

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DETERMINAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO  
DE ANOMALIAS CONGÊNITAS ATRAVÉS DE HIBRIDAÇÃO  
*IN SITU* FLUORESCENTE (FISH) EM *IMPRINTS*  
CELULARES DE FÍGADO

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade  
de São Paulo, para concorrer ao Título de  
Mestre em Patologia, pelo curso de Pós-  
Graduação em Patologia - Área de  
Concentração: Patologia.

Ribeirão Preto  
2002

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DETERMINAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO  
DE ANOMALIAS CONGÊNITAS ATRAVÉS DE HIBRIDAÇÃO  
*IN SITU* FLUORESCENTE (FISH) EM *IMPRINTS*  
CELULARES DE FÍGADO

**Patrícia Leite de Godoi Adachi**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade  
de São Paulo, para concorrer ao Título de  
Mestre em Patologia, pelo curso de Pós-  
Graduação em Patologia - Área de  
Concentração: Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cesar Peres

Ribeirão Preto  
2002

## FICHA CATALOGRÁFICA

Adachi, Patrícia Leite de Godoi

Determinação de um protocolo de investigação de anomalias congênicas através de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) em *imprints* celulares de fígado.

Ribeirão Preto, 2002.

64 p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Patologia.

Orientador: Peres, Luiz Cesar.

1. necropsia. 2. anomalias congênicas. 3. *imprints*.

4. FISH

## ERRATA

- **Pág. 9, linhas 7 a 9:**

O texto saiu como “...anticorpos ligados a avidina-Texas Red... a sonda biotinilada é detectada com FITC...”, onde na verdade seria: “anticorpos ligados a Texas Red... a sonda biotinilada é detectada com avidina-FITC...”

DEDICATÓRIA

À todos que amo,  
à todos que acreditam e anseiam pelo meu sucesso.

## Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Luiz Cesar Peres**, pela orientação, pelo exemplo de dedicação à pesquisa e ao trabalho, pela contribuição para meu crescimento científico.

À **Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo**, por dispor seu laboratório à realização dos meus experimentos, pela simpatia e exemplo de pessoa pró-ativa que é.

Ao **Prof. Dr. João Monteiro de Pina Neto**, pela oportunidade de estágio no Laboratório de Citogenética.

À **Profa. Dra. Laurelucia O. Lunardi**, por ter possibilitado o início da realização deste mestrado.

Ao **Prof. Dr. Miguel Ângelo DiMatteo**, pela sua disponibilidade em ajudar-me na análise estatística.

À **Deise Lucia Chesca Simões**, pela amizade e carinho durante todo este tempo de convívio, e pelo auxílio técnico.

Às pós-graduandas, **Marjori Leiva Camparoto e Maria Sol Brassesco Annichini**, pela orientação para a realização do FISH e paciência.

Aos Técnicos do Departamento de Genética: **Luis Fernando Mazzucato e Heloisa Helena L. Fernandez**, pela disposição em me ensinarem a cultura de células e a análise citogenética.

À **Cristiane Minot Gutierrez** pela amizade e presença nos momentos em que precisei de ajuda.

**À Camila Nunes de Moraes Ribeiro, Erminiana D. de Mendonça, Mariana S. Maggiori e Paulo Roberto V. Quemelo, pela amizade e companheirismo.**

**Ao Rodrigo de Oliveira Plotze, pela simpatia e disposição em me ajudar na utilização do computador.**

**À Neide Terezinha Gonçalves, Rosângela Mazzucato C. de Paiva, Regina Mara C.F. Bueno, pelo convívio e atenção.**

**À todos os professores e funcionários do Departamento de Patologia.**



# SUMÁRIO

Resumo

Summary

Introdução .....	2
Objetivo .....	17
Material e Métodos .....	19
Resultados .....	25
Discussão .....	36
Conclusão .....	47
Anexo .....	50
Referências Bibliográficas .....	53

RESUMO

A freqüência de anomalias congênitas como causa de mortalidade infantil tende a crescer proporcionalmente, na medida em que as causas de morte evitáveis, tais como prematuridade e suas conseqüências, infecções e desnutrição, podem ser melhor controladas em função da melhoria geral da saúde da população e do próprio sistema de saúde. No Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, as anomalias congênitas representam cerca de um quarto dos casos das necropsias pediátricas, sendo que muitas não têm sua etiologia definida com os recursos disponíveis, pois a cultura celular para a análise de cariótipo, apesar de ter grande valia para o estudo das anomalias congênitas, nem sempre tem sucesso, ora porque os tecidos não são mais cultiváveis, ora por contaminação bacteriana ou fúngica. Por outro lado, muitas vezes a citogenética convencional não é capaz de detectar certas alterações estruturais, como as microdeleções, que devem então ser investigadas com técnicas moleculares. Uma das possibilidades neste sentido é a utilização da Hibrição *in situ* fluorescente (*Fluorescent in situ hybridization* - FISH), que pode ser realizada tanto em células em metáfase como em interfase. Apesar de tecnicamente possível, a utilização de tecidos fixados em formol e emblocados em parafina tem muitas limitações, o que motivou a busca de um novo método de análise celular adequado e de baixo custo, representado pelo uso de *touch preparatives* ou *imprints*. O objetivo deste trabalho foi determinar um protocolo simplificado e de baixo custo para a investigação de anomalias congênitas no exame *post mortem*, através da técnica de FISH, em *imprints* celulares de fígado. Para tanto, foram colhidos *imprints* de 11

casos de necropsias, fixados em dois diferentes fixadores: metanol-ácido acético (3:1), por 45 segundos, e etanol 95% por 10 minutos. Antes de proceder à técnica de FISH, foi realizado um pré-tratamento com ácido-acético a 70%, por 2 minutos. A técnica de FISH foi realizada utilizando-se sondas alfa-centroméricas dos cromossomos 13/21, 18 e X. Os resultados mostraram que a utilização dos *imprints* de fígado para a técnica de FISH foi adequada, não havendo diferenças em relação ao sexo, idade e tempo de morte dos indivíduos. Além disso, os *imprints* são fáceis e rápidos de serem coletados e fixados, apresentando núcleos em número suficiente para a análise interfásica, separados, íntegros e em monocamada, o que propiciou uma análise relativamente rápida e bastante confiável. Quanto aos fixadores, não houve diferença entre os dois utilizados.

Portanto, o emprego de *imprints* de fígado fixados em etanol 95% constitui uma forma de preparação celular adequada para análise citogenética molecular (FISH) e tal protocolo poderá ser adotado na investigação de anomalias congênitas no exame *post mortem* pelo Departamento de Patologia da FMRP-USP.

Unitermos: necropsia, anomalias congênitas, *imprint*, FISH

SUMMARY

The frequency of congenital anomalies in infant mortality rate is expected to increase due to the better control of preventable diseases such as prematurity and its consequences, infections and malnutrition, associated to better health care and improved Health System. At the Hospital das Clínicas da Faculdade de Ribeirão Preto – HCFMRP-USP, congenital anomalies correspond to one quarter of all pediatric autopsies, some of which remain with its etiology undefined. Cell culture for cytogenetics is sometimes of no help due to absent growth, contamination, or because the abnormality is caused by a microdeletion. Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) provides an alternative to these problems as it may be performed on interphase and metaphase nuclei. Although it is technically possible to use formalin fixed and paraffin embedded tissues for FISH there are some limitations to its use and so we looked for a low cost alternative source of cells represented by touch preparatives or imprints. The aim of this study was to define a simplified and low cost protocol for the investigation of congenital anomalies seen at autopsy using FISH in liver touch preparatives. These touch preparatives obtained from 11 adult and pediatric autopsies were fixed in either ethanol 95%, for 10 minutes, or methanol:acetic acid 3:1, for 45 seconds, followed by pre-treatment with acetic acid 70% for 2 minutes. Alpha-centromeric probes for chromosomes 13/21, 18 and X were tested according to the protocol of Pinkel, 1986. Our results showed that touch preparatives are a good source of cells for FISH obtained at autopsy, with no sex, age and delay from death to the autopsy difference. They are easy to obtain and prepare, present an adequate amount of whole, isolated and non-overlapping interphase nuclei

which provide an easy and reliable analysis. There were no statistical differences between the two fixatives used and thus ethanol 95% should be the fixative of choice due to its lower cost, less toxicity and because it is ready to use. In conclusion, liver touch preparatives fixed in ethanol 95% are a good source of interphase cells for molecular cytogenetics – FISH – that should be recommended for the investigation of congenital anomalies of autopsies performed at the HCFMRP-USP.

**Key words:** autopsy, congenital anomalies, imprint, FISH.

# INTRODUÇÃO



## **Importância das anomalias congênitas**

As anomalias congênitas são defeitos anatômicos ou estruturais presentes ao nascimento. Estes defeitos podem envolver qualquer sistema ou órgão e freqüentemente se apresentam como associações ou síndromes (McGee et al, 1992).

Cerca de 3% dos recém-nascidos na população geral apresentam anomalias congênitas (Hobbs et al, 2002; Winter, 1996; Shepard, 1986; Alberman & Creasy, 1977; Kuleshov, 1976). Entretanto, estas anomalias são vistas em proporção muito mais elevada em hospitais terciários, para onde são referidas as gestações de risco, bem como recém-nascidos com tais problemas oriundos de outros hospitais e mesmo de outras regiões. No Estado de São Paulo as anomalias congênitas representam a segunda causa de mortalidade infantil, segundo os dados de morbi-mortalidade da Secretaria do Estado de Saúde de São Paulo, e na cidade de Ribeirão Preto, já são a principal causa de morte pós-neonatal no primeiro ano de vida (Silva & Manço, 1998) correspondendo a cerca de um quarto dos casos das necropsias pediátricas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (Peres et al., 1995; Peres, 2000; Piram, 2000). Nesta cidade houve nos últimos vinte anos acentuada redução na taxa de mortalidade infantil, que era de 60/1000 nascidos vivos na década de 70, passando para 13/1000 em 2001 (São Paulo, 2001), revelando melhoria geral das condições de vida da população e do Sistema de Saúde.

De uma forma geral, as anomalias congênitas como causa de mortalidade perinatal tendem a aumentar na medida em que causas de mortes evitáveis, tais como mortes provocadas por problemas no trabalho de parto, desnutrição e doenças infecto-contagiosas, têm sido menos freqüentes, e melhores cuidados neonatais tem aumentado a sobrevivência de recém nascidos saudáveis, mas com baixo peso ao nascimento (Keeling, 1987), o que tem sido observado também no Brasil como um todo e particularmente no Estado de São Paulo (Victoria& Barros, 2001).

As anomalias encontradas nos nativos, muito embora possam parecer graves, representam falhas do desenvolvimento embrionário compatíveis com o nascimento, pois considerando-se todos os zigotos, cerca de 30% não conseguem se desenvolver até a implantação por apresentarem graves aberrações cromossômicas (Boué et al., 1985) e dos que se desenvolvem, 50% serão eliminados como aborto do primeiro trimestre gestacional (Brown & Warburton, 1995).

Os defeitos congênitos podem ser classificados quanto à categoria, mecanismo e causa, segundo Opitz & Wilson (1997). As categorias incluem os defeitos de tipo único e os de tipo múltiplo, sendo os de tipo único, representados pelas anomalias maiores e menores e as seqüências, e os de tipo múltiplo as síndromes, associações e defeitos de campo de desenvolvimento. Quanto aos mecanismos, os defeitos podem ser intrínsecos, representados pela malformação e displasia, e extrínsecos, constituídos pela dilaceração e deformação. As causas compreendem

cromossomopatias, desordens monogênicas, fatores ambientais e multifatorial.

