

Influencia del método de desparafinación y el tiempo de almacenamiento en la extracción de DNA a partir de tejidos de archivo

Germán ZAFRA SIERRA^[1,3], Óscar FLÓREZ VARGAS^[1,3], Clara Isabel GONZÁLEZ RUGELES^[2,3]

Los tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina son un material de incalculable valor para estudios retrospectivos que requieran aplicar el análisis molecular a muestras clínicas de archivo. Sin embargo, la extracción del DNA a partir de este material consume mucho tiempo y los reactivos usados pueden contribuir a su fragmentación y contaminación, dificultando de esta forma su uso para pruebas moleculares. En este trabajo se analizaron cuatro métodos de desparafinación y su efecto sobre la cantidad y calidad del DNA. Todos los métodos mostraron una alta fragmentación del DNA, con amplificación de fragmentos de tamaños menores a 200 pb. El método de microondas fue el único que permitió amplificación de fragmentos de mayor tamaño, además de presentar la ventaja de su simplicidad, poco tiempo de ejecución y bajo costo. El tiempo de almacenamiento influyó, obteniéndose amplificación en muestras de 6 años y no en muestras almacenadas por 10 años. *Salud UIS* 2004;36:73-79

Palabras claves: desparafinación, tejidos embebidos en parafina, reacción en cadena de la polimerasa, microondas.

Formaline-fixed and paraffin wax embedded tissues are an invaluable source for retrospective molecular analysis with clinical correlation. However, DNA extraction from this type of material demands a prolonged time and the DNA is often highly fragmented and contaminated by protein agents, making it inadequate for molecular purposes. Four methods to deparaffinization are tested and compared the quality and quantity to DNA obtained. All techniques lead to DNA degradation but only short sequences can be amplified, less than 200 bases in all methods. The most efficient method uses a microwave to melt the wax. This method was quick, straightforward, cheaper and effective to amplify fragments the 450 pb. The time of storage influenced, with amplification to specimens of 6 years and not in samples stored 10 years. *Salud UIS* 2004;36:73-79

Key words: deparaffinization, paraffin-embedded tissues, polymerase chain reaction, microwave.

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas los análisis de biología molecular han empezado a jugar un papel clave en el campo de la patología y cuando son bien aplicados tienen una alta precisión diagnóstica y cada vez son más importantes en estudios genéticos y forenses. El material básico para la mayor parte del trabajo diagnóstico en Patología siguen siendo los tejidos embebidos en parafina^{1,2,9}, recurso fundamental e imprescindible al momento de hacer estudios retrospectivos. La facilidad de procesamiento, almacenamiento y transporte son algunas de las ventajas más renombradas de la inclusión en parafina. Si bien es cierto que los tejidos embebidos

en parafina son de gran valor en el diagnóstico histopatológico al preservar la arquitectura y proteínas propias del tejido, es bien conocido que los ácidos nucleicos extraídos de ellos tienen menor calidad que los extraídos de tejidos frescos, dificultando el análisis molecular posterior^{1-8,11,12}. Esto se debe en primera instancia al fijador utilizado en la preservación del tejido¹¹. Fijadores como la formalina, aldehídos y alcoholes ocasionan un entrecruzamiento de las hebras, modificaciones en las bases y degradación parcial del DNA en la mayoría de los casos^{2,3,11}. Los otros factores que pueden influir son el tiempo de almacenamiento, el método de desparafinación utilizado y el método de extracción del material genético.

En el proceso de desparafinación de las muestras de archivo el método más común y el más utilizado es el que hace uso de solventes como el xileno y el etanol^{3-10,12}. Métodos alternos incluyen procesos térmicos en microondas y termocicladores⁸, eliminando el uso del xileno¹⁰ o simplemente digestión directa del tejido para extraer el DNA⁹. Algunos autores utilizaron tejidos sin desparafinar y no encontraron diferencias ni en la cantidad ni en la calidad del ácido nucleico¹².

^[1] Bacteriólogo, UIS.

^[2] Bacterióloga. MSc. Inmunología. PhD. Profesor asociado. Escuela de Bacteriología. Facultad de Salud. UIS. Bucaramanga.

^[3] Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular. GIEM. Facultad de Salud, UIS.

Correspondencia: Clara I.G: E-mail: cig@uis.edu.co. Dirección: Carrera 32 No. 29 – 31. Oficina 419. Facultad de Salud, UIS, Bucaramanga. Teléfono: 6348228 - 6344000 Ext. 3198 - 3196.

