

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Luiza Emy Dorfman

**Implementação da produção de
sondas de DNA para hibridização *in
situ* fluorescente**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2018**

Luiza Emy Dorfman

Implementação da produção de sondas de DNA para hibridização *in situ* fluorescente

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Dr. Paulo Ricardo Gazzola Zen
Coorientadores: Dr. Diego D'Avila Paskulin
Dra. Patrícia Trevisan
Dr. Rafael Fabiano Machado da Rosa

**Porto Alegre
2018**

Catálogo na Publicação

Dorfman, Luiza Emy

Implementação da produção de sondas de DNA para
hibridização in situ fluorescente / Luiza Emy Dorfman.
-- 2018.

115 p. : 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências
da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em
Patologia, 2018.

Orientador(a): Paulo Ricardo Gazzola Zen ;
coorientador(a): Diego D'Avila Paskulin , Patricia
Trevisan.

1. Citogenética. 2. FISH. 3. Homebrew probes. 4.
Microdeletion syndrome. I. Título.

Agradecimentos

Ao prof. Paulo Zen pela oportunidade e confiança para o desenvolvimento deste projeto. Agradeço também pelas conversas, conselhos, tempo e paciência ao longo destes anos.

Ao prof. Rafael Rosa agradeço pelo estímulo, inspiração e conselhos preciosos.

Aos meus coorientadores Diego Paskulin e Patrícia Trevisan que me guiaram em todas as etapas deste árduo trabalho.

À querida colega Maiara Anschau pela parceria para todas horas.

À Andressa Scheneiders, Luiza Scherner e Naiane Bassani por participarem ativamente dos processos de desenvolvimento das sondas.

Aos colegas de laboratório Andressa Glaeser, Bruna Diniz, Daniéle Bernardi, Ernani Boeher, Jamile Correia, Leonardo Schereiner, Juliane Nascimento, Mauricio Rouvel e Vera Andrade, pelo auxílio e apoio nas diferentes etapas de desenvolvimento do trabalho.

Aos doadores voluntários, sem os quais as análises não poderiam ser realizadas.

À prof. Marileila Varella-Garcia que nos cedeu gentilmente os protocolos de desenvolvimento das sondas.

À prof. Mariluce Riegel por auxiliar nas dúvidas, emprestar reagentes e ceder protocolos.

Ao prof. Giorgio Paskulin por nos conceder as amostras alteradas e pelo empréstimo de reagentes.

Ao meu querido e amado marido, Joel pelo apoio incondicional.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	9
1.1.1 <i>Princípios da técnica de FISH</i>	9
1.1.2 <i>Aplicações clínicas da técnica</i>	11
1.1.3 <i>Tipos de sondas</i>	12
1.2 FISH no contexto das neoplasias	13
1.2.1 <i>O câncer na atualidade</i>	13
1.2.2 <i>A investigação citogenética nas leucemias</i>	14
1.2.2.1 <i>O cromossomo <i>Philadelphia</i> no diagnóstico de LMC</i>	16
1.2.2.2 <i>Alterações do gene <i>MLL</i></i>	18
1.2.3 <i>Investigação citogenética em tumores sólidos</i>	21
1.2.4 <i>Diagnóstico das neoplasias</i>	22
1.3 FISH no contexto das malformações congênitas	22
1.3.1 <i>Síndromes de microdeleções e microduplicações</i>	24
1.3.1.1 <i>Síndrome del22q11.2</i>	25
1.4 Desenvolvimento de sondas <i>in house</i>	26
1.4.1 <i>Escolha dos clones</i>	27
1.4.2 <i>Etapas de desenvolvimento laboratorial</i>	28
1.4.3 <i>Validação das sondas <i>homebrew</i></i>	30
1.4.3.1 <i>Classificação regulatória das sondas de FISH</i>	30
1.4.3.2 <i>Etapas de validação das sondas <i>homebrew</i></i>	31
1.5 Justificativa	33
1.6 Referências bibliográficas	35

2. OBJETIVOS	40
3. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS	41
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
5. ANEXOS	60

Lista de abreviaturas utilizadas

ABL1: Abelson Leukemia Virus

array-CGH: Microarray-based comparative genomic hybridization

ASRs: Analyte Specific Reagents (Reagente específico de análise)

BACs: Bacterial Artificial Chromosomes (Cromossomos artificiais bacterianos)

BCR: Breakpoint Cluster Region

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (Ferramenta básica de busca de locais de alinhamento)

CAP: College of American Pathologists (Colégio de Patologistas Americanos)

DNA: Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)

dNTPs: Deoxyribonucleotide triphosphate (Desoxirribonucleotídeos fosfatados)

FDA: Food and Drug Administration

*FISH: Fluorescence in situ hybridization (Hibridização *in situ* fluorescente)*

INCA: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

LLA: Leucemia Linfocítica Aguda

LMA: Leucemia Mielóide Aguda

LMC: Leucemia Mielóide Crônica

MLL: Mixed Lineage Leukemia

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da Polimerase)

Ph: Cromossomo Philadelphia

SNP-array: single nucleotide polymorphism microarray

WHO: World health organization (Organização mundial da saúde)

Resumo da Tese

Introdução: A tecnologia de citogenética molecular de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) permite a identificação de alterações cromossômicas submicroscópicas tanto em neoplasias como em doenças congênitas. Nas neoplasias, a identificação destas anomalias auxilia no diagnóstico, determinação da alternativa terapêutica mais adequada e indicação de prognóstico. Em indivíduos portadores de malformações múltiplas e déficit cognitivo, permite a investigação de alterações cromossômicas submicroscópicas que não são identificados pela técnica clássica de cariótipo. O diagnóstico citogenético molecular ainda é muito distante da realidade do nosso Sistema Único de Saúde, geralmente disponibilizado por meio de iniciativas pontuais e ligadas a projetos de pesquisa, devido ao alto custo das sondas comerciais disponíveis para FISH. Assim, há uma grande demanda reprimida, o que retarda ou mesmo impossibilita o diagnóstico, trazendo grande sofrimento físico e psíquico aos pacientes e seus familiares.

Objetivos: Implementar a manufatura de sondas de DNA para hibridização *in situ fluorescente* no Laboratório de Citogenética da UFCSPA.

Material e Métodos: Neste trabalho desenvolvemos as sondas para detecção da deleção 22q11.2, alterações no gene *MLL* e fusão dos genes *BCR-ABL1*. O desenvolvimento *in house* das sondas de FISH consiste em vários processos sequenciais, com etapas de checagem. Inicialmente foram identificados e selecionados os cromossomos artificiais de bactérias (BACs), estes foram cultivados, com posterior extração e amplificação de DNA. Depois os DNAs amplificados foram marcados com fluorocromos pela técnica de *Nick-*

translation. Após o desenvolvimento das sondas, realizou-se a validação em amostras normais e alteradas.

Resultados: O conjunto de sondas desenvolvidas para a detecção da deleção 22q11.2 permitiu a detecção da alteração em amostra alterada, tanto em metáfases quanto em interfases, apresentando 93,55% de sensibilidade, 99,2% de especificidade e 99,8% de eficiência em amostras normais. As sondas desenvolvidas para investigação de alterações no gene *MLL* apresentaram em amostras normais sensibilidade de 94,65%, especificidade de 100% e eficiência de 99,3%. Já as sondas desenvolvidas para a detecção da fusão dos genes *BCR-ABL1*, não puderam ser validadas em amostras normais devido a presença de sinais inespecíficos em uma das sondas manufaturadas. Todavia, em amostras alteradas foi possível detectar a fusão destes genes. Com a manufatura *in house* das sondas chegamos a um custo por amostra 8,5 vezes menor do que quando comparado aos valores das sondas comerciais.

Conclusão: A implementação do desenvolvimento das sondas foi eficaz, sendo que as sondas del22q11.2 e *MLL* apresentaram valores adequados no processo de validação. Para validar as sondas de detecção da fusão dos genes *BCR-ABL1* será necessária a compra de um novo clone para marcar o gene *BCR*. O grupo de pesquisa do Laboratório de Citogenética da UFCSPA pretende continuar com o desenvolvimento de sondas *home-brew* para investigação de outras alterações cromossômicas associadas a síndromes genéticas e neoplasias.

1 INTRODUÇÃO

O campo da Citogenética apresentou um grandioso avanço em 1956 quando foi determinado o número correto de cromossomos humanos (Tjio e Levan, 1956). A partir daí foram descobertas as primeiras síndromes associadas às alterações cromossômicas numéricas, como as síndromes de Down, Turner, Klinefelter e as trissomias dos cromossomos 18 e 13 (Crotwell e Hoyme, 2012; Riegel, 2014). Anos depois, em 1968, a citogenética iniciou a era do bandamento cromossômico, com a banda Q, a qual utilizava quinacrina, um corante fluorescente capaz de marcar os cromossomos em toda sua extensão (Riegel, 2014). Esta metodologia possibilitou a identificação de cada um dos 23 pares de cromossomos humanos. Com o desenvolvimento das técnicas de bandamento foram descobertas novas síndromes cromossômicas, mas agora envolvendo alterações na estrutura dos cromossomos.

Dentre as técnicas de bandamento citogenético, o Bandamento GTG - que utiliza tratamento enzimático com tripsina e posterior coloração com o corante Giemsa - é utilizado ainda na rotina de laboratórios do mundo todo. Também chamado de cariótipo convencional, o cariótipo com bandamento GTG é considerado padrão-ouro para diagnósticos citogenéticos em pediatria, ginecologia/obstetrícia e oncologia (Crotwell e Hoyme, 2012; Das e Tan, 2013; Lawce, 2017). Apesar de ser amplamente utilizado, o cariótipo convencional possui limitações, pois, alterações menores que 5-10 Mb dificilmente são detectadas (Rosenfeld e Patel, 2016).

1.1 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

Para suprir a necessidade de detectar alterações menores, foi desenvolvida em 1986 por Pinkel e cols. a metodologia de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), a qual possibilitou analisar a estrutura dos cromossomos com maior detalhamento.

1.1.1 Princípios da técnica de FISH

A FISH permite a identificação da presença e localização de determinadas regiões do genoma. Utiliza sondas de DNA genômico marcadas de forma direta, com fluorocromos, ou indireta, usando haptenos (Liehr, 2017). Convém ressaltar que neste estudo trataremos apenas da técnica de FISH com marcação direta pela metodologia de *Nick-translation*, a qual será descrita detalhadamente *a posteriori*.

A técnica de FISH depende da capacidade da fita simples de DNA (sequência-alvo) de se hibridizar em uma sequência complementar (sonda). A hibridização *in situ* inicialmente utilizava corantes radioativos para a marcação genômica, sendo substituída por corantes fluorescentes após alguns anos. A utilização dos fluorocromos tornou o emprego da técnica mais prático, e desta forma, rápida e amplamente aplicada na detecção de alterações cromossômicas (Lichtenbelt e cols., 2011).

Além de permitir a análise cromossômica, onde são necessárias células em divisão, a FISH tornou possível também a avaliação de núcleos interfásicos. As sondas de FISH podem ser aplicadas em lâminas contendo os mais diversos tipos celulares, previamente cultivados ou não, e secções de tecidos. Desta forma, essa técnica permite investigar alterações genéticas em

amostras sem a necessidade de cultivo celular, fato importante para superar as deficiências da análise cromossômica tradicional, como em amostras com índice mitótico limitado e baixa qualidade de metáfases ou mesmo amostras de tecido sólido sem cultivo celular prévio.

Mesmo sendo possível trabalhar com diversos tipos de células e tecidos, os princípios da FISH consistem basicamente de etapas essenciais, as quais são descritas a seguir (Liehr, 2017): (a) fixação do DNA-alvo na superfície de uma lâmina de microscopia; (b) pré-tratamento da lâmina para receber a sonda; (c) sonda de DNA marcada com fluorocromo complementar a sequência de interesse; (d) desnaturação do DNA-alvo e da sonda; (e) hibridização das sequências-alvo e sonda; (f) lavagem da lâmina pós-hibridização; (g) adição do contracolorante DAPI (4', 6-diamidino-2phenylindole) com *antifade* (solução antidesbotamento) e colocação da lamínula; (h) refrigeração do material; (i) análise em microscópio epifluorescente. As etapas de desnaturação e hibridização da sequência-alvo e da sonda de DNA podem ser acompanhadas na figura 1.

Cada laboratório adota variações da técnica em seus protocolos. De acordo com o tipo de material a ser investigado podem variar as soluções e tempos utilizados na técnica, mas geralmente, serão seguidas as etapas básicas citadas previamente. Com o advento da FISH, o campo da citogenética prosperou vastamente, logo surgiram novas técnicas de citogenética molecular baseadas nos mesmos princípios da FISH, e subsequentemente apareceram as técnicas de citogenômica.

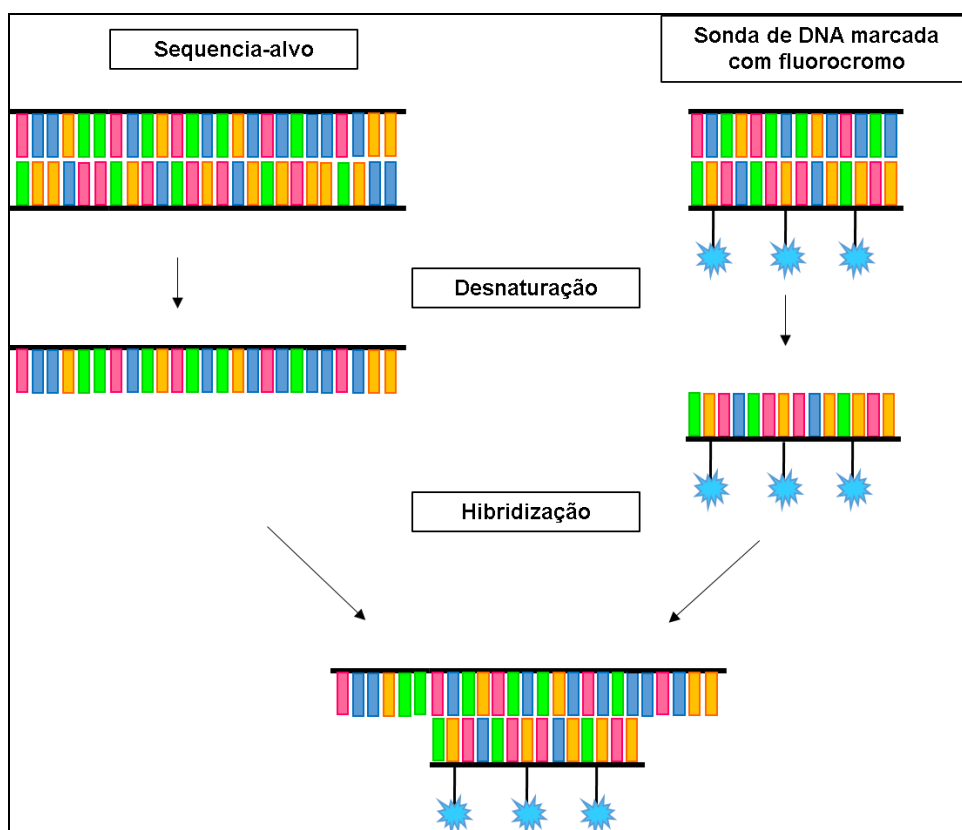


Figura 1- Representação esquemática da hibridização entre a sequência-alvo e a sonda de DNA. Legenda: As etapas básicas necessárias para que ocorra hibridização entre uma sequência-alvo e sonda de DNA específica constituem da desnaturação de ambas as fitas de DNA, e posterior união por meio das sequências complementares (hibridização). Fonte: Elaborado pela autora.

1.1.2 Aplicações clínicas da técnica

Devido a diversas vantagens em relação ao cariótipo, a técnica de FISH foi gradualmente inserida como uma complementação à tradicional análise dos cromossomos com bandamento GTG. Na citogenética clínica, a FISH é aplicada em diagnósticos pré e pós-natais e na detecção de alterações cromossômicas constitucionais e adquiridas. A técnica permite a detecção de alterações cromossômicas numéricas e estruturais, mapeamento de *loci* gênicos de cromossomos específicos, e ainda, pode revelar alterações crípticas (Wan, 2017).

Com a ampla difusão das técnicas de citogenômica dos últimos anos, a FISH vem sendo utilizada também para confirmação e esclarecimento de resultados de *array*-CGH (Hibridização Genômica Comparativa baseada em microarranjos) e Polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP) *array*. Desta forma, pode-se identificar os mecanismos de formação de alterações e localizações físicas de sequências genômicas (Akalin e cols., 2013; Torti e cols., 2013; Rosenfeld e Patel, 2016; Pace e cols., 2017).

1.1.3 Tipos de sondas

Atualmente, existe no mercado mundial uma infinidade de sondas disponíveis para aquisição, desenvolvidas por diversas empresas, para as mais diversas aplicações (Liehr, 2017). Todavia, consistem basicamente de três principais tipos (Figura 2): 1- sondas de pintura cromossômica, as quais podem marcar toda a extensão do cromossomo (a), ou apenas parcialmente (b), são aplicadas no estudo de rearranjos cromossômicos; 2- sondas com sequências repetitivas, como as centroméricas (c), teloméricas (d) e ribossomais; e 3- sondas *loci*-específicas (e), que são utilizadas na identificação de genes específicos, regiões cromossômicas com alterações no número de cópias e rearranjos estruturais.

As sondas *loci*-específicas são utilizadas para diferentes aplicações diagnósticas. Na investigação de translocações existem dois tipos principais, as sondas de fusão e as sondas *break-apart*. As sondas de fusão são utilizadas na detecção de parceiros específicos envolvidos na translocação, como as sondas para a detecção da fusão dos genes *BCR-ABL1*. Já as sondas *break-apart* são empregadas em casos onde ocorrem múltiplos parceiros na

translocação, como ocorre nas sondas *dual-color break-apart* que identificam alterações no gene *MLL*.

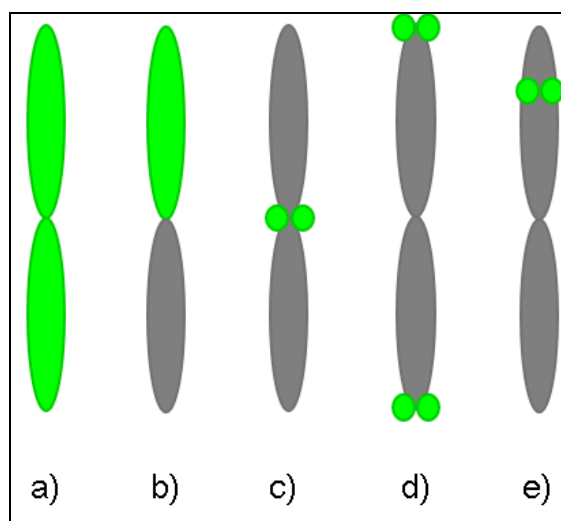


Figura 2- Representação esquemática dos principais tipos de sondas de FISH. Legenda: (a) Sonda de pintura cromossômica, marcação de todo o cromossomo (*whole-chromosome painting*) e (b) apenas o braço curto. (c) Sonda de sequências repetitivas, marcação centromérica e (d) telomérica. (e) Sonda *locus* específica. Fonte: Elaborado pela autora.

1.2 FISH no contexto das neoplasias

A FISH aplicada a oncologia oferece diagnósticos rápidos de ampliações gênicas, rearranjos, microdeleções e microduplicações cromossômicas (Das e Tan, 2013). A citogenética clássica bem como a molecular possuem um grande impacto no entendimento e na avaliação das neoplasias hematológicas e sólidas (Papaemmanuil e cols., 2016).

1.2.1 O câncer na atualidade

É indiscutível que o câncer representa um grande problema da saúde pública mundial, especialmente em países em desenvolvimento (INCA, 2015). O câncer configura a segunda principal causa de mortes em todo o mundo, ficando apenas atrás das doenças cardiovasculares (WHO, 2014). Na sua totalidade as neoplasias matam mais pessoas do que *HIV/AIDS*, malária e

tuberculose juntos (WHO, 2017). De acordo com dados da *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, estimam-se que em 2035 haverá 29,4 milhões de novos casos de câncer no mundo.

A estimativa para o Brasil, biênio 2016-2017, apontou a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos de câncer (INCA, 2015). De acordo com dados do Ministério da Saúde em 2016 no Brasil os óbitos causados por neoplasias representaram 16% (208.811) dos óbitos totais (1.277.852). Neste mesmo período, conforme dados da Secretaria Estadual de Saúde, do total de mortes no estado do RS (85.327), 17.979 (21%) foram ocasionadas pelas neoplasias.

Devido às altas taxas de morbidade, as neoplasias conferem gastos elevados em internações e tratamentos ambulatoriais no SUS (Soto, 2015). Em concordância a isso, as Informações do Registro Hospitalar do Câncer apontam que durante o ano de 2015, em nosso estado, foram diagnosticados 5.595 casos de câncer em unidades hospitalares do SUS.

1.2.2 A investigação citogenética nas Leucemias

As leucemias representam um grupo heterogêneo de câncer hematopoiético que podem ser classificadas amplamente de acordo com o tipo celular afetado, linfóide ou mielóide (Miranda-Filho e cols., 2018). No ano de 2012 foram estimados 352 mil novos casos de leucemia em todo o mundo, neste mesmo ano, foram estimados no mundo 265 mil óbitos em decorrência de leucemias. No Brasil, estimou-se para o ano de 2016, mais de 10 mil novos casos de leucemias em homens e mulheres (INCA, 2015). Nos países desenvolvidos, como os países da América do Norte e Europa, nas leucemias em adultos, a sobrevida relativa em cinco anos chega até 60%. Já a sobrevida

das leucemias infantis pode chegar a 90% em países como Canadá, Áustria, Alemanha, Bélgica e Noruega. No Brasil, no período de 2000 a 2005, em adultos, a sobrevida relativa em cinco anos foi de 20%. Nas leucemias infantis, o valor ficou mais próximo ao encontrado nos países desenvolvidos, chegando a 70% (INCA, 2015).

Atualmente, a maior parcela do trabalho em citogenética do câncer em laboratórios clínicos é direcionada às doenças hematológicas. Nestas patologias está bem estabelecida a correlação entre diferentes anormalidades cromossômicas identificadas em células leucêmicas e fenótipos clínicos específicos, como a $t(9;22)(q34;q11.2)$ em LMC (Leucemia Mielóide Crônica); e $inv(16)$, $t(15;17)$, $t(8;21)$ e alterações no gene *MLL* em LMA (Leucemia Mielóide Aguda).

A detecção de alterações citogenéticas e moleculares faz parte de diversos protocolos terapêuticos, devido ao seu valor diagnóstico; sendo que os estudos citogenéticos são considerados investigação obrigatória em leucemias recém-diagnosticadas. Além do mais, as alterações citogenéticas estão associadas ao prognóstico, taxa de remissão clínica e à sobrevida dos pacientes (Wan e Ma, 2012). Na nova classificação das neoplasias hematopoiéticas e linfóides da Organização Mundial de Saúde de 2016, foram incorporadas as informações genéticas para estabelecer entidades específicas dessas patologias a predizer o seu prognóstico de forma mais acurada (Wan, 2017), destacando ainda mais a importância destas informações na clínica médica.

A diversidade de sondas comerciais específicas para neoplasias vem auxiliando a definir subclasses moleculares e categorias de risco citogenético

para pacientes com leucemias. Consequentemente, a FISH se tornou uma ferramenta indispensável para o manejo das doenças hematológicas (Wan, 2017).

1.2.2.1 O cromossomo *Philadelphia* no diagnóstico de LMC

A LMC é um tipo raro de neoplasia, afeta de 1-2 pessoas a cada 100.000 por ano nos Estados Unidos (Zhang e Rowley, 2011). Estima-se que esta leucemia represente 0,5% de todos os novos casos de câncer diagnosticados em 2017 naquele país (Siegel, 2017).

A LMC é classicamente caracterizada pela presença do cromossomo *Philadelphia* (*Ph*) o qual é oriundo de uma translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22. O gene *Abelson Leukemia Virus* (*ABL1*) – localizado no braço longo do cromossomo 9 (9q34) – se funde com o gene *Breakpoint Cluster Region* (*BCR*) – localizado no braço longo do cromossomo 22 (22q11.2) – originando um cromossomo quimérico derivado 22. Esta foi a primeira alteração cromossômica recorrente a ser associada a um tipo de câncer, descoberta em 1960, quando Nowell e Hungerford identificaram um pequeno cromossomo do grupo G em células leucêmicas de LMC (Zhang & Rowley, 2011).

O gene híbrido resultante dessa fusão, codifica uma proteína quimérica com novas propriedades oncogênicas. Isso resulta em um aumento da atividade da tirosina quinase, indução da proliferação celular, transformação maligna de granulócitos imaturos e linfócitos, e supressão da apoptose. Além disso, afeta a diferenciação das células-tronco e o reparo do DNA (Chung, 2014).

A LMC é caracterizada pela expansão clonal das células hematopoiéticas progenitoras, resultando em um aumento das células circulantes de linhagem granulocítica. Os sintomas característicos desta doença são fadiga crônica, perda de peso, sangramento e febre (Zhang & Rowley, 2011).

O curso da doença pode ocorrer em três fases; crônica, acelerada e crise blástica; identificadas com base no número de blastos no sangue e na medula óssea. O diagnóstico é feito nessas amostras por meio da análise citogenética e dos achados clínicos hematológicos (Bortolheiro e Chiattoni, 2006).

Na maioria dos casos na fase aguda, é possível detectar a presença de *BCR-ABL1* em sangue periférico por meio da $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ ou ainda verificar a fusão destes genes por técnicas moleculares. Para possibilitar a análise adequada do cariótipo e a avaliação da alteração para confirmação da fase da doença, é necessária a análise das células de aspirado de medula óssea (Arber e cols., 2016).

Existem no mercado diferentes sondas para a detecção da fusão *BCR-ABL1*. A *Dual-color single-fusion*, onde uma sonda – marcada com o fluorocromo vermelho – é hibridizada na região do *ABL1*, e outra – marcada com o fluorocromo verde – no *BCR*. A combinação dos fluorocromos vermelho e verde faz com que apareça um sinal de fusão amarelo no cromossomo derivado *Ph* (Figura 3); já as sondas *Dual-color dual-fusion*, cobrem extensões maiores dos genes envolvidos, e os dois cromossomos derivados podem ser detectados produzindo dois sinais de fusão. Estas sondas são mais sensíveis na detecção da doença residual, o padrão anormal raramente é observado

como um artefato da sobreposição dos cromossomos na interfase (Lawce, 2017).