No estudo realizado por Peres (2000) com necropsias pediátricas realizadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), as principais categorias de anomalias congênitas foram as isoladas, seguidas pelas síndromes e seqüências, conforme a distribuição também observada por outros autores (Penchaszadeh, 1979; Al Gazali et al. 1995).

As anomalias congênitas podem ter etiologia genética, ambiental ou multifatorial, sendo que as causas genéticas podem ser subdivididas em cromossômica e monogênica (McGee et al, 1992).

Piram (2000) observou em um estudo com 279 casos de anomalias congênitas necropsiadas no HCFMRP-USP entre 01 janeiro de 1995 a 31 de dezembro de 1998, que das anomalias com diagnóstico definido, 21,3% eram de etiologia gênica, 17,6% de etiologia cromossômica, 23,4% de etiologia multifatorial, 3,2% de etiologia ambiental, 25% de etiologia desconhecida e 9,5% sem etiologia determinada.

As anomalias cromossômicas ocorrem em 20 a 50% das concepções humanas e suas conseqüências mais comuns são as perdas fetais precoces (McFadden, 1997).

As trissomias são as anormalidades cromossômicas mais freqüentes nos humanos. Nos abortos espontâneos foram observadas trissomias para todos os cromossomos, exceto para o cromossomo 1, (Alberman & Creasy, 1977) sendo que a trissomia 16 é a mais freqüentemente observada.

(Jacobs, 1992). Em casuísticas de necropsias, as trissomias do cromossomo 18 são mais comuns do que as do 21 devido à maior letalidade das primeiras (Peres, 2000; Piram, 2000; Ortolan, 2001). Como a mortalidade nas trissomias é muito elevada, variando de 70% para a trissomia do cromossomo 21, 90% para as dos cromossomos 13 e 18 e até virtualmente 100% nas demais, somente as trissomias do 21, 18 e 13 são freqüentemente observadas nos nativos (Alberman & Creasy, 1977; McFadden, 1997).

As monossomias constitucionais são raras e quase completamente limitadas a monossomia do cromossomo 21 ou X, sendo que somente 0,3% de conceptos com monossomia X sobrevivem até o nascimento. A ausência de monossomias para outros cromossomos é atribuída a sua letalidade precoce (Jacobs, 1992).

As anormalidades estruturais, incluindo deleções, duplicações e rearranjos, tais como translocações e inversões, são bem menos freqüentes que as aneuploidias. A incidência de uma nova anormalidade estrutural não balanceada é de 0,6% em abortos espontâneos e 0,1% em recém-nascidos. (Sperling apud McFadden, 1997).

As cromossomopatias tanto numéricas como estruturais têm grande importância, pois podem ter sua etiologia identificada, o que permite isolar os casos para estudos posteriores, bem como orientar no aconselhamento genético das famílias.

### **Métodos de estudo das anomalias congênitas**

O estudo das anomalias congênitas requer a existência de um serviço estruturado e multidisciplinar, contando com patologistas, geneticistas clínicos, ultrassonografistas especializados, ginecologistas-obstetras, pediatras e cirurgiões pediátricos (Keeling, 1987; Wigglesworth & Singer, 1991), todos disponíveis no HCFMRP-USP e já engajados em um trabalho em conjunto (Peres et al., 1995). Ao longo dos sete últimos anos vem se desenvolvendo intenso trabalho colaborativo neste sentido, integrando a Patologia Pediátrica e a Genética Clínica, cujos resultados têm demonstrado um grande avanço nos diagnósticos. (Peres, 2000; Piram, 2000; Ortolan, 2001). A partir deste trabalho foi criado um protocolo de exame necroscópico específico para as anomalias congênitas, incluindo a análise dismorfológica sistemática, determinação de diversos pesos e medidas antropométricas, obtenção de fotografias e filmagens externas e internas, documentação radiográfica quando pertinente, bem como exames sorológicos, bioquímicos e imuno-histoquímicos dirigidos para fins específicos. Destaca-se neste contexto a obtenção de tecidos para cultura celular para cariótipo, seja de linfócitos do sangue do seio sagital ou pele e fáscia do músculo reto abdominal, que muito têm contribuído para a elucidação diagnóstica (Ortolan, 2001).

As culturas mais rápidas e menos onerosas são as de linfócitos (Keeling, 1987; Bauld et al, 1974), porém há situações que impossibilitam a coleta de sangue, ou a tornam inviável, como o feto ser muito pequeno ou mesmo ter graves alterações cranianas (impedindo a coleta), um longo tempo após a morte, o intenso grau de maceração, presença de infecção e

pacientes que receberam transfusão sangüínea. (Bauld et al., 1974; Kuleshov, 1975; Keeling, 1987; Peres, 2000).

Para contornar tais problemas, pode-se utilizar fibroblastos obtidos de vários tecidos (Bauld et al, 1974; Kuleshov, 1976; Keeling, 1987). Na hipoderme há grande quantidade de fibroblastos, permitindo que ela seja geralmente utilizada para este fim (Keeling, 1987; Bauld et al., 1974; Kuleshov, 1976). Porém, por estar em contato com o meio ambiente, a pele pode estar mais facilmente contaminada. Além disso, há situações em que a região foi alterada por procedimentos cirúrgicos ou mesmo por anomalias congênitas, como nos caso de gastrosquise, onfalocele e extrofia de cloaca, entre outros, tornando este tecido inapropriado. Outro tecido que pode ser coletado é a fáscia dos músculos reto-abdominais, que apresenta algumas vantagens: é rica em fibroblastos, geralmente está isolada tanto do meio ambiente externo quanto da cavidade peritoneal, ambas mais sujeitas à contaminação e infecção e é pobremente vascularizada, diminuindo os riscos de contaminação via sangüínea. (Ortolan, 2001)

Ainda assim, a realização de cultura celular apresenta desvantagem quando se desejam resultados rápidos ou quando há dificuldades em se realizar cultura com obtenção de metáfases de boa qualidade para análise (Pinkel et al., 1988). Além disso, há um elevado número de pequenas alterações estruturais não perceptíveis ao exame citogenético convencional, cuja investigação deverá recorrer a técnicas moleculares (Drut et al., 1992; Piram, 2000).

A citogenética molecular vem sendo realizada através da hibridação *in situ* de ácidos nucléicos fluorescente (FISH), com o uso de sondas de DNA marcadas com fluorocromos que se hibridam com seqüências específicas de ácidos nucléicos *in situ*, tornando possível a detecção de alterações cromossômicas numéricas (perdas ou ganhos cromossômicos) e estruturais (translocações, inversões, deleções) (Alberts et al., 1997).

### **Sondas para FISH**

As moléculas de sonda são pequenos pedaços de DNA clonados em vetores como bacteriófagos  $\lambda$ , cosmídeos, YAC (cromossomo artificial de levedura) ou BACs (cromossomos bacterianos artificiais) (Trask et al., 1993; Werner et al., 1997).

Antes da hibridação, as moléculas da sonda são modificadas para carregar moléculas repórteres. Estas podem ser fluorocromos (marcação direta) ou moléculas intermediárias como biotina, digoxigenina e dinitrofenol, que são incorporadas à sonda por reações de *nick translation*, PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ou *random priming*, nas quais nucleotídeos modificados são substituídos. Estes intermediários são detectados indiretamente depois da hibridação, com avidina ou anticorpos conjugados à substância fluorescente (Trask et al., 1993).

A escolha do tipo de marcação das sondas de DNA e dos fluorocromos para uso em FISH depende do número de sondas a serem analisadas e dos jogos de filtros disponíveis. Para uma única sonda, o sistema que usa biotina e avidina-isotiocianato de fluoresceína (FITC) é

mais conveniente. A fluoresceína produz um sinal fluorescente verde e os cromossomos podem ser contra-corados em vermelho por iodeto de propídeo (PI). A sonda fluorescente e os cromossomos podem ser simultaneamente visualizados através de um jogo único de filtros para os comprimentos de onda de cada uma das substâncias. Duas sondas podem ser detectadas se uma for marcada com digoxigenina e outra com biotina. A sonda marcada com digoxigenina é detectada com anticorpos ligados a avidina-Texas Red, o qual produz um sinal vermelho; a sonda biotinilada é detectada com FITC, o que produz um sinal verde. A contra-coloração neste caso é feita com DAPI (*Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride hydrate*). Dependendo do tipo de filtro utilizado, os três fluorocromos podem ser visualizados separadamente ou simultaneamente. Uma terceira sonda pode ser utilizada se for marcada simultaneamente com biotina e digoxigenina, resultando numa cor intermediária alaranjada (Trask, 1998).

Sondas adicionais podem ser utilizadas marcando-as com outros fluorocromos ou com uma combinação de fluorocromos em diferentes proporções. Já foram testadas 24 combinações de fluorocromos, uma para cada cromossomo. O método que estuda cromossomos discriminados por este conjunto de fluorocromos é chamado *spectral karyotyping* (SKY), porém deve ser realizada em células em metáfase (Schrock, apud Trask, 1998).

Em citogenética molecular, três diferentes tipos de sonda são freqüentemente usados: sondas específicas para seqüência única, seqüências repetidas e sondas para cromossomos inteiros (Yan et al.,



2000).

Entre as primeiras sondas que foram aplicadas em citogenética molecular estão as sondas para seqüências altamente repetitivas da região do centrômero dos cromossomos (Cremer et al., 1986; Pinkel et al., 1987; Waye & Willard 1986; Waye et al., 1987a,b; Deville et al., 1988; Greig et al., 1989). Posteriormente surgiram as sondas para as seqüências repetitivas na região telomérica dos cromossomos (Buroker et al., 1987; Moyzs et al., 1988). Tanto a região centromérica quanto a telomérica consistem em repetições de seqüências de nucleotídeos quase ininterruptas, o que representa um grande alvo para a hibridação. Portanto, este tipo de sonda pode se hibridar repetidamente com as seqüências-alvo e os sinais de hibridação serão bem fortes (Werner et al., 1997). A principal aplicação de sondas centroméricas é avaliar aneuploidias, detectando perdas ou ganhos de cromossomos inteiros (Cremer et al., 1986; Pinkel et al., 1986; Dohner et al., 1993). Aberrações estruturais envolvendo pontos de quebra próximos aos centrômeros podem ser detectados pela combinação com sondas não centroméricas. (Janz et al., 1995). Em células em interfase as sondas teloméricas permitem a detecção de deleções terminais, se combinadas com sonda centromérica do respectivo cromossomo (VanDekken & Baumann, 1989).

As sondas para cromossomos inteiros têm como principal aplicação a detecção de rearranjos cromossômicos e cromossomos marcadores em metáfases (Brandt et al, 1994). No entanto, vários autores têm utilizado esta

sonda para demonstrar translocações em células em interfase (Shipley et al., 1996; Nagao et al., 1997).

As sondas de seqüência única, por sua vez, embora sejam mais difíceis de serem visualizadas, também podem ser usadas na identificação de mudanças cromossômicas estruturais, como translocações, deleções ou ampliações de genes, mas nesses casos, em que a intensidade do sinal fluorescente é menor, é requerida uma análise por um sistema digital com captura de imagens (Tkachuk et al., 1990; Janz et al., 1995; Weber-Matthiesen et al., 1996).

