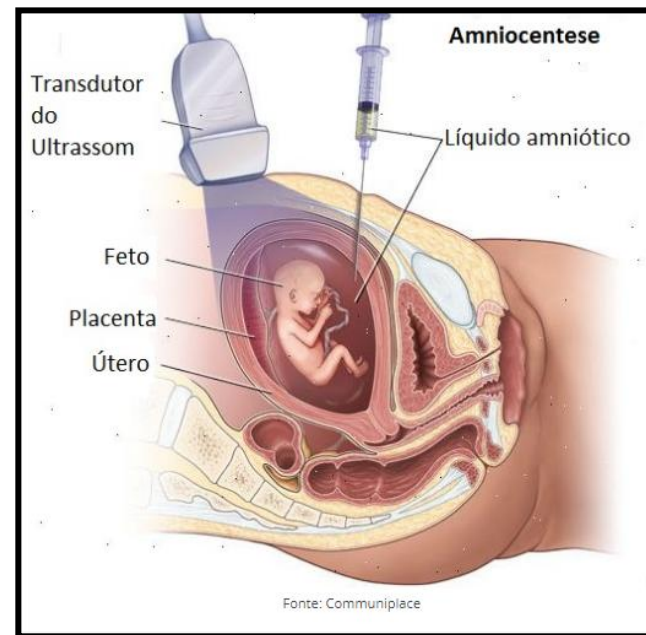


Pré Natal

- **Biopsia vilosidade coriônica**
12^a a 14^a semana gestação
Risco de aborto: 1%



- **Amniocentese**
15^a a 20^a semana gestação
Risco de aborto: 0,5%
- **Cordocentese**
A partir da 20^a semana gestação
Risco de aborto: 1%



Estudo Molecular

✓ DNA genômico e mitocondrial

✓ RNA:

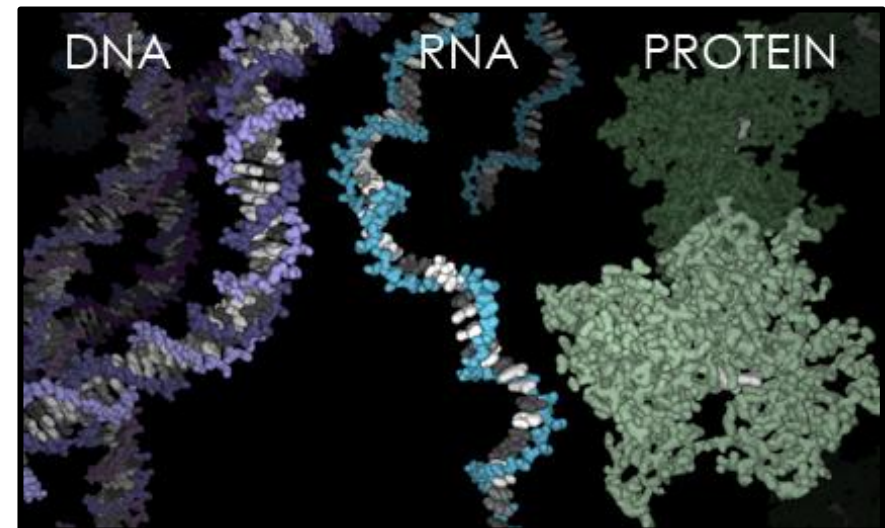
RNA mensageiro

RNA transportador

RNA de interferência

micro RNA, etc

✓ Proteínas



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

- **Descrição da pesquisa de modo compreensível e objetivo**
- **Procedimentos e os riscos**
- **Quais os benefícios**
- **Confidencialidade**
- **Participação voluntária com alternativa de sair da pesquisa a qualquer momento sem prejuízo**

➤ DNA

- **Tecidos frescos: sangue, pele, órgãos, pelos, cabelos, etc**
- **Esfregação de mucosas (oral, vaginal, etc)**
- **Saliva**
- **Tecidos congelados**
- **Tecidos parafinados**
- **Cultura de células**



- **Sangue: DNA de muito boa qualidade e quantidade**
- **Anticoagulante EDTA ou Citrato de Na (não usar heparina)**
- **Manter refrigerado e estéril por 1 semana**
- **Evitar congelamento do sangue total**