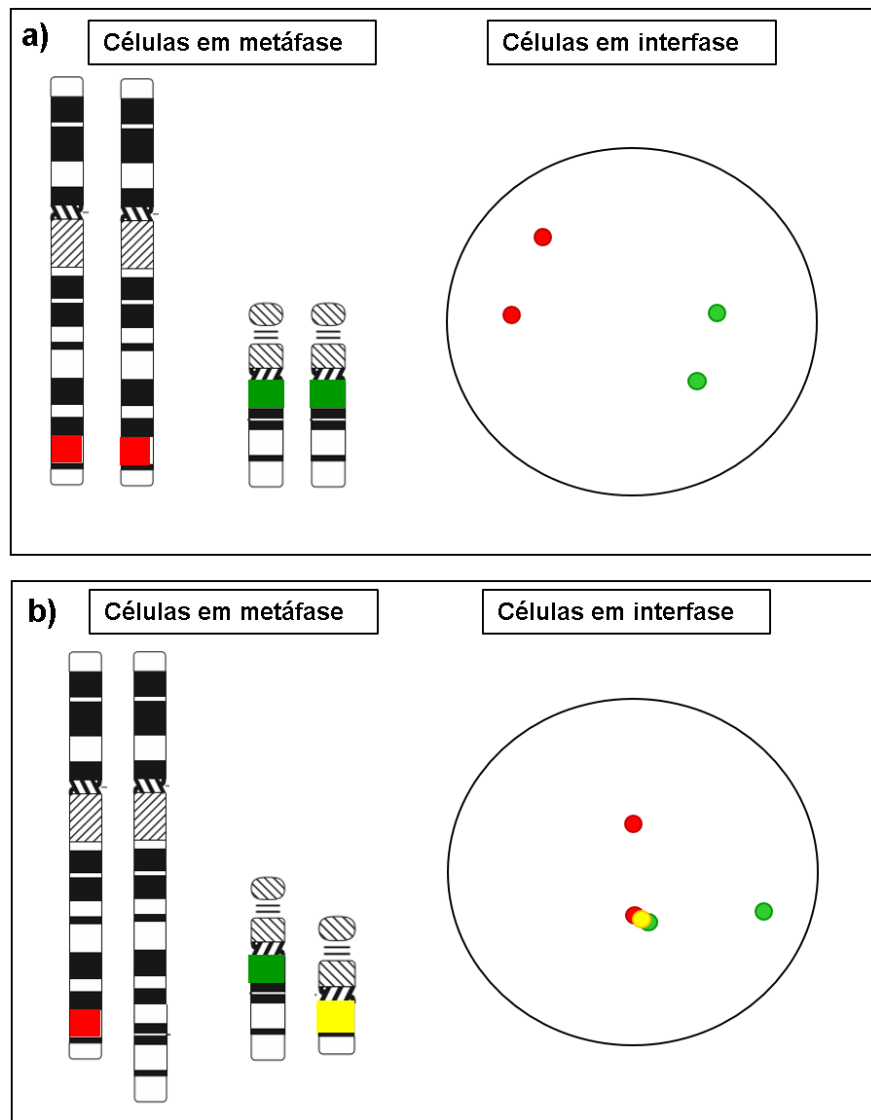


Figura 3- Representação esquemática da sonda *BCR-ABL1 dual-color single-fusion*. Legenda: Sonda *BCR-ABL1 dual-color single-fusion*. a) Marcação em metáfase e interfase de células normais, *ABL1* se hibridiza com sonda marcada com fluorocromo vermelho e *BCR* se hibridiza com sonda marcada com o fluorocromo verde. Na interfase se observa dois sinais de cada um dos *loci*. b) Marcação em metáfase e interfase de células com a fusão dos genes. Se observa um cromossomo 9 e um 22 normais, o cromossomo 9 derivado sem marcação, e o cromossomo *Ph* apresentando marcação amarela, resultado da fusão dos sinais vermelho e verde. Fonte: Elaborado pela autora.

1.2.2.2 Alterações do gene *MLL*

O gene *MLL* (*Mixed Lineage Leukemia*) ou mais recentemente nomeado de *KMT2A* (*Lysine-Specific Methyltransferase 2A*) (Arber e cols., 2016) é um

alvo frequente para translocações recorrentes em leucemias agudas, sendo uma alteração encontrada em LMA, LLA (Leucemia Linfocítica Aguda) ou leucemia de linhagem mista. Os rearranjos deste gene, localizado no braço longo do cromossomo 11 (11q23), são encontrados em mais de 70% das leucemias infantis, e em aproximadamente 10% das LMAs em adultos (OMIM- *Online Mendelian Inheritance in Man*).

As alterações no *MLL* podem se apresentar como translocações, deleções, inserções, ampliações; e também, alterações complexas ou crípticas (De Braekeleer e cols., 2011). Distintos rearranjos do *MLL* são considerados fatores independentes de prognóstico ruim, enquanto que, uma minoria de rearranjos deste gene estão associados a prognósticos bons ou intermediários (Meyer e cols., 2013). Além disso, acredita-se que o parceiro genético envolvido na translocação possa influenciar também a resposta à terapia (Keefe e cols., 2010). Desta forma, pacientes que apresentam alterações envolvendo o *MLL* geralmente são tratados com protocolos de alto risco. Assim, a identificação destes rearranjos é necessária para decisões clínicas rápidas (De Braekeleer e cols., 2011).

Já foram identificados 135 diferentes rearranjos envolvendo o gene *MLL*, destes, 94 foram caracterizados em nível molecular, sendo que 35 são recorrentes. Contudo, apenas nove fusões em genes específicos representam mais de 90% dos casos (Elzamly e cols., 2018). As leucemias mielóides agudas com translocações envolvendo este gene são comuns em pacientes jovens e geralmente estão associadas a maus prognósticos. Estas representam as alterações genéticas mais comuns na LMA pediátrica (Lagacé e cols., 2017).

De acordo com as “Diretrizes de trabalho de diagnóstico inicial de Leucemia Aguda” do Colégio de Patologistas Americanos (CAP) e da Sociedade Americana de Hematologia, as alterações no gene *MLL* são um marcador importante para estratificação do risco pediátrico, conferindo ao paciente um prognóstico ruim. Recomenda-se também investigar essas alterações em pacientes adultos e pediátricos com suspeita ou LLA-B confirmada (Arber e cols., 2017).

A análise citogenética convencional, apesar de ainda ser considerada padrão-ouro no diagnóstico de doenças hematológicas (Wan, 2017), quando utilizada para a detecção de rearranjos envolvendo o gene *MLL*, não é capaz de detectar cerca de um terço destes rearranjos. A utilização da FISH surgiu então como alternativa para estes casos (Keefe e cols., 2010). Atualmente a maioria dos laboratórios utiliza a sonda de FISH *break-apart* (Figura 4) para avaliar a integridade do *MLL* (Lagacé e cols., 2017). Embora forneça informações importantes referentes sobre os rearranjos deste gene, esta sonda é incapaz de identificar especificamente outros genes envolvidos (Wan & Ma, 2012).

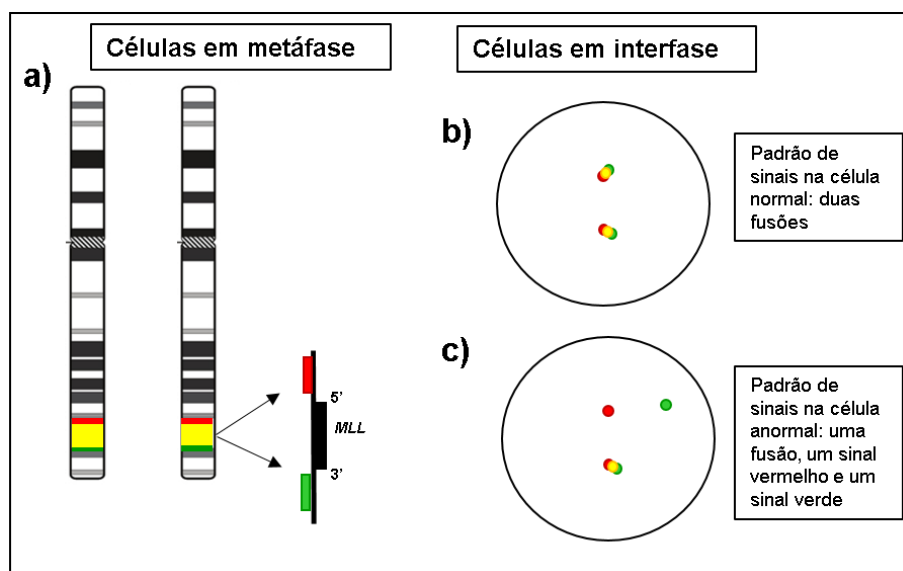


Figura 4- Representação esquemática da sonda *MLL break-apart*. Legenda: Sonda *MLL break-apart*. a) Marcação do cromossomo em metáfase de células normais. As sondas com marcação verde e vermelho flanqueiam o gene *MLL*, nas células normais se observa a integridade do gene em amarelo. b) Marcação em interfase de célula normal. Observa-se a integridade dos dois cromossomos 11 em amarelo. c) Marcação em interfase de célula com alteração no gene *MLL*. Observa-se um sinal amarelo, e um sinal verde e um vermelho. Fonte: Elaborado pela autora.

1.2.3 Investigação citogenética em tumores sólidos

Estudos citogenéticos em tumores sólidos também são essenciais para prover informações diagnósticas e prognósticas, muitas delas já estabelecidas para diversos tipos tumorais (Liehr, 2017). De acordo com as “Diretrizes de investigações citogenéticas em tumores” (Hastings e cols., 2016), a FISH pode ser utilizada como principal método de escolha para o diagnóstico de diferentes tipos tumorais, como por exemplo, para a detecção da amplificação do oncogene *MYCN* em neuroblastoma, alterações em 1p e 19q em gliomas, e amplificação do oncogene *HER-2* em câncer de mama.

Nas análises de diferentes tipos tumorais, cada vez mais a citogenética molecular vem se tornando independente das análises tradicionais de bandamento cromossômico. Isso se deve à possibilidade de investigação diretamente no tecido. A técnica de FISH pode ser aplicada em lâminas com

amostras tumorais frescas, congeladas, ou ainda seções de tecidos parafinados. Desta forma não há necessidade de cultivo celular, reduzindo assim o tempo de preparação e análise das amostras. O estudo direto no tecido não cultivado permite também um melhor retrato da morfologia e heterogeneidade tumoral (Liehr, 2017), evitando as alterações desenvolvidas *in vitro*. Devido à análise de uma ampla gama celular, ao se comparar com as análises da citogenética convencional, é possível detectar alterações em mosaico e linhagens clonais de poucas células.

1.2.4 Diagnóstico das neoplasias

O sofrimento pessoal e o custo financeiro envolvidos com o diagnóstico e o tratamento das neoplasias são significativos e muito altos. A melhor abordagem para o bem-estar destes pacientes é realizar o diagnóstico precoce e específico, para que se possa instituir a terapia adequada para cada subtipo neoplásico.

Todavia, a maioria dos pacientes de baixa renda de países em desenvolvimento não tem acesso a exames de laboratório, patológicos, radiológicos ou outros métodos de diagnóstico necessários para a realização do diagnóstico precoce. Sendo assim, a grande maioria de pacientes com neoplasias malignas nesses países conseguem o diagnóstico apenas na fase tardia da doença, quando, muitas vezes, já não há mais cura (WHO, 2017).

1.3 FISH no contexto das malformações congênitas

As malformações congênitas, ou seja, qualquer alteração anatômica presente ao nascimento, são, nas Américas, a segunda principal causa de morte em recém-nascidos e crianças menores de cinco anos (Nações Unidas,

2017). Presentes em 5% dos nascidos vivos, estas alterações podem ser determinadas total ou parcialmente por fatores genéticos (Horovitz e cols., 2006).

No mundo, no ano de 2015 as malformações congênitas foram responsáveis pela morte de 303.000 recém-nascidos de até quatro semanas de vida, representando 11% das causas de morte no período neonatal. Estima-se que cerca de 94% das malformações congênitas graves ocorram em países de baixa e média renda. Isso se deve ao fato de que nesses países as gestantes têm menos acesso a alimentos nutritivos, um aumento da exposição a agentes ou fatores como álcool e infecções, além de terem menor acesso aos cuidados de saúde e triagem (WHO, 2016).

No Brasil, no ano de 2016, ocorreram 10.472 mortes devido às malformações congênitas, estas representaram 0,8% das 1.277.852 mortes ocorridas neste ano (Brasil, 2018). Em nosso país, estas alterações refletem em cerca de 37% das internações em hospitais pediátricos de referência (Horovitz e cols., 2005).

Nos humanos, as alterações cromossômicas representam a principal causa de malformações congênitas e falha reprodutiva (Lawce, 2017). De acordo com estudos clássicos em citogenética, as alterações cromossômicas são observadas em 1% dos recém-nascidos (Jacobs e cols., 1992) e em mais de 10% dos natimortos (Jackson, 2002). Estão presentes em torno de 50% de todas as perdas gestacionais reconhecidas de primeiro trimestre (Hassold e cols., 1980). Ademais, muitas doenças congênitas são secundárias a desequilíbrios cromossômicos submicroscópicos (microdeleções ou microduplicações), os quais em inúmeros casos estão associados a formas

sindrômicas de atraso do desenvolvimento e déficit intelectual. Contudo, estas alterações não são identificadas por meio das técnicas de citogenética clássica, mas somente utilizando técnicas moleculares.

1.3.1 Síndromes de microdeleções e microduplicações

Com os avanços das técnicas moleculares, como a FISH, e as novas tecnologias de análise de alta resolução genômica, tem-se descoberto novas síndromes de microdeleção ou microduplicação (Weise e cols., 2012; Nevado e cols., 2014). Na última década, mais de 200 destas síndromes foram descritas e registradas (Capalbo e cols., 2017). Em muitas destas síndromes as deleções/duplicações afetam de dois a dezenas de genes adjacentes, sendo então chamadas de síndromes de genes contíguos. Várias destas alterações são recorrentes na população e estão associadas a fenótipos clínicos específicos.

Na análise direta de muitas destas síndromes, como Velocardiofacial (VCFS) /DiGeorge (DGS), Prader-Willi/Angelman, Williams e Smith-Magenis; utiliza-se sondas de DNA *loci*-específicas de FISH. A técnica é aplicada quando há uma suspeita específica, ou ainda, na verificação de dados gerados por *array*-CGH (Weise e cols., 2012). Devido às dificuldades de se detectar estas alterações por meio do cariótipo convencional, o uso destas sondas se tornou padrão na investigação destas síndromes (Lawce, 2017).

1.3.1.1 Síndrome del22q11.2

A síndrome de deleção 22q11.2 possui um fenótipo clínico bastante amplo e variável, o qual pode ser caracterizado por dismorfias faciais, imunodeficiência, alterações cardíacas congênitas, malformações do palato e alterações endócrinas. Esta síndrome está associada a altas taxas de comorbidades clínicas e psiquiátricas, assim como déficit cognitivo (Verheij e cols., 2018). Além disso, é atualmente, considerada como a síndrome genética mais associada à esquizofrenia (Weinberger e cols., 2018).

A síndrome del22q11.2 é uma das doenças genéticas mais frequentes em humanos, encontra-se na literatura uma prevalência estimada de 1 para cada 3.000 a 4.000 nascidos vivos (Lawce, 2017). Ainda não se tem dados bem estabelecidos destas frequências, uma vez que elas podem variar de acordo com a amostra estudada e a técnica utilizada para a detecção da alteração (Belangero e cols., 2009). Contudo, devido à expressividade variável desta síndrome, e, conseqüentemente, o diagnóstico clínico dificultado, acredita-se que os valores de prevalência encontrados em grande parte da literatura estão subestimados. De acordo com isso, Grati e cols. (2015), avaliaram microdeleções e microduplicações em gestações e encontraram uma prevalência para del22q11.2 de 1 para cada 1.000 gestações de baixo risco.

Em decorrência da dificuldade de diagnóstico, alguns pacientes recebem a confirmação da síndrome apenas na idade adulta, ou como parte do seguimento do diagnóstico de um membro da família mais severamente afetado (Benn e cols., 2017). A detecção precoce desta síndrome é fundamental para possibilitar um diagnóstico preciso para os pacientes e seus familiares. Desta forma, o diagnóstico citogenético orienta o delineamento de

uma terapia mais apropriada, e evita o agravamento do quadro clínico. Além disso, pode-se proporcionar um aconselhamento genético mais específico, onde a família recebe informações sobre prognóstico, riscos de recorrência e possibilidade de diagnóstico pré-natal ou pré-implantacional para futuras gestações.

Apesar da possibilidade de identificação das alterações submicroscópicas por meio das técnicas de *array*-CGH, MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*) e *BACs-on-Beads*; as sondas de FISH ainda são utilizadas para diagnóstico ou confirmação dos resultados destas técnicas (Grati e cols., 2015; Poirsier e cols., 2016). No que se refere às sondas comerciais para investigação da deleção 22q11.2, estas possuem uma capacidade de detecção de cerca de 85% dos casos em deleções de 3Mb (Lawce, 2017), e usualmente consistem de uma sonda que se hibridiza na região crítica *TUPLE1(HIRA)*- 22q11.2 e outra sonda em uma região controle no mesmo cromossomo.

1.4 Desenvolvimento de sondas *in house*

Antes de dispormos da imensa variedade de sondas comerciais que temos acesso atualmente, as sondas para uso na técnica de FISH eram desenvolvidas pelos próprios pesquisadores que as utilizavam. Mesmo com a grande oferta de sondas comerciais, as sondas de desenvolvimento *in house* ainda são frequentemente utilizadas (Lawce, 2017).

Também conhecidas como sondas *homebrew*, estes tipos de sondas são comumente desenvolvidas a partir de clones de cromossomos artificiais de bactérias (BACs). Os BACs são vetores, ou seja, moléculas circulares de DNA

que podem se replicar de forma autônoma no hospedeiro, neste caso, a bactéria. Consistem em plasmídeos de *Escherichia coli* que possuem fragmentos de sequências específicas de DNA humano (inserto) e um gene de resistência a antibióticos.

Estes vetores são capazes de clonar fragmentos de DNA de 100-300Kb. As sondas *homebrew* podem ser produzidas utilizando vetores em hospedeiros, ou o DNA pode ser adquirido já marcado e pronto para uso (Lawce, 2017).

Atualmente, na citogenética molecular os BACs são mais utilizados no desenvolvimento de sondas *loci*-específicas de FISH. Sendo desenvolvidas para diversas aplicações, tais como; mapeamento genético, determinação de pontos de quebra, caracterização de cromossomos derivados e estudos de células em interfase (Liehr, 2017).

1.4.1 Escolha dos clones

A identificação e seleção dos clones para o desenvolvimento das sondas é realizada utilizando as ferramentas de *Genomes Browsers*, como o *UCSC genome browser* [<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>]. Este navegador dispõe de uma série de categorias (*tracks*) onde se pode selecionar a busca específica, pelos BACs, genes ou sequências genômicas específicas, como: *BAC End Pairs*, *Clones Placed on Cytogenetic Map Using FISH*, *UCSC Genes* e *RefSeq Genes*. Posteriormente, os clones selecionados podem ser adquiridos na *BACPAC Resources Center* [<https://bacpacresources.org/>].

1.4.2 Etapas de desenvolvimento laboratorial

O desenvolvimento *in house* das sondas de FISH consiste em vários processos sequenciais, com etapas de checagem. No geral, desde a cultura inicial dos BACs até a finalização completa da sonda são necessários pelo menos seis dias consecutivos de trabalho. As principais etapas do desenvolvimento laboratorial serão descritas a seguir.

Após aquisição, os clones são cultivados para aumentar a quantidade dos insertos, após esta etapa o DNA é extraído e purificado. Este DNA então é amplificado e posteriormente marcado com os fluorocromos pela técnica de *Nick-translation* (Figura 5).

Nesta técnica a desoxirribonuclease (DNAase) é usada para clivar (*nick*) randomicamente ligações fosfodiéster de uma das fitas do DNA. No local da clivagem é gerado uma hidroxila na extremidade 3' e um fosfato na extremidade 5'. Posteriormente, a DNA polimerase I remove o nucleotídeo da região 5' terminal gerada pela clivagem, e o substitui por nucleotídeos (*dNTPs*-Desoxirribonucleotídeos fosfatados) marcados com fluorocromos na região terminal 3'. A cada vez que a DNA polimerase I adiciona um *dNTP*, o faz na extremidade 5' fosfato em direção a 3' OH, unindo a ligação fosfodiéster, mas deixando uma nova extremidade 3' OH aberta. Assim, como um *dNTP* é adicionado ao espaço aberto, as clivagens na fita vão se movendo em direção à extremidade 3' da fita de DNA (Farrell, 2010; Hermanson, 2013).

O DNA marcado então passa por um processo de precipitação, onde se utiliza um DNA não marcado - Cot-1® DNA - que tem a função de bloquear a hibridização inespecífica em sequências repetitivas. Desta forma, se otimiza a

hibridização nas sequências únicas. Nas lâminas isso se reflete em um material mais limpo, com menos *background* (resquícios de fluorescência de fundo que podem interferir na análise do material), um critério fundamental para uma análise de FISH de qualidade. Posteriormente, o DNA precipitado é diluído em um tampão de hibridização contendo formamida, um solvente que cujo papel é auxiliar na desnaturação da dupla-fita do DNA. Ao ser finalizada esta etapa, a sonda estará pronta para ser aplicada nas amostras em lâminas.

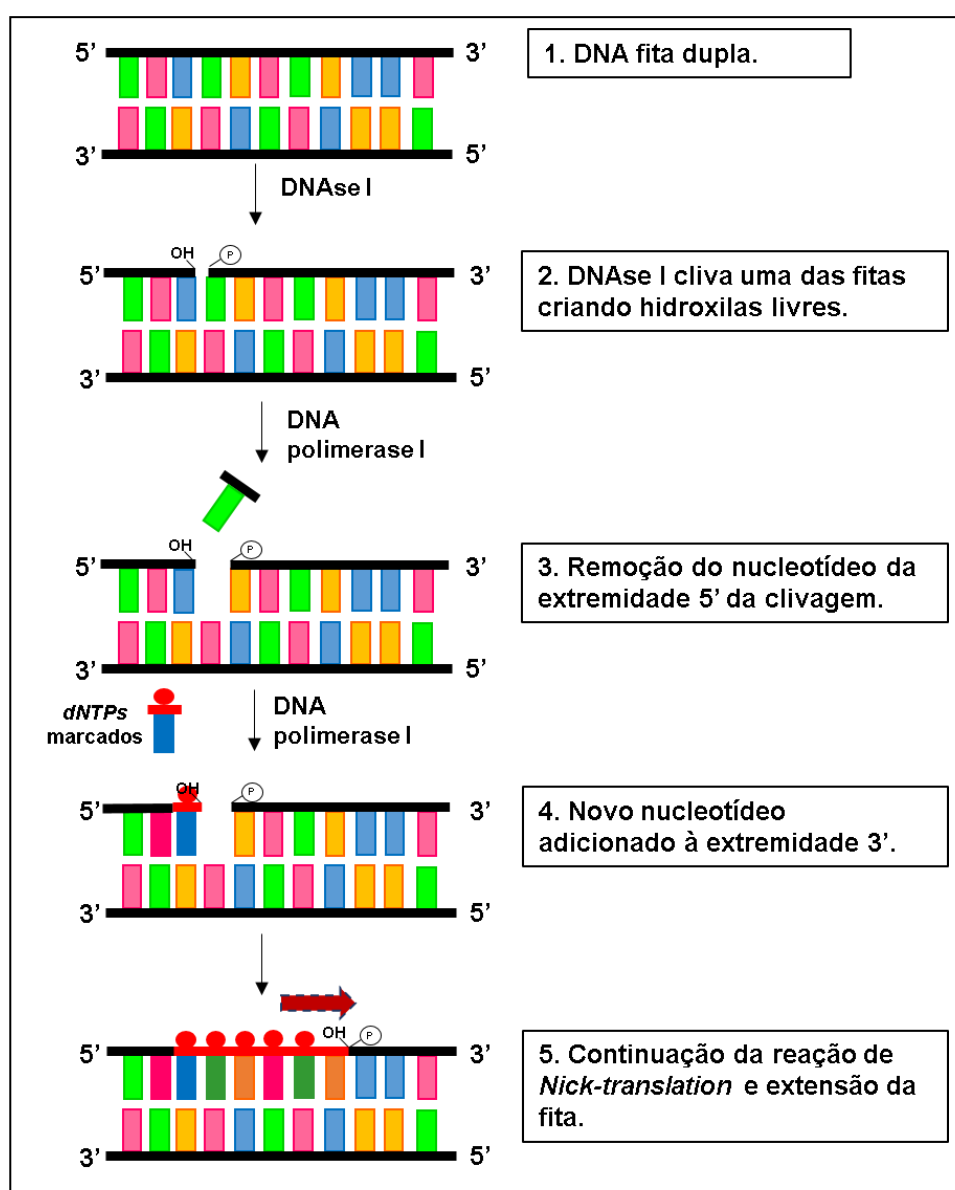


Figura 5- Representação esquemática da técnica de *Nick-translation*. Legenda: A marcação de DNA por *Nick-translation* com a atuação da enzima DNase I a qual inicia a clivagem de uma das fitas por meio da ruptura das ligações fosfodiéster, e a DNA polimerase I

que remove nucleotídeos existentes na fita os substituindo por *dNTPs* marcados. Fonte: Elaborado pela autora.

1.4.3 Validação das sondas homebrew

Uma vez instituído o protocolo de manufatura das sondas, é necessária sua validação. Este processo consiste em testar cada sonda desenvolvida garantindo resultados confiáveis para uso clínico. Desta maneira, o alvo deve ser detectado na maioria das vezes, não devendo ocorrer ligações em alvos indesejados. Além disso, na validação serão determinados os parâmetros para se considerar uma amostra normal ou alterada (Lawce, 2017).

1.4.3.1 Classificação regulatória das sondas de FISH

Nos EUA, as sondas comerciais de FISH para aplicação em diagnósticos clínicos são regulamentadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e outras instituições como o CAP, estas agências estabelecem características analíticas e de desempenho das sondas (Wan, 2017). Segundo o FDA, as sondas de FISH são classificadas em quatro grupos, conforme com sua regulamentação (Mascarello e cols., 2011):

(a) diagnóstico *in vitro* (*in vitro diagnostics- IVD*), sondas/kits que possuem performance analítica e utilidade clínica aprovadas pelo FDA.

(b) reagentes específicos de análise (*analyte specific reagents- ASRs*), sondas “*Stand-alone*”, desenvolvidas de acordo com as boas práticas de manufaturas e reguladas para uso clínico pelo FDA.

(c) sondas para uso exclusivo em pesquisa (*research use only- RUO*) ou “*investigation use only*” (IUO), sujeitas a aprovação do FDA, porém não aprovadas para uso clínico.

(d) sondas desenvolvidas e utilizadas exclusivamente *in house*, não são vendidas para outros laboratórios. Até o momento não são ativamente regulamentadas pelo FDA.

De acordo com a classificação apresentada acima, as *ASRs* representam a maioria das sondas de FISH utilizadas na citogenética clínica. Como não são aprovadas pelo FDA, apenas reguladas, e apesar destas já terem passado pela validação realizada pelo fabricante, elas devem ser validadas pelo comprador antes do uso clínico (Saxe e cols., 2012). Desta forma, cabe ao comprador determinar sensibilidade, especificidade e utilidade da sonda (Lawce, 2017).

Também no Brasil, as sondas de FISH comercializadas, tanto para diagnóstico clínico quanto para a pesquisa, são consideradas *ASRs*, não existindo em nosso país legislação para desenvolvimento e validação dos testes.

1.4.3.2 Etapas de validação das sondas *homebrew*

Nas diferentes instituições que regularizam o desenvolvimento de sondas para FISH os critérios de testagem de desempenho e validação são distintos, e nem sempre, são específicos para as sondas *homebrew*. Sendo assim, Lawce (2017), no AGT Cytogenetics Laboratory Manual, utilizando os critérios de validação do CAP, *American College of Medical Genetics* e publicações reconhecidas neste tema, sugere critérios para validar sondas desenvolvidas *in house*. Nestes critérios são avaliadas a sensibilidade, especificidade e eficiência das sondas produzidas, sugerindo-se que estas análises sejam realizadas em vinte amostras normais. Quando possível,

recomenda-se a verificação do funcionamento das sondas em amostras alteradas, todavia algumas alterações são tão raras ou difíceis de detectar por meio da citogenética convencional que impossibilitam este tipo de testagem.

A sensibilidade da sonda é o quão bem a sonda detecta os alvos, pode-se contar 200 interfases utilizando a fórmula:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{número de interfases com o padrão de sinais esperado}}{\text{Número total de interfases}} \times 100$$

Enquanto que a especificidade da sonda é o quão frequente a sonda detecta os alvos ou faz hibridização cruzada com outro cromossomo que não seja aquele determinado. Comumente são analisadas 100 metáfases para verificação do padrão de sinais, de acordo com a fórmula:

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{número de sinais esperados por locus}}{\text{Número total de sinais}^*} \times 100$$

* ou número de sinais no *locus* esperado + número de sinais no *locus* não esperado

Ainda para avaliação da especificidade da sonda, recomenda-se a análise precisa da localização dos sinais diretamente nos cromossomos, esta pode ser realizada pelo método de DAPI invertido, bandamento sequencial G- ou Q-.