### **A técnica de FISH**

A técnica de FISH baseia-se nos seguintes princípios: 1) uma fita simples de DNA é capaz de anelar-se para formar uma dupla fita; 2) a grande complementaridade entre as fitas resulta numa união extremamente forte; 3) segmentos de DNA (genes ou regiões cromossômicas) podem ser marcados com moléculas repórteres, como a biotina ou a digoxigenina. Tais moléculas são capazes de reagir com a avidina ou anticorpo específico, respectivamente, ligados a uma substância fluorescente. Portanto, quando um DNA nativo é desnaturado (fitas simples) e incubado com DNA marcado específico (sonda) o resultado será o forte anelamento das regiões complementares (hibridação) e a localização do DNA nativo através da visualização do sinal fluorescente (Wolman, 1994).

Para a hibridação é necessária a desnaturação, tanto da sonda quanto do DNA alvo. As moléculas da sonda devem estar em excesso em

relação ao DNA cromossômico, e portanto competem efetivamente com a fita complementar cromossômica pelo anelamento. A sonda e os cromossomos são então conduzidos juntos a condições que favorecem o correto pareamento das bases. Após o período de incubação, o excesso de sondas pobremente hibridadas é removido com uma lavagem estridente. As lâminas são então submetidas aos passos da imunocitoquímica para a amplificação do sinal da sonda marcada. A contra-coloração do material é feita com DAPI ou PI, para a visualização ao microscópio de epifluorescência (Trask, 1993).

### **FISH: Metáfase x Interfase**

A hibridação *in situ* fluorescente pode ser realizada tanto em núcleos metafásicos quanto em núcleos interfásicos (Feijin et al., 1996; Wolfe et al., 1997; Werner et al., 1997). Os núcleos em metáfase apresentam as melhores condições para a realização de FISH, uma vez que os cromossomos estão isolados, distendidos, sem sobreposição e sem artefatos de fixação que porventura venham a interferir negativamente no exame. Porém, é necessária a realização de cultura celular, o que representa uma desvantagem quando se desejam resultados rápidos ou quando há dificuldades em se realizar cultura para a obtenção de metáfases de boa qualidade para análise. Nestes casos, a realização da citogenética interfásica se torna extremamente importante (Pinkel et al., 1988).

O termo citogenética interfásica foi usado pela primeira vez por Cremer (1986) para descrever a detecção de seqüências pericentroméricas

cromossomo-específicas em núcleo interfásico para a determinação de trissomia do cromossomo 18 em linhagem de cultura celular. Atualmente este termo é amplamente utilizado para se referir à detecção de seqüências de DNA em interfase (Anastasi et al., 1990).

A principal vantagem da citogenética interfásica em relação à metafásica é prescindir de cultura de células, tornando o procedimento aplicável diretamente à amostra celular (Wolf et al., 1997), podendo ser realizada em preparações citológicas, *imprints* de tecido fresco ou congelado (Nasarek et al., 1995; Xiao et al., 1995), desagregação mecânica dos tecidos com digestão enzimática (Xiao et al., 1995) ou sem a mesma (VanDekken et al., 1989; Hopman et al., 1991) ou em preparações histológicas, seja em cortes de tecido fresco, congelado, ou emblocado em parafina (Werner et al., 1997).

O uso de cortes de tecido oferece a vantagem de uma boa preservação da morfologia (Hopman et al., 1991; Werner et al., 1997), podendo ser obtidos de casos arquivados por longos períodos de tempo (Wolman, 1994). No entanto, muitas vezes os núcleos poderão apresentar-se cortados e partes do genoma poderão ser perdidas em células individuais, resultando em uma subestimativa do número de cópias cromossômicas (Werner et al., 1997). Uma alternativa para cortes em parafina é a realização de FISH em cortes com mais de 15  $\mu\text{m}$ , porém neste caso, é necessária a análise em microscópio confocal (Thompson et al., 1994; Aubele et al., 1997).

Além disto, a utilização de cortes histológicos de material incluído em parafina para FISH é muitas vezes difícil, pois a fixação em formaldeído resulta em fragmentação do DNA (Werner et al., 1997), além de induzir *cross-links* do DNA com histonas, o que também restringe a amplificação de seqüências-alvo quando se deseja utilizar o material para realização de PCR (Teo & Shaumak, 1995). Resulta daí a necessidade da utilização de outras fontes de células interfásicas e, principalmente, de outros fixadores mais adequados.

Uma alternativa, neste sentido, é a utilização de *imprint*, que é um tipo de preparação celular utilizado inicialmente para diagnóstico citológico (Tribe, 1965; Lee T.K., apud Shidam et al., 1984), per-operatório e em necropsias (Shidam et al., 1984). Ultimamente, este vem sendo usado também para a extração de DNA (Ribeiro, 2002) e para citogenética interfásica (Nasarek, 1995, Xiao et al., 1995, Kapranos et al., 1997; Huang et al., 1999, Dalrymple et al., 1995), representando mais um meio de se contornar as dificuldades e desvantagens enfrentadas na realização de cultura de células ou com a utilização de tecidos emblocados em parafina.

Vários autores utilizaram a técnica de *imprints* para estudo da citogenética de tumores, com a descrição da mesma e de suas vantagens (Xiao et al., 1995; Nasarek, 1995, Taylor et al., 1994).

Para a realização dos *imprints*, uma lâmina de vidro nova e limpa é levemente pressionada sobre uma fatia do tecido a ser estudado e imediatamente fixada (Xiao et al., 1995). A grande vantagem dos *imprints* em relação às outras preparações celulares para citogenética interfásica é

que permitem a obtenção de núcleos inteiros, com a preservação citomorfológica, o que não ocorre com cortes de tecido e preparações nucleares, além de minimizar o problema de superposição celular (Xiao et al., 1995; Nasarek et al., 1995).

Apesar das diversas vantagens como, fácil execução, baixo custo, pouco tempo necessário, possibilidade de armazenamento simples e em pouco espaço, a utilização de *imprints* para realização de FISH, como método para o estudo *post mortem* das anomalias congênitas, ainda não foram estudados.

## OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo determinar um protocolo de investigação de anomalias congênitas de etiologia cromossômica, com a aplicação do método de FISH (hibridação *in situ* fluorescente) com as sondas para os cromossomos X, 18, 13 e 21, em *imprints* celulares de fígado, obtidos de necropsias realizadas no HCFMRP-USP.



## MATERIAL E MÉTODOS

## **Casuística e Coleta de Materiais**

Foram colhidos materiais de 11 casos necropsiados no HCFMRP-USP. Destes, 5 eram necropsias pediátricas e 6 necropsias de adultos. A idade variou de cinco minutos de vida a 86 anos, sendo 8 masculinos e 3 femininos. O tempo entre a morte e a coleta do material variou de 40 minutos a 8 horas. Tais dados de necropsia estão melhor detalhados no Anexo.

Após a abertura da cavidade abdominal, foram retirados fragmentos do lobo esquerdo do fígado de aproximadamente 4 X 3 X 0,5 cm, que eram lavados em água corrente rapidamente para retirar o excesso de sangue.

### ***IMPRINTS*: Obtenção, Fixação e Pré-tratamento das lâminas**

As lâminas utilizadas eram novas e limpas. Foram ainda lavadas com água corrente, detergente extran, enxaguadas em água corrente por pelo menos 1 hora, megulhadas em solução álcool-éter e finalmente secas em estufa.

Os *imprints* eram feitos pelo pressionamento das lâminas de vidro previamente identificadas sobre a superfície do fragmento, três ou quatro vezes, em toda a extensão da lâmina.

As lâminas foram imediatamente fixadas em etanol 95% (três lâminas de cada caso) por 10 minutos ou metanol-ácido acético 3:1 (três lâminas de cada caso) por 45 segundos, secando-se ao ar e posteriormente submetidas ao pré-tratamento com ácido acético.

Este consistiu na digestão em solução de ácido acético 70% por 30 a 40 segundos, seguindo-se lavagem em água destilada 2 vezes, 1 minuto cada, desidratação em etanol 70%, 80% e 90%, 2 minutos cada e, finalmente, secagem ao ar. A seguir as lâminas foram embrulhadas em filme de polipropileno e armazenadas em temperatura ambiente, em local seco e fresco.

### **Sondas de DNA**

As sondas utilizadas para a determinação do protocolo de investigação de anomalias congênicas foram sondas alfa-centroméricas produzidas pela ONCOR, Inc., obtidas comercialmente em conjunto e o protocolo da reação foi exatamente o mesmo.

Como o interesse era determinar qual o melhor fixador para os *imprints*, a sonda de DNA escolhida foi a do cromossomo X para aqueles casos em que não havia anomalia congênita e para os cromossomos 13/21 para os casos com suspeita diagnóstica de trissomia do 13 ou do 21 e 18 para aqueles com suspeita de trissomia do cromossomo 18 (Willard, & Waye, 1987).

### **FISH**

Os experimentos de FISH seguiram o protocolo de Pinkel et al, 1986 com modificações realizadas no laboratório da Prof<sup>a</sup> Elza Tiemi Sakamoto Hojo (Departamento de Biologia – FFCLRP e Genética FMRP-USP):

- *Tratamento das lâminas com RNase*

As lâminas contendo os *imprints* foram lavadas em PBS por 5 minutos e desidratadas em gradiente crescente de etanol a 70%, 80% e 90% por 5 minutos em cada passagem. Em seguida foram incubadas com RNase 10 mg/ml diluída 100 vezes em 2XSSC, por 1 hora a 37°C, em câmara úmida. Após este período era feita a lavagem com 2XSSC, três vezes, por 5 minutos e uma vez por 5 minutos com PBS.

- *Tratamento das lâminas com Pepsina*

As lâminas foram incubadas numa solução de pepsina 0,005% a 37°C por 10 minutos, lavadas com PBS por 5 minutos, incubadas em PBS/MgCl<sub>2</sub> por 5 minutos, fixadas com 1 % formaldeído em PBS/MgCl<sub>2</sub> por 10 minutos e lavadas com PBS. Foram então desidratadas em gradiente crescente de etanol a 70%, 80% e 90% por 5 minutos em cada passagem.

- *Desnaturação do DNA alvo*

As lâminas foram incubadas com uma solução de formamida 70% / 2XSSC à uma temperatura de 80°C por 4 minutos e 30 segundos e desidratadas em etanol 70% a -20°C e posteriormente em etanol 80% e 90% à temperatura ambiente, 5 minutos cada.

- *Preparação e Desnaturação da sonda*

A sonda foi pré aquecida a 37°C por 5 minutos e misturada ao tampão de hibridação na proporção de 1,5 µl de sonda para 30 µl de tampão de

hibridação. A sonda foi desnaturada a 70°C por 5 minutos e a seguir deixada em recipiente com gelo até o momento do uso.

- *Hibridação*

As lâminas foram incubadas com 30 µl da sonda, cobertas com lamínulas de vidro e seladas com cola “*Rubber Cement*” (Simson). Foram incubadas a 37°C em câmara úmida por um período de aproximadamente 16 horas. Após a hibridação as lâminas foram lavadas em: formamida 50% / 2XSSC quatro vezes por 5 minutos; 0,1XSSC a 60°C três vezes por 5 minutos; e em 4XSSC / 0,05% Tween 20.

- *Detecção da fluorescência*

As lâminas foram pré incubadas em tampão imunológico (5% Non Fat Dry Milk / 4XSSC) por 15 minutos, em câmara úmida à temperatura ambiente e lavadas com 4XSSC / 0,05% Tween 20.