Cartão FTA



Tubo com citrato de Na



Tubo com EDTA

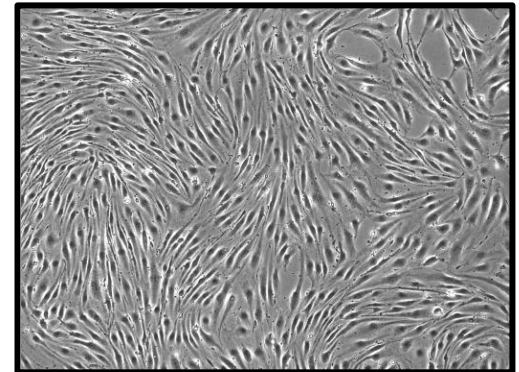
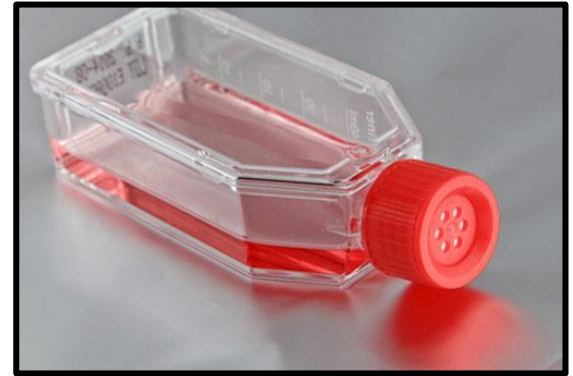
➤ **Esfregaços de Mucosas e Saliva: quantidade de amostra limitada**

- Fácil obtenção e fácil armazenamento
- Cuidados para evitar contaminação
- DNA de qualidade boa
- Amostras de pacientes/familiares que moram longe
- Bebês muito novos e/ou pequenos



➤ **Cultura de Células ou Tecidos Congelados**

- **Difícil manutenção do tecido: estrutura do laboratório**
- **DNA de qualidade e quantidade boas**



➤ Tecidos Parafinados

- Fácil obtenção, manutenção dos tecidos e transporte
- DNA de qualidade ruim, com muitas impurezas e degradado



Extração de DNA

➤ Kits comerciais diversos:

- tempo: de 30 minutos a algumas horas
- DNA de boa qualidade dependendo do tecido
- quantidade variável (depende do kit)

- custo maior

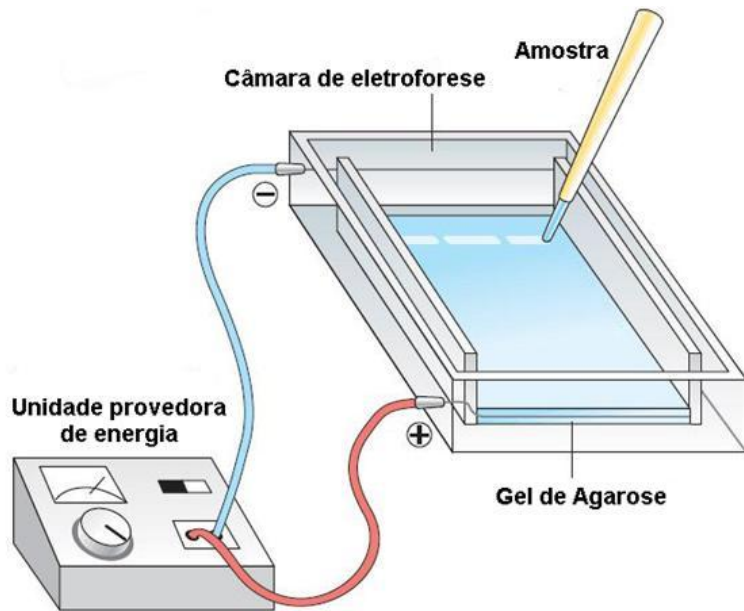
➤ Método “caseiro”:

- tempo: 2 dias
- DNA de boa qualidade dependendo do tecido
- custo menor

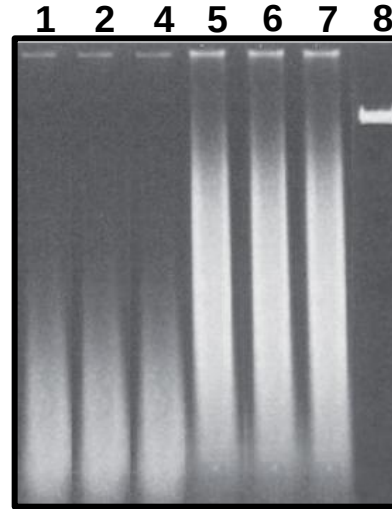


Avaliação do DNA

- Leitura no espectrofotômetro: concentração e pureza
- Eletroforese em gel de agarose: integridade