Por fim, a eficiência é verificada calculando-se a percentagem de células analisáveis que hibridizaram ao se comparar com o número de células sem sinal.

Recomenda-se ainda, que os testes tenham reprodutibilidade, ou seja, a sonda deve ter a mesma performance em vários ensaios, em dias distintos, com diferentes técnicos, nas mesmas condições de hibridização, pós-lavagem e preparo de lâminas.

1.5 Justificativa

A tecnologia de FISH há muitos anos vem sendo aplicada no mundo inteiro. Porém, em nosso país, seu custo comercial elevado tem limitado de forma muito intensa a sua utilização para diagnósticos aos pacientes do SUS. Em nosso sistema público de saúde, a metodologia de FISH ainda não é disponível rotineiramente para a realização de diagnósticos. Desta forma, o domínio da técnica de confecção de sondas de DNA para FISH representa um avanço tecnológico que permite o acesso a diagnósticos mais precisos. Em consequência disso, se pode oferecer aos pacientes um aconselhamento genético mais diretivo e apropriado, além de proporcionar a coleta de dados epidemiológicos destas alterações para estudos futuros.

Além da tradicional aplicação da metodologia de FISH para diagnósticos, o domínio da manufatura das sondas possibilita uma vasta gama de opções para a pesquisa citogenética, como a oportunidade de desenvolver novos produtos que não estão disponíveis no mercado, ou ainda, personalizar produtos já existentes de acordo com nossas demandas.

Ademais, a implementação da manufatura das sondas de FISH possibilita um processo intenso de treinamento técnico. O acompanhamento e o desenvolvimento de todas as etapas, desde a cultura dos BACs até a análise e o registro fotográfico das células, permite que o aprendiz possa desenvolver uma série de habilidades. Dentre elas, estão, o preparo de diversos reagentes, a prática de técnicas de citogenética e de biologia molecular, e capacitação ao uso de diferentes equipamentos. Além da experiência de vivência em atividades práticas de laboratório, onde o aluno pode perceber na prática a

necessidade da atenção, comprometimento e dedicação nas atividades laboratoriais e de pesquisa.

Até o presente momento, em nosso estado não existe outro laboratório que produza sondas de FISH, tanto para aplicação em diagnósticos quanto para pesquisas. Neste trabalho desenvolvemos três diferentes conjuntos de sondas de DNA, estas foram para aplicação da detecção da fusão *BCR/ABL1*, anomalias do gene *MLL*, e deleção 22q11.2.

1.6 Referências Bibliográficas

Akalin I, Bozdog S, Spielmann M, Basaran S, Nanda I, Klopocki E. Partial trisomy 1q41-qter and partial trisomy 9pter-9q21.32 in a newborn infant: An array CGH analysis and review. *Am J Med Genet Part A*. 2013; 64A:490–494.

Arber DA, Borowitz MJ, Cessna M, Etzell J, Foucar K, Hasserjian RP, *et al*. Initial Diagnostic Workup of Acute Leukemia: Guideline From the College of American Pathologists and the American Society of Hematology. *Arch Pathol Lab Med*. 2017; 141: 1342-1393.

Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Borowitz MJ, Beau MM Le, Bloomfield CD, *et al*. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20): 2391–406.

Belangero SIN, Bellucco FTS, Kulikowski LD, Christofolini DM, Cernach MCSP, Melaragno MI. Deleção 22q11.2 em pacientes com defeito cardíaco conotruncal e fenótipo da síndrome da deleção 22q11.2. *Arq Bras Cardiol*. 2009; 92(4): 307-311.

Benn P, Iyengar S, Crowley TB, Zackai EH, Burrows EK, Moshkevich S, *et al*. Pediatric healthcare costs for patients with 22q11.2 deletion syndrome. *Mol Genet Genomic Med*. 2017; 5(6): 631–8.

Bortolheiro TC, Chiattoni CS. Leucemia Mielóide Crônica: história natural e classificação. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008; 30(Supl. 1): 3-7.

Brasil, 2018. Ministério da Saúde. Painel de Monitoramento da Mortalidade CID-10. Disponível em: <http://svs.aids.gov.br/dashboard2/mortalidade/cid10/>. Acessado em: 12 de janeiro de 2018.

Capalbo A, Rienzi L, Ubaldi FM. Diagnosis and clinical management of duplications and deletions. *Fertil Steril*. 2017; 107(1): 12-18.

Chung C. Omacetaxine for treatment-resistant or treatment-intolerant adult chronic myeloid leukemia. *Am Soc Heal Pharma- Cist*. 2014; 71:279–88.

Crotwell PL, Hoyme HE. Advances in whole-genome genetic testing: from chromosomes to microarrays. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2012; 42(3):47–73.

Das K, Tan P. Molecular cytogenetics: recent developments and applications in cancer. 2013; (9):315–25.

De Braekeleer E, Meyer C, Douet-Guilbert N, Basinko A, Le Bris M-J, Morel F, *et al*. Identification of MLL partner genes in 27 patients with acute leukemia from a single cytogenetic laboratory. *Mol Oncol*. 2011; 5(6): 555-63.

Elzamy S, Chavali S, Tonk V, Tonk S, Gaur S, Tarango D, *et al*. Acute myeloid

leukemia with *KMT2A-SEPT5* translocation: A case report and review of the literature. *SAGE Open Med Case Reports*. 2018; 6: 1-5.

Farrell RE. Nucleic Acid Probe Technology. In: *RNA Methodologies*. 2010. p. 261–82.

Governo do Estado do Rio Grande do Sul, 2016. Secretaria Estadual de Saúde. Pactuação Interfederativa de indicadores. Disponível em: http://bipublico.saude.rs.gov.br/QvAJAXZfc/opendoc.htm?document=publico.qvw&host=QVSbari&anonymous=true&Sheet=SH_CadernoIndicadores. Acessado em: 13 de janeiro de 2018.

Grati FR, Molina Gomes D, Ferreira JCPB, Dupont C, Alesi V, Gouas L, *et al*. Prevalence of recurrent pathogenic microdeletions and microduplications in over 9500 pregnancies. *Prenat Diagn*. 2015; 35(8):801–9.

Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuel B, Matsuura J, *et al*. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet*. 1980; 44:151–178.

Hastings RJ, Bown N, Tibiletti MG, Debiec-Rychter M, Vanni R, Espinet B, *et al*. Guidelines for cytogenetic investigations in tumours. *Eur J Hum Genet*. 2016; 24:6–13.

Hermanson GT. Nucleic Acid and Oligonucleotide Modification and Conjugation. In: *Bioconjugate Techniques*. 2013. p. 959–87.

Horovitz DDG, Cardoso MHC de A, Llerena Jr. JC, Mattos RA de. Atenção aos defeitos congênitos no Brasil: características do atendimento e propostas para formulação de políticas públicas em genética clínica. *Cad Saude Publica*. 2006; 22(12):2599–609.

Horovitz DDG, Jr JCL, Mattos RA de. Atenção aos defeitos congênitos no Brasil : panorama atual. *Cad Saude Publica*. 2005; 21(4):1055–64.

IARC. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. Disponível em: http://globocan.iarc.fr/Pages/burden_sel.aspx. Acessado em: 09 de janeiro de 2018.

INCA. INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016. Ministério da Saúde Inst Nac Cancer José Alencar Gomes da Silva. 2015;124.

Jackson L. Cytogenetics and molecular cytogenetics. *Clin Obstet Gynecol*. 2002; 45:622-639.

Jacobs P, Browne C, Gregson N, Joyce C, White H. Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. *J Med Genet*. 1992; 29:103-108.

Keefe JG, Sukov WR, Knudson R a, Nguyen LP, Williamson C, Sinnwell JP, *et al.* Development of five dual-color, double-fusion fluorescence in situ hybridization assays for the detection of common MLL translocation partners. *J Mol Diagn.* 2010;12(4):441–52.

Lagacé K, Barabé F, Hebert J, Cellot S, Wilhelm BT. Identification of novel biomarkers for MLL translocated acute myeloid leukemia. *Exp Hematol.* 2017; 56: 58-63.

Lawce HJ. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual.* New Jersey: John Wiley & Sons; 2017. 4. ed. 1113p.

Lichtenbelt KD, Knoers NV a M, Schuring-Blom GH. From karyotyping to array-CGH in prenatal diagnosis. *Cytogenet Genome Res.* 2011;135(3–4):241–50.

Liehr T, editor. *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). Application Guide.* Springer Protocols Handbooks. Jena: Springer; 2017. 2. ed. 606p.

Mascarello JT, Hirsch B, Kearney HM, Ketterling RP, Olson SB, Quigley DI, *et al.* Section E9 of the American College of Medical Genetics technical standards and guidelines: Fluorescence in situ hybridization. *Genet Med.* 2011;13(7):667–75.

Meyer C, Hofmann J, Burmeister T, Gröger D, Park TS, Emerenciano M, *et al.* The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia.* 2013; 27(11):2165–76.

Miranda-Filho A, Piñeros M, Ferlay J, Soerjomataram I, Monnereau A, Bray F. Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. *Lancet Haematol.* 2018; 5(1):e14–24.

Nações Unidas, 2017. OPAS: Anomalias congênitas são 2a causa de morte de recém-nascidos e crianças com menos de 5 anos. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/opas-anomalias-congenitas-sao-2a-causa-de-morte-de-recem-nascidos-e-criancas-menos-5-anos>. Acessado em: 23 de janeiro de 2018.

Nevado J, Mergener R, Palomares-Bralo M, Souza KR, Vallespín E, Mena R, *et al.* New microdeletion and microduplication syndromes: A comprehensive review. *Genet Mol Biol.* 2014; 37(1 SUPPL. 1):210–9.

OMIM- Online Mendelian Inheritance in Man. Disponível em: <http://omim.org/entry/159555>. Acessado em: 15 de janeiro de 2018.

Pace NP, Maggouta F, Twigden M, Borg I. Molecular cytogenetic characterisation of a novel de novo ring chromosome 6 involving a terminal 6p deletion and terminal 6q duplication in the different arms of the same chromosome. *Mol Cytogenet.* 2017; 10(1): 1-9.

Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND,

et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2016; 374(23): 2209-2221.

Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83(9): 2934–8.

Poirsier C, Besseau-Ayasse J, Schluth-Bolard C, Toutain J, Missirian C, Le Caignec C, *et al.* A French multicenter study of over 700 patients with 22q11 deletions diagnosed using FISH or aCGH. *Eur J Hum Genet.* 2016; 24(6):844–51.

RHC- Integrador RHC- Registro Hospitalar de Câncer, 2015. Disponível em: <https://irhc.inca.gov.br/RHCNet/visualizaTabNetExterno.action>. Acessado em: 13 de janeiro de 2018.

Riegel M. Human molecular cytogenetics: From cells to nucleotides. *Genet Mol Biol.* 2014; 37, 1 (suppl), 194-209.

Rosenfeld J, Patel A. Chromosomal Microarrays: Understanding Genetics of Neurodevelopmental Disorders and Congenital Anomalies. *J Pediatr Genet.* 2016.

Saxe DF, Persons DL, Wolff DJ, Theil KS. Validation of fluorescence in situ hybridization using an analyte-specific reagent for detection of abnormalities involving the mixed lineage leukemia gene. *Arch Pathol Lab Med.* 2012; 136(1):47–52.

Siegel R. Câncer Statistics. *Ca Câncer J.* 2017; 67(1):7–30.

Soto PHT, Raitz GM, Bolsoni LL, Costa CKF, Yamaguchi UM, Massuda EM. Morbidades e custos hospitalares do Sistema Único de Saúde para doenças crônicas. *Rev RENE.* 2015; 16(4): 567-575.

Tjio JH, Levan A. The chromosome number of man. *Hereditas.* 1956; 42(1–2):1–6.

Torti EE, Braddock SR, Bernreuter K, Batanian JR. Oculo-Auriculo-Vertebral Spectrum, Cat Eye, and Distal 22q11 Microdeletion Syndromes: A Unique Double Rearrangement. *Am J Med Genet Part A.* 2013; 161A:1992–1998.

Verheij E, Speleman L, Mink van der Molen AB, Thomeer HGXM. Congenital respiratory tract disorders in 22q11.2 deletion syndrome. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2018; 104:1–4.

Wan TSK, editor. *Cancer Cytogenetics. Methods in Molecular Biology*; vol. 1541. New York: Springer; 2017. 339p.

Wan TSK, Ma ESK. Molecular Cytogenetics : An Indispensable Tool for Cancer Diagnosis. *Chang Gung Med J.* 2012; 35(2):96–110.

Weinberger R, Weisman O, Guri Y, Harel T, Weizman A, Gothelf D. The interaction between neurocognitive functioning, subthreshold psychotic symptoms and pharmacotherapy in 22q11.2 deletion syndrome: A longitudinal comparative study. *Eur Psychiatry.* 2018; 48:20–6.

Weise A, Mrasek K, Klein E, Mulatinho M, Llerena JC, Hardekopf D, *et al.* Microdeletion and Microduplication Syndromes. *J Histochem Cytochem.* 2012; 60(5):346–58.

WHO. World Health Organization. WHO list of priority medical devices for cancer management WHO Medical device technical series. 2017. 252 p.

WHO. World Health Organization. Congenital anomalies. 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs370/en/>. Acessado em: 23 de janeiro de 2018.

WHO. World Health Organization - Noncommunicable Diseases (NCD) Country Profiles . 2014. Disponível em: http://www.who.int/nmh/countries/bra_en.pdf?ua=1. Acessado em: 11 de janeiro de 2018.

Zhang Y, Rowley JD. Chronic Myeloid Leukemia : CLL. 2011; 31(4):687–98.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Implementar a manufatura de sondas de DNA para hibridização *in situ* fluorescente no Laboratório de Citogenética da UFCSPA.

2.2 Objetivos específicos

- a) Hibridizar as sondas desenvolvidas em vinte amostras controles normais.
- b) Hibridizar cada sonda desenvolvida em suas respectivas amostras alteradas, confirmadas previamente por meio de cariótipo ou FISH.
- c) Avaliar sensibilidade, especificidade e eficiência das sondas desenvolvidas.
- d) Capacitar a equipe do laboratório nos procedimentos associados ao desenvolvimento e validação dos produtos.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento *in house* das sondas de DNA para FISH foi eficaz. As sondas para a detecção da deleção 22q11.2 e alterações do gene *MLL* responderam adequadamente aos critérios de validação. A fusão dos genes *BCR-ABL1* foi detectada em amostras alteradas, porém devido às marcações inespecíficas da sonda para identificação do gene *BCR* não foi possível realizar a validação. Comprovamos que, após o aprendizado e implementação das técnicas, o custo por amostra tornou-se inferior ao compararmos com os valores oferecidos pelos fornecedores das sondas comerciais disponíveis.

O decorrer do presente estudo foi árduo, as dificuldades e imprevistos desta implementação foram inúmeras, principalmente devido ao fato de que a maioria das técnicas desenvolvidas nunca tinham sido realizadas em nosso laboratório. Para chegarmos aos resultados obtidos foram necessárias adaptações e modificações dos protocolos que tínhamos. Inicialmente as alterações ocorreram na tentativa de detecção dos sinais e, após, para aperfeiçoar os processos e melhoria da qualidade dos sinais. Dentre as alterações mais significativas estão, a redução do tempo de hibridização das amostras pela metade, alteração do processo de co-desnaturação, e por fim, otimização das sondas produzidas com a redução da quantidade de sonda por *spot*.

O domínio que adquirimos desenvolvendo estas três sondas nos proporciona habilidades para a elaboração de novas sondas ou sondas indisponíveis comercialmente. O grupo de pesquisa do Laboratório de Citogenética da UFCSPA pretende continuar com o desenvolvimento de

sondas *homebrew* nos diferentes níveis de pesquisa acadêmica, desde iniciação científica até pesquisas de pós-doutorado.

5 ANEXOS

5.1 Material e Métodos

Este trabalho consistiu em uma pesquisa experimental com posterior validação das sondas desenvolvidas. Os protocolos para o desenvolvimento das sondas que utilizamos são derivados daqueles utilizados e gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Marileila Varella-Garcia (*Cytogenetics Core, Cancer Center, University of Colorado – Aurora*). Os protocolos de pré-tratamento e pós-lavagem foram derivados daqueles utilizados e gentilmente cedidos pela Prof^a Dra. Mariluce Riegel (Laboratório de Citogenética Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

Local de Realização e suporte financiamento

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), contemplado no edital FAPERGS/MS/CNPq/SESRS n° 002/2013 (Número de Processo: 1213-2551/13-0), no valor de R\$ 149.945,00. No decorrer deste trabalho, a aluna Luiza contou com a bolsa de estudos de doutorado CAPES.

Amostras

O projeto foi registrado na Comissão de Pesquisa da UFCSPA (Anexo 5.1.1) e aprovado conforme o parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da mesma universidade (2.348.732 de 25/10/2017) (Anexo 5.1.2). Para as análises de sensibilidade, especificidade e eficiência das sondas desenvolvidas, foram utilizadas vinte amostras não alteradas (controles negativos) de doadores voluntários saudáveis, todos alunos e/ou funcionários da UFCSPA. Foram coletados 4mL de sangue periférico, em tubo de colheita apropriado. As amostras foram utilizadas apenas para a validação das sondas desenvolvidas, o risco aos doadores foi associado apenas a própria coleta de sangue. A doação ocorreu mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 5.1.3).

Os controles positivos para a validação das sondas foram obtidos de amostras não identificadas advindas do Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA) e do Grupo Hospitalar Conceição (GHC). Convém esclarecer que as amostras de medula óssea alteradas foram disponibilizadas pelo Instituto de

Exames Genéticos – GENEX – laboratório responsável pelas análises citogenéticas do Grupo Hospitalar Conceição (GHC) (Anexo 5.1.4). Após análise, liberação de laudo e estocagem por tempo padrão, as amostras nos foram fornecidas. Cabe aqui ressaltar que após este tempo estas seriam descartadas. Nos foram fornecidas cinco alíquotas não identificadas com diagnóstico citogenético para a presença de cromossomo *Philadelphia*. Além do resultado do cariótipo, nenhuma outra informação a respeito das amostras foi fornecida, mantendo assim o anonimato destes indivíduos.

5.1.1 Registro na Comissão de Pesquisa da UFCSPA



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
COMISSÃO DE PESQUISA

Atestado

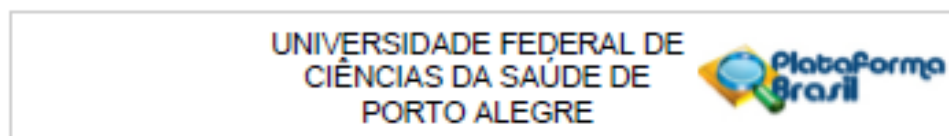
Atestamos, para o fim de inscrição de projeto de pesquisa no processo seletivo de iniciação científica/iniciação tecnológica e inovação da UFCSPA, que os projetos de pesquisa abaixo listados estão registrados na Comissão de Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Pesquisador Responsável	Título do projeto de pesquisa
Adriana Seixas	Inibidores de enzimas da cascata da coagulação: possíveis alvos no controle de carrapatos e modelos para novos anticoagulantes
Cecília Dias Flores	Perfil dos usuários do sistema de saúde do IPERGS
Cláudia Ramos Rhoden	HSP70 como biomarcador do ponto crítico da realização de exercício físico agudo em animais diabéticos expostos à poluição atmosférica
Estela Iraci Rabito	Risco nutricional em pacientes admitidos em um serviço de emergência de um hospital terciário de Porto Alegre associação com morbimortalidade
Graziela Brusch Brinques	Avaliação da composição de flavonoides em resíduos de cebola
Graziela Brusch Brinques	Desenvolvimento de bebida fermentada probiótica a partir de sucos de banana e maçã
Kellen Cristhina Borges de Souza	Padronização e avaliação da ação antimicrobiana de extrato de folhas de <i>Psidium cattleianum</i> (araçá) como matéria prima para formulações de higiene oral
Kellen Cristhina Borges de Souza	Desenvolvimento tecnológico e avaliação da ação antimicrobiana de extrato de <i>Acca sellowiana</i>
Kellen Cristhina Borges de Souza	Determinação de parâmetros de qualidade e estudo preliminar da estabilidade de tintura de <i>Passiflora edulis</i> (maracujá)
Liane Nanci Rotta	Sistema especialista para apoio à análise de amostras e seleção de condutas em uroanálise
Paulo Ricardo Gazzola Zen	Implementação da produção de sondas de DNA para hibridização in situ fluorescente
Rafael Andrade Caceres	Estudos estruturais e planejamento de novos inibidores seletivos para a enzima purina nucleosídeo fosforilase (E. C. 2.4.2.1) de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Rodrigo Della Méa Plentz	Diagrama de influência para apoio a decisão na reabilitação cardiopulmonar e metabólica

Porto Alegre, 23 de abril de 2014.


Paulo Ricardo Gazzola Zen
Coordenador Geral da Pesquisa
UFCSPA

5.1.2 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Implementação da produção de sondas de DNA para hibridização in situ fluorescente.

Pesquisador: Paulo Ricardo Gazzola Zen

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 3

CAAE: 75279317.0.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.348.732

Apresentação do Projeto:

Projeto com o objetivo de confecção de sondas de DNA para FISH representará um avanço tecnológico que permitirá o acesso a diagnósticos mais precisos, o que levará a realização de um aconselhamento genético mais apropriado, e a coleta de dados epidemiológicos de modo mais amplo. A partir da implantação desta metodologia, será possível identificar anormalidades citogenéticas em neoplasias e diagnosticar diversas doenças causadas por microdeleções cromossômicas que determinam síndromes dismórficas ou retardo mental. Através deste projeto, o Serviço pretende iniciar o desenvolvimento de sondas para serem aplicadas para o diagnóstico das anomalias do gene MLL, da fusão BCR/ABL e da síndrome de deleção 22q11.2. Após a plena implantação das técnicas de manufatura e validação destas sondas em experimentos de hibridização in situ fluorescente, o Serviço buscará a ampliação do leque de testes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Implantação da manufatura de sondas de DNA para hibridização in situ fluorescente no Laboratório de Citogenética da UFCSPA.

Objetivo Secundário:

1- Produzir sondas de DNA para serem utilizadas em outros laboratórios ligados ao SUS.

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245
 Bairro: Sarmiento CEP: 91.050-170
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3303-8804 E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 2.348.732

2- Capacitar a equipe do laboratório nos procedimentos associados a validação dos produtos e a transferência de tecnologia ao setor produtivo.

3- Possibilitar a realização de exames de citogenética molecular aos pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS).

4- Desenvolver um banco de dados sobre anormalidades cromossômicas identificadas por métodos de citogenética molecular.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco mínimo referente a coleta de sangue com voluntários da UFCSPA.

Benefícios não estão explicitados, mas pelo objetivo e justificativa da pesquisa a produção de novas sondas auxiliará para o avanço tecnológico das pesquisas genéticas no país, o que permitirá o acesso a diagnósticos mais precisos, em como o baixo custo do mesmo. Futuramente, esse testes poderão ser disponibilizados aos pacientes do SUS. Não há benefício direto aos participantes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não haverá coleta de nenhuma informação clínica dos voluntários. Em caso de qualquer complicação os indivíduos serão orientados pelos próprios pesquisadores, uma vez que na equipe também inclui médicos. A chance de encontrar alterações na região 22q11.2 ou os genes BCR/AL e MLL entre os indivíduos adultos saudáveis e assintomáticos é praticamente inexistente. Lembrando que as amostras não serão identificadas já no momento da coleta. Os controles positivos para a validação das sondas serão obtidos de amostras não identificadas advindas do Hospital da Criança Santo Antônio e do Grupo Hospital Conceição. Essa amostras foram coletadas anteriormente e aprovadas pelos CEPs do HCSA (1.871.676 de 16/10/2016) e do GHC (Projeto 10-055 de 12/05/2010), com cronogramas válidos até 2020. Em relação aos controles positivos, a única informação que será utilizada é o próprio fato de serem portadores das alterações cariotípicas citadas. Nenhuma outra informação será utilizada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos o documentos foram apresentados.

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245

Bairro: Sarmiento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 2.348.732

Recomendações:

Esclarecido como serão transportadas as amostras biológicas do HCSA e GHC.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do Relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_985124.pdf	09/10/2017 12:39:12		Aceito
Outros	Resposta_ao_parecer_CEP.pdf	09/10/2017 12:38:40	Paulo Ricardo Gazzola Zen	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Doc_Lulza_Dorfman_09102017.pdf	09/10/2017 12:36:27	Paulo Ricardo Gazzola Zen	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada.pdf	28/08/2017 10:32:09	Paulo Ricardo Gazzola Zen	Aceito
Outros	memo_resposta_06out2015.pdf	24/08/2017 15:39:52	Paulo Ricardo Gazzola Zen	Aceito
Outros	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_1871676.pdf	24/08/2017 15:37:13	Paulo Ricardo Gazzola Zen	Aceito
Outros	Declaracao_ProjPesq_sondas_UFCSPA_GENEX.pdf	24/08/2017 15:35:22	Paulo Ricardo Gazzola Zen	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso.pdf	24/08/2017 15:31:52	Paulo Ricardo Gazzola Zen	Aceito
Outros	Termo_de_anuenci.pdf	24/08/2017 15:31:18	Paulo Ricardo Gazzola Zen	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Doc_Lulza_Dorfman_24082017.pdf	24/08/2017 15:30:43	Paulo Ricardo Gazzola Zen	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_UFCSPA1.pdf	24/08/2017 15:24:13	Paulo Ricardo Gazzola Zen	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245
 Bairro: Sarmento CEP: 90.050-170
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3303-8804 E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 2.348.732

Não

PORTO ALEGRE, 25 de Outubro de 2017

Assinado por:
Julia Fernanda Semmelmann Pereira Lima
(Coordenador)

Endereço: Rua Sarmiento Leite ,245
Bairro: Sarmiento CEP: 90.050-170
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3303-8804 E-mail: cep@ufcspa.edu.br

5.1.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

“Implementação da produção de sondas de DNA para hibridização *in situ* fluorescente”

As doenças genéticas são raras e seu diagnóstico é dependente de testes genéticos. A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) é um método diagnóstico para algumas doenças genéticas, porém de alto custo. Desta forma, o domínio da técnica de confecção de sondas de DNA para FISH representará um avanço tecnológico que permitirá o acesso a diagnósticos mais precisos. O acesso a testes genéticos no Sistema Único de Saúde (SUS) é muito restrito.

Sendo assim você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa intitulada **“Implementação da produção de sondas de DNA para hibridização *in situ* fluorescente”**. O objetivo do estudo é implementar a técnica de manufatura de sondas de DNA para FISH no Laboratório de Citogenética da UFCSPA. Você será convidado(a) a participar cedendo uma amostra de 4 mL de sangue. Nenhuma informação adicional será solicitada e sua amostra de sangue não será identificada. A amostra servirá de controle para a validação da sonda de DNA a ser utilizada em testes de FISH.

A implementação da técnica de manufatura de sondas de DNA para FISH no Laboratório de Citogenética da UFCSPA representa um avanço tecnológico que permitirá o acesso a diagnósticos mais precisos. Futuramente, esses testes poderão ser disponibilizados aos pacientes do SUS.

O único risco é associado a coleta do sangue, podendo ocorrer desconforto e sangramento mínimos. Nesses casos a assistência será gratuita e realizada pela própria equipe. A sua identidade não será revelada uma vez que sua amostra não será identificada. Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelo procedimento proposto neste estudo (nexo casual comprovado), os custos serão suportados pelos pesquisadores. A pesquisa não irá gerar nenhum custo ou benefício direto aos participantes.

A sua participação é voluntária. Além disso, você pode desistir da pesquisa a qualquer momento. O seu nome não será revelado em momento algum. Nenhuma informação será coletada e sua amostra não será identificada.