A detecção da sonda biotinilada foi alcançada usando-se o complexo avidina-fluoresceína (FITC). Assim as lâminas foram incubadas com 5µg/ml de isotiocianato de fluoresceína (FITC) conjugada com avidina D diluída (1:1000 em 4XSSC, 5% leite desnatado) por 30 minutos, em câmara úmida no escuro. A amplificação do sinal foi conseguida incubando as lâminas com 5µg/ml de anti-avidina conjugada à biotina, por 30 minutos em câmara úmida no escuro e reincubando com avidina-FITC pelo mesmo período nas mesmas condições.

Após cada incubação as lâminas foram lavadas três vezes por 5 minutos com 4XSSC / 0,05% Tween 20.

Em seguida o material foi desidratado em gradiente crescente de etanol a 70%, 80% e 90%, por 5 minutos em cada passagem, e as lâminas contrainformadas com 30  $\mu$ l de solução de iodeto de propídeo (1 $\mu$ g/ml) associado à solução “antifade” (Vectashield) e finalmente montadas com lamínulas e seladas com esmalte de unha.

A análise das lâminas foi realizada em microscópio Zeiss, modelo Axiophot 2, com sistema de epifluorescência Zeiss dotado de lâmpada HBO 50 e sistema de filtros para FITC e Duplo para FITC e rodamina. Os dados anotados para cada caso foram o número total de núcleos, número de núcleos com 1, 2, 3, 4 ou 5 sinais. Procurou-se contar 500 núcleos por lâmina, desde que intactos e não sobrepostos. Sinais duplos ou pareados bem próximos foram contados como um único sinal.

RESULTADOS

A utilização de *imprints* de fígado provenientes de necropsias para FISH foi adequada, conseguindo-se em geral grande quantidade de células isoladas, não superpostas e íntegras. Não houve variação nestes aspectos em relação ao sexo, idade e tempo de morte (figuras 1, 2 e 3).

Todas as sondas foram previamente testadas em experimentos piloto com o mesmo protocolo, mostrando-se igualmente eficientes.

Nos casos onde utilizamos sonda para cromossomo X, o que esperávamos encontrar era um sinal em casos de pacientes do sexo masculino (casos nº 1, 2, 3, 4, 5) e dois sinais para pacientes do sexo feminino (casos nº 6, 7, 8), o que realmente foi confirmado com FISH (tabelas 1 e 2), indicando ausência de anomalias do cromossomo X nestes indivíduos.

No caso com suspeita de trissomia 18 (caso nº 9) esperávamos encontrar três sinais fluorescentes em cada núcleo, correspondentes aos três cromossomos 18, se o indivíduo realmente tivesse trissomia, ou 2 sinais se fosse normal. Nos casos com suspeita de trissomia 13 (caso nº 11) ou 21 (caso nº 10), esperávamos encontrar cinco sinais fluorescentes por núcleo, correspondentes a três cópias do cromossomo afetado e duas cópias do outro cromossomo normal, se os indivíduos tivessem trissomias ou 4 sinais se fossem normais. As trissomias 18 e 21 foram confirmadas por FISH (tabelas 1 e 2) e por cariótipo. No entanto para o caso 11, suspeito de trissomia 13, encontramos quatro sinais na maioria dos núcleos (64,8% e 62,2%) indicando que não se tratava de uma trissomia 13 (tabelas 1 e 2). O



cariótipo deste caso, realizado posteriormente, foi 46, XY, o que confirmou o resultado de FISH, tendo sido o diagnóstico final de pseudotrissomia 13.

Tabela 1. Resultados obtidos pela análise citogenética, método de FISH, em células obtidas por *imprint* de fígado fixadas com metanol-ácido acético 3:1

Nº caso	Sexo	Sonda	Total núcleos	% sinais por núcleo					
				0	1	2	3	4	5
1	M	X	533	6,2	93,8	0	0	0	0
2	M	X	631	20,8	79,2	0	0	0	0
3	M	X	518	0,8	96,5	2,7	0	0	0
4	M	X	625	15	80	5	0	0	0
5	M	X	520	3,8	96,2	0	0	0	0
6	F	X	592	5,2	1,5	84,5	0	8,8	0
7	F	X	550	9,1	0	85,1	0	5,8	0
8	F	X	632	19,8	0	79,1	0	1,1	0
9	M	18	521	0	0	4	96	0	0
10	M	21	208	43,8	0	0	0	0	56,2
11	M	13	500	2,2	3,2	7,8	20	64,8	2

Tabela 2. Resultados obtidos pela análise citogenética, método de FISH em células obtidas por *imprint* de fígado fixadas em etanol 95%

Nº caso	Sexo	Sonda	Total núcleos	% sinais por núcleo					
				0	1	2	3	4	5
1	M	X	540	7,4	92,6	0	0	0	0
2	M	X	542	6,8	92,2	1	0	0	0
3	M	X	531	5,8	94,2	0	0	0	0
4	M	X	711	25,9	70,3	3,8	0	0	0
5	M	X	529	4,5	94,5	1	0	0	0
6	F	X	772	28,1	5,7	64,8	1,4	0	0
7	F	X	357	55,2	00	33,6	11,2	0	0
8	F	X	742	31,7	0	67,3	0	1	0
9	M	18	186	12,9	0	11,3	75,8	0	0
10	M	21	181	18,8	0	14,9	0	0	66,3
11	M	13	500	5,6	4,2	7,2	18,8	62,2	2

Para avaliar a eficiência dos fixadores comparamos a porcentagem de núcleos com número de sinais esperados ou acima do esperado, para os dois fixadores (tabela 3), aplicando um teste não paramétrico (Wilcoxon) para amostras não pareadas, e assim, pudemos constatar que não houve diferença significativa entre os dois fixadores ( $W=30,0$ ;  $P=0,2754$ ).

Tabela 3- Porcentagem de núcleos com “número de sinais esperado ou acima do esperado” em *imprints* fixados com metanol-ácido acético e etanol 95%

Nº Caso	MA (%)	Etanol (%)
1	93	93
2	79	93
3	80	68
4	85	74
5	96	95
6	95	72
7	91	49
8	99	94
9	100	87
10	56	81
11	66	65,2

#### *Intensidade da marcação*

Não foram observadas diferenças na intensidade de marcação com qualquer uma das sondas ou dos tipos de fixadores.

#### *Presença de marcação inespecífica de fundo (background) X Pré-tratamento*

Lâminas fixadas tanto com metanol-ácido acético quanto com etanol 95% e sem pré-tratamento apresentavam elevada quantidade de *debris* celulares quando observadas ao microscópio de contraste de fase. Devido a isto, nos experimentos piloto, a aplicação de FISH foi prejudicada, chegando

a impossibilita a visualização dos núcleos durante a análise. Apesar de não quantificado, este problema era aparentemente maior nas lâminas fixadas com etanol 95%.

O tratamento com ácido acético a 70% por 40 segundos logo após a fixação do material e secagem da lâmina foi eficiente na eliminação de grande parte do *background* na maioria dos casos. Algumas lâminas, contudo, apresentaram ainda uma considerável quantidade de citoplasma mesmo com o pré-tratamento, o que deve ter dificultado a penetração da sonda, e, conseqüentemente, a contagem de núcleos com sinais. Isto aconteceu consideravelmente com a lâmina 7 fixada com etanol 95%.

#### *Quantidade de material obtida com imprints*

A quantidade de material presente nas lâminas de *imprints* foi suficiente para se contar no mínimo 500 núcleos por lâmina, na maioria dos casos. Porém houve algumas lâminas onde esta quantidade foi insuficiente. Isto aconteceu com o caso 7, com a lâmina fixada com etanol 95% (total de 357 núcleos); com o caso 9, também com a lâmina fixada com etanol 95% (total de 186 núcleos), e com o caso 10, com ambos os fixadores: etanol 95% (total de 181 núcleos) e metanol-ácido acético (total de 208 núcleos).

Figura 1- Resultados de FISH em células interfásicas obtidas por *imprint* de fígado com sondas  $\alpha$ -centromérica para o cromossomo X. **A** (caso 1), **B** (caso 2), **C** (caso 3), **D** (caso 4), **E** (caso 5): núcleos com presença de um sinal em indivíduos normais do sexo masculino; **F** (caso 6): núcleo com presença de 4 sinais (poliploidia de hepatócitos) em indivíduo normal do sexo feminino; **G** (caso 7): núcleo com presença de dois sinais em indivíduo normal do sexo feminino.

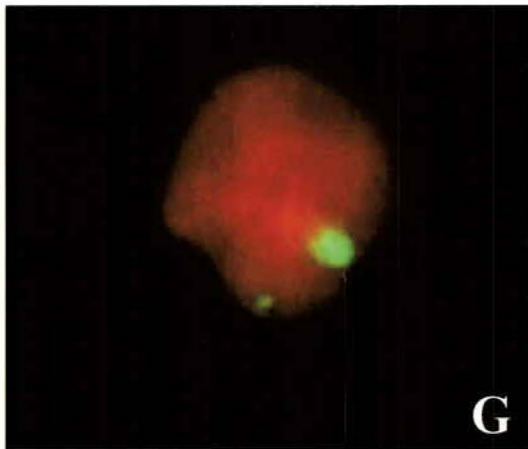
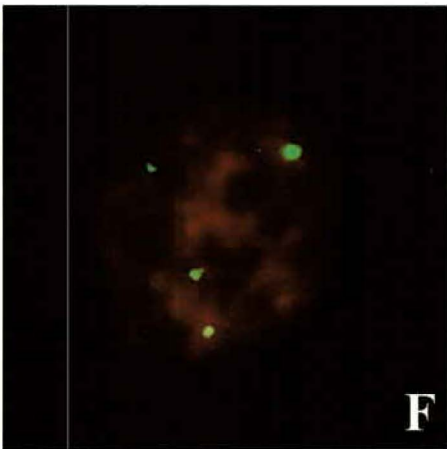
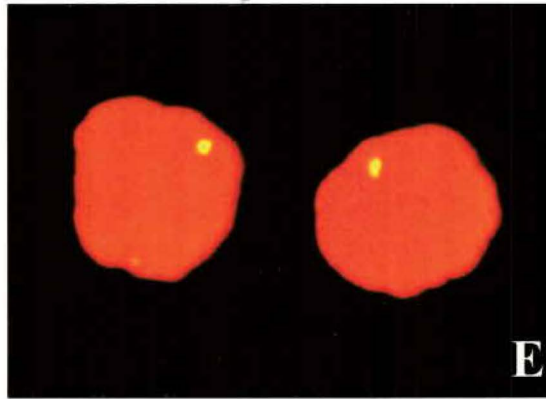
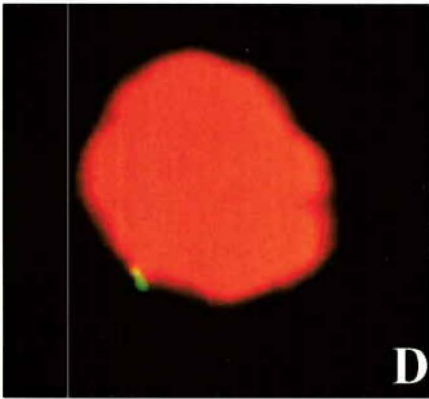
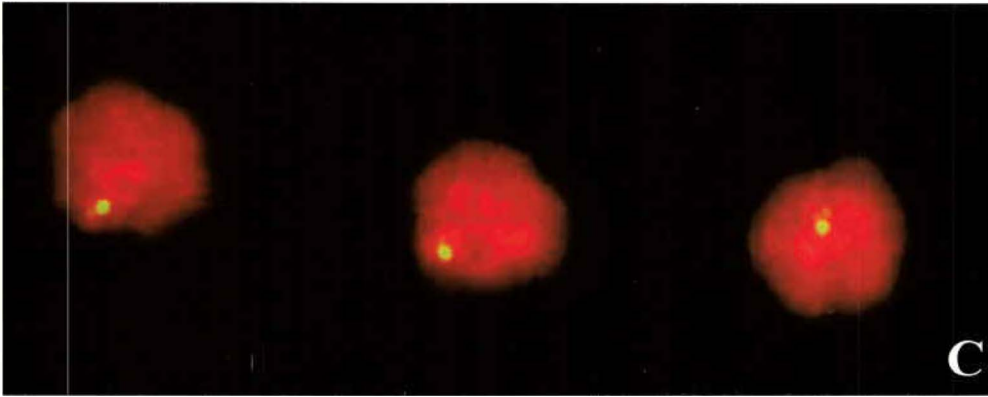
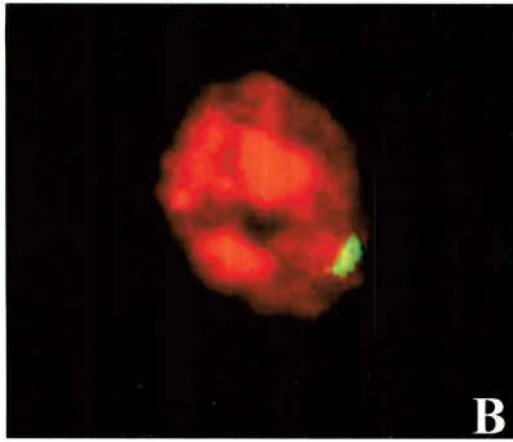
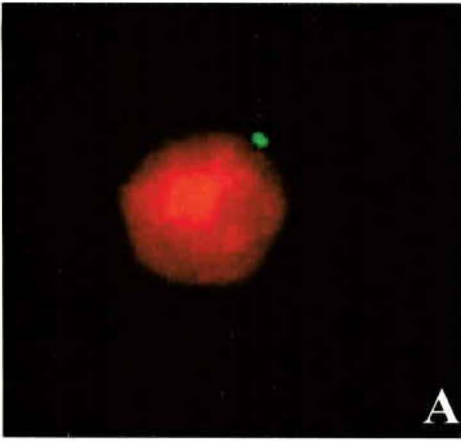