quimicaline.wordpress.com

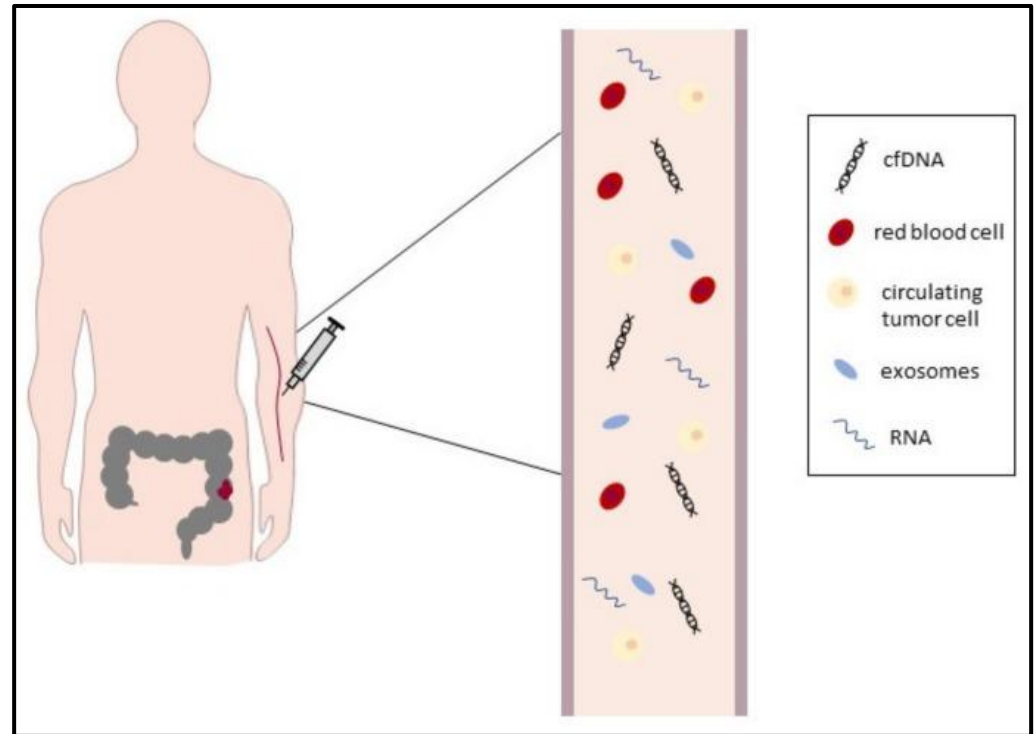
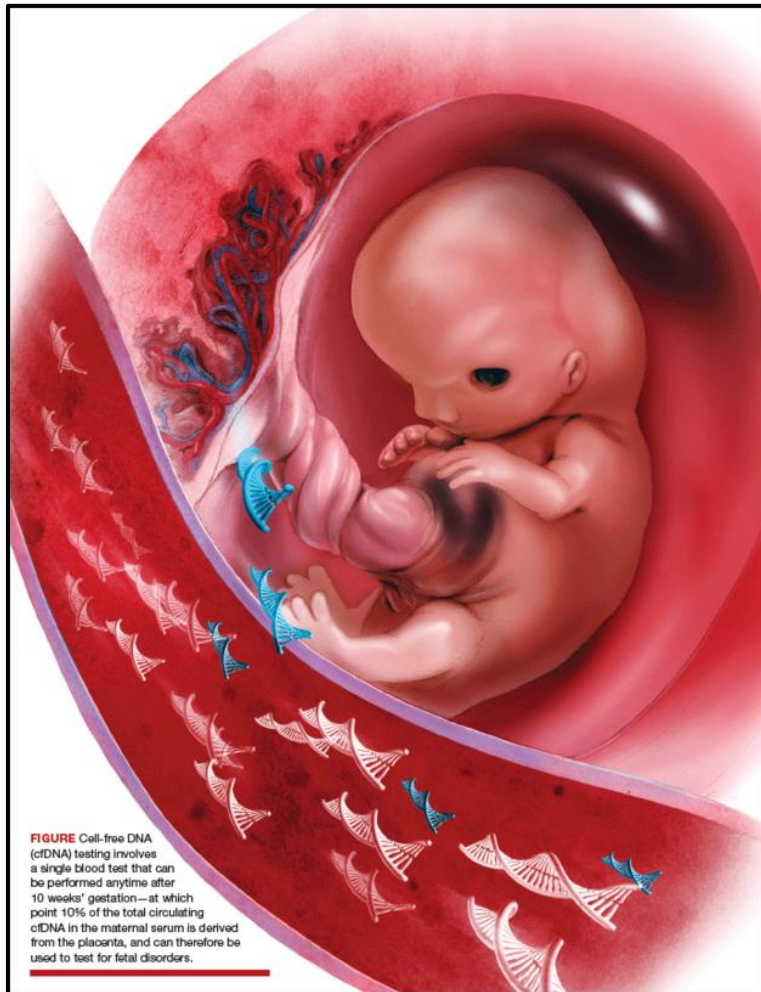