Recibido: octubre 12 de 2004 / Aceptado: noviembre 15 de 2004

Debido a que la condición ideal del DNA que se va a utilizar en estudios moleculares es que posea una alta pureza, una longitud suficiente y una proporción de absorbancia 260:280 nm entre 1,6 y 2,0¹³, se debe tener especial cuidado al trabajar con estos tejidos, tanto en el momento de la fijación y la remoción de la parafina como en la posterior extracción y purificación del DNA.

El objetivo del presente estudio es comparar distintos métodos de desparafinación de muestras de archivo, con el fin de optimizar la extracción de DNA para su posterior utilización en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con fines diagnósticos o investigativos y determinar la influencia del tiempo de almacenamiento en la calidad del DNA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tejidos

Los ensayos se llevaron a cabo a partir de tejido cardíaco obtenido en el departamento de Patología de la UIS, Colombia. El tejido utilizado fue fijado en formol y embebido en parafina, según el procedimiento de rutina de este laboratorio. El tiempo de almacenamiento del tejido usado para los diferentes procesos de desparafinación fue de un año.

Se evaluaron y compararon cuatro métodos de desparafinación y no desparafinación, todos los ensayos se realizaron por triplicado. Antes de empezar la desparafinación, cada muestra se lavó dos veces con PBS estéril pH 7,4 (137 mM de NaCl, 2,68 mM de KCl, 1,47 mM de Na₂HPO₄ y 9,03 mM de KH₂PO₄·2H₂O) con el fin de eliminar restos del fijador y contaminantes que pudieran inactivar la proteinasa K, utilizada en la etapa siguiente de digestión. Para cada ensayo se utilizaron cuatro secciones de tejido de 4 µm (1 cm² aproximadamente) las cuales se transfirieron a un tubo de 1,5 ml.

Procedimientos de desparafinación

Xileno/etanol: se añadieron 200 µl de xileno a la sección de tejido. Después de calentar por 15 minutos a 37 °C, se centrifugó a 6.000 g por 15 minutos. Posteriormente se removió el sobrenadante y se repitió el lavado con xileno. Se lavó dos veces con 200 µl de etanol absoluto a 37 °C por 30 minutos. Se centrifugó y se dejó secar al aire. El tejido se resuspendió en 100 µl de PBS hasta la digestión⁸.

Desparafinación por microondas: se añadieron 200 µl de Tween 20 al 0.5 % a la sección de tejido y se agitó fuertemente. Posteriormente se calentó en microondas de 600 W durante 2 minutos e inmediatamente se

centrifugó a 6.000 g durante 15 minutos. Se enfrió en hielo por 2 minutos y se removió el disco de parafina formado. El proceso se repitió cuando fue necesario. El tejido se transfirió a un tubo, se realizaron dos lavados con PBS y se procedió a la digestión⁸.

Desparafinación por termociclador: el procedimiento es similar al anterior, pero se calentó en un termociclador a 90 °C por 10 minutos y se dejó a 65 °C por un minuto. Se centrifugó, y se removió la parafina, el proceso se repitió cuando fue necesario. El tejido se transfirió a tubo, se realizaron dos lavados con PBS y se procedió a la digestión⁸.

Desparafinación libre de xileno: se incubó la sección de tejido (aún en la lámina) a 60 °C por 10 minutos. Después de dejar el tejido a temperatura ambiente por 10 minutos, se sumergieron las muestras en Tween 20 al 2 % a 90 °C por un minuto, luego se pasó al baño maría a 90 °C por 5 segundos. Se enjuagó en agua tibia y se transfirió el tejido a un tubo de 1,5 ml para la digestión, luego de dos lavados con PBS¹⁰.

Digestión sin desparafinación: a la sección de tejido se le añadieron 100 µl de solución TEP (Tris 10 mM, EDTA 10 mM pH 8,0, proteinasa K 200 µg/ml). Las muestras se digirieron por un a dos días a 60 °C⁹.

Lisado total

Para obtener el lisado total, los tejidos se digirieron a 60 °C en 120 µl de solución de digestión sin SDS (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM pH 8,0, Tween 20 0,5%, Proteinasa K 20 mg/ml) durante 12 a 24 horas. Posteriormente se dejaron hervir las muestras por 10 minutos para denaturar la proteinasa K y demás proteínas residuales. Las muestras se centrifugaron (3.500 g por 4 minutos) para remover el exceso de proteínas y el sobrenadante fue transferido a otro tubo. De la solución obtenida se realizó una dilución 1:10 para ser utilizada como muestra blanco en la PCR.