Figura 2- Resultados de FISH em células interfásicas obtidas por *imprint* de fígado com sonda  $\alpha$ -centromérica para o cromossomo 18, **A** e **B** (caso 9): núcleos com presença de três sinais em indivíduo com trissomia 18.

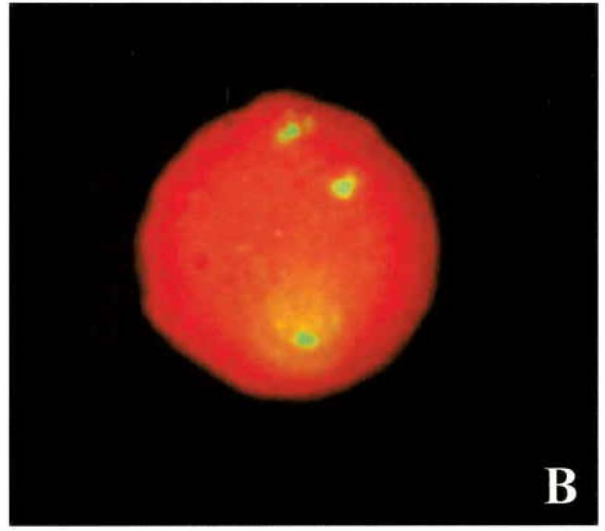
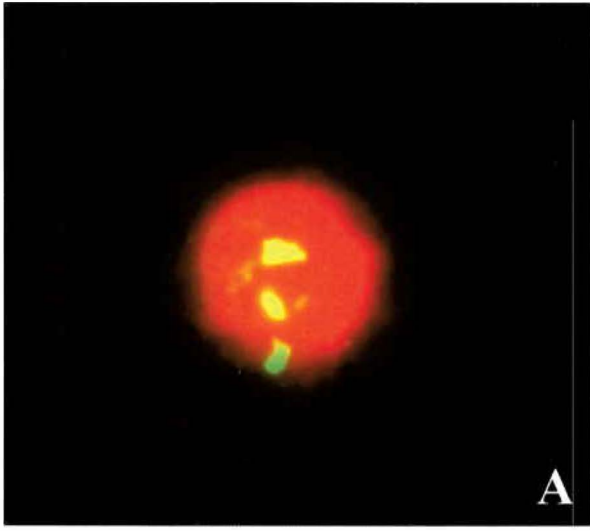
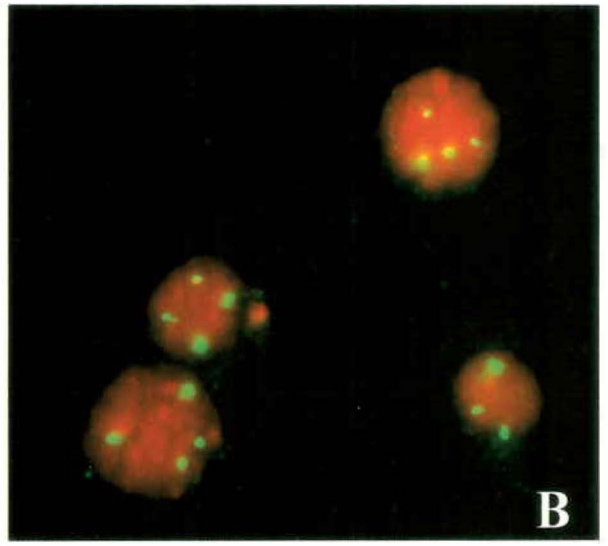
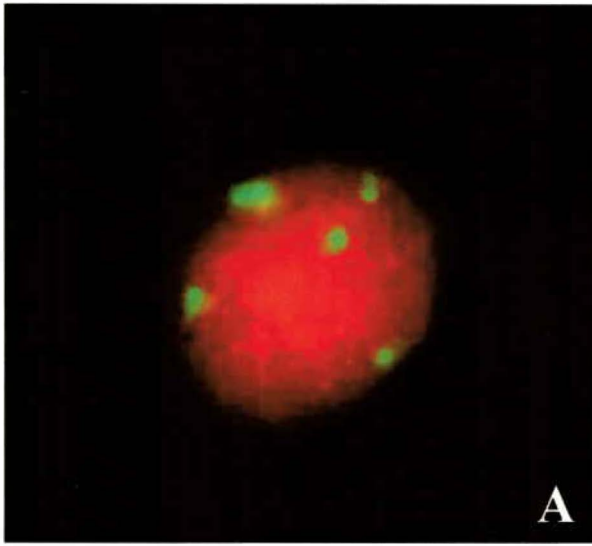


Figura 3- Resultados de FISH em células interfásicas obtidas por *imprint* de fígado com sondas  $\alpha$ -centroméricas para os cromossomos 13/21, **A** (caso 10): núcleos com presença de 5 sinais, correspondentes a dois cromossomos 13 e três cromossomos 21, em indivíduo com trissomia 21, e **B** (caso 11): núcleos com presença de 4 sinais, correspondentes a dois cromossomos 13 e dois cromossomos 21, em indivíduo com pseudotrissomia 13.





DISCUSSÃO

A crescente importância das anomalias congênitas como causa de mortalidade infantil (São Paulo, 2001), que em Ribeirão Preto constituem a primeira causa de morte pós-neonatal no primeiro ano de vida (Silva & Manco, 1998), e sua considerável proporção nas necropsias pediátricas, correspondendo a um quarto de todas as necropsias realizadas no HCFMRP-USP (Peres, 1995; Peres, 2000), vem requerendo a utilização de técnicas moleculares para a definição diagnóstica e posterior aconselhamento genético das famílias (Fejgin et al., 1996).

A citogenética convencional muitas vezes não produz resultados satisfatórios, seja pelo não crescimento da cultura celular, o que pode ocorrer pelo tempo elevado de morte ou contaminação (Bauld, 1974; Kuleshov, 1976, Keeling, 1987; Ortolan, 2001), seja porque as alterações estão abaixo da resolução óptica, como nas microdeleções. (Larson & Butler, 1995, Gopal et al., 1995). Por outro lado é pouco útil quando se deseja resultados rápidos (Pinkel, 1988). Tais dificuldades podem ser contornadas com a Hibridação *in Situ* Fluorescente (FISH), a qual permite a identificação de alterações numéricas ou estruturais, incluindo microdeleções, tanto em células metafásicas quanto interfásicas (Fejgin et al, 1996), constituindo-se em um método relativamente simples e rápido, muito embora oneroso como a citogenética convencional.

A importância da técnica FISH está justificada pela grande quantidade de casos na literatura demonstrando que a utilização de FISH na investigação de anomalias congênitas vem possibilitando a descoberta de alterações cromossômicas não detectadas pela citogenética convencional.

Sabe-se, por exemplo, que grande parte de casos diagnosticados como monossomia completa do cromossomo 21, depois de re-examinados com FISH, apresentaram translocações não balanceadas, como a translocação 18,21 demonstrada por Alkan et al. (2002) que afirma ser indispensável a utilização de FISH no diagnóstico de casos de monossomia do 21. Riegel et al. (2001) relatam outro caso inicialmente diagnosticado como monossomia do cromossomo 21 e que era, na realidade, uma monossomia parcial 21pTer-q22.2 e 11q24-qTer.

Nas Síndromes de Microdeleções, como Prader Willi e Angelman, em que a região cromossômica afetada pode ser menor que 2 milhões de pares de bases, FISH é o método de análise ideal (Larson & Butler, 1995; Gopal et al., 1995). Isto se deve ao fato de que esta técnica é capaz de detectar alterações de menos de 1 milhão de pares de bases (Gopal et al., 1995), enquanto que mesmo a análise cromossômica de bandeamento de alta resolução só detecta alterações em regiões maiores, com no mínimo 5 a 10 milhões de pares de base (Emanuel, apud Gopal, et al., 1995). Desta forma, esta última é incapaz de identificar grande parte das síndromes de microdeleções e por isso Gopal et al. (1995) e Bettio et al. (1995) recomendam que todos os pacientes suspeitos destas síndromes sejam analisados com FISH, além da citogenética convencional.

Tem sido descrito que o aparecimento de cromossomos em anel supra-numerários em humanos é associado a neoplasias, irradiação X e gama e anomalias congênitas (Cooke & George, apud Chen et al., 1995). O diagnóstico pré-natal ou em crianças costuma ser difícil devido à incerteza



da origem do cromossomo supranumerário (Chen & Harris, 1980). A utilização de FISH nestes casos ajuda a esclarecer tal origem (Bartsch & Schwinger, apud Chen et al., 1995), conduzindo a uma melhor correlação fenótipo-cariótipo e permitindo o reconhecimento de novas síndromes. (Chen et al., 1995).

A metodologia FISH é também extremamente importante no diagnóstico diferencial entre molas hidatiformes completas e incompletas e abortos hidrópicos, pois o prognóstico e a terapia são diferentes para cada um. O fato deste tipo de material ser, na maioria das vezes, impróprio para cultura celular e do diagnóstico baseado em aspectos histológicos ser muito difícil, demonstrado pela grande variabilidade entre diferentes observadores, torna a técnica FISH fundamental para a conclusão diagnóstica final (Van De Kaa, et al., 1991).