Telefones de contato:

- Investigador principal: Prof. Dr. Paulo Ricardo Gazzola Zen (51) 33038774.

- Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA: (51) 3303-8804. Endereço: Rua Sarmiento leite, 245 – CEP 90050-170 - Porto Alegre-RS – para questões sobre a pesquisa e sobre os direitos dos pacientes envolvidos ou sobre problemas decorrentes da pesquisa.

Ao assinar abaixo, você confirma que leu as afirmações contidas neste termo de consentimento, que foram explicados os procedimentos do estudo, que teve a oportunidade de fazer perguntas, que está satisfeito com as explicações fornecidas e que decidiu participar voluntariamente deste estudo. Uma via será entregue a você e outra será arquivada pelo investigador principal.

Nome do Sujeito de Pesquisa (letra de forma) _____

Data _____

Assinatura _____

Responsável pela aplicação do TCLE _____

Data _____

Assinatura _____

5.1.4 Declaração GENEX



Serviço com Certificado de Acreditação do *College of American Pathologists*.



Porto Alegre, 15 de agosto de 2017.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que GENEX- Instituto de Exames Genéticos S/S LTDA EPP, CNPJ 93.019.644/0001-02 possui contrato em vigor de prestador de serviços para o Grupo Hospitalar Conceição, Contrato nº 73/17, Processo nº 1034/16, Página 93 da Seção 3 do Diário Oficial da União (DOU) de 06 de Abril de 2017. Os serviços prestados referem-se a análises citogenéticas em amostras de sangue periférico e medula óssea. Após a realização da análise citogenética e da liberação do laudo, as amostras são estocadas por um tempo padrão e, após, descartadas. Dentre as amostras a serem descartadas serão selecionadas 10 alíquotas de amostras que serão cedidas para utilização no projeto de pesquisa "Implementação da produção de sondas de DNA para hibridização in situ fluorescente". Forneceremos amostras, não identificadas, com diagnóstico Citogenético de presença de cromossomo Philadelphia (cinco alíquotas) e de alterações envolvendo o gene *MLL* (cinco alíquotas) para validação das sondas desenvolvidas no projeto de pesquisa citado acima. A única informação cedida será o próprio resultado do cariótipo, ou seja, que a alíquota apresenta uma das alterações citadas. Nenhuma outra informação será fornecida, mantendo assim o anonimato das amostras que, de outra forma, seriam descartadas.

O projeto é desenvolvido pela aluna de pós-doutorado Luiza Emy Dorfman, sob a orientação do professor Dr. Paulo Ricardo Gazzola Zen no Laboratório de Citogenética da UFCSPA. Cabe salientar que o pesquisador Paulo Zen é coordenador do projeto de pesquisa "Estudo clínico, citogenético, molecular e imunohistoquímico das neoplasias hematológicas para a identificação de marcadores terapêuticos e prognósticos", aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição (GHC) (Projeto Nº 10-055 de 12/05/2010) com cronograma válido até o primeiro semestre de 2020. Este projeto prevê a utilização de amostras de indivíduos com diagnóstico de doenças hematológicas que são atendidos no GHC.

Dr. Giorgio Paskulin
Responsável Técnico

Seleção dos clones

Os genes ou sequências de DNA de interesse foram localizados no *UCSC Genome Browser* [<https://genome.ucsc.edu>] de acordo com a espécie humana, *hg19 assembly*. Foram escolhidos os clones presentes nas bibliotecas *BAC End Pairs* e *Clones Placed on Cytogenetic Map Using FISH*, conforme sua localização em relação ao gene ou sequência de interesse (Figura 1). Os clones selecionados foram adquiridos da empresa *BACPAC Resources Center* [<https://bacpacresources.org/>].

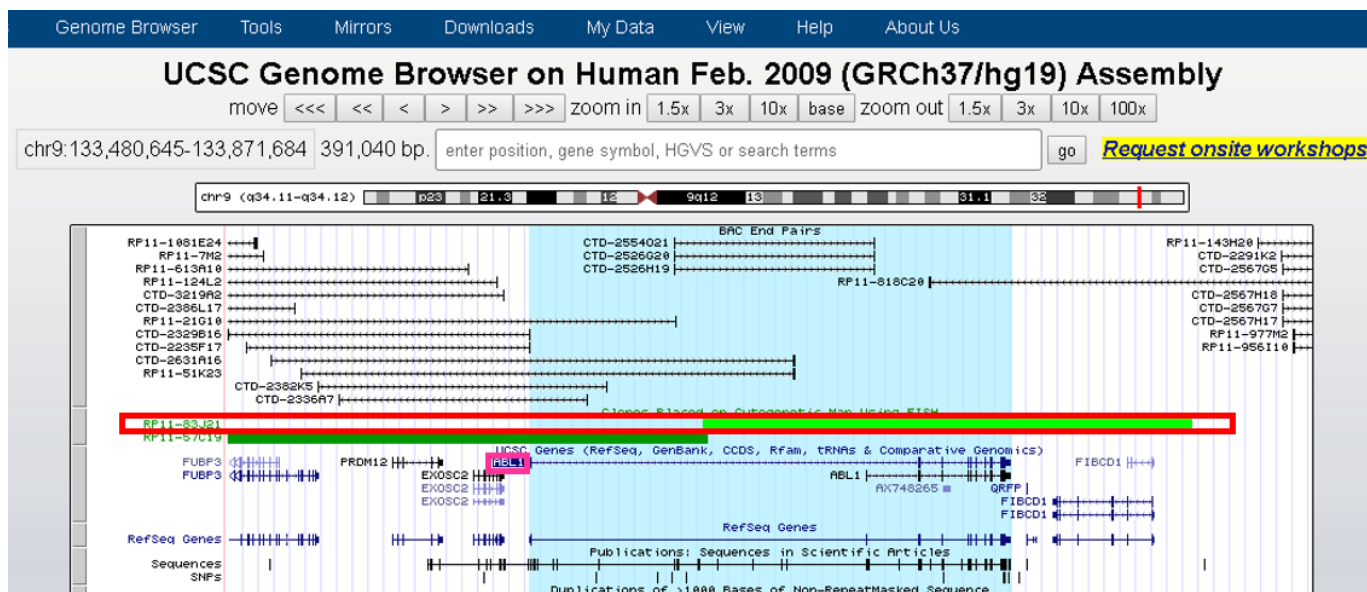


Figura 1- Demonstração da escolha do clone utilizado para identificação do gene *ABL1* no *UCSC Genome Browser*. Legenda: Clones disponíveis em *BAC End Pairs* e *Clones Placed on Cytogenetic Map Using FISH* compatíveis com a sequência do gene *ABL1* (sequência do gene marcada em azul claro, e gene *ABL1* em retângulo rosa). No retângulo vermelho, o clone RP11-83J21 utilizado para o desenvolvimento da sonda de DNA para identificação do gene *ABL1*.

Desenho dos primers específicos

Foram selecionadas as sequências de cada clone adquirido, sendo que, uma parte de cada uma delas, de cerca de 600 pb, foi copiada e colada no *PrimerQuest Tool* do *Integrated DNA Technologies* [<https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>] para escolher e comprar cada um dos pares de *primers* (*forward* e *reverse*). Foram selecionados os pares que possuíam em torno de 20 pb cada um, que gerassem fragmentos de 200 a 500 pb, com conteúdo de guanina e citosina de 45-55%, e temperatura de anelamento (*melting*) entre 54 a 60°C. Antes da solicitação de compra, foi realizado o *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) de cada uma das sequências dos *primers* [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>] para verificação

da especificidade em relação as sequências de interesse. Foram escolhidas apenas as sequências que apresentaram 100% de cobertura na região de interesse (*query cover*) e *E value* < 1.0, quando estes valores apareceram também para áreas diferentes das selecionadas, selecionamos outro par de *primers*.

Cultivo dos BACs

As sondas foram desenvolvidas a partir dos BACs comerciais (*BACPAC Resources Center*): RP11-806D22, RP11-83J21, RP11-947D13, RP11-414G21, RP11-1057H19 e RP11-825H3. Cada um dos clones adquiridos foi cultivado *overnight* a 37°C em estufa bacteriológica, em 100 mL de meio sólido LB Ágar *Affymetrix/USB®* 3,5%, após a solidificação do meio espalhamos em sua superfície cloranfenicol a uma concentração de 34 µg/mL. Após cultivo, foram selecionadas de 4 a 8 colônias únicas, de tamanho médio, isoladas (Figura 2), as quais foram colocadas em cultivos individuais contendo 3 mL de LB Broth *Affymetrix/USB®* 2% com cloranfenicol a 34 µg/mL.

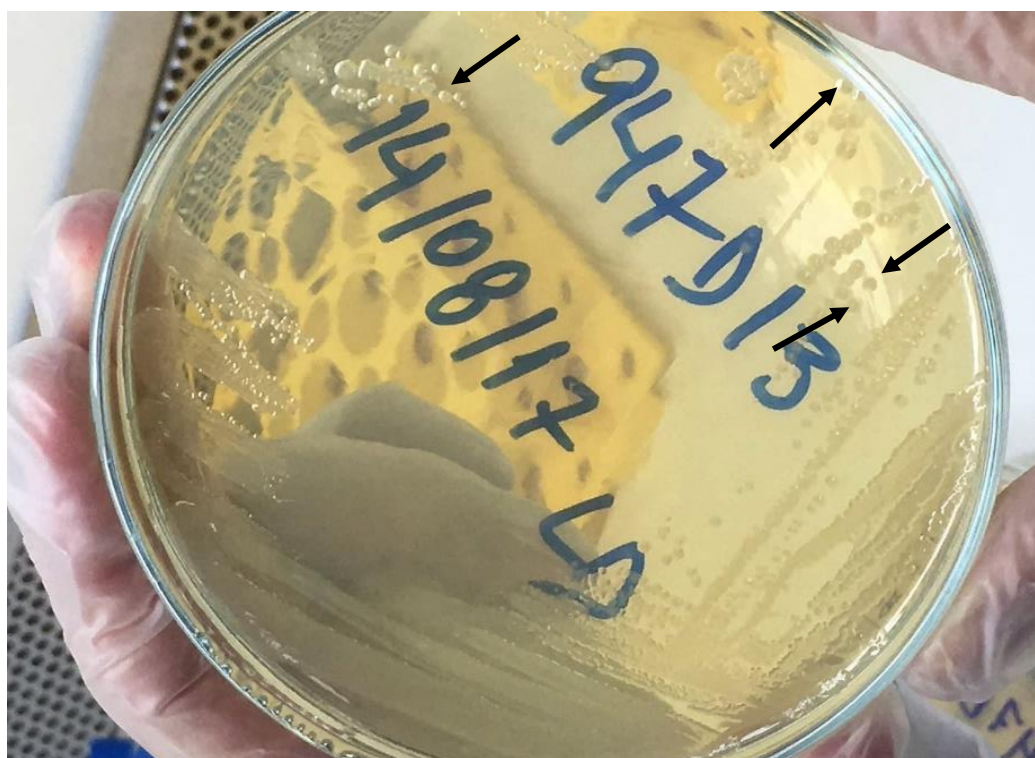


Figura 2- Colônias isoladas e de tamanho médio. Legenda: Placa de Petri contendo meio sólido LB Ágar após cultivo *overnight* de clone. As setas indicam colônias isoladas e de tamanho médio.

O material remanescente de cada colônia foi utilizado para a verificação dos insertos mediante a reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com *primers* específicos. Os produtos gerados foram identificados por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (Anexo 5.1.5). As identificações dos *BACs* utilizados em cada uma das sondas, o locus cromossômico, bem como o tamanho do fragmento (em pares de base – pb) esperado para cada *BAC* após a revelação da eletroforese em gel de agarose, as sequências e as características dos *primers* específicos para cada *BAC* estão descritos no quadro 1.

Quadro 1- Descrição dos *BACs* e dos *primers* utilizados para desenvolvimento das sondas.

Sonda	locus	BAC	Pb	Sequência do primer específico	T_m	C/G
<i>BCR-ABL1</i>	9q34	RP11 83J21	235	F: 5'- GCC TGG CCT CTT TAC TCT TAT T- 3'	54,5°C	45,5%
				R: 5'- CTC ATA TCC TCA GAG AGA CCC A- 3'	54,9°C	50%
<i>BCR-ABL1</i>	22q11	RP11 806D22	228	F: 5'- CAC AGT CTG GTA GGA GAA ACA- 3' R: 5'- GGC AGC TGG ACT ACA AAG AT- 3'	54,8°C	50%
<i>MLL</i>	11q23.3	RP11 947D13	219	F: 5'- GCC TGT ATC CCA GCA CTT T- 3'	55,1°C	52,6%
				R: 5'- AGT GCA GTG GCA CGA TTT- 3'		50%
<i>MLL</i>	11q23.3	RP11 414G21	219	F: 5'- CCT GAC TTC TCT GGG CTA TTT- 3'	54,1°C	47,6%
				R: 5'- AGG ATG GAT CTA GGA AGT CTC A- 3'	54,2°C	45,5%
del22q	22q11.21	RP11-1057H19	332	F: 5'- CAA CAT CAC CCT GAC ACC AA- 3'	55,2°C	50%
				R: 5'- CCA CCA CGC CAA GCT AAT- 3'	55,6°C	55,6%
del22q	22q13.33	RP11-825H3	267	F: 5'- AAA CGT CTC ACC GAG TTG AC- 3'	55°C	50%
				R: 5'- GGA GGA TAA AGC AGG AGA AAT GA- 3'	54,4°C	43,5%

Legenda: pb – tamanho do fragmento em pares de base, F – *primer forward*, R- *primer reverse*, T_m – temperatura de *melting*, C/G – proporção citosina e guanina.

Extração e amplificação dos DNAs

Apenas as colônias que obtiveram a confirmação das sequências específicas por PCR foram utilizadas no desenvolvimento das sondas (Figura 3). Após o cultivo *overnight* das colônias únicas em LB Broth, o DNA de cada uma delas foi extraído (QIAmp® DNA Mini Kit – QIAGEN) (Anexo 5.1.6) e quantificado em gel de agarose (Figura 4) (Anexo 5.1.7). Posteriormente, dois DNAs de cada clone foram selecionados para amplificação (REPLI-g® Mini Kit – Invitrogen) para que ocorresse o incremento da quantidade de DNA (Anexo 5.1.8). Após a amplificação os DNAs foram novamente quantificados em gel de agarose (Figura 5) (Anexo 5.1.9).

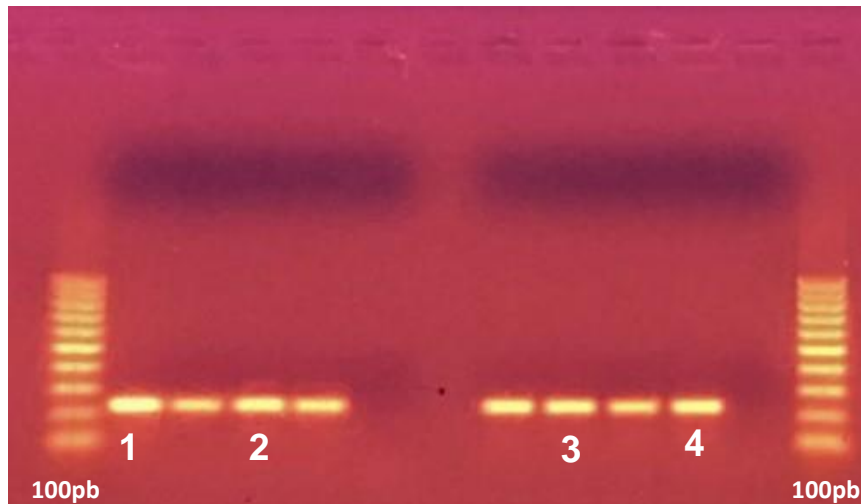


Figura 3- Eletroforese em gel de agarose para confirmação dos insertos nas bactérias cultivadas. Legenda: A primeira e última coluna do gel apresentam o marcador de peso molecular 100 pb DNA *Ladder* utilizado para mensurar o tamanho aproximado dos fragmentos. Os números 1 e 2 indicam os clones escolhidos do BAC RP11-806D22 para o prosseguimento dos experimentos, todos os clones apresentaram bandas compatíveis com os fragmentos esperados (228pb). Os números 3 e 4 indicam os clones escolhidos do BAC RP11-83J21 para o prosseguimento dos experimentos, todos os clones apresentaram bandas compatíveis com os fragmentos esperados (235pb).

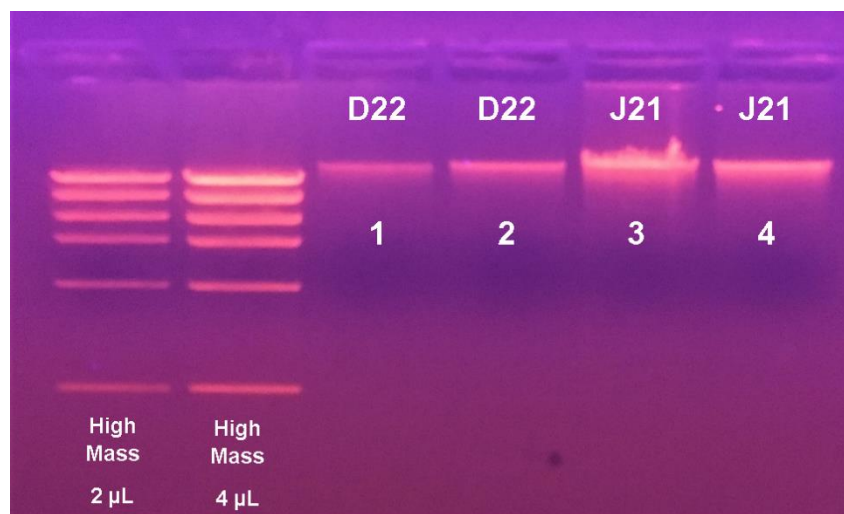


Figura 4- Eletroforese em gel de agarose para quantificação dos DNAs extraídos. Legenda: A primeira e segunda coluna do gel apresentam o marcador *High Mass DNA Ladder* utilizado para quantificar a concentração de cada DNA extraído. Os números 1 e 2 indicam os DNAs extraídos do clone RP11-806D22, e os números 3 e 4, DNAs extraídos do clone RP11-83J21. Com base na comparação da intensidade entre as bandas do marcador *High Mass* e dos DNAs dos *BACs*, a concentração dos DNAs 1 e 2 foi estimada em 20 e 40 ng/µL, respectivamente. Para o clone 3 não foi possível estimar a concentração; já para o 4, foi estimada em 60 ng/µL.

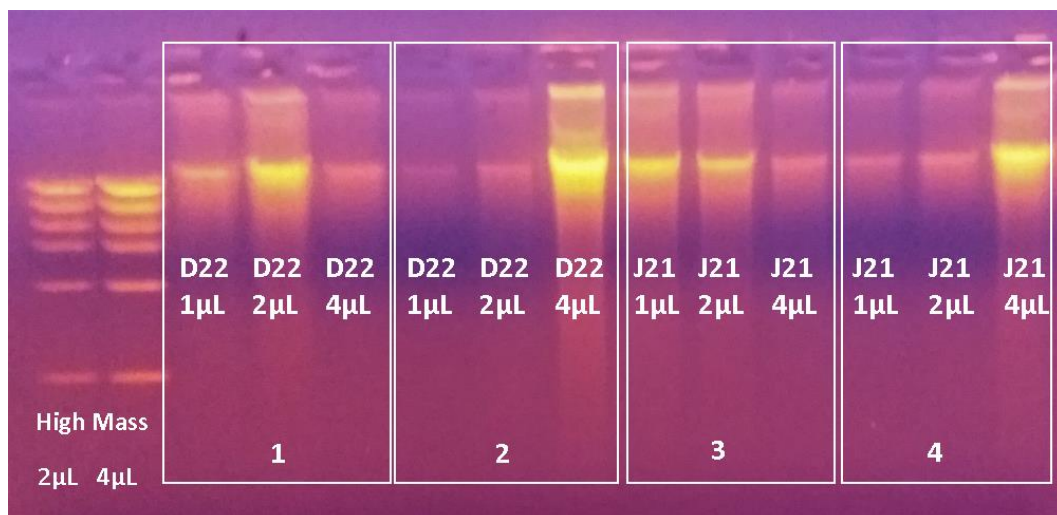


Figura 5- Eletroforese em gel de agarose para quantificação dos DNAs após Repli-G. Legenda: A primeira e segunda coluna do gel apresentam o marcador *High Mass DNA Ladder* utilizado para quantificar a concentração de cada DNA extraído após amplificação. Os números 1 e 2 indicam as colônias do clone RP11-806D22, 3 e 4 indicam as colônias do clone RP11-83J21; cada uma delas apresentando diluições com 1, 2 e 4 μL de DNA. Devido a clara visualização do aumento gradual das concentrações, foram selecionados os DNAs das colônias 2 e 4. Para ambas as colônias a quantificação do DNA foi estimada em 40 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Pelo fato das alíquotas de DNA terem sido diluídas em 1:10 para a verificação no gel de agarose, a real quantidade de DNA pode ser estimada em 400 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

Marcação dos DNAs por Nick-translation

Foi utilizado em torno de 1 μg do DNA amplificado para a realização da marcação por *Nick-translation* (Nick Translation Kit® – Abbott) (Anexo 5.1.10). De acordo com a concentração estimada de cada DNA amplificado, foi definido o volume a ser utilizado na reação. Por exemplo, para um DNA com concentração estimada de 400 $\text{ng}/\mu\text{L}$, utilizou-se 2,5 μL para chegar a concentração desejada de 1 μg (1.000 ng) de DNA. As reações foram realizadas no termociclador (Veriti 96 – Well Thermal Cycler – Applied Biosystems), onde os DNAs e reagentes específicos foram incubados de 12 a 15 horas a 15°C, e posteriormente permaneceram por 10 minutos a 70°C.

Cada conjunto de sondas desenvolvidas foi formado por um par de clones cujos DNAs foram marcados com um fluorocromo vermelho (*Red-dUTP*), e outro verde (*Green-dUTP*). A figura 6 representa os clones utilizados no desenvolvimento das sondas *BCR-ABL1* e *MLL*.

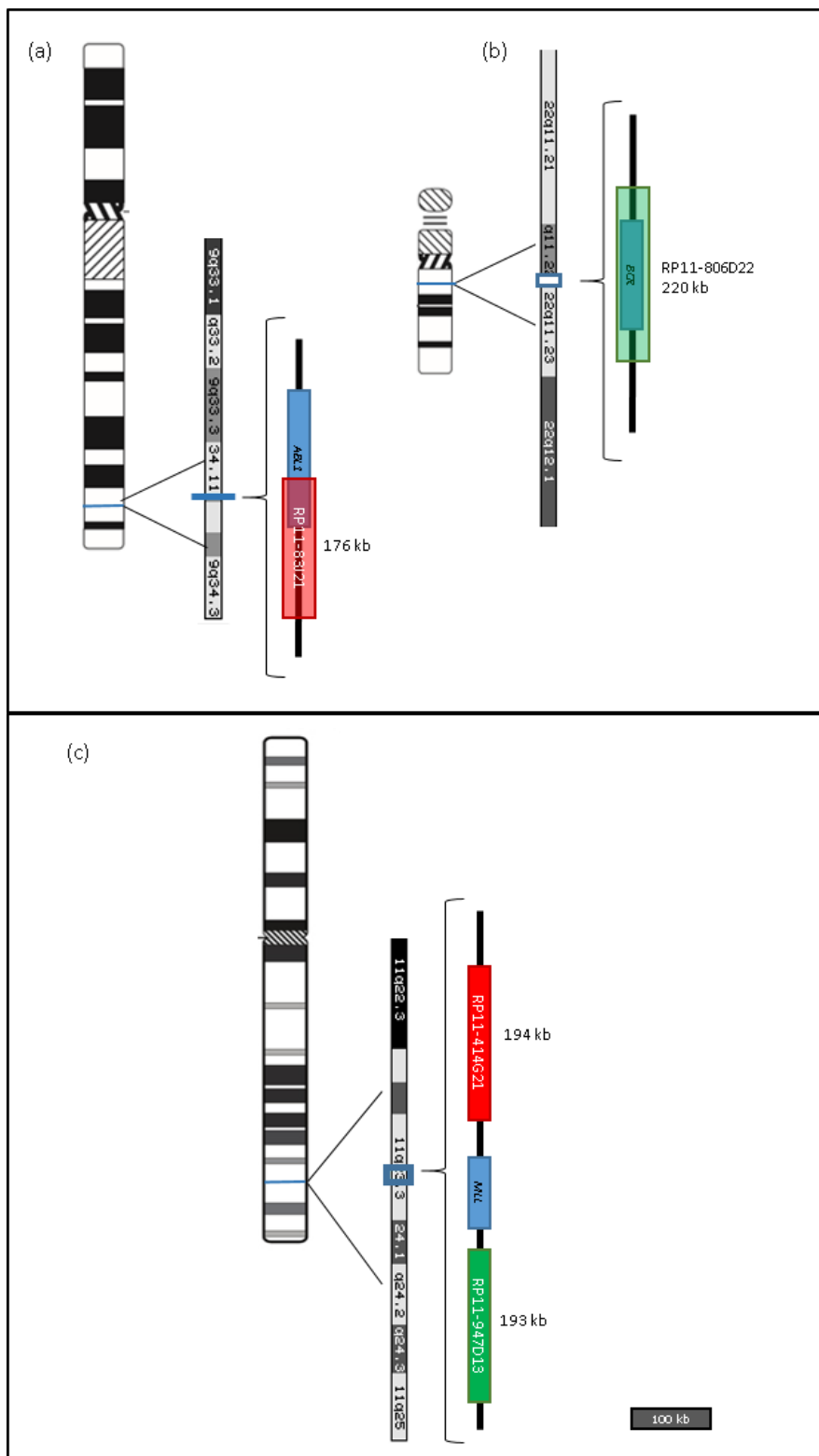


Figura 6- Representação esquemática da localização cromossômica dos clones utilizados para o desenvolvimento das sondas *BCR-ABL1* e *MLL*. Legenda: Em azul se pode observar a localização dos genes. Os clones estão coloridos de acordo com o fluorocromo utilizado em cada sonda. (a) Ideograma do cromossomo 9, a marcação em azul representa o locus do gene *ABL1*, ao lado pode-se observar esta região ampliada, e a direita dela, um aumento maior mostrando o gene *ABL1* e o clone que foi utilizado no desenvolvimento desta sonda. (b) Representação do cromossomo 22 e do clone utilizado para avaliação do gene *BCR*. (c) Ideograma do cromossomo 11 e os clones utilizados para identificação da integridade do gene *MLL*. Fonte: Elaborado pela autora.

Precipitação e purificação das sondas

Os DNAs marcados foram individualmente misturados ao DNA de esperma de salmão (Salmon Sperm® DNA – Invitrogen), à Cot-1 DNA (Human Cot-1® DNA – Invitrogen), acetato de sódio 3M e etanol absoluto. Estas misturas permaneceram por 1 hora a -85°C, decorrido o tempo, estas passaram por centrifugações com álcool 70% para a lavagem dos *pellets*. Depois os *pellets* foram deixados em temperatura ambiente para a secagem completa. Os precipitados foram então dissolvidos em solução de hibridização (tDenHyb-2 Solution® Insitus), com esta etapa concluiu-se o processo de desenvolvimento das sondas, tornando-as disponíveis para a realização dos ensaios de FISH (Anexo 5.1.11).

Cultura e Processamento das Amostras

As amostras de sangue dos doadores voluntários (controles negativos) passaram por cultivo de 72 horas em meio PB-MAX® Karyotyping Medium (ThermoFisher Scientific) em estufa de CO₂ a 37°C. Decorrido o tempo de cultivo, foi adicionada às amostras Colcemid® Solution (ThermoFisher Scientific) por 20 minutos, estas então foram centrifugadas, e após a retirada dos sobrenadantes foi adicionado cloreto de potássio (KCl) 0,075M a 37°C para realização do choque hipotônico. Após 15 minutos, se interrompeu a ação da solução hipotônica com solução fixativa de Carnoy (3 metanol: 1 ácido acético glacial). Os *pellets* das amostras foram centrifugados e lavados com esta solução por duas vezes, após processamento. A seguir, as amostras foram armazenadas a -8°C.