Extracción de DNA

La extracción se llevó a cabo por el método de *salting out*²⁴. Los tejidos se digirieron a 60 °C en 114 µl de solución de digestión (Tris-HCl 100 mM, EDTA 40 mM pH 8,0, SDS 5 %) y 6 µl de proteinasa K (20 mg/ml). El tiempo de digestión varió entre uno y dos días. Para precipitar las proteínas se trató con 150 µl de acetato de sodio 5 M, se centrifugó a 6.000 g por 5 minutos y se transfirió el sobrenadante a otro tubo. Se agregaron 400 µl de isopropanol para precipitar el DNA, se centrifugó y se lavó con etanol al 70 %. El DNA se resuspendió en 50 µl de TE 1X.

Amplificación del DNA

Se realizó amplificación enzimática de genes humanos como IL-4 que amplifica fragmentos de 195 pb y de hormona de crecimiento humano (HCH) que amplifica fragmentos de 450 pb. Las condiciones de los ensayos se resumen en la Tabla 1.

En los casos en los cuales no se observó amplificación en el gel de agarosa se realizó una segunda PCR usando como molde una alícuota de la primera. En estudios previos observamos amplificación en el 85% de las muestras negativas sometidas a una segunda ronda de amplificación²⁵.

Para evaluar la influencia del tiempo de inclusión del tejido en parafina sobre la amplificación por PCR se utilizaron 12 tejidos (tres tejidos por tiempo) embebidos en parafina con diferentes tiempos (un mes, un año, seis y diez años). Estos ensayos se llevaron a cabo desparafinando por el método de microondas y haciendo purificación del DNA por *salting out*.²⁴ Para la amplificación se utilizaron los iniciadores de IL-4 y hormona de crecimiento.

Electroforesis del DNA

La cantidad y calidad del DNA extraído por cada uno de los métodos fue determinado corriendo las muestras en un gel de agarosa (BioWhittaker Molecular Applications, U.S.A.) al 1,2% tratado con bromuro de etidio y detectado con un transiluminador de luz ultravioleta. Se utilizó el marcador de peso molecular DNA Lambda/ HindIII (Promega).

Los amplificadores obtenidos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% utilizando una alícuota de 10 µl. Se utilizó el marcador de peso Gene ruler 50 bp DNA ladder (Fermentas).

RESULTADOS

El DNA analizado mediante electroforesis en gel de agarosa mostró degradación, con el mayor contenido de DNA en tamaños que oscilaron entre 50-100 pb en el caso de los tejidos desparafinados con el método de xileno-etanol (Figura 1). En los métodos que utilizaron calor como el microondas y el termociclador, el tamaño del DNA obtenido fue superior, entre 50-200,

obteniéndose una mayor cantidad con tamaños arriba de 300 pb en el método libre de xileno (Figura 1). Cuando no se realizó desparafinación la mayor parte del DNA obtenido presentó tamaños alrededor de 50 pb.

Tabla 2. Reacción en cadena de la polimerasa para amplificación de DNA de genes humanos. La convención utilizada muestra el número de pruebas positivas sobre el total de las muestras empleadas para cada método de desparafinación y en paréntesis los resultados de la segunda PCR.

Método		IL- 4 (195 pb)	HCH (450 pb)
Xileno-etanol	DNA extraído	2/3	0/3 (2/3)
	Lisado total	2/3	0/3 (0/3)
Microondas	DNA extraído	3/3	1/3 (2/3)
	Lisado total	3/3	2/3 (2/3)
Termociclador	DNA extraído	3/3	2/3 (3/3)
	Lisado total	3/3	0/3 (0/3)
Libre de xileno	DNA extraído	3/3	1/3 (2/3)
	Lisado total	3/3	0/3 (0/3)
Sin desparafinación	DNA extraído	3/3	0/3 (1/3)
	Lisado total	2/3	0/3 (0/3)

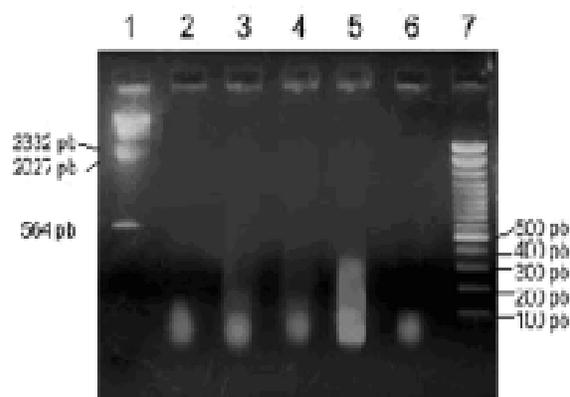


Figura 1. Electroforesis de DNA obtenido de tejidos embebidos en parafina. Carril 1, marcador de peso Lambda DNA/HindIII (Promega); carril 7, marcador de peso Gene ruler 100bp DNA ladder (Fermentas U.S.A.); carril 2, método xileno/etanol; carril 3, desparafinación con microondas; carril 4, termociclador; carril 5, libre de xileno; carril 6, sin desparafinar.