Apesar de tecnicamente ser possível realizar FISH em diferentes tecidos fixados e preparados de formas distintas, sabe-se que há muitas limitações para o uso de tecidos fixados em formol e emblocados em parafina (Xiao et al., 1995, Nasarek et al., 1995). A própria experiência do setor de Patologia Pediátrica do Departamento de Patologia da FMRP-USP tem evidenciado isto, o que motivou a busca de uma fonte de células adequada e de baixo custo representada pelo uso de *touch preparatives* ou *imprints*, como utilizado neste estudo com sucesso.

Os *imprints* oferecem as vantagens de apresentarem núcleos intactos, não cortados e com citomorfologia preservada, quando comparado com

cortes de tecidos e preparações nucleares (Taylor et al., 1994, Huang et al., 1999, Nasarek et al., 1995).

Apesar de serem utilizados, os cortes histológicos de tecidos emblocados em parafina apresentam maiores dificuldades para a penetração das sondas, além de favorecerem o aumento do *background* pela presença de citoplasma. Nos cortes histológicos, vários núcleos são seccionados em planos distintos, o que pode comprometer o resultado da reação, uma vez que as regiões cromossômicas alteradas podem ser perdidas (Werner et al., 1997, Xiao et al., 1995, Nasarek et al., 1995). No entanto, pelo fato de que muitos dos casos de interesse podem apresentar somente blocos de parafina arquivados, este método tem seu valor e não deve ser abandonado (Anastasi et al., 1990, Drut et al., 1992).

Para contornar os problemas gerados pelo citoplasma e núcleos seccionados, foram desenvolvidas técnicas de desagregação celular e isolamento nuclear, os quais podem ser submetidos ao exame pelo método FISH. Estes métodos podem tanto ser realizados em tecidos emblocados em parafina quanto em tecido a fresco ou congelado (Criado et al, 1995, Xiao et al., 1995, Calabrese et al., 1996).

A desagregação nuclear de tecidos emblocados em parafina requer vários passos, tais como desparafinização, hidratação *overnight*, digestão com pepsina, centrifugação e fixação, além de tratamento com proteinase K, como utilizado por Calabrese et al. (1996) para o diagnóstico de Síndrome de DiGeorge. O processo de desagregação dos núcleos em tecidos frescos ou congelados requer um menor número de etapas que o citado para tecidos

emblocados em parafina, mas ainda é mais trabalhoso se comparado aos *imprints*, necessitando de picotamento do fragmento de tecido, digestão com pepsina, centrifugação, fixação e tratamento com formol tamponado e série crescente de álcoois, conforme descrito por Xiao et al. (1995).

Além de ser um método mais trabalhoso, a desagregação nuclear tem o grande inconveniente de eliminar as características citológicas do material, impedindo que se possa definir com exatidão qual o tipo celular que apresenta a alteração. Isto pode ser um fator limitante no estudo de aberrações cromossômicas ou gênicas restritas a um tipo celular (Criado et al., 1995).

A utilização de *imprints* celulares para realização de FISH está bem documentada em diversos estudos de alterações genéticas em tumores (Xiao et al., 1995, Nasarek et al., 1995, Huang et al., 1999 e Dalrymple et al., 1995, McNamara et al., 1997, McManus et al., 1995, Verdoodt et al., 1994) e dos efeitos da fixação entre acetona e formol em células tumorais (Kapranos et al., 1997), porém não há relatos na literatura de sua utilização para diagnóstico das anomalias congênitas, como proposto e realizado no presente estudo.

Nossos resultados mostraram que a utilização dos *imprints* de fígado para FISH é adequada, não havendo diferenças em relação ao sexo, idade e tempo de morte, com ambos os fixadores utilizados. Além disto, a análise do material pode ser feita de forma relativamente rápida, sendo facilitada pelo fato de os núcleos estarem dispostos separadamente e em uma única



camada, além de estarem inteiros, o que aumenta a confiança no número de sinais encontrados por núcleo.

Em relação aos fixadores, a literatura nos mostra uma relativa variedade de possíveis fixadores para *imprints* de tecidos, tais como formol (Kapranos et al., 1997, DeRosa, et al., 1989), acetona (Merkel & Zimmer 1982), metanol (Darlymple, et al., 1995), paraformaldeído a 4% (Nasarek, et al., 1995), metanol:ácido acético (McNamara, et al., 1997, McManus, et al. 1995, Verdoot et al., 1994) e etanol (Xiao et al., 1995, Huang et al., 1999, e Oliveira et al., 2001).

Segundo Thompson et al. (1994), a fixação com formol aumenta a complexidade da estrutura e a condensação da cromatina, dificultando a penetração e a interação da sonda com o DNA alvo. Tal fato foi comprovado por Kapranos et al. (1997), que examinaram o efeito da fixação de *imprints* com acetona e formol, demonstrando que *imprints* fixados com formol mostravam poucos núcleos com fracos sinais de hibridação e que só apareceram após pré-tratamento com proteinase K, o que, por sua vez, prejudicou a morfologia celular. Por outro lado, os *imprints* fixados com acetona mostraram sinais intensos, sem necessidade de qualquer pré-tratamento, com preservação da morfologia celular. No entanto, a fixação com acetona traz inconvenientes por ser mais tóxica, irritante, altamente inflamável e de custo maior, principalmente se comparada ao etanol, como utilizado neste estudo.

O paraformaldeído a 4% é um bom fixador para morfologia, podendo ser utilizado inclusive para microscopia eletrônica (Nawab & Davies, 1989;

Silva et al., 2001). No entanto, é instável e por isso deve ser preparado pouco tempo antes do uso, o que o torna inconveniente neste aspecto. Adicionalmente, traz os mesmos problemas de *cross-links* com proteínas produzido pelo formol, não havendo assim vantagens do seu uso para as finalidades pretendidas neste estudo.

O metanol:ácido acético é um fixador comumente utilizado em citogenética, tem a capacidade de desnaturação de proteínas, de extração de histonas e de remover o citoplasma (Ronne et al., 1979). O etanol 95%, por sua vez, tem sido utilizado em diferentes investigações, mostrando-se adequado na preservação de características citomorfológicas e na qualidade do material cromossômico evidenciado por FISH (Xiao et al., 1995, Huang et al., 1999) e extração e amplificação do DNA (Ribeiro, 2002). Nossos resultados mostraram que não há diferenças nos resultados obtidos com ambos os fixadores, pois obtivemos sinais fortes e constantes com os dois. Devido ao fato do etanol 95% ser um fixador de menor custo e não necessitar de preparação, seu emprego parece ser o mais aconselhável.

Independentemente do tipo de fixador utilizado, a presença de citoplasma e de proteínas nucleares prejudica a penetração das sondas. Para contornar esta dificuldade, é conveniente que se faça um pré-tratamento das lâminas com proteinase K ou ácido acético (Huang, et al., 1999; Xiao et al., 1995; Nasarek et al., 1995). Neste estudo, pudemos constatar que o pré-tratamento com ácido acético proposto por Drut (1997) e por nós utilizado foi fundamental para aumentar a eficiência da reação, por isso passou a fazer parte do protocolo após a constatação de que muitas

das dificuldades observadas nos experimentos piloto foram contornadas com este procedimento. Outra constatação importante foi a de que as lâminas devem ser submetidas ao pré-tratamento logo em seguida à sua fixação e secagem, pois quando o tratamento foi feito em material envelhecido sua eficiência foi prejudicada. Utilizado no momento correto e na concentração estabelecida, o pré-tratamento não prejudica a aderência do material na lâmina. A perda de aderência, revelada pela formação de dobras e rugas, foi observada neste estudo quando se tentou recuperar lâminas envelhecidas com o aumento no tempo de tratamento ou na concentração do ácido acético.

Segundo Nasarek, et al., 1995, o pré-tratamento poderia ser melhorado com a utilização de proteinase K para facilitar o acesso da sonda. Em alguns dos casos deste estudo (lâminas 7 e 9 fixadas com etanol 95%), observamos que a penetração da sonda ficou prejudicada mesmo com o pré-tratamento com ácido acético, o que possivelmente teria melhorado com o uso da proteinase K. No entanto, Kapranos et al. (1997) desaconselham este procedimento, pois em seus estudos estes autores notaram que a proteinase K causa danos à morfologia celular.

Durante a análise do material, procuramos contar no mínimo 500 núcleos por lâmina, o que foi possível na maioria dos casos. Porém em algumas lâminas não havia número suficiente de núcleos para a contagem de 500. Isto aconteceu com 3 lâminas fixadas com etanol 95% e apenas uma fixada com metanol-ácido acético (as lâminas: 7 fixada com etanol 95%, 9 fixada com etanol 95%, e 10 fixada com etanol 95% e metanol-ácido

acético). Este fato pode ser devido à aderência inadequada do material à lâmina (Polack & McGee, 1992), pois quando a mesma é colocada no fixador há uma certa perda de material, notada pela turvação do líquido. Tal problema poderia ser contornado aguardando-se alguns segundos antes de se colocar as lâminas no fixador para garantir uma adesão das células ao vidro (Bauer et al., 1990; Blumenfeld et al., 1998).

O fígado foi escolhido como fonte do DNA alvo a ser estudado, pois é um órgão que está presente na absoluta maioria das necropsias pediátricas, o que nem sempre acontece com outros órgãos, além do fato de nos fetos e neomortos conter células epiteliais e hematopoiéticas (Zanjani et al., 1993).

Deve-se lembrar que o fígado de mamíferos apresenta, caracteristicamente, hepatócitos poliplóides (Brodsky et al., 1977), fato importante na interpretação dos achados tanto da citogenética quanto do FISH. No presente estudo, foram identificadas células com número de sinais maior do que o esperado, justificado por este fato. Kudryatvtev et al (1993) realizaram um aprofundado estudo com o objetivo de examinar as mudanças de ploidia em fígados humanos durante diferentes períodos de vida: período pós-natal, período de desenvolvimento ou de crescimento (0-20 anos), período reprodutivo ou maturidade (21-50 anos) e senilidade (mais de 51 anos). Estes autores demonstraram que durante a fase de crescimento a maioria dos hepatócitos é mononuclear diplóide. Em recém-nascidos, 95% dos hepatócitos são 2C, ou seja, contém a quantidade de cromatina de uma célula diplóide, e até o final do período de crescimento estas células representam 90% dos hepatócitos. Porém, hepatócitos binucleados, com

cada núcleo diplóide ( $2C \times 2$ ), já estão presentes no fígado no período embrionário. A quantidade de hepatócitos  $2C \times 2$  aumenta vagarosamente após o nascimento, alcançando a representação de 7,1% por volta dos 16 a 20 anos. Hepatócitos poliplóides  $4C$ ,  $4C \times 2$  e  $8C$  não excedem 3 a 4% no final do período de crescimento. É possível que pelo menos alguns hepatócitos  $4C$  no recém-nascido sejam na verdade hepatócitos  $2C$  na fase  $G2$  do ciclo celular. Após o período de desenvolvimento as mudanças na população de hepatócitos são caracterizadas pelo lento decréscimo de células  $2C$  e lento aumento de células poliplóides. O número relativo de células tetraplóides aumenta de 2,1% para 5,8% durante o período reprodutivo. Neste período a ploidia celular predominante é  $2C \times 2$ . O grau de poliploidização celular aumenta, principalmente no envelhecimento, passando então os hepatócitos poliplóides e binucleados a representar cerca de metade das células do fígado. As células binucleadas  $2C \times 2$  duplicam imediatamente após os 50 anos e o número de células tetraplóides ou de maior ploidia (chegando até a  $16C$ ), também aumenta rapidamente entre 51 e 55 anos. Baseando-se nestes resultados, podemos concluir que o número de células poliplóides encontradas nas necropsias pediátricas deverá ser pequeno, em torno de 4%, pois a maior parte dos óbitos pediátricos ocorre no período perinatal, como demonstrado pela casuística do HCFMRP-USP (Peres, 2000). No entanto é preciso levar em conta esta característica dos hepatócitos quando se lidar com crianças maiores e adultos.