As amostras de medula óssea (controles positivos), foram cultivadas e processadas previamente no Instituto de Exames Genéticos – GENEX, o qual nos disponibilizou alíquotas das células fixadas e em suspensão para o preparo das lâminas.

Preparo das Lâminas

Após cultivo e processamento, as amostras foram centrifugadas, os sobrenadantes foram retirados e se adicionou solução de Carnoy para diluição dos *pellets*. Com os *pellets* devidamente diluídos, se pingou com pipeta Pasteur uma gota destas soluções em lâminas de vidro previamente lavadas. Depois da

completa secagem do material nas lâminas, a concentração e índice mitótico de cada lâmina foi verificada em microscópio de contraste de fase. As áreas que apresentaram melhores concentrações de material foram demarcadas (*spot*) com caneta de ponta de diamante. As lâminas permaneceram em temperatura ambiente até uma semana após este preparo para o processo de pré-tratamento.

Pré-tratamento

Neste processo (Anexo 5.1.12) as lâminas previamente preparadas passaram por lavagens com citrato de sódio, solução de pepsina, tampão fosfato-salino (PBS) e solução de formaldeído. Posteriormente foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol. Concluída esta etapa, iniciou-se o processo de hibridização.

Hibridização

Foram preparadas as misturas das sondas para as lâminas que seriam hibridizadas naquele momento. Para cada lâmina misturou-se 1,5 μL de cada sonda marcada à 1 μL de solução de hibridização (tDenHyb-2 Solution® Insitus). Esta mistura foi colocada na região demarcada do *spot*, representando 75ng/ μL de DNA marcado, a qual foi coberta com uma lamínula redonda de 11 mm. A lamínula foi então selada com *rubber cement* (Elmer's®). Após secagem completa da cola, as lâminas foram incubadas em estufa a 85°C por 10 minutos para que ocorresse a codesnaturação dos DNAs. Terminado este tempo o material das lâminas foi hibridizado em câmara úmida a 37°C por 18 a 44 horas.

Pós-lavagem

Decorrido o período de hibridização, as lâminas foram lavadas em soluções de citrato de sódio e Tween-20; e depois, em soluções contendo apenas citrato de sódio. Finalizado este processo, colocou-se o contracorante DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) na região demarcada, sobrepondo-a depois com uma lamínula. As lâminas foram embaladas em papel-alumínio e armazenadas sob refrigeração até o momento da análise.

Análise

As análises foram realizadas em microscópio de epifluorescência Axio Imager Z2 Zeiss, e os registros fotográficos foram feitos no software Isis®MetaSystems. A contagem das células seguiu os parâmetros de sinais recomendados no *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual* (Figura 7), e foi realizada preferencialmente por dois analistas treinados. Cada *spot* foi varrido de forma similar à análise comumente praticada para as lâminas de bandamento GTG. A análise ocorreu apenas nas lâminas que apresentaram sinais brilhantes e facilmente reconhecidos, com *background* escuro e limpo, sem resquícios de fluorescência entre as células. Para a contagem utilizamos células íntegras, com núcleos bem delimitados, sem sobreposições, e metáfases arredondadas com aparência diploide.

As células foram avaliadas em filtro verde (Green- 49303 Chroma) e laranja (Orange- 49305 Chroma) para a detecção individual das sondas marcadas com os fluorocromos *Green-dUTP* e *Red-dUTP*, respectivamente. Para a visualização do conjunto de sondas desenvolvidas utilizamos o filtro triplo (DAPI/FITC/TexasRed- 61002 Chroma). Para registro das análises de FISH utilizamos uma ficha (Anexo 5.1.13) para cada amostra, cujos dados foram posteriormente transpostos para tabelas em Excel. Com estes valores realizamos os cálculos de sensibilidade, especificidade e eficiência das sondas desenvolvidas.







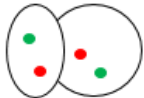
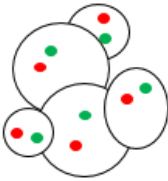
 <p>2G 2R – dois sinais bem delimitados de cada cor</p>	 <p>2G 1R – dois sinais verdes, um sinal vermelho dividido.</p>	 <p>1G 1R – um sinal verde e um vermelho difuso.</p>	 <p>2G 2R – dois sinais verdes, dois sinais vermelhos, um deles está dividido.</p>
 <p>2G 2R – um sinal verde bem compacto o outro mais difuso, dois sinais vermelhos.</p>	 <p>1G 2R – um sinal verde, um sinal vermelho bem delimitados, o outro difuso.</p>	 <p>Não analisar- podem ser dois núcleos cada um com dois sinais, ou um núcleo torcido.</p>	 <p>Não analisar- núcleos sobrepostos.</p>

Figura 7- Representação de algumas das diretrizes para contagem de sinais de FISH em interfases. Legenda: Interfases com sondas de FISH em duas cores. Abaixo de cada desenho está o resultado recomendado a ser considerado, onde G representa os sinais verdes e R representa os sinais vermelhos. Fonte: Adaptado de Lawce e cols., 2017, elaborado pela autora.

5.1.5 Fluxos de trabalho- 1_Cultivo dos BACs e validação por PCR



Laboratório de Citogenética

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 4º Andar

Rua Sarmento Leite, 245 - Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil - CEP 90050-170
Fone +55 (51) 3303-9000 - Fax +55 (51) 3303-8810

1_Cultivo dos BACs e validação por PCR

Responsável: _____ Data: __/__/____
Nome do BAC: _____ Antibiótico usado: _____

A. Preparo dos meios de cultivo *LB Broth* e *LB Ágar*

1. *LB Broth*: 20g de meio de cultivo *LB Broth* + 1000mL de água MilliQ ____;
2. *LB Ágar*: 35g de meio de cultivo *LB Ágar* + 1000mL de água MilliQ ____;
3. Autoclavar ____;
4. *LB Broth*: deixar esfriar a temperatura ambiente. Aliquotar 3mL do meio em tubos de centrifuga ____;
5. *LB Ágar*: deixar esfriar até que se possa segurar o frasco. Colocar 50mL do meio de cultivo em placas de Petri. Deixar solidificar a temperatura ambiente ____.

B. Teste de contaminação dos meios de cultivo *LB Broth* e *LB Ágar*

1. Colocar um tubo de centrifuga com meio de cultivo líquido *LB Broth* e uma placa de Petri com meio de cultivo sólido *LB Ágar* na estufa a 37°C *overnight* ____.
- O crescimento de colônias indica contaminação dos meios de cultivo e inviabiliza o uso para os experimentos.

C. Inoculação dos BACs em meio sólido *LB Ágar*

1. Aplicar 100µL de cloranfenicol nas placas de Petri contendo meio de cultivo sólido *LB Ágar* ____ e espalhar utilizando material descartável adequado ____.
2. Identificar cada uma das Placas de Petri a serem utilizadas com nome do BAC ____, data ____, e iniciais do responsável ____.
3. Inocular o BAC com alça estéril de 10µL através da técnica de esgotamento ____;
4. Colocar na estufa a 37°C *overnight* ____.

D. Replicação das colônias em meio líquido *LB Broth*

1. Com alça estéril, inocular pelo menos quatro colônias* isoladas e de tamanho médio para cada clone em meio líquido ____;
 2. Incubar no *shaker* a 37°C *overnight* ____;
 3. *Utilizar o restante de cada uma das colônias para o *mix* da PCR ____.
- Preparar o *mix* antes desta etapa. Deixar para colocar a *Taq* somente antes de ir para o termociclador.

E. Verificação da presença da sequência de DNA específica por PCR

1. Preparar o *mix* para PCR de acordo com a tabela abaixo ____:
- OBS. 1: Retirar a *TaqPolimerase* do armazenamento a -20°C apenas no momento do uso.
OBS. 2: Utilizar o restante de cada uma das colônias para o *mix* da PCR ou utilizar 1µL do meio de cultivo líquido (após crescimento *overnight*) de cada uma das colônias após homogeneizar vigorosamente.

	Volume por reação (µL)	Volume por <i>mix</i>
H ₂ O	13,25	
Tampão 10x	2,50	
MgCl ₂	0,75	
DNTP	5,00	
Primer F	1,00	
Primer R	1,00	
<i>TaqPolimerase</i>	0,50	
DNA do BAC	1,00	

Protocolo gentilmente cedido pela Profa. Dra. Marileila Varella-Garcia / Cytogenetics Core Laboratory / Universidade do Colorado.

Traduzido e adaptado por Luiza Emy Dorfman em 15/11/2017.



Laboratório de Citogenética

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 4º Andar

Rua Sarmento Leite, 245 - Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil - CEP 90050-170
Fone +55 (51) 3303-9000 - Fax +55 (51) 3303-8810

2. Colocar no termociclador utilizando o programa adequado para o *BAC* a ser verificado ____; Programa utilizado: _____.
3. Verificar o tamanho do fragmento através de eletroforese ____;
4. Baseado no tamanho do produto e na qualidade da banda presente no gel de agarose, escolher as duas melhores colônias para cada clone ____;
5. Armazenar os tubos de *LB Broth* com as colônias escolhidas a 4°C, selando com parafilme (até 1 semana) ____ ou seguir com a extração do DNA bacteriano ____.

5.1.6 Fluxos de trabalho- 2_Extração de DNA bacteriano



Laboratório de Citogenética

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 4º Andar

Rua Sarmento Leite, 245 - Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil - CEP 90050-170
Fone +55 (51) 3303-9000 - Fax +55 (51) 3303-8810

2_Extração de DNA bacteriano – usando QIAamp DNA Mini Kit

Responsável: _____ Data: __/__/__ Início às: __: __

Clone	Gene

1. Centrifugue 1mL da suspensão celular durante 1 minuto a 9.000rpm em um microtubo ____;
2. Remova o sobrenadante ____; **não misture o pellet celular!**
3. Repita os passos 1 e 2 no mesmo microtubo, se necessário, até que todo o volume seja centrifugado ____;
4. Ressuspenda as células em PBS 1X, um volume total de 300µL ____;
5. Adicione 30µL de QIAGEN Proteinase K ____;
6. Adicione 300µL de Buffer AL ____ . Misture no vórtex por 15 segundos ____;
7. Incube a 56°C por, pelo menos, 1 hora ou até a lise total ____ e dê um *spin* ____;
8. Adicione 300µL de etanol 100% gelado ____ . Misture e centrifugue brevemente ____;
9. Aplique a mistura ao QIAamp *Spin Column* ____ . Centrifugue durante 1 minuto a 8.000rpm ____;
10. Coloque a coluna em um segundo tubo coletor limpo ("*collecting tube*") ____ e descarte o filtrado ____;
11. Abra o tubo de coluna ("*column tube*") e adicione 500µL de Buffer AW1 ____ . Centrifugue durante 1 minuto a 8.000rpm ____;
12. Coloque a coluna em um terceiro tubo coletor limpo ("*collecting tube*") ____ e descarte o filtrado ____;
13. Abra o tubo de coluna ("*column tube*") e adicione 500µL de Buffer AW2 ____ . Centrifugue durante 1 minuto a 8.000rpm ____;
14. Coloque a coluna em um tubo de microcentrifuga de 2mL limpo ____ , descarte o filtrado ____ e centrifugue durante 1 minuto a 13.000rpm;
15. Coloque a coluna em um tubo de microcentrifuga de 2mL limpo e adicione 150µL de Buffer AE ____ . Incube a temperatura ambiente por 5 minutos ____ e centrifugue durante 1 minuto a 8.000rpm ____ . **MANTENHA O SOBRENADANTE.**
16. Repita o passo 15 mais duas vezes no mesmo tubo de microcentrifuga de 2mL ____ ; total = 450µL
17. Descarte o *Spin Column* e mantenha o sobrenadante ____;
18. Adicione 0,1x do volume da reação de Acetato de Sódio 3M (~45µL) ____;
19. Adicione 2-2,5x do volume da reação de Etanol 100% gelado (~1.250µL, o volume pode ser dividido em 2 microtubos) ____;
20. Misture gentilmente e mantenha a -85°C durante 1 hora ou a -20°C *overnight* ____;
21. Centrifugue durante 30 minutos a 11.000rpm a 4°C, remova o sobrenadante ____;
22. Adicione 200µL de Etanol 70% gelado (não misture), centrifugue durante 10 minutos a 11.000rpm a 4°C ____ e remova o sobrenadante ____;
23. Centrifugue novamente durante 2 minutos a 11.000rpm ____ e remova o máximo do sobrenadante usando uma pipeta pequena e seque o pellet a temperatura ambiente por no mínimo 15 minutos ____;
24. Dissolva o pellet em 10-30µL de Buffer AE ou H₂O em banho-maria a 37°C ____;
25. Estime a concentração de DNA submetendo a amostra a eletroforese em gel de agarose ____.

Término às: __: __

Protocolo gentilmente cedido pela Profa. Dra. Marileila Varella-Garcia / Cytogenetics Core Laboratory / Universidade do Colorado.
Traduzido e adaptado por Luiza Emy Dorfman em 15/11/2017.

5.1.7 Fluxos de trabalho- 3_ Gel de eletroforese



Laboratório de Citogenética

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 4º Andar

Rua Sarmento Leite, 245 - Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil - CEP 90050-170
Fone +55 (51) 3303-9000 - Fax +55 (51) 3303-8810

3_ Gel de eletroforese (*High Mass*)

Responsável: _____

Data: __/__/____

A. Preparar o gel de agarose

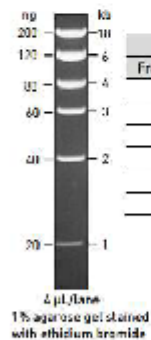
1. Dissolver 1g de Agarose em 100mL de TBE 1x _____;
2. Aquecer a solução em microondas durante 3 minutos _____;
3. Resfriar o frasco em água corrente _____, adicionar 10µL de Brometo de Etídio (estoque 10mg/mL) _____ e homogeneizar com cuidado _____;
4. Colocar o gel na bandeja _____, inserir o pente _____, aguardar a solidificação (de 30 a 45 minutos) _____.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
DNA												
H2O												
2Xdye												

Fragment size	Amount of DNA (ng) in each band		
	2 µL	4 µL	8 µL
10,000 bp	100 ng	200 ng	400 ng
6000 bp	60 ng	120 ng	240 ng
4000 bp	40 ng	80 ng	160 ng
3000 bp	30 ng	60 ng	120 ng
2000 bp	20 ng	40 ng	80 ng
1000 bp	10 ng	20 ng	40 ng

5. Condições de corrida: 85V, 400mA, 50 minutos _____.

Resultado:



– cole o gel aqui –

Protocolo gentilmente cedido pela Profa. Dra. Marileila Varella-Garcia / Cytogenetics Core Laboratory / Universidade do Colorado.
Traduzido e adaptado por Luiza Emy Dorfman em 15/11/2017.

5.1.8 Fluxos de trabalho- 4_ Repli-G



Laboratório de Citogenética

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 4º Andar

Rua Sarmento Leite, 245 - Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil - CEP 90050-170
Fone +55 (51) 3303-9000 - Fax +55 (51) 3303-8810

4_ Repli-G (Tampão 2.5µl)

Responsável: _____ Data: __/__/____ Início às: __:__

1. Prepare a solução *DLB buffer* estoque: adicione 500µL de água MilliQ ao tubo ____, misture completamente ____ e centrifugue brevemente ____;
2. Prepare a solução *buffer D1* e *buffer N1* para o número total de reações de amplificação de genoma total (volumes baseados em 4 reações de Repli-G):
Buffer D1: 2,25µL de *DLB Buffer* reconstituído ____ + 8µL de água MilliQ ____;
Buffer N1: 3µL de *stop solution* ____ + 17µL de água MilliQ ____;
3. Identifique um eppendorf de 50µL ____ e pipete 100ng (em $\leq 2.5\mu\text{L}$) do DNA molde (DNA genômico – gDNA) no tubo ____;
4. Adicione 2.5µL de *Buffer D1* ao DNA para desnaturação ____. Vortex ____. Centrifugue brevemente ____;
5. Incubar as amostras a temperatura ambiente (15–25°C) por 3 minutos ____.
6. Adicione 5µL de *Buffer N1* as amostras para neutralização ____. Vortex ____. Centrifugue brevemente ____;
7. Prepare a *master mix* para o número total de reações de amplificação de genoma total no gelo e misture ____;
Master Mix por amostra:
29µL de *Repli-G Midi Reaction Buffer* ____,
10µL de água MilliQ ____,
1µL de *Repli-G Midi DNA Polymerase* ____ . Retire do freezer apenas no momento do uso. Guardar assim que utilizar.
8. Adicione 40µL do *master mix* aos 10µL do DNA desnaturado ____;
9. Homogenize algumas vezes com a pipeta pegando e soltando o líquido ____;
10. Coloque o eppendorf de 50µL no termociclador ____, selecione o programa *Repli-G* ____ e inicie a máquina ____;
11. Dilua 1ul do produto do *Repli-G* 1:10 em água milliQ ____;
12. Coloque em um gel de agarose 1%: o DNA diluído *Repli-G* e *high mass ladder* ou equivalente para estimar a concentração do DNA ____;
13. Identificar o frasco do DNA com o número do clone, concentração, data, e iniciais ____;
14. Armazenar o DNA a -20°C ou prosseguir com a marcação ____.

ID DNA molde	DNA inicial (em µL)	ng DNA usadas para o Repli-G	Repli-G DNA [] 1:10 diluição	Repli-G DNA concentração (ng/ul)	Quantidade total de DNA obtida (ng)

Protocolo gentilmente cedido pela Profa. Dra. Marileila Varella-Garcia / Cytogenetics Core Laboratory / Universidade do Colorado.

Traduzido e adaptado por Luiza Emy Dorfman em 15/11/2017.

5.1.9 Fluxos de trabalho- 5_ Gel de eletroforese



Laboratório de Citogenética

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 4º Andar

Rua Sarmento Leite, 245 - Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil - CEP 90050-170
Fone +55 (51) 3303-9000 - Fax +55 (51) 3303-8810

5_ Gel de eletroforese (*High Mass*)

Responsável: _____

Data: __/__/__

B. Preparar o gel de agarose

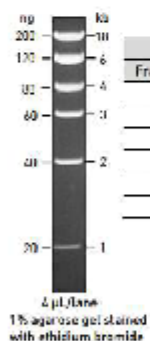
6. Dissolver 1g de Agarose em 100mL de TBE 1x ____;
7. Aquecer a solução em microondas durante 3 minutos ____;
8. Resfriar o frasco em água corrente ____, adicionar 10µL de Brometo de Etidio (estoque 10mg/mL) ____ e homogeneizar com cuidado ____;
9. Colocar o gel na bandeja ____, inserir o pente ____, aguardar a solidificação (de 30 a 45 minutos) ____.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
DNA												
H2O												
2Xdye												

Fragment size	Amount of DNA (ng) in each band		
	2 µL	4 µL	8 µL
10,000 bp	100 ng	200 ng	400 ng
6000 bp	60 ng	120 ng	240 ng
4000 bp	40 ng	80 ng	160 ng
3000 bp	30 ng	60 ng	120 ng
2000 bp	20 ng	40 ng	80 ng
1000 bp	10 ng	20 ng	40 ng

10. Condições de corrida: 85V, 400mA, 50 minutos ____.

Resultado:



– cole o gel aqui –

Protocolo gentilmente cedido pela Profa. Dra. Marileila Varella-Garcia / Cytogenetics Core Laboratory / Universidade do Colorado.
Traduzido e adaptado por Luiza Emy Dorfman em 15/11/2017.

5.1.10 Fluxos de trabalho- 6_ Marcação direta do DNA- Nick-translation



Laboratório de Citogenética

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 4º Andar

Rua Sarmento Leite, 245 - Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil - CEP 90050-170
Fone +55 (51) 3303-9000 - Fax +55 (51) 3303-8810

6_ Marcação direta do DNA- Nick-translation

Responsável: _____ Data: __/__/__ Início às: __: __

Sonda: _____

Nota: Proteger da luz.

1. Colocar no freezer um Eppendorf identificado para cada um dos DNAs a ser marcado ____;
2. Separar os reagentes ____;

	1	2	3	4	5	6	7
Sonda	dH ₂ O completar até 22,5µL	DNA para __µg	10x Nick translation Buffer	0.2mM SG or SR dUTP	0.1mM dTTP	dNTP Mix	Nick- translation Enzyme
			5µL	2.5µL	5µL	10µL	5µL
			5µL	2.5µL	5µL	10µL	5µL
			5µL	2.5µL	5µL	10µL	5µL
			5µL	2.5µL	5µL	10µL	5µL
			5µL	2.5µL	5µL	10µL	5µL
			5µL	2.5µL	5µL	10µL	5µL
			5µL	2.5µL	5µL	10µL	5µL
			5µL	2.5µL	5µL	10µL	5µL

3. Em cada Eppendorf identificado, adicionar os reagentes na ordem em que estão listados na tabela:
 - a. dH₂O para um volume final de 22.5µL, quando combinado com o DNA ____;
 - b. DNA para 1µg ou a quantidade desejada ____;
 - c. 5µL de 10x nick translation buffer ____;
 - d. 2.5µL 0.2mM SpectrumGreen, SpectrumOrange ou SpectrumRed dUTP ____;
 - e. 5µL de 0.1mM dTTP ____;
 - f. 10µL de dNTP mix ____ Centrifugar ____ Vórtex ____;
 - g. 5µL de nick translation enzyme ____ (manter no gelo durante todo o processo).
4. Incubar a 15°C por ____ horas (12-16 horas) ____;
5. Incubar a 70°C por 10 minutos ____;
6. Manter no gelo ____ ou incubar à 4°C ____;
7. Guardar a -20°C ou iniciar o protocolo de Precipitação do DNA.

Término às: __: __

Protocolo gentilmente cedido pela Profa. Dra. Marileila Varella-Garcia / Cytogenetics Core Laboratory / Universidade do Colorado.
Traduzido e adaptado por Luiza Emy Dorfman em 15/11/2017.

5.1.11 Fluxos de trabalho- 7_ Precipitação da sonda de DNA

**Laboratório de Citogenética**

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 4º Andar

Rua Sarmento Leite, 245 - Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil - CEP 90050-170
Fone +55 (51) 3303-9000 - Fax +55 (51) 3303-8810**7_ Precipitação da sonda de DNA**

Responsável: _____ Data: __/__/__ Início às: __: __

1. Em um tubo de centrifuga de 1,5mL identificado, adicionar:
 - a. Volume selecionado de DNA (marcado ou não) para ser precipitado individualmente ou em conjunto ____;
 - b. 10x µg de Human Cot-1 DNA ou quantidade apropriada ____;
 - c. 50x µg de DNA carreador (esperma de salmão estoque 10µg/µL) ou quantidade apropriada ____;
 - d. 0,1x o volume da mix de Acetato de Sódio 3M pH 5,2 ____;
 - e. 2 – 2,5x o volume total da mix de etanol 100% gelado ____.

Sonda	DNA marcado	Cot-1 DNA	DNA carreador	Acetato de Sódio	Etanol
Marcação única	50 ul	10 ul	5 ul	7 ul	180 ul

2. Misturar os reagentes ____;
3. Incubar a -85°C por 60 minutos ____;
4. Centrifugar a 11.000rpm, a 4°C por 30 minutos ____;
5. Remover o sobrenadante ____;
6. Lavar o pellet com 200µL de etanol 70% gelado ____;
7. Centrifugar a 11.000rpm, a 4°C, por 10 minutos ____;
8. Remover o sobrenadante e repetir os passos 6 e 7 ____;
9. Remover o sobrenadante e secar as paredes do tubo com papel filtro ____;
10. Deixar o pellet secando a temperatura ambiente até que fique completamente seco ____;
11. Ressuspender o pellet em ____ µL de DenHyb mix para uma concentração final de ____ ng/µL. Misturar completamente no vórtex ____;
12. Incubar a 37°C no banho-maria por, pelo menos, 15 minutos, para dissolver o pellet ____;
13. Embrulhar com papel alumínio. Manter no gelo até o uso ou armazenar a -20°C ____.

Término às: __: __

Protocolo gentilmente cedido pela Profa. Dra. Marileila Varella-Garcia / Cytogenetics Core Laboratory / Universidade do Colorado.
Traduzido e adaptado por Luiza Emy Dorfman em 15/11/2017.

5.1.12 Fluxos de trabalho- 8_ Hibridização *in situ* fluorescente em células em suspensão



Laboratório de Citogenética

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 4º Andar
Rua Sarmiento Leite, 245 - Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil - CEP 90050-170
Fone +55 (51) 3303-9000 - Fax +55 (51) 3303-8810

8_ Hibridização *in situ* fluorescente em células em suspensão

Responsável: _____ Data: __/__/____ Início às: __: __

Sonda: _____

A. Pré-tratamento das lâminas

1. Retirar da geladeira os reagentes que serão utilizados ____;
2. Colocar um frasco com 2xSSC no banho-maria 37°C ____;
3. Preparar a solução de pepsina/HCl ____;

70mL água destilada
1mL HCl 1M (armazenado na geladeira)
70uL pepsina (0,05g/mL – armazenada no freezer) – Adicionar à solução apenas no momento do uso

4. Colocar a solução de pepsina no banho-maria 37°C ____;
5. Verificar temperatura da estufa 90°C ____;
6. Preparar 3 frascos 1xPBS, 1 frasco Formaldeído (solução armazenada na geladeira), 1 frasco Etanol 70%, 1 frasco Etanol 85%, 1 frasco Etanol 100% (todas devem estar em temperatura ambiente no momento do uso) ____;
7. Colocar as lâminas na estufa a 90°C por 5 minutos ____;
8. Reduzir a temperatura da estufa para 85°C ____;
9. Incubar as lâminas em 2xSSC à 37°C por 15 min ____;
10. Incubar as lâminas em solução de pepsina à 37°C por 7 min ____;
11. Lavar em 1x PBS no agitador por 5 min ____;
12. Lavar em outro frasco em 1x PBS no agitador por 5 min ____;
13. Incubar em solução de Formaldeído no agitador por 2 min ____;
14. Lavar em 1x PBS no agitador por 5 min ____;
15. Desidratar em etanol, por 2 minutos cada, no agitador, 70% ____, 85% ____, 100% ____;
16. Secar as lâminas em temperatura ambiente ____.

B. Hibridização (prepare no escuro)

1. Remover a sonda e o DenHyb do freezer, deixar descongelar em temperatura ambiente ____;

	Sonda vermelha	Sonda verde	DenHyb	Total por spot
Mix 1				
Mix 2				
Mix 3				

2. Limpar as lamínulas com papel toalha e álcool 70%, secar bem com papel toalha ____;
3. Pipetar cuidadosamente o mix, passar no vórtex e spin ____;
4. Deixar o mix da sonda, lâminas e lamínulas à 37°C por 5 min ____;
5. Aplicar ____ uL do mix da sonda no spot da lâmina. Cobrir com lamínula redonda de 11mm ____;
6. Selar com rubber cement ____. Deixar secar até que a cola fique transparente ____;
7. Incubar à 85°C por 10 min para co-desnaturação ____;
8. Hibridizar em câmara úmida à 37°C por ____ horas.