Tabla 1. Reacción en cadena de la polimerasa de genes humanos.

Gen	Iniciador	Secuencia	Amplificado (pb)	Conc iniciador	T ⁰ unión	Ciclos	Ref
IL-4	IL-4 F	5' -TAA ACT TGG GAG AAC ATG GT- 3'	195	0,5 µM	53°C	45	21
	IL4- R	5' -TGG GGA AAG ATA GAG GAA TA- 3'					
HCH	HCH F	5' -GCC TTC CCA ACC ATT CCC TT- 3'	450	0,1 µM	65°C	35	22
	HCH R	5' -TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT- 3'					

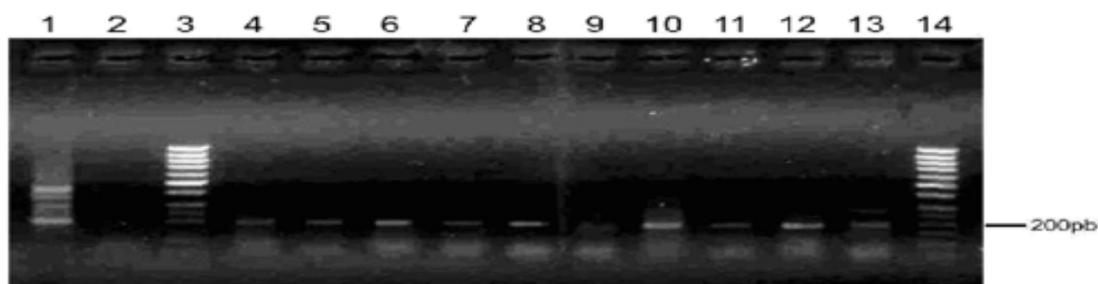


Figura 2. Amplificación de IL-4 en tejidos embebidos en parafina. Carril 3 y 14, marcador de peso Gene ruler 50 bp DNA ladder (Fermentas USA); carril 1, control positivo (DNA humano); carril 2, control negativo (sin DNA); carril 4 y 5 DNA y lisado total obtenidos por desparafinación con xileno/etanol; carril 6 y 7 DNA y lisado total obtenidos por desparafinación con microondas; carril 8 y 9 DNA y lisado total obtenidos por desparafinación con termociclador; carril 10 y 11, DNA y lisado total obtenidos por desparafinación libre de xileno; carril 12 y 13 DNA y lisado total obtenidos sin desparafinar.

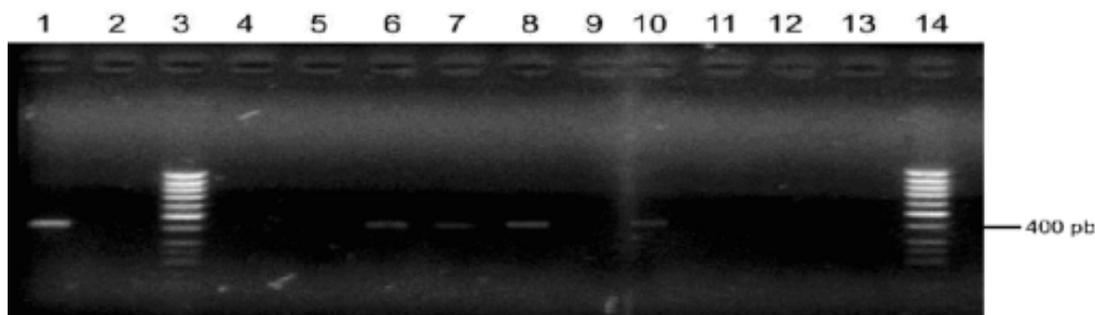


Figura 3. Amplificación de hormona del crecimiento humano en tejidos embebidos en parafina. Carril 3 y 14, marcador de peso Gene ruler 50bp DNA ladder (Fermentas U.S.A.); carril 1, control positivo (DNA humano); carril 2, control negativo (sin DNA); carril 4 y 5 DNA y lisado total obtenidos por desparafinación con xileno/etanol; carril 6 y 7 DNA y lisado total obtenidos por desparafinación con microondas; carril 8 y 9 DNA y lisado total obtenidos por desparafinación con termociclador; carril 10 y 11, DNA y lisado total obtenidos por desparafinación libre de xileno; carril 12 y 13 DNA y lisado total obtenidos sin desparafinar.