Poços 1-7: DNAs genômicos extraídos de tecidos parafinados
Poço 8: DNA genômico extraído de tecido fresco

Cell Free DNA Circulante

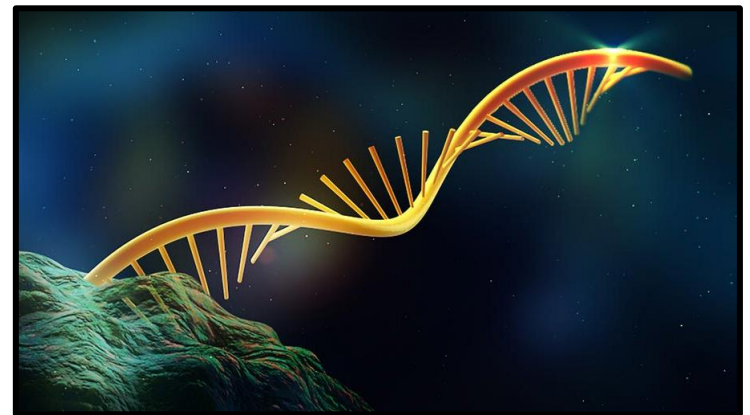
- **Fragmentos de DNA circulantes no sangue**
- **Descrito pela primeira vez por Mandel e Metais em 1948**
- **Método não invasivo:**
 - **Biomarcador de tumores: identificar a presença de tumores e avaliar o estágio**
 - **Medicina fetal: identificar o sexo cromossômico, aneuploidias e variantes alélicas patogênicas no feto**
 - **Trauma, doenças cardíacas, sepse, etc.**
- **Coleta:**
 - **Plasma ou soro sanguíneo**
 - **Liquor, urina, escarro, etc.**

Cell Free DNA Circulante (cfDNA)



➤ RNA

- Tecidos frescos: sangue, pele, órgãos
- Tecidos congelados
- Cultura de células
- Tecidos parafinados



- **RNA molécula instável, exige muitos cuidados durante a coleta:**
- **Coleta e congelamento em nitrogênio líquido do tecido imediatamente após a retirada durante a cirurgia para o transporte**
 - **Extração RNA imediatamente após a coleta do tecido**
 - **Tecidos devem ser congelados em nitrogênio líquido para armazenamento**



➤ **Estabilizador e protetor de RNA (RNA *Later*):**

- 1 dia a 37°C
- 7 dias a 18 – 25°C
- 4 semanas a 2 – 8°C
- Indefinidamente a – 30 ou – 80 °C



Extração do RNA

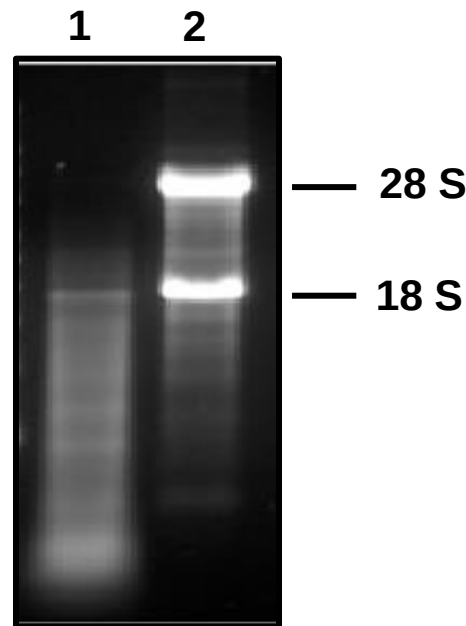
➤ RNAses:

- materiais estéreis, vidrarias secas em forno a 200 °C
- descontaminante de RNAses em superfícies (RNase *AWAY*)