Laboratório de Citogenética

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 4º Andar
Rua Sarmiento Leite, 245 - Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil - CEP 90050-170
Fone +55 (51) 3303-9000 - Fax +55 (51) 3303-8810

Término às: __/__/__

Lâmina	ID/Material	Sonda	Observações
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			

C. Pós-lavagem

Responsável: _____

Data: __/__/__

- Ligar banho-maria à 71°C ____;
- Colocar no banho-maria 50mL de 0,4x SSC (frasco de plástico) ____;
- Retirar 2x SSC da geladeira (a solução deve estar em temperatura ambiente para uso) ____;
- Verificar a temperatura das soluções ____;
- Adicionar aos 0,4x SSC 150uL de Tween20 (0,3%) ____;
- Adicionar aos 50mL de 2x SSC 50uL de Tween20 (0,1%) ____;
- Verificar o pH da solução 0,4x SSC/0,3%Tween20, pH 7 – 7,2; ajustar se necessário ____;
- Término da hibridização às ____;
- Retirar com cuidado o rubber cement e remover a lamínula ____;
- Incubar as lâminas por 5 min em 0,4x SSC/Tween20, 67°C ____;
- Lavar as lâminas por 5 min em 2x SSC/Tween20, à temperatura ambiente no agitador ____;
- Lavar as lâminas por 5 min em 2x SSC, à temperatura ambiente no agitador ____;
- Lavar as lâminas por 5 min em 2x SSC, à temperatura ambiente no agitador ____;
- Com as lâminas ainda úmidas, aplicar 10uL de DAPI (0.3 µg/µl) na lâmina ____;
- Cobrir com lamínula de 22x50mm (limpas previamente), pressionar gentilmente com papel filtro, limpando o excesso ____;
- Proteger as lâminas de luz com papel alumínio ____ Armazenar à 4°C ____.

Término às: __: __

2

Protocolo gentilmente cedido pela Profa. Dra. Mariluce Riegel/ Laboratório de Citogenética Molecular/
Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
Adaptado por Luiza Emy Dorfman em 15/11/2017.

Validação

Os critérios de testagem de desempenho e validação das sondas seguiram o recomendado no *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*, cap. 16, para validação de sondas desenvolvidas *in house*. Neste trabalho avaliamos a sensibilidade, especificidade e eficiência das sondas produzidas.

Para os cálculos de sensibilidade de cada uma das sondas desenvolvidas, foram contadas 4.000 interfases em 20 amostras controle negativas, sendo 200 interfases em cada amostra. Foi considerado o padrão de sinais verde/vermelho em cada uma das células analisadas.

Para os cálculos de especificidade das sondas, analisamos ao menos um total de 100 metáfases nas 20 amostras controle negativas. A fim de assegurar com precisão a localização cromossômica das sondas desenvolvidas, utilizamos a ferramenta do software de captura de imagem Isis®, chamada DAPI reverso, que facilita a identificação cromossômica baseada no padrão de bandeamento adotado na citogenética convencional. Desta forma, registramos no mínimo dez fotografias de metáfases com este bandeamento. Esse procedimento assegurou que a sonda desenvolvida hibridizasse na região cromossômica esperada, que não existisse hibridização cruzada, que não houvesse contaminação do mix da sonda, e que o protocolo fosse adequado para o desenvolvimento da mesma.

Por fim, a eficiência foi verificada calculando-se a percentagem de células analisáveis que hibridizaram, dentre as 4.000 células contadas.

As sondas para investigação de deleção 22q11.2 e fusão *BCR-ABL1* também foram testadas em amostras de controles positivas para ambas alterações, para verificação do funcionamento correto das sondas na detecção das respectivas alterações. Cabe aqui ressaltar que, para garantir a reprodutibilidade dos experimentos, todas as etapas do desenvolvimento das sondas e hibridização foram realizadas diversas vezes, em dias distintos, por diferentes técnicos.

5.2 Sonda *MLL*

Durante o período de aquisição dos reagentes selecionamos e compramos os clones RP11-414G21 e RP11-59N1 para o desenvolvimento da sonda *MLL*. Os cultivos bacterianos ocorreram conforme o esperado, todavia ao realizar a etapa de checagem por PCR, não ocorria a amplificação da sequência utilizando os *primers* específicos para o clone RP11-59N1. Esta etapa foi realizada por diversas vezes para este clone. Realizamos novas culturas, porém também sem obtenção de resultados na etapa de verificação por PCR. Como com os *primers* dos outros clones tivemos resultados positivos, cogitamos que haveria algum problema específico neste par de *primers*, desta forma optamos por seguir as etapas de desenvolvimento desta sonda mesmo sem a confirmação da sequência do *BAC* por PCR. Ao final do desenvolvimento da sonda deste clone, observamos na análise em microscopia de fluorescência que a marcação verde, utilizada para este clone, se apresentava em outro cromossomo que não o 11. Com o auxílio da ferramenta DAPI reverso, podemos observar que a sonda marcava um par de cromossomos do grupo B, aparentemente o braço longo do cromossomo 5 (Figura 8).

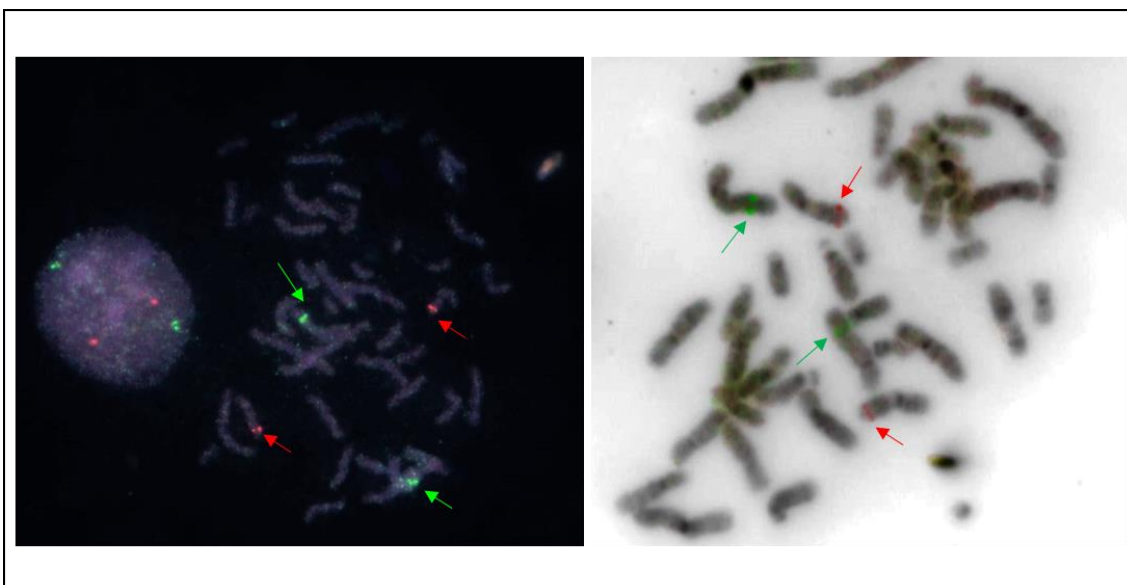


Figura 8- Imagens fotográficas em microscopia de fluorescência de sondas desenvolvidas a partir dos *BACs* RP11-414G21 e RP11-59N1. Legenda: Na metáfase da esquerda, apenas com os filtros laranja e verde, sem filtro DAPI, se pode observar a marcação da sonda vermelha no braço longo de um cromossomo do grupo C (flechas vermelhas), e a marcação verde (flechas verdes) em outro cromossomo. A direita, utilizando a ferramenta de DAPI reverso, se observa os cromossomos 11 com a marcação vermelha nos braços longos, e dois cromossomos do grupo B com a marcação em verde.

Ao verificarmos no sítio eletrônico da empresa, encontramos a informação de que 10% dos clones vendidos não correspondem às expectativas do consumidor. Acreditamos que de alguma forma o clone que escolhemos foi trocado por outro na própria empresa, devido a algum erro de identificação ou houve contaminação. Sendo assim, selecionamos outro clone, RP11-947D13, com outra sequência também compatível com a região de interesse. Para este clone todas as etapas de desenvolvimento ocorreram conforme o esperado.

Após o desenvolvimento das sondas utilizando o novo clone, foi realizado o processo de validação destas. Foram analisadas 20 interfases em amostras de 20 controles negativos (Figura 9), resultando em um total de 4.000 células. Deste total, 3.786 interfases apresentaram o padrão de sinais esperado, resultando em uma sensibilidade de 94,65%. A média de sinais esperados por núcleo foi de 189,3 (175 - 197).

Ainda analisamos nestas amostras 136 metáfases, as quais todas apresentaram, conforme o esperado, dois sinais verdes e dois sinais vermelhos na parte distal do braço longo do cromossomo 11. Sendo assim, a especificidade desta sonda resultou em 100%.

Das 4000 interfases analisadas, 3972 apresentaram hibridização, resultado assim em uma eficiência de 99,3%. Em média, das 200 interfases analisadas por amostra, 198,6 (193 - 200) hibridizaram.

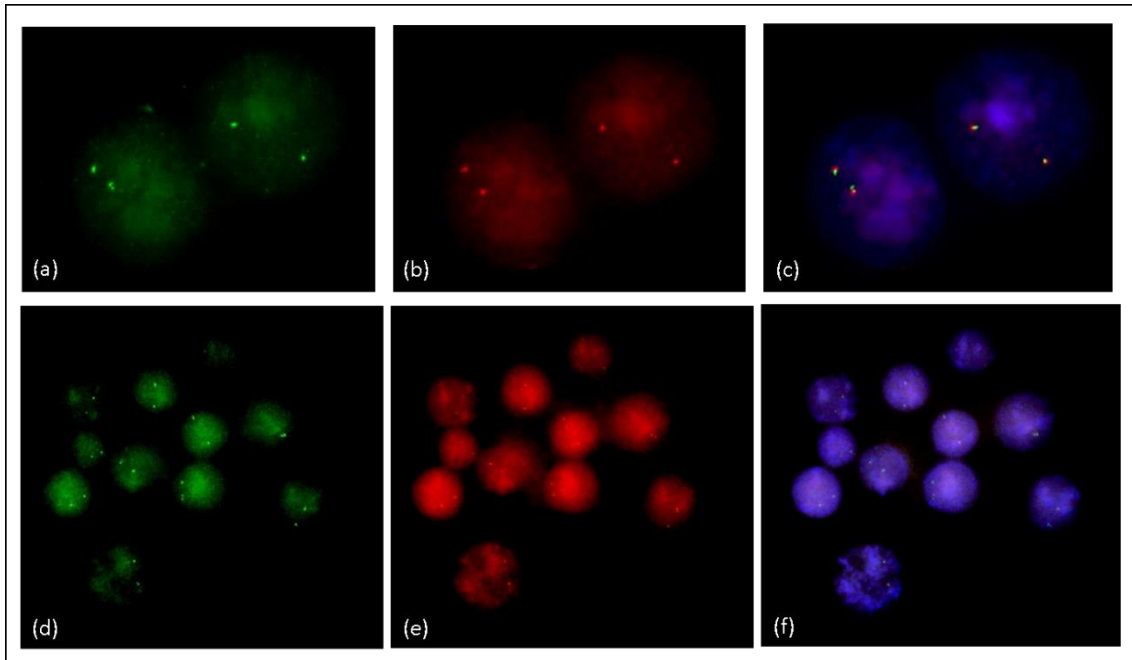


Figura 9- Imagens fotográficas das sondas para detecção de anomalias no gene *MLL* em núcleos interfásicos. Legenda: Núcleos hibridizados de amostra controle negativo com as sondas para investigação do gene *MLL*. (a, d) presença de dois sinais por núcleo utilizando o filtro verde. (b, e) presença de dois sinais por núcleo com o filtro laranja. (c, f) presença de dois sinais amarelos por núcleo no filtro triplo.

O registro pela ferramenta de DAPI reverso foi realizado para 23 metáfases (Figuras 10 e 11). Durante o período de desenvolvimento deste trabalho não tivemos acesso a nenhuma amostra com alteração confirmada no gene *MLL*. Desta forma, a sonda pode ser testada apenas em amostras controle negativas.

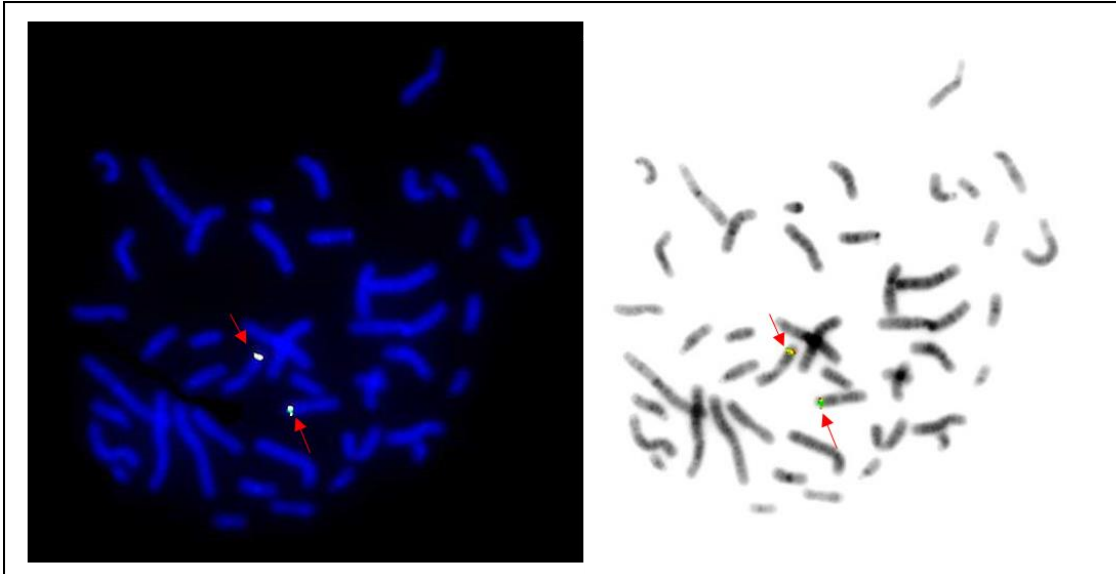


Figura 10- Imagens fotográficas de metáfase em microscopia de fluorescência utilizando as sondas para detecção de anomalias no gene *MLL*. Legenda: A esquerda, metáfase de controle negativo em filtro triplo, as setas vermelhas indicam a sobreposição das sondas vermelhas e verdes em amarelo, demonstrando a integridade da região do gene *MLL*. A direita, a mesma metáfase em DAPI invertido, pode-se observar que as sondas estão localizadas no braço longo do cromossomo 11.

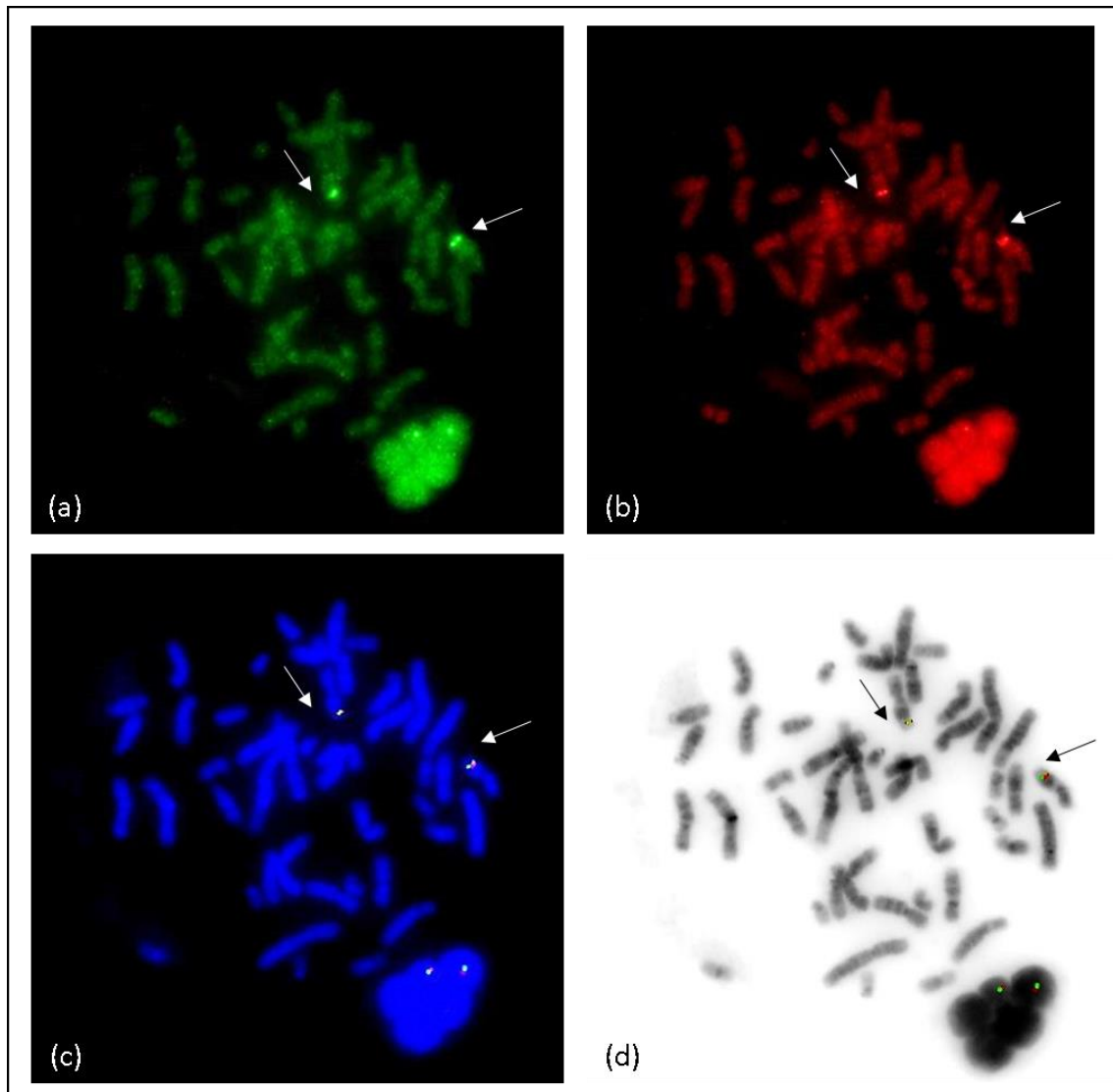


Figura 11- Imagens fotográficas de metáfase com as sondas para detecção de alterações no gene *MLL* em microscopia de fluorescência com a individualização dos filtros utilizados. Legenda: Metáfase hibridizada com as sondas para investigação do gene *MLL*. (a) filtro verde, flechas indicam ambos os cromossomos 11 marcados com a sonda desenvolvida a partir do clone RP11-947D13. (b) filtro laranja, flechas indicam ambos os cromossomos 11 marcados com a sonda desenvolvida a partir do clone RP11-414G21. (c) filtro triplo, sobreposição das sondas em amarelo em ambos os cromossomos 11. (d) DAPI invertido, demonstrando que as sondas hibridizaram nas regiões esperadas.

Posteriormente aos testes de validação que realizamos conseguimos, por meio da empresa Citogem, uma pequena amostra desta mesma sonda da fabricante Vysis. Desta forma foi possível compará-la com a sonda desenvolvida por nós. Com a quantidade doada foi possível hibridizar duas lâminas. Sendo assim, selecionamos duas amostras controle negativas que apresentaram bons índices mitóticos nos testes previamente realizados.

Foram feitas duas lâminas de cada amostra, em uma, foi utilizada a sonda desenvolvida *in house*, e na outra, a sonda comercial. Um integrante da equipe

que não participou do preparo e nem das contagens microscópicas cobriu com uma etiqueta a identificação destas lâminas para garantir que a análise fosse realizada de forma cega. O pré-tratamento, hibridização e pós-lavagem para todas as lâminas ocorreu da mesma forma e simultaneamente. As concentrações da sonda comercial utilizadas na hibridização foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante, enquanto que, para a sonda *in house* permanecemos com o usualmente realizado nos testes anteriores.

Dois analistas realizaram as avaliações microscópicas, onde foram avaliadas 200 interfases (Figura 12) por lâmina e um total de 33 metáfases (Figura 13). Das 400 interfases analisadas nas duas amostras onde se utilizou a sonda comercial, 384 apresentaram o padrão de sinais esperado, resultando em uma sensibilidade de 96%. Ainda nestas amostras, analisou-se 23 metáfases, onde todas apresentaram o padrão de sinais na localização cromossômica esperada. Desta forma, a especificidade resultou em 100%. Do total de interfases analisadas, apenas duas não apresentaram sinais de hibridização, resultando em uma eficiência de 99,5%.

Para a sonda desenvolvida *in house*, das 400 interfases avaliadas, 391 apresentaram o padrão de sinais esperado, resultando em uma sensibilidade de 97,7%. Nestas amostras analisamos 10 metáfases, todas apresentaram o padrão de sinais esperado, sendo assim a especificidade foi de 100%. Do total de interfases analisadas, todas apresentaram sinais de hibridização, resultando em uma eficiência de 100%.

Verificamos que, apesar de a sensibilidade, especificidade e eficiência entre ambas as sondas apresentarem valores muito similares, e a aparência do padrão e intensidade dos sinais ser bastante semelhante, as lâminas onde utilizamos a sonda comercial exibiram metáfases com os cromossomos mais íntegros, nítidos e sem citoplasma; e os núcleos tinham aspecto mais homogêneo. A sonda comercial possivelmente tenha algum reagente que proteja as células deixando o material com um aspecto mais homogêneo, não degradando as membranas celulares e nem o material genético, e/ou utilize reagentes de melhor qualidade que os nossos, ou, simplesmente possua uma qualidade melhor do que a nossa neste momento. Desta forma, acreditamos que na sonda que desenvolvemos possa ser adicionado algum reagente que proteja a morfologia cromossômica e celular, ou ainda, nos reagentes que utilizamos,

algum deles poderia estar afetando a qualidade das células. Cabe aqui esclarecer que as amostras hibridizadas com a sonda *in house* também apresentaram interfases e metáfases com aspecto homogêneo e cromossomos íntegros, todavia ao compararmos com as amostras hibridizadas com a sonda comercial, observamos um maior índice de células com aspecto ideal de análise nestas.

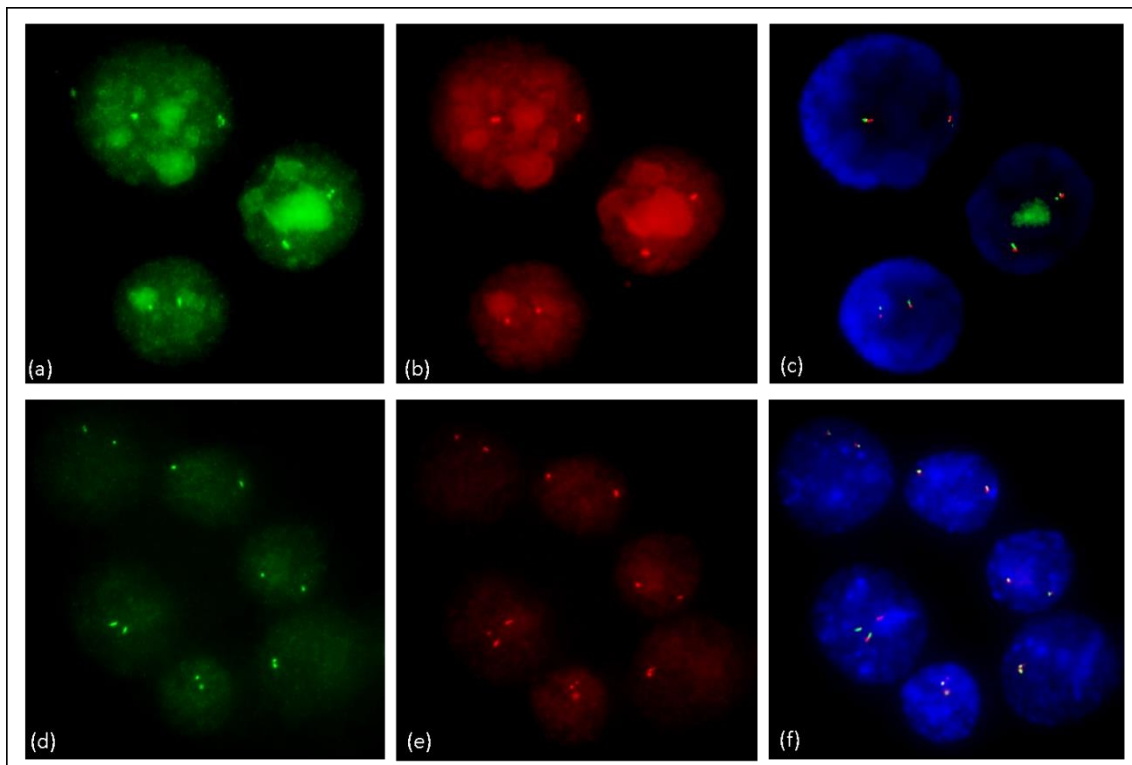


Figura 12- Comparação de interfases hibridizadas com a sonda *in house* e sonda comercial. Legenda: Interfases hibridizadas com as sondas para investigação do gene *MLL*, observadas em filtro verde, laranja e triplo, respectivamente. (a-c) Interfases hibridizada com sonda desenvolvida *in house*. (d-f) Interfases hibridizada com sonda comercial.

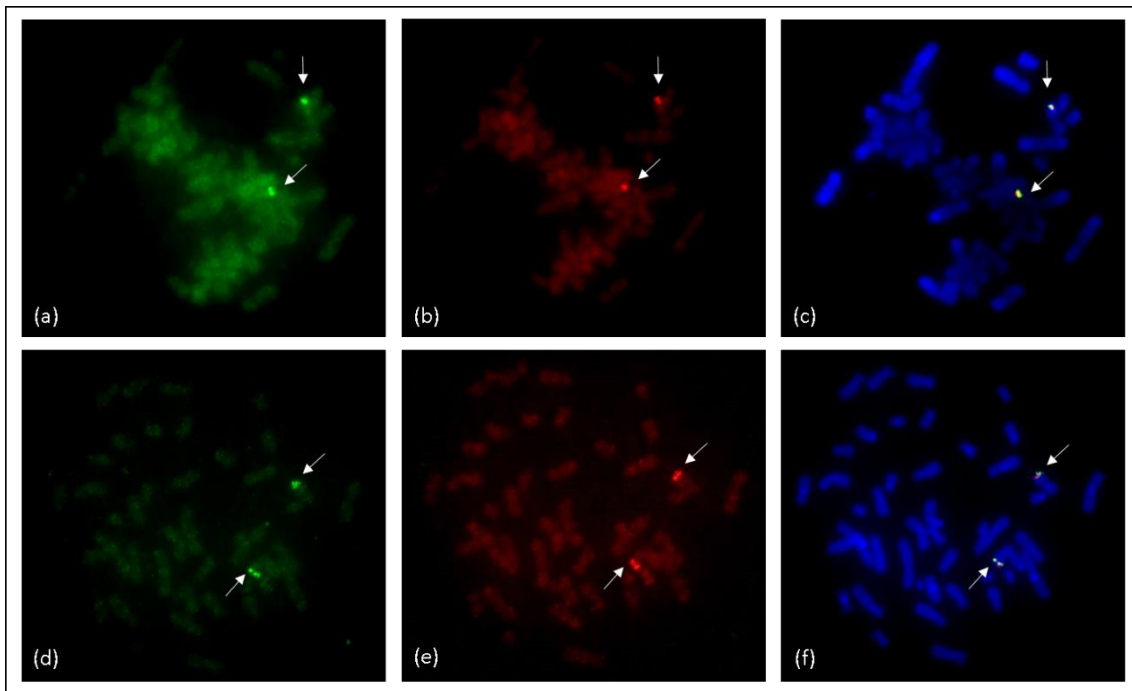


Figura 13- Comparação de metáfases hibridizadas com a sonda *in house* e sonda comercial. Legenda: Metáfases hibridizadas com as sondas para investigação do gene *MLL*, observadas em filtro verde, laranja e triplo, respectivamente. Nas fotos as flechas indicam a localização dos sinais. (a-c) Metáfase hibridizada com sonda *in house*. (d-f) Metáfase hibridizada com sonda comercial.