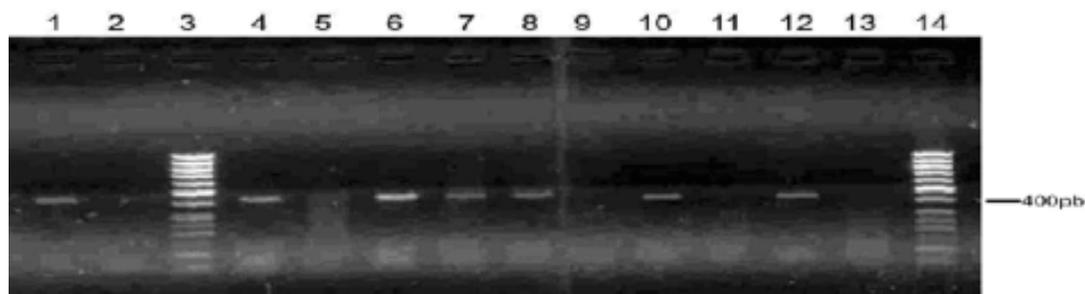


Figura 4. Reamplificación de hormona de crecimiento humano. Carril 3 y 14, marcador de peso Gene ruler 50bp DNA ladder (Fermentas USA); carril 1, control positivo (DNA humano); carril 2, control negativo (sin DNA); carril 4 y 5 DNA y lisado total obtenidos por desparafinación con xileno/etanol; carril 6 y 7 DNA y lisado total obtenidos por desparafinación con microondas; carril 8 y 9 DNA y lisado total obtenidos por desparafinación con termociclador; carril 10 y 11, DNA y lisado total obtenidos por desparafinación libre de xileno; carril 12 y 13 DNA y lisado total obtenidos sin desparafinar.

Los resultados de la amplificación se resumen en la Tabla 2, donde se observa amplificación de fragmentos de tamaños mayores a 450 pb (gen HCH), 2/3 cuando se desparafinó con calor y en el método libre de xileno, mientras que con fragmentos de tamaños pequeños de 195 pb (gen de IL-4) la amplificación se obtuvo en las

muestras procesadas por todos los métodos utilizados, incluido el que no eliminó la parafina. Adicionalmente se obtuvo amplificación de los lisados totales diluidos 1:10 (figura 2 y 3). En el caso de HCH, donde se realizó la segunda PCR se obtuvo amplificación, en por lo menos un ensayo de tres con todas las muestras, cuando se

Tabla 3. Reacción en cadena de la polimerasa para DNA de genes humanos. La convención utilizada muestra el número de secciones positivas sobre el total de las secciones empleadas para cada tiempo de almacenamiento.

Tiempo de almacenamiento	IL- 4 (195 pb)	HCH (450 pb)
1 mes	9/9	0/9
1 año	8/9	0/9
6 años	5/9	0/9
10 años	0/9	0/9

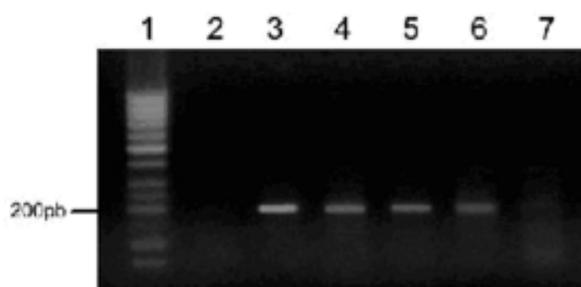


Figura 5. Amplificación de IL-4 en tejidos de diferentes edades. Carril 1, marcador de peso Gene ruler 50 bp DNA ladder (Fermentas USA); carril 2, control negativo (sin DNA); carril 3, control positivo (DNA humano); carril 4, un mes de edad; carril 5, un año de edad; carril 6, 6 años de edad; carril 7, 10 años de edad.

extrajo el DNA, pero con el lisado total solamente en el método de microondas (ver Figura 4 y Tabla 2).

A partir de las muestras almacenadas en diferentes tiempos se obtuvo amplificación en aquellas menores a 10 años y solamente con fragmentos de tamaños menores de 200 pb (Tabla 3).