CONCLUSÃO

1- Neste trabalho pudemos constatar que os *imprints* se mostraram uma forma adequada de preparação celular para análise cromossômica por citogenética molecular (FISH), sendo fáceis e rápidos de serem coletados, apresentando núcleos em número suficiente para a análise interfásica, separados, dispostos em uma única camada e íntegros, o que propiciou uma análise relativamente rápida e bastante confiável.

2- Não houve diferença quanto à eficiência dos dois fixadores utilizados, portanto o emprego do etanol 95% poderia ser justificado por se tratar de um fixador de menor custo e mais prático, não necessitando de preparação.

3- O pré-tratamento com ácido acético 70% logo após a fixação e secagem das lâminas foi essencial para a realização da técnica de FISH, devendo ser adotado.

4- O protocolo final proposto de coleta e preparação das amostras de *imprints* de fígado para FISH é o seguinte:

1. Obter um fragmento de fígado de 4 x 3 x 0,5 cm;
2. Lavar por 1 minuto em solução salina;
3. Secar ao ar a superfície de corte;
4. Fazer *imprints* da superfície de corte do fígado em lâmina de vidro nova e limpa, previamente identificada;
5. Secar a lâmina ao ar por 30 segundos;
6. Colocar a lâmina em etanol 95% por 10 minutos;
7. Secar ao ar;
8. Mergulhar as lâminas em ácido-acético 70% por 40 seg.;
9. Lavar em água destilada 2 vezes, por um minuto cada;
10. Desidratar o material das lâminas em uma seqüência crescente de álcoois 70%, 80% e 90%;

11. Secar ao ar;
12. Embrulhar a lâmina individualmente em filme de polipropileno;
13. Armazenar as lâminas em geladeira ou à temperatura ambiente em local apropriado, seco e ao abrigo da luz, até ser processado pelo método de FISH.



**ANEXO**

Tab. 4-Dados das necropsias

Caso	Nº da necropsia	Registro no HC	Iniciais	Sexo	Idade	Tempo de Morte	Cariótipo	Diagnósticos
1	HC114/02	0587868 K	J.B.V.	M	73 anos	8 horas	Não	IA: Infarto agudo do miocárdio IB: Oclusão de óstio coronária E IC: Trombose valva aórtica ID: Endocardite bacteriana em tratamento II: Hipertensão arterial sistêmica/ Insuficiência renal crônica
2	HC 148/02	0597747 E	R.N. de F.J.N.	M	2 dias	5 horas	Não	IA: Rabdomiomas cardíacos IB: Esclerose tuberosa
3	HC 182/02	0584653 I	B.E.	M	72 anos	4 horas	Não	IA: Pneumonia bilateral IB: Acidente vascular cerebral hemorrágico IC: Hipertensão arterial descompensada ID: Aterosclerose sistêmica grave
4	HC 153/02	0377438 A	J.P.F.	M	44 anos	3 horas	Não	IA: Hipertensão intracraniana IB: Edema cerebral IC: Acidente Vascular Cerebral isquêmico á direita ID: Aneurisma cerebral gigante, operado II:Enfisema centrolobular/ Pneumonia basal bilateral
5	HC 155/02	0598376 H	R.N. de J.A.O.	M	23 min	13 horas	46 XY	IA: Anóxia neonatal IB: Exencefalia

continua

Tab. 4- Dados das necropsias

continuação

6	HC 165/02	0333015 D	A.M.B.	F	86 anos	4 horas	Não	IA: Peritonite purulenta IB: Piométrio com perfuração do fundo uterino IC: Endometrite purulenta ID: Carcinoma do endocérvix II: Pielonefrite crônica bilateral/ Aterosclerose sistêmica grave
7	HC 179/02	0530103 F	B.R.O.	F	41 anos	8 horas	Não	IA: Necrose de alças intestinais IB: Trombose mesentérica IC: Esclerose sistêmica progressiva
8	HC 149/02	0597571 J	S.J.G.	F	57 anos	3 horas	Não	IA: Estado pós-cirúrgico IB: Hemorragia digestiva alta IC: úlcera péptica crônica duodenal, operada ID: Hipertensão arterial essencial/ Diabetes mellitus/ obesidade
9	HC 223/02	0594990 D	L.S.R.	M	2 meses	7 horas	47 XX +18	IA: Pneumonia IB: Comunicação interventricular IC: Cardiopatia congênita ID: Trissomia 18
10	HC 266/02	0590034 H	P.R.O.	M	5 meses	3 horas	47,XY +21	IA: Pneumonia IB: Canal AV total IC: Síndrome de Down
11	HC 269/02	0606293 K	R.N. de L.A.O.	M	5 min	40 minutos	46,XY	IA: Anóxia neonatal IB: Hipoplasia pulmonar bilateral IC: Hérnia diafragmática D ID:Pseudotrissomia 13

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERMAN, E. D.; CREASY, M. R. Frequency of chromosomal abnormalities in miscarriages and perinatal deaths. **J Med Genet**, v.14, p.313-5, 1977.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**. 3º ed. Porto Alegre: Artes Medicas, 1997.

AL-GAZALI L. I.; DAWODU H. Á.; SABARINATHAN K.; VARGHESE M. Profile of major congenital abnormalities in the United Arab Emirates (UAE) population. **J Med Genet**, v.32, p.7-13, 1995.

ALKAN, M.; RAMELLI, G. P.; HIRSIGER, H.; KESE, I.; REMONDA, L.; BÜHLER, E. M, MOSER, H. Presumptive monosomy 21 with neuronal migration disorder rediagnosed as de novo unbalanced translocation t(18p;21q) by fluorescence in situ hybridization. **Genetic Counseling**, v.13, n.2, p.151-6, 2002.

ANASTASI, J.; LE BEAU, M. M.; VARDIMAN, L. W.; WESTBROOK, C. A. Detection of Numerical Chromosomal Abnormalities in Neoplastic Hematopoietic Cells by In situ Hybridization with a Chromosome –Specific Probe. **Am J Pathol**, v.136, n.1, p.131-9, 1990.

AUBELE, M.; ZITZELSBERGER H.; SZÜZS, S.; WERNER, M.; BRASELMANN, H.; HUTZLER, P.; RODENACKER, K.; LEHMANN. L.; MINKUS, G., HÖFLER, H. Comparative FISH analysis of numerical chromosome 7 abnormalities in 5 µm and 15 µm paraffin embedded tissue sections from prostatic carcinoma. **Histochem Cell Biol**, v.107, p.121-6, 1997.

BAUER, T; TUBBS, R; EDINGER, m. G.; SUIT, P. F.; GEPHARDT, G. N.; LEVIN, H. S. A prospective comparison of DNA quantitation by image and flow cytometry. **Am. J. Clin. Pathol.** V.93, p.322-6,1990.

BAULD, R.; SUTHERLAND, G.R.; BAIN, A.D. Chromosome studies in investigation of stillbirths and neonatal deaths. **Arch Dis Child.** V.49, p.182-8, 1974.

BARTSCH, O.; SCHWINGER, E. A simplified protocol for fluorescence in situ hybridization with repetitive DNA probes and its use in clinical cytogenetics. **Clin Genet**, v.40, p.47-56, 1991.

BETTIO, D.; RIZZI, N.; GIARDINO, D.; GRUGNI, G.; BRISCIOLI, V.; SELICORNI, A.; CARNEVALE, F.; LARIZZA, L. FISH analysis in Prader-Willi and Angelman syndrome patients. **Am J Med Genet.** v.56, n.2, p.224-8, 1995.

BLUMENFELD, W.; HASHMI, N.; SAGERMAN, P. Comparison of aspiration, touch abd scrape preparations simultaneously obtained from surgically excised specimens-effect of different methods of smear preparation on interpretive cytologic features. **Acta Cytol.** v.42, n.6, p1414-8, 1998.

BIRREN, B.; GREEN, E. D.; HIETER, P.; KLAPHOLZ, S.; MYERS, R. M.; RIETHMAN, H.; ROSKAMS, J. **Genome Analysis: a Laboratory Manual.**, New York, Cold Spring Harbor Laboratory , 1998.

BOUÉ A, BOUÉ J, GROOP A. Cytogenetics of pregnancy wastage. **Adv Human Genet**, v.14, p.1-57, 1985.

BRANDT, C. A.; LYNGBYE, T.; PEDERSEN, S.; BOLUND, L.; FRIEDRICH, U. Value of chromosome painting in determining the chromosomal outcome in offspring of a 12;16 translocation carrier. **J Med Genet.** 31:234-237, 1994.

BRODSKY, W. Y.; URYVAEVA, I.V. Cell polyploidy: its relation to tissue and function. **Int Ver Cyto**, v.50, p. 232-275-, 1977.

BROWN, S.; WARBURTON, D. Recurrent abortion: genetic and other non-immune factors. In: REED, G.B.; CLAIREAUX, A.E.; COCKBURN, F. **Diseases of the fetus and newborn: pathology, imaging, genetics and manegement.** London: Chapman & Hall Medical, 1995. p.167-173.

BUROKER, N.; BESTWICK, R.; HAIGHR, G.; MAGENIS, R. E.; LITT, M. A. hypervariable repeated sequence on human chromosome 1p36. **Human Genet.** v.77, p.175-81, 1987.

CALABRESE, G.; MINGARELLI, R.; FRANCALANCI, P.; BOLDRINI, R.; PALKA, G.; BOSMAN, C.; NORELLI, G.; DALLAPICCOLA, B. Diagnosis of DiGeorge síndrome in nuclei released from archival autoptic heart specimens using fluorescence in situ hybridization. **Human Genet**, v.97, p.414-17, 1996.

CHEN, H.; TUCK-MULLER, C. M.; BATISTA, D. A. S.; WERTELECKI. W. Identification of supranumerary ring chromosome 1 mosaicism using fluorescence in situ hybridization. **Am J Med Genet**, v.56, n.2, p.216-23, 1995.

CHEN, H.; HARRIS, H. Prenatal diagnosis in the presence of an extra small chromosome in amniotic cell cultures. **Ann Genet**, v.23, p.97-9, 1980.

COSTA, M.; ZHITKOVICH, A.; HARRIS, M.; PAUSTERIBACH, D.; GARGAS, M. DNA-protein-cross-links produced by various chemicals in cultured human lymphoma cells. **J Toxicol Envirom Health**, v.50, n.5, p.433-49, 1997.

CREASY, M. R.; CROLLA, J. A.; ALBERMAN, E. D. A cytogenetic study of human spontaneous abortions using banding techniques. **Human Genet**,v. 31, p.177-96, 1976.

CREMER, T.; LANDEGENT, J.; BRUCKNER, A.; SCHOLL, H. P.; SCHARDIN, M.; HAGER, H. D.; DEVILEE, P.; PEARSON, P.; PLOEG, M.; VAN D.E.R. Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. **Human Genet**, v.74, p.346-52, 1986.