5.3 Sonda *BCR-ABL1*

No decorrer do desenvolvimento das sondas para detecção da fusão *BCR-ABL1* foram necessárias diversas execuções das etapas até que o material se tornasse adequado para as análises (Anexo 5.3.1). Todavia, quando iniciamos as primeiras análises em microscopia de fluorescência, além dos sinais que esperávamos, detectamos inúmeros outros sinais inespecíficos. Estes advinham da sonda desenvolvida para a identificação do gene *BCR*, marcada com o fluorocromo verde. Os sinais inespecíficos apresentavam-se de forma mais evidente nas interfases (Figura 14) e não tanto nas metáfases (Figura 15).

5.3.1- Tabela de execuções dos protocolos de desenvolvimento das sondas de FISH- *BCR-ABL1*.

	Cultivo dos <i>BACs</i>	Extração do DNA dos <i>BACs</i>	REPLI-g	<i>Nick-translation</i>	Purificação	Hibridização
Execução 1	25/01/16	03/02/16 ¹	07/03/16	03/05/16		
Execução 2				02/01/17	03/01/17	04/01/17 ²
Execução 3						11/01/17 ³
Execução 4						18/01/17 ⁴
Execução 5	02/05/17	04/05/17	05/05/17	09/05/17 ⁵		
Execução 6				10/05/17	11/05/17	12/05/17 ⁶
Execução 7						18/05/17 ⁶
Execução 8				23/05/17 ⁷	25/05/17	26/05/17 ⁸
Execução 9				12/06/17	13/06/17	05/07/17 ⁹
Execução 10	10/07/17 ¹⁰	25/07/17	26/07/17	27/07/17	28/07/17	31/07/17
Execução 11				10/08/17	11/08/17	12/08/17 ¹¹
Execução 12						15/08/17 ¹¹
Execução 13				24/08/17	25/08/17	26/08/17 ¹²
Execução 14				28/08/17	29/09/17	29/08/17 ¹³
Execução 15				04/09/17	05/09/17	06/09/17 ¹⁴
Execução 16						10/09/17 ¹⁴
Execução 17				12/09/17	13/09/17	14/09/17 ¹⁵
Execução 18			18/09/17 ¹⁶	25/09/17	26/09/17	26/09/17 ¹⁷
Execução 19				09/10/17	10/10/17	11/10/17 ¹⁸
Execução 20				18/10/17	19/10/17 ¹⁹	19/10/17 ²⁰
Execução 21					23/10/17 ²¹	24/10/17 ²²
Execução 22				30/10/17 ²³	31/10/17	31/10/17 ²⁴
Execução 23				07/11/17	08/11/17 ²⁵	08/11/17 ²⁶

Legenda: (1) dificuldades na verificação do gel pós-PCR (muito DNA); (2) sinais adequados, muito background; (3) sinais adequados, sem background, sinais de umidade, material desmanchando; (4) material desmanchando na região da lamínula; (5) curva *Nick-translation* para determinação do melhor tempo para a reação; (6) sinais adequados, marcação some rápido; (7) teste com maior quantidade de fluorocromo na reação; (8) sinais adequados; (9) ausência de sinais; (10) toda execução desenvolvida pelas alunas de TCC; (11) início das análises nos controles negativos, detecção de sinais inespecíficos; (12) hibridização incorreta, sondas trocadas; (13) estufa estragou, hibridização a 28°C, lâminas manchadas, material degradado; (14) sinais inespecíficos; (15) teste de redução do tempo de hibridização, permanências dos

sinais inespecíficos, ausência dos sinais vermelhos; (16) novo kit de Repli-g; (17) permanências dos sinais inespecíficos; (18) verificação de que os sinais inespecíficos aparecem sempre nos mesmos cromossomos; (19) aumento da quantidade de Cot-1 (15 μ L) na purificação da sonda; (20) lâminas com mix de sonda convencional e outro com menos sonda verde, ainda aparecem os sinais inespecíficos em todas as lâminas; (21) aumento da quantidade de Cot-1 (20 μ L) na purificação da sonda; (22) teste com dois mix de sonda com diferentes concentrações da sonda verde (1,5 μ L e 0,5 μ L), sem alterações significativas na redução dos sinais inespecíficos, o aumento do Cot-1 parece ter reduzido parcialmente os sinais inespecíficos; (23) sinal de fluorescência invertido – gene *ABL1* marcado com fluorescência verde e gene *BCR* marcado com fluorescência vermelha; (24) marcação inespecífica em vermelho; (25) purificação com 20 μ L de Cot-1; (26) permanência das marcações inespecíficas.

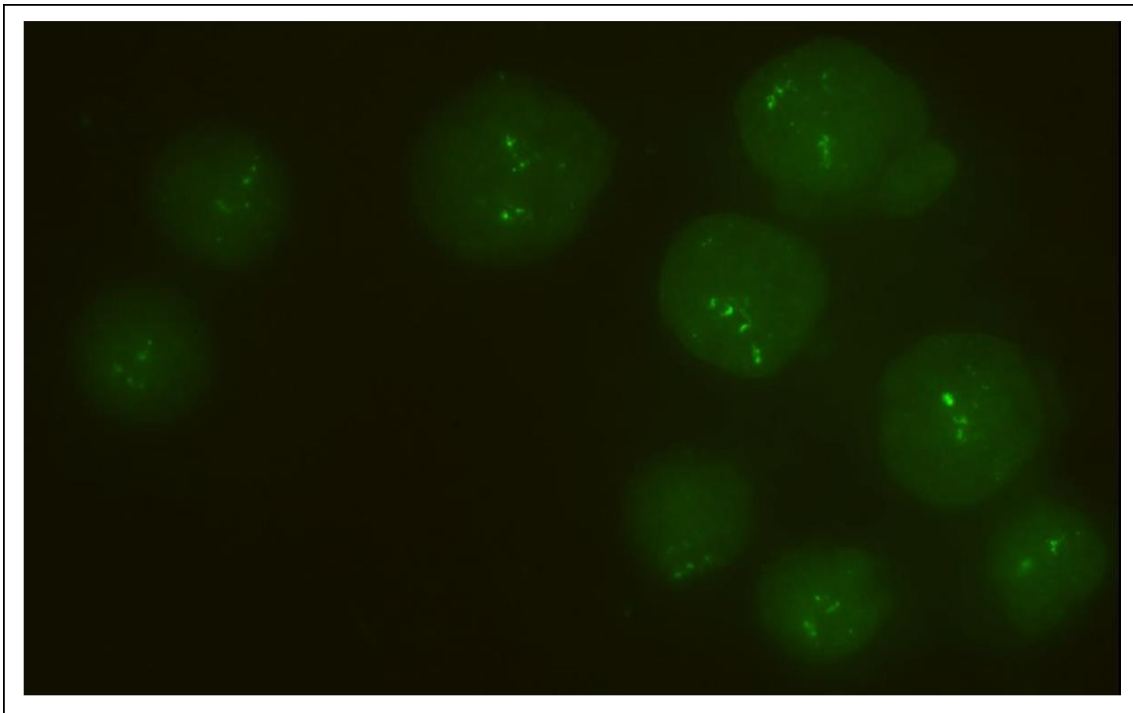


Figura 14- Interfases hibridizadas com as sondas *BCR-ABL1*. Legenda: Interfases observadas em filtro verde, hibridizadas com as sondas para detecção da fusão dos genes *BCR-ABL1*, nota-se a presença de vários sinais inespecíficos.

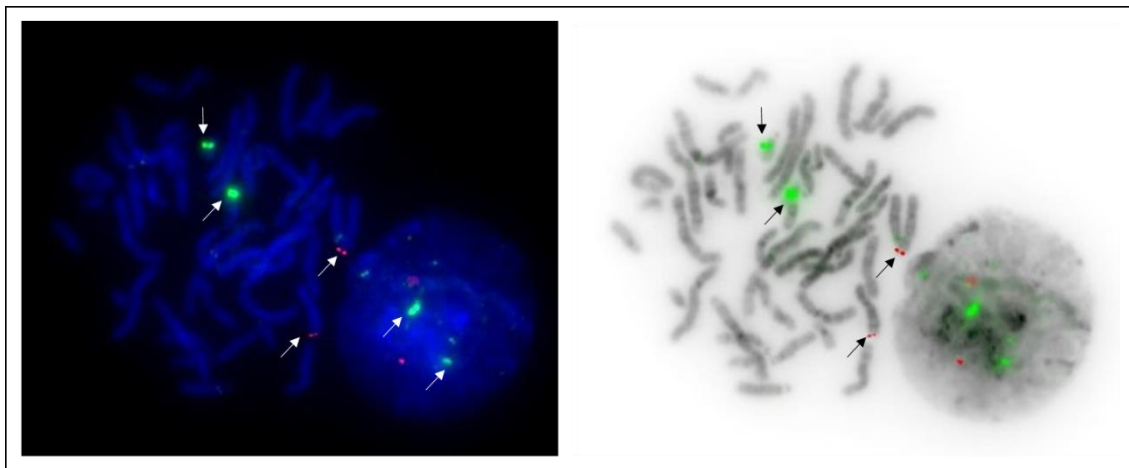


Figura 15- Metáfase e interfase hibridizadas com as sondas *BCR-ABL1*. Legenda: A foto da esquerda foi realizada em filtro triplo, a da direita, a mesma imagem em DAPI reverso. Nas metáfases, as flechas indicam, em verde os cromossomos 22, e em vermelho os cromossomos 9. Na interfase (a esquerda) as flechas indicam dois sinais verdes maiores, compatíveis com os cromossomos 22, ainda se pode observar em verde outros sinais menores inespecíficos.

Assim, as etapas de desenvolvimento desta sonda foram refeitas várias vezes, testando diferentes fatores, com o objetivo de suprimir estes sinais inespecíficos (Anexo 5.3.1). No decorrer das etapas de desenvolvimento criamos hipóteses para tentar compreender o porquê do aparecimento destes sinais, buscando soluções e as testamos. Uma das hipóteses para o surgimento dos sinais inespecíficos seria o excesso de DNA deste clone na sonda, logo buscamos reduzir a quantidade desta sonda na lâmina. Testamos também, o incremento da quantidade de *COT-1* no processo de precipitação, este reagente é responsável por bloquear as sequências repetitivas.

De acordo com os protocolos que utilizamos para o desenvolvimento das sondas *homebrew*, ao final das etapas de cultivo dos *BACs*, extração de DNA e amplificação do DNA (*Repli-g*); haviam pontos de checagem, para a confirmação das sequências, quantificação do DNA extraído e quantificação do DNA amplificado, respectivamente. Desta forma, sabíamos que a etapa realizada havia decorrido conforme o esperado. Quando nas análises microscópicas verificávamos que a hibridização se mostrava inadequada, buscamos fazer alterações nas etapas de purificação; e ao não ter o resultado esperado, partíamos para as alterações na etapa de *Nick-translation*. Sendo assim, buscamos repetir ou alterar uma etapa anterior no desenvolvimento das sondas,

se todas as tentativas não dessem certo, iniciávamos as mudanças e repetições em uma etapa anterior, neste caso o *Repli-g*.

Além das hipóteses citadas, outros fatores também podem interferir na qualidade e funcionamento das sondas, como, o tempo decorrido de armazenamento dos DNAs, período e quantidade de vezes em que as soluções e kits foram utilizados, devido principalmente a alterações de temperatura. Durante o desenvolvimento deste estudo, muitas vezes trabalhamos com mais de um conjunto de sondas por vez, desta forma quando apenas um tipo de sonda não apresentava o funcionamento adequado, suspeitávamos que o problema era específico daquela sonda, e não dos reagentes e kits utilizados. Por outro lado, quando em um conjunto de lâminas com diferentes sondas não apresentavam os sinais esperados, sabíamos que o problema era devido a algum fator que foi comum a todas as amostras.

No processo de testagem para a melhoria desta sonda, passamos a observar que os sinais inespecíficos pareciam estar presentes sempre nos mesmos cromossomos; 1, 2 e 13 (figura 16).

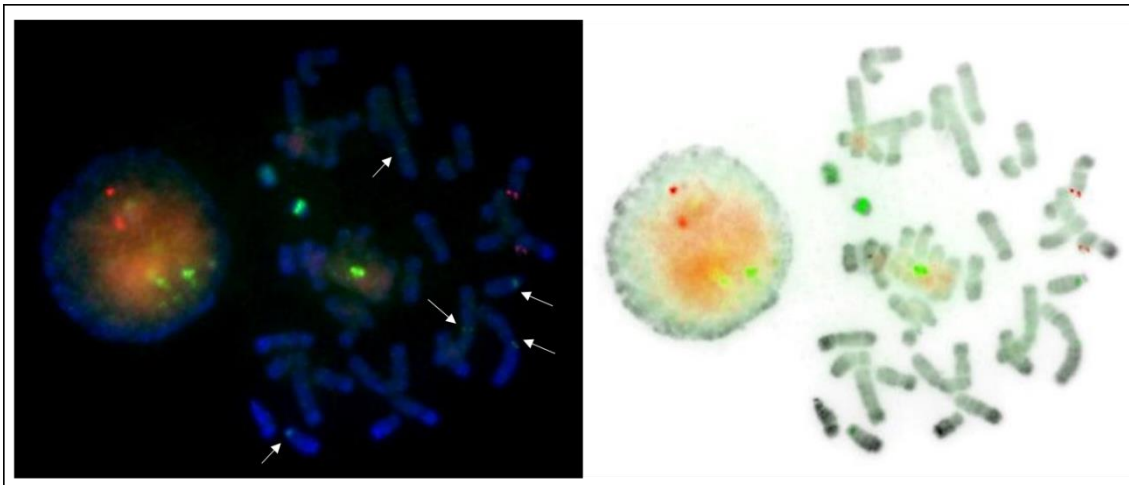


Figura 16- Presença de sinais inespecíficos com as sondas *BCR-ABL1*. Legenda: A foto a esquerda apresenta-se em filtro triplo, a direita, a mesma imagem em DAPI reverso. Nas metáfases, as flechas indicam a marcação inespecífica nos cromossomos 1, 2 e 13.

Passamos a suspeitar então que a marcação inespecífica advinha de uma inadequação do *BAC* utilizado, RP11 806D22, o qual além de ser complementar a região 22q11.22, também parecia ser complementar a outras regiões de outros cromossomos. Com o intuito de testar esta hipótese, utilizamos a ferramenta

BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), que busca por regiões de similaridade entre sequências de nucleotídeos ou proteínas, e calcula a significância estatística das possíveis combinações encontradas, disponível no portal do NCBI [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/]. Ao utilizarmos a ferramenta para a sequência do clone RP11 806D22, obtivemos como resultado uma similaridade entre a sequência de nucleotídeos do cromossomo 22, e regiões dos cromossomos 1, 2 e 13, conforme a figura 17.

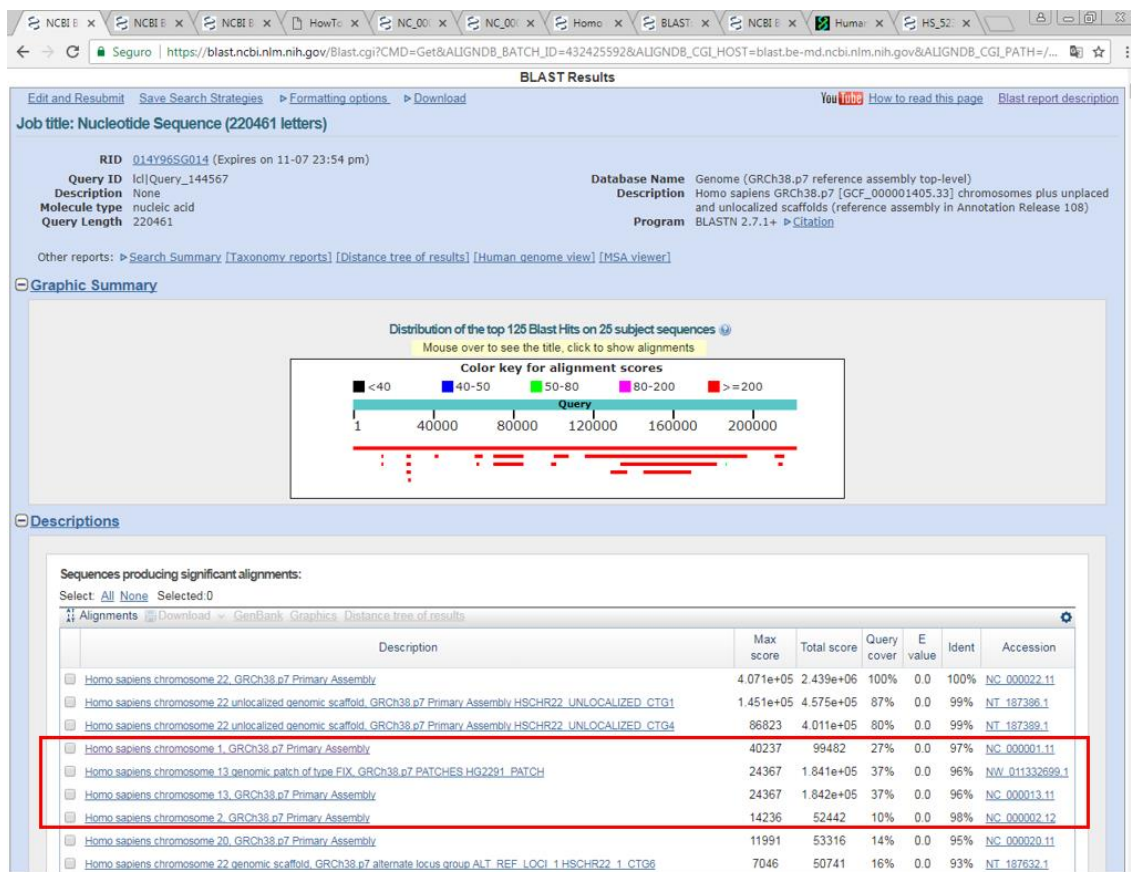


Figura 17- Resultados da ferramenta *BLAST* para a sequência de nucleotídeos do clone RP11 806D22. Legenda: o retângulo vermelho indica a similaridade entre a sequência pesquisada e regiões dos cromossomos 1, 13 e 2. O valor *query cover* representa a taxa de similaridade entre estas sequências e a sequência investigada.

Com base nestes achados, acreditamos que durante o processo de escolha dos clones para o desenvolvimento das sondas *in house*, deveria ser incluída uma etapa de verificação das sequências com a ferramenta *BLAST*, etapa que não constava em nossos protocolos originais. Desta forma a escolha dos clones seria mais acertada, evitando gastos e trabalho desnecessários. Devido ao término dos recursos para o desenvolvimento deste projeto, não foi possível adquirir outro clone para substituir o RP11 806D22.

Apesar das intercorrências com um dos clones escolhidos para este conjunto de sondas, ao testarmos as sondas em amostras de controles positivos, *Philadelphia* positivos, observamos nas metáfases analisadas a presença do padrão de sinais esperado; um sinal vermelho, um sinal verde e um sinal amarelo indicativo da fusão dos genes *BCR-ABL1* (Figura 18). Mesmo detectando o padrão de sinais esperado nos controles positivos, não foi possível realizar os testes de validação para este conjunto de sondas devido aos sinais inespecíficos detectados.

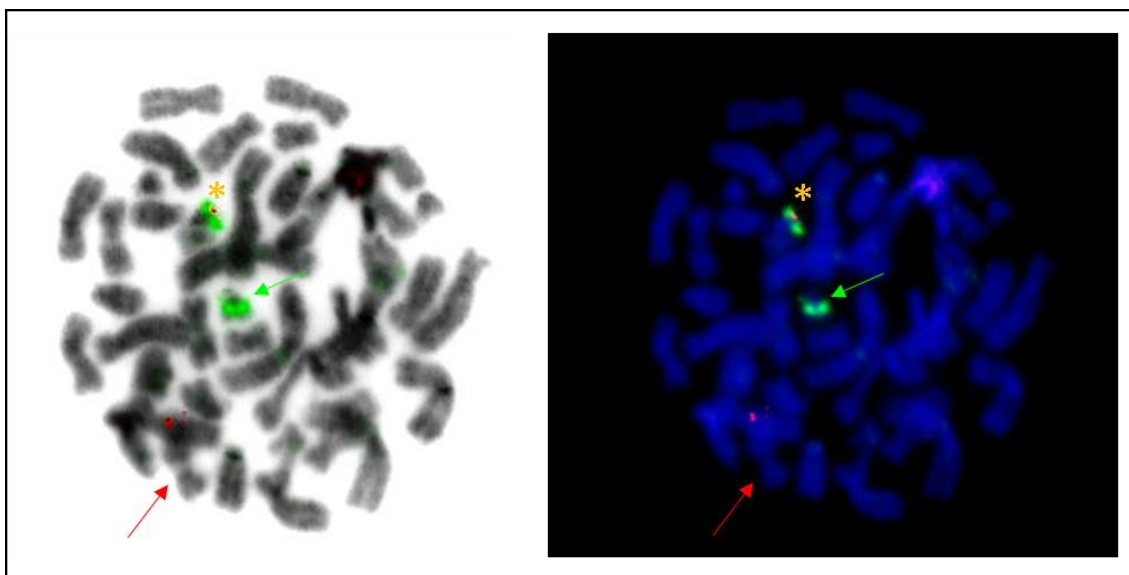


Figura 18- Padrão de sinais encontrados em amostra controle positiva para fusão dos genes *BCR-ABL1*. Legenda: a metáfase a esquerda é observada com a ferramenta DAPI reverso, a direita, a mesma imagem em filtro triplo. As flechas vermelhas indicam o cromossomo 9, as verdes, o cromossomo 22, e o asterisco indica o cromossomo Philadelphia, onde é possível observar a fusão das duas sondas.

5.4 Contratempos além da bancada

Além das etapas inesperadas já relatadas aqui inerentes ao processo de implementação das técnicas, no decorrer deste trabalho ocorreram imprevistos que dificultaram, e em alguns momentos atrasaram o cronograma de trabalho previsto. Estes imprevistos foram relacionados a diversos fatores, os quais os mais significativos serão relatados brevemente.

O cronograma proposto no projeto contava com a liberação de recursos ainda no ano de 2013. A primeira liberação dos recursos (R\$ 74.972,50) aconteceu em janeiro de 2014, sendo que, conforme orientação da agência, imediatamente adquirimos os bens de capital. Assim, restaram R\$ 34.472,50 desta primeira liberação. Porém, no orçamento para a compra somente dos kits

de *Nick-translation* seriam necessários R\$ 37.920,00. Ou seja, somente foi possível adquirir reagentes quando aconteceu a segunda liberação de recursos. Não seria prudente comprar apenas parte dos reagentes e deixá-los estocados sob risco de perder prazo de validade. Assim, a compra dos reagentes somente pode acontecer a partir da liberação de todo o valor contemplado, que aconteceu em fevereiro do ano de 2015.

Adquirimos então um lote de reagentes suficiente para a implementação dos procedimentos laboratoriais, sendo que optamos por iniciar pela manufatura da sonda para a deleção 22q.11.2. Foram comprados todos os *BACs*, reagentes e kits necessários para o desenvolvimento de uma das sondas para FISH previstas (22q.11.2). Como diversos reagentes são importados e os fornecedores não os têm em estoque, pois são raríssimos laboratórios brasileiros que manufaturam sondas de DNA, recebemos todos os insumos necessários para trabalhar somente em meados de julho de 2015.

Começamos, então, a desenvolver a primeira sonda, porém somente o fluorocromo verde foi observado. Não foi possível visualizar o fluorocromo vermelho, mesmo adequando procedimentos laboratoriais e utilizando outros microscópios de fluorescência. Para testar se o problema era com a sonda que produzimos ou com o fluorocromo, invertemos a marcação. Marcamos o clone da região controle de vermelho e o clone da região crítica de verde. Mesmo alterando a marcação, não observamos a marcação vermelha, apenas a verde novamente. Este primeiro kit de *Nick-translation* que adquirimos pertencia a marca Jena Bioscience, diferente da indicada nos protocolos que tínhamos. No momento da compra dos reagentes a marca utilizada nos protocolos ainda não estava sendo comercializada no Brasil, desta forma precisamos adquirir esta outra. Mesmo sem o funcionamento adequado de um dos fluorocromos podemos verificar que o desenvolvimento das sondas estava ocorrendo de acordo com o desejado, já que conseguimos visualizar as sondas marcando os *loci* definidos para o cromossomo 22.

Em outubro de 2015 realizamos a compra dos reagentes necessários para a manufatura das outras sondas e conseguimos adquirir o kit de *Nick-translation* da marca Abbott que estava começando a ser importado para o Brasil. Este kit era o indicado nos protocolos obtidos a partir da Profa. Marileila Varella-Garcia. Ao final do mês de janeiro de 2016 recebemos este kit de *Nick-translation*. Além

do que já foi descrito, ocorreram outros imprevistos que são apresentados no quadro 2.

5.5 Atividades complementares desenvolvidas

No decorrer deste trabalho tivemos muitos períodos sem atividades de bancada devido aos vários fatores que aqui foram relatados, estes períodos foram utilizados principalmente para o desenvolvimento e escrita de artigos científicos. Ao longo deste trabalho de doutorado, foram publicados 8 artigos científicos.

Também fizeram parte das atividades desenvolvidas neste período os orçamentos e compra de reagentes, atuação na documentação para a prestação de contas deste projeto, cooperação na elaboração de projetos para os editais INCT-MCTI/CNPq/CAPES/FAPs nº 16/2014, edital MS-SCTIE-Decit/CNPq nº 12/2018. Orientação e coorientação de trabalhos de conclusão de curso, apoio e treinamento de bolsistas de extensão e iniciação científica. Além de atividades de docência com aulas e seminários em disciplinas da graduação e pós-graduação, e minicurso de Citogenética no Congresso Brasileiro de Genética Médica.

Quadro 2- Principais imprevistos ocorridos durante o trabalho.

Imprevisto	Período	Consequências	Desfecho
Atraso na liberação segunda parcela da verba (Primeira parcela recebida em janeiro de 2014 utilizada para aquisição dos equipamentos).	Julho 2014- Janeiro 2015	Adiamento da compra dos reagentes. Experimentos não puderam iniciar.	Verba recebida em fevereiro de 2015, de imediato foram feitos os orçamentos e compras dos reagentes.
Atraso de entrega de reagentes importados.	Fevereiro 2015- Agosto 2015	Experimentos não puderam iniciar sem todos os reagentes necessários.	Experimentos iniciaram assim que os reagentes foram recebidos.
Fluorescência vermelha não foi visualizada no primeiro <i>kit Nick-translation</i> adquirido. No momento da compra só havia disponível o kit da marca Jena Bioscience.	Setembro 2015	Durante a realização da sonda de deleção 22q foi possível confirmar que as duas sequencias utilizadas estavam adequadas. Ambas marcaram com o fluorocromo verde e nenhuma com o vermelho.	Se conseguiu solicitar a compra de dois kits da marca Abbott.
Kits <i>Nick-translation</i> recebidos sem refrigeração adequada no transporte.	Janeiro 2016	Ambas fluorescências não foram observadas nas amostras testadas. Experimentos de FISH suspensos.	Solicitada a troca dos kits, os quais foram recebidos apenas em agosto de 2016.
Falta de luz na universidade por 3 dias devido a temporal.	Fevereiro 2016	Alteração das temperaturas dos reagentes armazenados nas geladeiras, freezers e freezer -80°C. Consequências desconhecidas na eficiência dos reagentes.	Após retorno da luz, os reagentes foram armazenados adequadamente.
Aquisição de microscópio de fluorescência novo.	Mai 2016	Adaptação ao novo sistema de captura e softwares.	Treinamentos em setembro e novembro de 2016 e maio de 2017.
Filtro triplo inadequado no microscópio novo.	Setembro 2017	Dificuldades na análise das amostras. Muitas tentativas de melhorar a qualidade das lâminas antes de verificar que o filtro estava trocado.	Solicitação da troca do filtro.