DISCUSIÓN

Las muestras de archivo de los laboratorios de patología tienen un incalculable valor dado que permiten hacer estudios moleculares a partir de muestras clínicas de archivo. Para la realización de los estudios moleculares, el DNA aislado de los tejidos debe ser de buena calidad y en cantidad suficiente para poder obtener resultados satisfactorios.

El método de rutina utilizado para el almacenamiento de estos tejidos es la fijación en formalina e inclusión en parafina debido a los bajos costos, facilidad de almacenamiento y a la preservación adecuada de las estructuras y proteínas tisulares. Desafortunadamente este método afecta tanto la calidad como la cantidad de

los ácidos nucleicos que se pueden obtener, por ello se han diseñado numerosas técnicas para desparafinar y extraer el DNA, de tal forma que pueda ser usado en la realización de pruebas moleculares^{5,10,16,17}.

La mayoría de los métodos involucran tres pasos: desparafinación, digestión y purificación. La disolución de la parafina en xileno y etanol para la rehidratación de los tejidos fue descrito en 1985 y es el método empleado en la mayoría de los laboratorios de patología⁸. Posteriormente, se han desarrollado métodos que involucran calor para la eliminación de la parafina, digestión con proteinasa K y purificación con fenol-cloroformo o el uso directamente del Chelex-100, una resina que permite obtener DNA de buena calidad en un solo paso^{8, 14}. Algunos estudios reportan que no encontraron diferencias en la calidad y cantidad del DNA obtenido en los tejidos no desparafinados cuando se compararon con los desparafinados¹².

El propósito de este trabajo fue comparar cuatro métodos de desparafinación y no desparafinación evaluándolos para su uso posterior en amplificación enzimática. Adicionalmente se evaluaron aspectos tales como tiempo, y facilidad del procedimiento. La calidad del DNA fue analizada por electroforesis en gel de agarosa y su integridad por su capacidad para amplificar fragmentos de genes humanos de diferente tamaño.

La alta degradación del DNA extraído observada con todos los métodos utilizados, incluido el tejido sin desparafinar comparado con nuestros estudios previos donde se controló el proceso de fijación, y la calidad de los fijadores utilizados²⁵, muestra la importancia del proceso de fijación previo a la inclusión del tejido en parafina. El método usado en el laboratorio de patología utiliza formol como fijador. Está descrito que este reactivo o la formalina no tamponada se oxidan a ácido fórmico generando un medio ácido, factor principal en la degradación del DNA, dado que a pH menor a cuatro hay hidrólisis de los enlaces β glicosídicos de las purinas. En esta condición las purinas son protonadas y fácilmente clivadas quedando la cadena abierta y el DNAapurínico es susceptible al clivaje por iones hidroxilo³.

A pesar de que la mayoría de los fragmentos de DNA se encontraron en tamaños que oscilaron desde 50-100 pb y pocos arriba de 200 se obtuvo amplificación del fragmento del gen de IL-4 (195 pb) en todos los métodos analizados, demostrando que persisten fragmentos de DNA de mayor tamaño, aunque a una concentración que no alcanza a ser detectada por la electroforesis en agarosa.

Se recomienda en la literatura que los blancos de amplificación para muestras de archivo no almacenadas en las condiciones de fijación y tiempo adecuadas deben ser lo más pequeños posible^{3,5,12}. En el caso que se requiera amplificación de fragmentos de tamaño mayor se han descrito métodos de tratamiento del DNA previos a la PCR con resultados satisfactorios^{3,6,11}.

El método del microondas mostró mejores resultados en la amplificación del gen de HCH cuyo fragmento a amplificar es de 450 pb ya que fue positiva en uno de tres ensayos con DNA extraído y en dos de tres con lisado total. Este resultado estaría acorde con la técnica usada para la demostración de antígenos proteicos en los métodos inmunohistoquímicos, en la cual con el simple calentamiento del tejido de archivo en agua caliente se aumentó dramáticamente la detección¹⁸. Posteriormente se utilizó la misma técnica para los estudios de hibridación in situ (ISH)¹⁹ y de ISH fluorescente (FISH) con aumentos significativos de la señal²⁰. Shi y colaboradores emplearon un método similar analizando además, el efecto del pH, observando mejor calidad e integridad del DNA a 120 °C y pH alcalino¹⁶. Este método además presenta la ventaja de ser muy simple, no requiere reactivos adicionales al Tween 20 y se realiza en un tiempo corto, aproximadamente 25 minutos. Estos resultados son importantes, especialmente en los casos en los cuales se requiera manipular gran cantidad de muestras.