➤ Kits para extração comerciais e “caseiro”

Avaliação do RNA

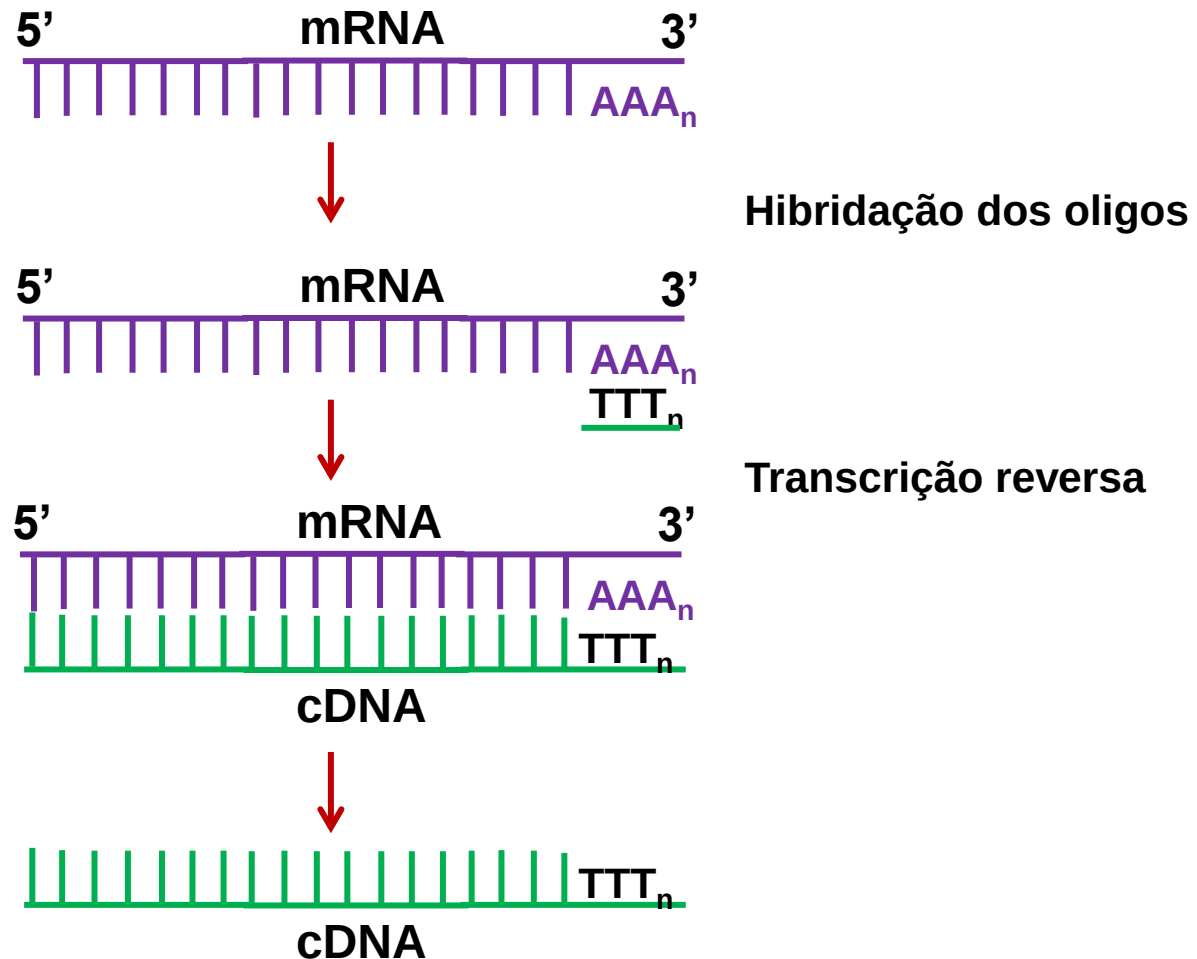
- Leitura no espectrofotômetro: concentração e pureza
- Eletroforese em gel de agarose: integridade



Armazenamento do RNA: - 80 °C

Transcrição Reversa

- RNA mensageiro é utilizado como molde para a síntese do DNA complementar (cDNA)



Estudo do RNA: tecido específico, pesquisa:

- **Expressão gênica (microarrays, qPCR, etc)**
- **Sequenciamento do cDNA – alterações no splicing e variantes alélicas**
- **Sequenciamento em larga escala do RNA: variantes no RNAm, expressão gênica, alterações de splicing, etc.**

Obrigada!!!