Artigos desenvolvidos

The role of cytogenetics and molecular biology in the diagnosis, treatment and monitoring of patients with chronic myeloid leukemia

O papel da citogenética e da biologia molecular no diagnóstico, no tratamento e no monitoramento de pacientes com leucemia mieloide crônica

Luiza Emy Dorfman¹; Maíara A. Floriani¹; Tyana Mara R. D. R. Oliveira¹; Bibiana Cunegatto¹; Rafael Fabiano M. Rosa^{1,2}; Paulo Ricardo G. Zen^{1,2}

1. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA), Rio Grande do Sul, Brazil.

2. Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre (CHSCPA), Rio Grande do Sul, Brazil.

ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia (CML) is the most common myeloproliferative disorder among chronic neoplasms. The history of this disease joins with the development of cytogenetic analysis techniques in human. CML was the first cancer to be associated with a recurrent chromosomal alteration, a reciprocal translocation between the long arms of chromosomes 9 and 22 – Philadelphia chromosome. This work is an updated review on CML, which highlights the importance of cytogenetics analysis in the continuous monitoring and therapeutic orientation of this disease. The search for scientific articles was carried out in the PubMed electronic database, using the descriptors “leukemia”, “chronic myeloid leukemia”, “treatment”, “diagnosis”, “karyotype” and “cytogenetics”. Specialized books and websites were also included. Detailed cytogenetic and molecular monitoring can assist in choosing the most effective drug for each patient, optimizing the treatment. Cytogenetics plays a key role in the detection of chromosomal abnormalities associated with malignancies, as well as the characterization of new alterations that allow more research and increase knowledge about the genetic aspects of these diseases. The development of new drugs, through the understanding of the molecular mechanisms involved, will allow a possible improvement in the survival of these patients.

Key words: BCR-ABL positive chronic myeloid leukemia; leukemia; cytogenetics; karyotype; Philadelphia chromosome; therapeutics.

INTRODUCTION

Chronic myeloid leukemia (CML) is a rare type of neoplasia, with incidence of 1-2 cases per 100,000 individuals annually. CML is the most common chronic myeloproliferative neoplasms, representing 0.5% of all new cancer cases in the United States⁽¹⁾. This represents 15% of all leukemia in adults and is more common in men than women (1.3-1.7 compared to 1.0)⁽²⁾. The National Institutes of Health (NIH) estimates that, in 2017, there will be 8,950 new cases of CML and approximately 1,080 people will die from this disease^(1, 3). CML is most frequently diagnosed among individuals with 40-60 years of age, with mean age of 53 years and only 10% of patients are diagnosed with less than 20 years of age^(2, 4).

CML is characterized by clonal expansion of hematopoietic progenitor cells, resulting in increased circulating cells of granulocytic lineage. The characteristic symptoms of this disease are chronic fatigue, weight loss, bleeding and fever; whereas signals are anemia, granulocytosis, and immature granulocytes, presence of basophils, thrombocytosis and splenomegaly⁽³⁾.

The first treatments for CML provided a significant improvement in the quality of life at the chronic phase disease. For several years, the only treatment available for patients was hematopoietic stem cells transplantation⁽⁵⁾. The development of cytogenetic research involving the Philadelphia chromosome and molecular alterations enabled the emergence of a new perspective for the CML treatment, making it more accurate and effective. The aim of this article is an updated review about CML, highlighting



Research paper

The rs2292239 polymorphism in *ERBB3* gene is associated with risk for type 1 diabetes mellitus in a Brazilian population

Natália Emerim Lemos^{a,b,1}, Cristine Dieter^{a,b,1}, Luiza Emy Dorfman^c, Taís Silveira Assmann^{a,b},
Guilherme Coutinho Kullmann Duarte^{a,b}, Luis Henrique Canani^{a,b}, Andrea Carla Bauer^{a,b},
Daisy Crispim^{a,b,*}

^a Endocrine Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Post-graduation Program in Medical Sciences: Endocrinology, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^c Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

Type 1 diabetes mellitus
DNA polymorphisms
ERBB3 gene

ABSTRACT

The Erb-b2 receptor tyrosine kinase 3 (*ERBB3*) belongs to a family of epidermal growth factor receptors of protein tyrosine kinases, and regulates cell survival, differentiation and proliferation in several cell types. Previous studies have suggested that *ERBB3* contributes to T1DM pathogenesis by modulating antigen presenting cell function, autoimmunity and cytokine-induced beta-cell apoptosis. Accordingly, some genome-wide association studies identified *ERBB3* gene as a susceptibility locus for T1DM, with the strongest association signal being observed for the rs2292239 single nucleotide polymorphism (SNP) in intron 7 of the gene. Therefore, the aim of the present study was to replicate the association of the *ERBB3* rs2292239 SNP with T1DM in a Brazilian population. We analyzed 421 T1DM patients (cases) and 510 nondiabetic subjects (controls). All subjects were self-declared as white. The *ERBB3* rs2292239 (A/C) SNP was genotyped by real-time PCR using TaqMan MGB probes. Genotype ($P = 0.001$) and allele ($P = 0.002$) frequencies of the *ERBB3* rs2292239 SNP were differently distributed between T1DM patients and nondiabetic controls. Moreover, the A allele was significantly associated with risk for T1DM when considering recessive (OR = 1.58, 95% CI 1.11–2.27; $P = 0.015$), additive (OR = 1.78, 95% CI 1.21–2.62; $P = 0.004$), and dominant (OR = 1.39, 95% CI 1.07–1.81; $P = 0.016$) models of inheritance. However, after adjustment for presence of high-risk *HLA DR/DQ* genotypes, the rs2292239 SNP remained independently associated with T1DM only for the additive model (OR = 1.62, 95% CI 1.02–2.59; $P = 0.043$). Our results suggest that the A/A genotype of the *ERBB3* rs2292239 SNP is associated with risk for T1DM in a white Brazilian population.

1. Introduction

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is caused by autoimmune destruction of pancreatic beta-cells by T lymphocytes and macrophages, which renders affected subjects insulin-dependent for life (van Belle et al., 2011; American Diabetes Association, 2015). The disease probably arises from a complex interaction among several genetic and environmental risk factors (van Belle et al., 2011). The major susceptibility locus maps to the *HLA* class II region at chromosome 6p21, and

accounts for up to 30–50% of the genetic risk for T1DM (Steck and Rewers, 2011; Noble, 2015). Although polymorphisms in other 60 genes have minor effects on T1DM risk compared to *HLA* loci, the combination of *HLA* haplotypes and non-*HLA* polymorphisms has been shown to improve disease prediction (Winkler et al., 2014; Pociot and Lernmark, 2016). Thus, the identification of non-*HLA* polymorphisms associated with T1DM might aid the prediction of this disease (Steck et al., 2014).

In this context, recent genome-wide association studies (GWAS)

Abbreviations: T1DM, type 1 diabetes mellitus; HLA, human leukocyte antigen; GWAS, genome-wide association study; *ERBB3*, Erb-b2 receptor tyrosine kinase 3; SNP, single nucleotide polymorphism; EGFR, epidermal growth factor receptor; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; Akt, Protein kinase B; APCs, antigen-presenting cells; HbA1c, glycated hemoglobin; PCR, Polymerase chain reaction; HWE, Hardy–Weinberg equilibrium; DKD, diabetes kidney disease; DR, diabetic retinopathy; GLIS3, GLIS family zinc finger 3; PTPN22, protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22; INS, insulin; IL2RA, interleukin 2 receptor subunit alpha; ORMDL3, ORMDL sphingolipid biosynthesis regulator 3; BACH2, BTB domain and CNC homolog 2; IL27, interleukin 27; RNLS, renalase, FAD-dependent amine oxidase; PBMC, peripheral blood mononuclear cell

* Corresponding author at: Rua Ramiro Barcelos 2350, prédio 12, 4º andar, 90035-003 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

E-mail address: dcmoreira@hcpa.edu.br (D. Crispim).

¹ They contributed equally to this study.

<https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.11.009>

Received 22 August 2017; Received in revised form 30 October 2017; Accepted 2 November 2017

Available online 03 November 2017

0378-1119/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Short stature, unusual face, delta phalanx, and abnormal vertebrae and ribs in a girl born to half-siblings

Robert Pogue¹ | Felipe A. Marques^{1,2,3,4} | Cristiane Kopacek⁵ |
Rosana C. M. Rosa⁶ | Luiza E. Dorfman^{6,7} | Juliana F. Mazzeu⁸ |
José A. M. Flores⁹ | Paulo R. G. Zen^{6,10,11} | Rafael F. M. Rosa^{6,10,11,12}

¹ Graduate Program in Genomic Sciences and Biotechnology, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brazil

² Biotechnology Laboratory, Universidade CEUMA, São Luis, MA, Brazil

³ Department of Biomedicine, Universidade CEUMA, São Luis, MA, Brazil

⁴ Department of Pharmacy, Universidade CEUMA, São Luis, MA, Brazil

⁵ Department of Pediatric Endocrinology, Hospital Materno Infantil Presidente Vargas (HMIPV), Porto Alegre, RS, Brazil

⁶ Graduate Program in Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil

⁷ Department of Biomedicine, Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), São Leopoldo, RS, Brazil

⁸ Graduate Program in Medical Sciences, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

⁹ Department of Pediatric Radiology, Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA), Porto Alegre, RS, Brazil

¹⁰ Graduate Program in Biosciences, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil

¹¹ Department of Clinical Genetics, UFCSPA and Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre (CHSCPA), Porto Alegre, RS, Brazil

¹² Department of Clinical Genetics, HMIPV, Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence

Prof. Rafael F. M. Rosa, M.D., Ph.D., Genética Clínica, UFCSPA/CHSCPA, Rua Sarmento Leite, 245/403, CEP: 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil. Email: rfmrosa@gmail.com

Funding information

The Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF), Grant number: 564537/2010

Delta phalanx is a rare abnormality typically associated with additional features. We describe a patient with a phenotype resembling Catel-Manzke syndrome, but with delta phalanx and abnormal vertebrae and ribs. The patient was the only child of half siblings born with a marked prenatal growth deficiency. At 10 years of age, she had a short stature, long face, long and tubular nose with small alae nasi, high palate, short and broad thorax, and short index fingers with radial deviation. There were hyperpigmentations following Blaschko's lines. Radiology showed a proximal delta phalanx in the index finger of hands, abnormal vertebrae, and fused and small ribs. GTG-Banding karyotype and microarray analysis yielded normal results. Exome sequencing identified 25 genes that harbored homozygous variants, but none of these is assumed to be a good candidate to explain (part of) the phenotype. The here described patient may have a new condition, possibly following an autosomal recessive pattern of inheritance, although due to the high degree of consanguinity a compound etiology of the phenotype by variants in various genes may be present as well.

KEYWORDS

abnormal ribs, abnormal vertebrae, autosomal recessive, consanguinity, delta phalanx, short stature

Robert Pogue and Felipe A. Marques contributed equally to the development of the manuscript.

Report of a patient with fragile X syndrome unexpectedly identified by karyotype analysis

Relato de um paciente com a síndrome do X frágil identificada de forma inesperada por meio do cariótipo

Maiara A. Floriani¹; Marcelo R. Vilas Boas¹; Rafael Fabiano M. Rosa^{1,2}; Patrícia Trevisan¹; Luiza Emy Dorfman¹; Rosana C. M. Rosa¹; Tatiana D. Zen¹; Paulo Ricardo G. Zen^{1,2}

1. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA), Rio Grande do Sul, Brazil.

2. Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre (CHSCPA), Rio Grande do Sul, Brazil.

ABSTRACT

Fragile X syndrome is considered the main known cause of inherited learning disabilities and it is characterized by mutations in the *FMR1* gene. Our aim was to report an unexpected detection of a patient with fragile X syndrome by GTG-Banding karyotype analysis (G-bands after trypsin and Giemsa). The karyotype analysis identified Xq27.3 fragility in 17% of the metaphases analyzed and in 54% when using TC 199, consistent with the cytogenetic diagnosis of the syndrome. This case was the sole one to present the fra(X) tests in the high-resolution karyotype analysis in our care service, contributing to future diagnoses of patients with history of developmental delay.

Key words: karyotype; fragile X syndrome; intellectual disability; chromosomal fragile sites.

INTRODUCTION

Fragile X syndrome is considered the main known cause of inherited learning disability and it is characterized by mutations in the *FMR1* gene⁽¹⁾. Our aim was to report an unexpected detection of a patient with fragile X syndrome by GTG-Banding karyotype analysis (G-bands after trypsin and Giemsa). The patient was a 2-year-old boy with history of neuropsychomotor developmental delay. He was the second child of young parents, with no similar family history. His pregnancy was uneventful. The child was born by normal delivery at term, weighing 3,200 g and measuring 49 cm. He evolved with developmental and speech delay. Physical examination showed broad forehead, triangular face, epicanthal folds, and prominent ears. High resolution GTG-Banding karyotype analysis (≥ 550 bands) made from peripheral blood by the modified method of Yunis (1981)⁽²⁾, using culture medium Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640 (Invitrogen), identified spontaneous fragility of the region q27.3 of X chromosome in 17% of the 53 metaphases analyzed, which was consistent with the diagnosis of fragile X syndrome⁽³⁾. Further study using low folic acid culture medium (TC 199) showed

the same fragile site in 54% of the metaphases analyzed, which confirmed the diagnosis (Figure)⁽³⁾.

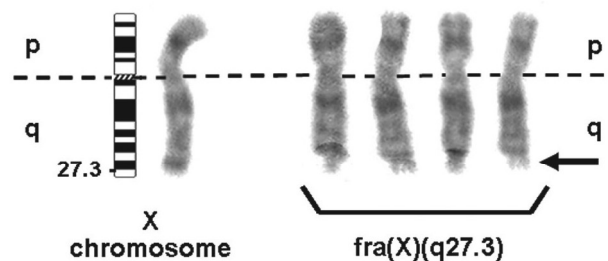


FIGURE – Partial GTG-Banding karyotypes (≥ 550 bands) showing a normal X and fragile X [fra(X)(q27.3)] chromosomes

GTG: G-bands after trypsin and Giemsa; p: short arm; q: long arm.

Lubs (1969) was the first to identify this chromosomal abnormality in individuals with fragile X syndrome, which he called “X chromosome marker”⁽⁴⁾. This alteration was more frequently verified when using the TC 199 medium⁽⁵⁾. Currently, the diagnosis of fragile X syndrome is more frequently performed by polymerase chain reaction (PCR) and southern blot, techniques

Applications of electron microscopy in health: the example of epidermolysis bullosa

Aplicações da microscopia eletrônica em saúde: o exemplo da epidermólise bolhosa

Maiara A. Floriani¹; Ana Elisa K. Bau¹⁻³; Raquel P. Silva¹; Carla Graziadio¹⁻³; Luiza Emy Dorfman¹;
Tatiana D. Zen¹; Rafael Fabiano M. Rosa¹⁻³; Paulo Ricardo G. Zen¹⁻³

1. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rio Grande do Sul, Brazil. 2. Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA), Rio Grande do Sul, Brazil.
3. Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA), Rio Grande do Sul, Brazil.

ABSTRACT

We report the case of a patient with dystrophic epidermolysis bullosa (DEB) diagnosed by transmission electron microscopy (TEM), emphasizing the applications and importance of this technique in the health area. The patient was a male, the only child of young and non-consanguineous parents without similar cases in the family. The patient underwent a cutaneous biopsy in which TEM revealed sub-basal membrane involvement, confirming the diagnosis of DEB. Despite technological advances, TEM continues to play an important role in diagnosis and clinical research and is considered the best option for confirmation of diagnosis and subtypes of diseases such as epidermolysis bullosa (EB).

Key words: epidermolysis bullosa; epidermolysis bullosa dystrophica; epidermis; basement membrane; electron microscopy.

INTRODUCTION

Our aim was to report the case of a patient with dystrophic epidermolysis bullosa (DEB), whose diagnosis was reached through transmission electron microscopy (TEM), highlighting the applications and importance of this technique in health. The patient was an 18-year-old Caucasian man, the only child of young and non-consanguineous parents without similar cases in the family. According to his mother, the bullous lesions appeared after 15 days of life, affecting the skin of hands, shoulders, elbows, back, knees, ankles and feet, besides oral and nasal mucosa. Some of the lesions had blood inside and the developed scars were atrophic (erythematous in the region of the knees and feet). The lesions frequently get infected, causing itching when dry (**Figure 1**). When the patient was 8 years old he underwent a skin biopsy, whose histopathological analysis showed findings indicative of a subepithelial blister, with only one intrapapillary projection in the central area. The adjacent dermis showed mild edema and minimal lymphocytic infiltrate. TEM performed from the biopsy of a bullous lesion caused by skin friction showed sub-basement membrane involvement, confirming the diagnosis of epidermolysis bullosa (EB) of the dystrophic type

(**Figure 2**). An increased number of lesions appeared with the patient growth, especially after puberty. At age 13, epidermal cysts (milia) and dystrophic nails were also present. Dysphagia for solid foods and bleeding of the oral mucosa were also reported. Endoscopy and colonoscopy were normal. He presented abdominal pain at age 17 years, being diagnosed with secondary duodenal stenosis due to an aorto-mesenteric impingement. The patient underwent a duodenal-jejunal anastomosis surgery that progressed well, without the occurrence of stenosis or constipation.



FIGURE 1 – Images of the patient's hands and feet showing blistering and scarring skin lesions, in addition to dystrophic and missing nails (especially in the feet), secondary to EB. EB: epidermolysis bullosa.

Use of the fluid obtained by puncture of cystic hygroma: an alternative method for fetal karyotyping

Uso do fluido obtido por punção do higroma cístico: método alternativo para cariotipagem fetal

Maiara A. Floriani¹; Luiza E. Dorfman¹; Dayane B. Koshiyama¹; Tatiana D. Zen¹; Jorge Alberto B. Telles²; André C. Cunha²; Paulo Ricardo G. Zen^{1,3}; Rafael Fabiano M. Rosa^{1,3}

1. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rio Grande do Sul, Brazil. 2. Hospital Materno-Infantil Presidente Vargas (HMIPV), Rio Grande do Sul, Brazil. 3. Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre (CHSCPA), Rio Grande do Sul, Brazil.

ABSTRACT

The aim of our study was to report the case of a fetus with Turner syndrome (TS) diagnosed by karyotype from cystic hygroma (CH) fluid, highlighting the applications and importance of this procedure. First-trimester screening revealed an increased nuchal translucency measurement, cervical cystic hygroma and head and trunk subcutaneous edema. The presence of oligohydramnios prevented the performance of amniocentesis. We performed puncture of the CH for fetal karyotyping, which revealed X-chromosome monosomy (45,X), compatible with TS. Therefore, the use of CH fluid as an alternative sample for fetal karyotyping may be considered when conventional invasive procedures can not be performed.

Key words: karyotype; cystic lymphangioma; Turner syndrome; chromosome abnormalities; genetic counseling.

CASE REPORT

The aim of our study was to report a fetus with Turner syndrome (TS) diagnosed by karyotype from cystic hygroma (CH) fluid, emphasizing the applications and importance of this procedure. A 38-year-old healthy pregnant woman was in her third pregnancy and had a history of two previous miscarriages (all occurred during the first trimester). There was no family history of birth defects or genetic disorders. First-trimester screening revealed an increased nuchal translucency measurement (7 mm), cervical cystic hygroma and head and trunk subcutaneous edema. Ascites was also noted later. There was oligohydramnios, which prevented the execution of amniocentesis. Therefore, at 18 weeks of pregnancy, a puncture of the CH was held for fetal karyotyping, following a long-term culture. Chromosomal analysis showed a X-chromosome monosomy - 45,X[21], consistent with TS. At 21 weeks, there was no fetal heartbeat and spontaneous elimination of the fetus occurred two days later.

TS is a multisystemic disorder characterized by partial or total X-chromosome monosomy, seen in 1:2,500-3,000

born alive females. It can be diagnosed at different life stages, including the intrauterine period. Ultrasound findings, such as CH and hydrops, may assist in its detection⁽¹⁾. Prenatal diagnosis is usually performed by karyotype analysis from amniotic fluid samples. However, as found in the present report, this type of sample or even fetal blood by cordocentesis becomes unable to obtain due to obstructions by large cysts or oligohydramnios⁽²⁾.

The use of CH fluid, obtained through direct hygroma puncture, can be used as an alternative procedure⁽²⁾. Fetal CH is characterized by single or multiple lymphatic congenital cysts and is often found associated with TS⁽³⁾. The procedure is similar to amniocentesis and has low complication rate. If the CH is multiloculated, it is possible to puncture and analyze different regions (especially due to the possibility of mosaicism)⁽⁴⁾. The karyotype is performed through lymphocyte culture from cystic cells that has a mitotic index and metaphases quality compatible with a blood lymphocyte culture. The karyotype test results using CH puncture are obtained in four days, while by amniocentesis they range from 14-24 days⁽⁵⁾ (**Figures 1 and 2**).

Nasoethmoidal Meningocele in a Child Presenting Bilateral Congenital Cystic Adenomatoid Malformation: Evidence for a New Entity or Consequence of Gestational Exposures?

Ernani B. da Rosa¹, Daniéle B. Silveira¹, Laís G. Tsugami², Nathan L. Bellé², Izabelle O. Matos³, Luciano V. Targa⁴, Rosilene da S. Betat⁵, André C. da Cunha⁵, Rolando A.R. Villacis⁶, Sílvia R. Rogatto^{6,7}, Luiza E. Dorfman¹, Rafael F. M. Rosa^{1,8,9}, and Paulo R.G. Zen^{*1,8}

Background: Nasoethmoidal meningocele is considered an uncommon type of cephalocele, and congenital cystic adenomatoid malformation (CCAM) is a rare lung disorder characterized by overgrowth of the terminal bronchioles.

Case: We report the unusual association between a nasoethmoidal meningocele and CCAM type II in a fetus exposed to valproic acid and misoprostol. The mother was an 18-year-old woman on her first pregnancy. She had a history of absence seizures since she was 5 years old. She took valproic acid from the beginning of the gestation until the end of the third month. At the end of the third month, she attempted interruption of her pregnancy using misoprostol. The fetal nasoethmoidal meningocele and CCAM type II were identified through morphological ultrasound examination and magnetic resonance imaging. A genome-wide study detected one copy number variation classified as rare, entirely contained into the *SPATA5* gene. However, it does not seem to be associated to the clinical findings of the patient. **Conclusion:** To our knowledge, there is only one case reported in the

literature showing the same association between a nasoethmoidal meningocele and CCAM. Thus, the malformations observed in our patient may be related to the gestational exposures. Also, we cannot rule out that the patient may present the same condition characterized by a cephalocele and CCAM described by some authors, or even an undescribed entity, because some hallmark features, such as laryngeal atresia and limb defects, were not observed in our case. Further reports will be very important to better understand the associations described in our study.

Birth Defects Research (Part A) 106:225–231, 2016.

© 2016 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: nasoethmoidal meningocele; congenital cystic adenomatoid malformation; prenatal diagnosis; valproic acid; misoprostol

Introduction

Cephalocele is defined as a congenital defect of the skull observed in 1 : 5,000 to 10,000 births (Hunter, 1984). The protrusion in the cephalocele usually occurs at the cranium midline and is covered by an intact skin or thin epithelium (Stevenson and Hall, 2006). When there is brain content inside the herniated sac through the skull defect, it is called an encephalocele. However, when there is meninges herniation, without brain content, the defect is referred to as a

cranial meningocele. A nasoethmoidal meningocele is defined as the cranial meningocele that emerges above the nasal bones (Stevenson and Hall, 2006).

Congenital cystic adenomatoid malformation (CCAM) consists of a rare lung disorder characterized by overgrowth of the terminal bronchioles, resulting in cysts of varying sizes and alveoli deficiency (Keidar et al., 2001). Its estimated incidence is 1: 25,000 to 35,000 births. CCAM corresponds to 95% of cystic lung diseases, occurring with an equal frequency in both lungs, with a slight predominance of the upper lobes (Farrugia et al., 2008). Currently, the used CCAM classification is the one proposed by Stocker et al. (1978), which subdivides the condition into three morphologically distinct types. The CCAM type I is characterized by cysts larger than 2 cm in diameter, having permeable alveoli; type II has smaller cysts mixed with adenomatous areas, and type III is rare and characterized by completely adenomatous compact injury. Types II and III usually have extensive lesions and carry an unfavorable prognosis (Laje and Liechty, 2008).

In the present study, we report the unusual association between a nasoethmoidal meningocele and CCAM type II in a child whose diagnosis was performed during the prenatal period in a pregnancy exposed to teratogenic drugs.

Case Report

The mother was an 18-year-old woman on her first pregnancy. She was referred at 27 weeks and 5 days due to

¹Graduate Program in Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), RS, Brazil

²Graduation in Medicine, UFCSPA, RS, Brazil

³Pediatrics, Hospital Materno Infantil Presidente Vargas (HMIPV), RS, Brazil

⁴Radiology, HMIPV, and Tomoclínica, RS, Brazil

⁵Fetal Medicine, HMIPV, RS, Brazil

⁶Neogene Laboratory, Research Center (CIPE), AC Camargo Cancer Center, SP, Brazil

⁷Department of Urology, School of Medicine, UNESP - São Paulo State University, SP, Brazil

⁸Clinical Genetics, UFCSPA and Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre (CHSCPA), RS, Brazil

⁹Clinical Genetics, HMIPV, RS, Brazil

*Correspondence to: Paulo Ricardo Gazzola Zen, Clinical Genetics – UFCSPA/CHSCPA, Rua Sarmento Leite, 245/403, CEP: 90050-170 Porto Alegre - RS – Brazil. E-mail: paulozen@ufcspa.edu.br

Published online 2 March 2016 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).
Doi: 10.1002/bdra.23452

Clinical utility of skin karyotype

Utilidade clínica do cariótipo de pele

Luiza E. Dorfman; Agnes E. R. P. Silva; Giorgio A. Paskulin; Rafael F. M. Rosa; Paulo R. G. Zen

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

ABSTRACT

We report the case of a patient with Patau syndrome, diagnosed by skin karyotype, emphasizing the applications and importance of this test. The pregnancy morphology ultrasound showed face defects and of central nervous system and heart chambers asymmetry. In the postnatal evaluation it was identified microcephaly, single central nostril, and other malformations. We performed skin karyotype that resulted in full trisomy 13. Our report highlights the possibility of performing karyotype examination in cases when it is no longer possible to obtain a blood sample, thus providing the correct diagnosis and genetic counseling for the family.

Key words: karyotype; fibroblasts; human chromosomes pair 13; chromosome aberrations; genetic counseling.

INTRODUCTION

Our aim was to report a case of a patient with trisomy 13 (Patau syndrome) diagnosed by skin karyotype, emphasizing the applications and importance of this exam. She was born vaginally at 34 weeks of gestation, weighing 1,700 g, with Apgar scores of 1 in the first and fifth minutes. Her gestational ultrasound disclosed the presence of holoprosencephaly, ocular hypotelorism, microphthalmia, and left heart chambers asymmetry. In postnatal evaluation, it was also identified microcephaly; single central nostril; micrognathia; small and abnormal ears; clitoromegaly; hypoplastic nails, and postaxial polydactyly of the right hand and foot (**Figure 1**). She died soon after birth, before the possibility of blood sample collecting for karyotype analysis. However, it was possible to perform skin biopsy and karyotyping, because the child body had not yet been placed in formalin. This study was conducted following the protocol described by Paskulin *et al.*⁽¹⁾. The result was consistent with the diagnosis of Patau syndrome due to full trisomy 13 (47,XX,+13) (**Figure 2**).

Trisomy 13 is considered a severe condition characterized by multiple malformations. The diagnosis in postnatal period is usually performed through conventional karyotype analysis using a sample of peripheral blood to obtain metaphase chromosomes⁽²⁾. The preference for this sample occurs due to its easily collection and cell culture, besides fast result. However, in some cases it is not possible to perform this kind of collection, as after the death of a newborn. Thus, the use of a skin biopsy for cytogenetic diagnosis may be an option in cases when it is not possible to obtain a



FIGURE 1 – Postnatal appearance of the patient. Note especially single nostril and right foot postaxial polydactyly