El método libre de xileno fue el más rápido y sencillo (20 minutos) comparado con los demás métodos de desparafinación como el Xileno/etanol (una hora), termociclador (35 minutos) y microondas (25 minutos), además el DNA tuvo mayor contenido de fragmentos de tamaños mayores, pero en la amplificación del gen de HCH (450 pb) sólo uno de tres ensayos fue positivo con DNA purificado y ninguno de los que utilizaron lisado total. Este resultado puede deberse a la presencia de inhibidores o a la concentración de Tween 20 utilizada en el procedimiento la cual ha sido descrita como posible inhibidora de la PCR.

Vale la pena destacar los resultados obtenidos con la utilización del lisado total como molde para la amplificación, ya que existen reportes con resultados similares al de este estudio donde muestran la disminución de la sensibilidad cuando se compara con el DNA purificado⁸. En este caso la utilización de la dilución 1:10 que disminuye la inhibición¹⁵ pudo influir en el resultado positivo obtenido con algunos métodos de desparafinación, en contraste con un estudio previo realizado por nuestro grupo con muestras similares en las cuales no se observó amplificación con el lisado sin diluir²⁵.

La amplificación al realizar una segunda PCR corrobora los resultados obtenidos en nuestro estudio previo²⁵ y lo descrito en la literatura sobre el aumento de la sensibilidad de detección usando este método^{23,26}.

En conclusión el método de microondas para desparafinar funciona mejor, no sólo para amplificación por PCR de fragmentos de tamaños hasta 500 pb sino es un método rápido, simple y económico, ideal para ser utilizado en el manejo de gran cantidad de muestras.

La amplificación enzimática se ve afectada por el tiempo de almacenamiento de las muestras en parafina según los resultados obtenidos, donde se logró amplificación con muestras de archivo de seis años o menos. En la literatura se han reportado amplificaciones con muestras desde uno hasta 30 años o más de almacenamiento y no se observaron diferencias cuando se usaron diferentes métodos de desparafinación, ni de purificación del ácido nucleico⁸. Probablemente el resultado obtenido se halle influenciado, no solamente por el tiempo de almacenamiento en parafina, sino principalmente por la solución de fijación empleada previamente y por el tiempo de permanencia en la misma, uno de los parámetros más cruciales en la obtención de DNA en cantidad y calidad adecuadas para análisis moleculares^{15,27}.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Julio César Mantilla del Departamento de Patología de la Facultad de Salud, por suministrar los tejidos de archivo para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

- 1 FARKAS D.H., KAUL K.L., WIEDBRAUK D.L., KIECHLE F.L. "Specimen collection and storage for diagnostic molecular pathology investigation". *Arch Pathol Lab Med* 1996;120:91-596
- 2 GILLESPIE J.W., BEST C., BICHSEL V., COLE K.A., GREENHUT S.F., HEWITT S.M., AHRAH M., GATHRIGHT Y.B., MERINO M.J., STRAUSBERG R.L., EPSTEIN J.I., HAMILTON S.R., GANNOT G., BAIBAKOVA G.V., CALVERT V.S., FLAIG M.J., CHUAQUI R.F., HERRING J.C., PFEIFER J., PETRICOIN E.F., LINEHAN W.M., DURAY P.H., BOVA G.S., EMMERT-BUCK M.R. "Evaluation of non-formalin tissue fixation for molecular profiling studies". *Am J Pathol* 2002;160(2):449-457
- 3 BONIN S., PETRERA F., NICCOLINI B., SANTA G. "PCR Analysis in archival postmortem tissues". *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2003;56:184-186
- 4 SERTH J., KUCZYK M.A., PAESLACK U., LICHTINGHAGEN R., JONAS U. "Quantitation of DNA extracted after

- micropreparation of cells from frozen and formalin-fixed tissue sections". *Am J Pathol* 2000;156(4):1189-1196
- 5 BIELAWSKI K., ZACZEK A., LISOWSKA U., DYBIKOWSKA A., KOWALSKA A., FALKIEWICZ B. "The suitability of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for double differential polymerase chain reaction analysis". *Int J Mol Med* 2001;8: 573-578
 - 6 CHAN P.K.S., CHAN D.P.C., TO K.F., YU M.Y., CHEUNG J.L.K., CHENG A.F. "Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral DNA". *J Clin Pathol* 2001;54:401-403
 - 7 TBAKHI A., TOTOS G., HAUSER-KRONBERGER C., PETTAY, BAUNOCH D., HACKER G.W., TUBBS R.R. "Fixation conditions for DNA and RNA *in situ* Hybridization". *Am J Pathol* 1998;152(1):35-41
 - 8 COOMBS N.J., GOUGH A.C., PRIMROSE J.N. "Optimization of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue". *Nucleic Acid Res* 1999;27(16)
 - 9 PINTO A.P., VILLA L.L. "A spin cartridge system for DNA extraction from paraffin wax embedded tissues". *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1998;51:48-49
 - 10 FALKEHOM L., GRANT C.A., MAGNUSSON A., MÖLLER E. "Xylene-free method for histological preparation: A multicentre evaluation." *Lab Invest* 2001;81(9):1213-1221
 - 11 REN Z.P., SÄLLSTRÖM J., SUNDSTRÖM C., NISTÉR M. "Recovering DNA and optimizing PCR conditions from microdissected formalin-fixed and paraffin embedded materials". *Pathobiology* 2000;68:215-217
 - 12 SEEP R., SZABÓ I., UDA H., SAKAMOTO H. "Rapid techniques from DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR". *J Clin Pathol* 1994;47:318-323
 - 13 BREGÅRD A., VU P., GEITVIK G., BØRRESEN-DALE A.L. "Promising method for DNA extraction from paraffin embedded archive material". *Breast Cancer Res* 2000;2(Suppl 1):P8.01
 - 14 STEIN A., RAOULT D. "A simple method for amplification of DNA from paraffin-embedded tissues". *Nucleic Acid Res* 1992;20(19):5237-5238
 - 15 CELESTE C.N. "Diagnosis of infectious diseases: a Cytopathologist's perspective". *Clinical Microbiology Review*, 1998; 11: 341-365
 - 16 SHI S.R., COTE R.J., WU L., LIU C., DATAR R., SHI Y., LIU D., LIM H., TAYLOR C.R. "DNA extraction from archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH". *J Histochem Cytochem* 2003;50(8):1005-1011
 - 17 WICKHAM C.L., BOYCE M., JOYNER M.V., SARSFIELD P., WILKINS B.S., JONES D.B., ELLARD S. "Amplification of PCR products in excess of 600 base pairs using DNA extracted from decalcified, paraffin wax embedded bone marrow trephine biopsies". *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2000;53:19-23
 - 18 TAYLOR C.R. "Paraffin section immunocytochemistry for estrogen receptor. This time has come". *Cancer* 1996;77:2419-2422
 - 19 SIBONY M., COMMO F., CALLARD P., GASC J.M. "Enhancement of mRNA *in situ* hybridization signal by microwave heating". *Lab Invest* 1995;73:586-591
 - 20 OLIVER K.R., HEAVENS R.P., SIRINATSINGHI D.J.S. "Quantitative comparison of pretreatment regimens used to sensitive *in situ* hybridization using oligonucleotide probes on paraffin-embedded brain tissue". *J Histochem Cytochem* 1997;45:1707-1713
 - 21 NOGUCHI E., SHIBASAKI M., ARINAMI T., TAKEDA K., YOKOUCHI Y., KAWASHIMA T., YANAGI H., MATSUI A., HAMAGUCHI H. "Association of asthma and the interleukin-4 promoter gene in Japanese". *Clinical and Experimental Allergy*, 1997; 28: 449-453
 - 22 MULLIGHAN C.G., MARSHALL S.E., BUNCE M., and WELSH K.I. "Variation in immunoregulatory genes determines the clinical phenotype of common variable immunodeficiency". *Genes and Immunity*, 1999;1:137-148.
 - 23 LEVINE S., PEREZ G., OLIVARES A., YEE H., HANNA B., BLAZER M. "PCR-based detection of *Bacillus anthracis* in Formalin-Fixed tissue from a patient receiving Ciprofloxacin". *Journal of Clinical Microbiology*, 2002; 40: 4360-4362
 - 24 ALJANABI S.M., MARTÍNEZ I. "Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques". *Nucleic Acids Research*, 1997; 25(22):4692-4693
 - 25 FLÓREZ O., GONZÁLEZ C.I. "Amplificación por PCR de tejidos de archivo: efecto de los fijadores". *Salud UIS*, 2004; 36(2):56-64
 - 26 NITTA Y., TANAKA H., MASUDA Y., HOSHI M. "The quality of DNA recovered from the archival tissues of atomic bomb survivors is good enough for the single nucleotide polymorphism analysis in spite of the decade-long preservation in formalin". *J Radiat Res*, 2002;43:65-75
 - 27 LEHMANN U., BOCK O., GLOCKNER S., KREIPE H. "Quantitative molecular analysis of laser-microdissected paraffin-embedded human tissues". *Pathobiology* 2000;68:202-208