CRIADO, B.; BARROS, <sup>a</sup>; SUIJDERBUIJD, R. F.; WEGHUIS, D. <sup>o</sup>; SERUCA, R.; FONSECA, E.; CASTEDO, S. Detection of Numerical Alterations for Chromosomes 7 and 12 in Benign Thyroid lesions by in Situ Hybridization. **Am J Pathol**, v 147, n.1, july,1995.

DALRYMPLE, S.J.; HERATH, J. F.; RITLAND, S. R.; MOERTEL, C.A.; JENKINS, R. B. Use of fluorescence in situ hybridization to detect loss of chromosome 10 in astrocytomas. **J Neurosurg**, v. 83, p.316-23, 1995.

DEROSA, C. M.; OZZELLO, L.; HABIF, D. V.; KONRATH, J. G.; GREENE, G. L. Immunohistochemical assessment of estrogen and progesterone receptors in stored imprints and cryostat sections of breast carcinomas. **Ann Surg**, v. 210, n.2, p.224-8, 1989.



DEVILEE, P.; KEIVITS, T.; WAYE, J. S.; PEARSON, P. L., WILLARD, H. F. Chromosome-specific alpha satellite DNA: isolation and mapping of a polymorphic alphoid repeat from human chromosome 10. **Genomics**, v.3, p.1-7, 1988.

DÖHNER, H.; POHL, S.; BUGAY-MPRSCHEL, M.; STILGENBAUER, S.; BENTZ, M.; LICHTER, P. Trisomy 12 in chronic lymphoid leukemias- a metaphase and interphase cytogenetic analysis. **Leukemia**, v.7, p.516-20, 1993.

DRUT, R. M.; HARRRIS, C. P.; DRUT, R.; MEISNER, L. Use of fluorescence in situ hybridization to detect trisomy 13 in archival tissues for cytogenetic diagnosis. **Pediatric Pathol**, v.12, p.799-805, 1992.

DRUT M. Introduccion a la citogenética del nucleo en interfase. La Plata, 1997 / mimeografado.

EMANUEL, B. S. The use of fluorescence in situ hybridization to identify human chromosome anomalies. **Growth, Genteics and Hormones**, v.9, p.6-12, 1993.

FEIJIN, M. D.; KIDRON, D.; KEDAR, I.; ELENA, G.; TEPPER, R.; YORAM, B.; AMIEL, A. Genetic diagnosis from formalin-fixed fetal tissue using FISH: anew tool for genetic counseling in subsequent pregnancies. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.64, n.2, p.:221-24, 1996.

GOPAL RAO, V.V.N.; ROOP, H.; CARPENTER, N. Diagnosis of Microdeletion Syndromes: high –relolution chromosome analyses versus fluorescence in situ hybridization. **Am J Med Sci**, v.309, n.4, p.208-12, 1995.

GREIG, G. M.; ENGLAND, S. B.; BEDFORD, H. M.; WILLARD, H. F. Chromosome-specific alpha satellite DNA from the centromere of human chromosome 16. **Am J Human Genet**, v.45, p.862-72,1989.

HERRINGTON, D. S.; McGEE, J. Interphase cytogenetics. **Biochem Res**, v.15,p.467-74,1990.

HOBBS, C. A.; CLEVES, M., A.; SIMMONS, C., J. Genetic Epidemiology and Congenital Malformations. **Arch Pediatr Adolesc Med**. v.156, apr, p. 315-20, 2002.

HOPMAN, A. H.; VAN HOOREN, E.; VAN DE KAA, D.; VOOIJS, P. G.; RAMAEKERS, F. C. Detection of numerical chromosome aberrations using in situ hybridization in parafin sections of routinely processed bladder cancers. **Mod Pathol**, v.4, p.503-13, 1991.

HUANG, S. F.; HSU, H.C.; FLETCHER, J. A. Investigation of chromosomal aberrations in hepatocellular carcinoma by fluorescence in situ hybridization. **Cancer Genet Cytogenet**, v.111, p.21-7, 1999.

JANZ, M.; DE LEEUW, B.; WEGHUIS, D.O.; WERNER, M.; NOLTE, M.; VAN KESSEL, A. G.; NORDHEIM, A.; JIPSDIND, R. A. Interphase cytogenetic analysis of distinct X-chromosomal translocation break-points in synovial sarcoma. **J Pathol**, v.175, p.391-6, 1995.

JACOBS, P. A.; 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**. v. 29, n. 2, p. 103-8, 1992.

KAPRANOS, N.; KONTOGEORGOS, G.; KONSTANTINA, F.; KOKKA, E. Effect of fixation on interphase cytogenetic analysis by direct fluorescence in situ hybridization on cell imprints. **Biotech Histochem**, v.72, n.3, p.148-51, 1997.

KEELING, J. W. The perinatal autopsy. In: **Fetal and neonatal pathology**. London: Springer-Verlag, 1987, p.1-43.

KUDRYAVTSEY, B. N.; KUDRYAVTSEYA, M. V.; SAKUTA, G. A.; STEIN, G. I. Human hepatocyte polyploidization kinetics in the course of life cycle. **Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol**, v.64, n.6, p.387-93, 1993.

KULESHOV, N. P. Chromosome anomalies of infants dying during the perinatal period and premature newborn. **Human Genet**, v.31, p.151-60, 1976.

LARSON, R.S.; BUTLER, M. G. Use of fluorescence in situ hybridization (FISH) in the diagnosis of DiGeorge sequence and related diseases. **Diagn Mol Pathol**, v.4, n.4, p.274-8, 1995.

LAXOVA , R. **Prenatal diagnosis**. In: GILBERT-BARNESS, E. **Potter's Pathology of the fetus and infant**. Mosby-Year Book, 1997. p.182-240.

MCFADDEN, D. E.; FRIEDMAN, J. M. Chromosome abnormalities in human beings. **Mutat. Res.** v. 396, n.1,2, p. 129-40, 1997.

MC GEE, O. D. J.; ISAACSON, P. G.; WRIGHT, N. A. **Oxford textbook of pathology**. Student Ed, New York: Oxford University, 1992. v. 1

MCNAMARA, M.; FELIX, C.; DAVISON, E. V.; FENTON, M.; KENNEDY, S. M. Assessment of chromosome 3 copy number in ocular melanoma using

fluorescence in situ hybridization. **Cancer Genet Cytogenet**,; v.98, n.1, p.4-8, Oct, 1997.

MCMANUS, A. P.; GUSTERSON, B. A.; PINKERTON, C. R.; SHIPLEY, J. M. Diagnosis of Ewing's sarcoma and related tumours by detection of chromosome 22q12 translocations using fluorescence in situ hybridization on tumour touch imprints. **J Pathol**, v.176, n.2, p.137-42, jun, 1995.

MERKE, L. K. H.; ZIMMER, M. The immunoperoxidase method for rapid diagnosis of Herpes simplex encephalitis (HSE) using touch preparations. **Am J Clin Pathol**, v.77, n.5, p.605-7, 1982.

MOYZIS, R. K.; BUCKINGHAM, J. M.; CRAM, L. S.; DANI, M.; DEAVEN, L. L.; JONES, M.D.; MEYNE, J.; RATLIFF, R. L.; WU, J. R. A highly conserved repetitive DNA sequence (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.85, p.6622-6, 1988.

NAGAO, K.; ITO, H.; YOSHIDA, H.; MINAMIZAKI, T.; FUFUSE, K.; YOSHIKAWA, T.; USHIGOME, S. Chromosomal rearrangement t(11;22) in extraskeletal Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumour analysed by fluorescence in situ hybridization using paraffin- embedded tissue. **J Pathol**, v.181, p.62-6, 1997.

NASAREK, A.; WERNER, M.; NOLTE, M.; KEMPNAUER, J.; GEORGII, A. Trisomy 1 and 8 occur frequently in hepatocellular carcinoma but not in liver cell adenoma and focal nodular hyperplasia. A fluorescence in situ hybridization study. **Virchows Arch**, v.427, p.373-8, 1995.

NAWAB, M. D.; DAVIES, D. R. Light and electron microscopic demonstration of extracellular immunoglobulin deposition in renal tissue. **J Clin Pathol.** v. 42, n.10, p.1104-8, 1989.

OLIVEIRA, K.; HAASE, G.; KURTZMAN, C.; HYLDIG-NIELSEN, J.J.; STENDER, H. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by fluorescent in situ hybridization with peptide nucleic acid probes. **J. Clin. Microbiol**, v.39, p.4138-41, 2001.

OPTIZ, J. M.; WILSON, G. N. Causes and pathogenesis of birth defects. In: GILBERT-BARNES E. (Editor) *Potter's Pathology of the fetus and infant*, Mosby Year Book, Inc., 1997, p. 44-64.

ORTOLAN, D. **Estudo citogenético em crianças com anomalias congênitas submetidas à necropsia no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, no período de novembro de 1996 a novembro de 1999.** 2001. 130p. Dissertação Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

PENCHASZADEH, V.B. Frequency and characteristics of birth defects admissions to a pediatric hospital in Venezuela. **Am J Genet**, v.3, p.356-69, 1979.

PERES, L. C.; FERRAZ, V. E. F.; ACOSTA, A. C.; ROJAS, M. V. M.; NOCE, T. R.; PINA NETO, J. M. Estruturação de um serviço de Patologia Pediátrica: a importância do trabalho conjunto entre Genética Médica e Patologia. **Rev. Med. Minas Gerais**, v.5, n.2, p.67, 1995.

**PERES, L. C. Criação de um banco de dados de necropsias pediátricas realizadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo no período de abril de 1993 a abril de 1999.** 2000. 278p. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

**PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W.** Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity fluorescence hybridization. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.83, p.2934-38, 1986.

**PINKEL, D.; LANDEGENT, J.; COLLINS, C.** Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy of 21 and translocations of chromosome 4. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.85, p.9138-42, 1988.

**PIRAM, A. Determinação de risco de recorrência em pacientes com anomalias congênitas submetidos a necropsia no HCFMRP-USP.** 2000. 194p. Dissertação Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

**RIBEIRO, C. N. M. Extração e Quantificação de DNA de células obtidas por imprints e raspados de fígado.** 2002. 41p. Dissertação Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

**RIEGEL, M.; BAUMER, A.; PIRAM, A.; ORTOLAN, D.; PERES, L. C.; PINA-NETO, J. M.** De Novo unbalanced t(11q;21q) leading to a partial monosomy 21 pter-q22.2 and 11q24-qter in a patient initially diagnosed as monosomy 21. **Genetic Counseling**, v.12, n.1, p.69-75, 2001.

RONNE, M.; ANDERSEN, O.; ERLANDSEN, M. Effect of colcemid exposure and methanol acetic acid fixation on human metaphase chromosome structure. **Hereditas**, v.90, p.195-201, 1979.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Estado de Saúde. (SES-SP). **Dados de morbi-mortalidade**. Disponível em:<<http://www.saude.sp.gov.br>>. Acesso em: 12 ago. 2002.

SEASHORE, M. R. Chromosomal abnormalities in the newborn period. **Semin Perinatol.** v. 17, n. 5, p. 312-7, 1993.

SHEPARD, T. H. Human teratogenicity. **Adv Pediatric** 33:225- 332, 1986.

SHIDAM, V. B.; BRAVID, N. V.; GROVER, S.; KHER, A. V. Role of Scrape Cytology in rapid intraoperative diagnosis- Value and Limitations. **Acta Cytol.** V.28, n.4, p.477-82, 1984.

SHIPLEY, J.; CREW, J.; VIRDSALL, S.; GILL, S.; CLARK, J.; FISHER, C.; KESEY, A.; NOJIMA, G.; SONOBE, H.; COOPER, C.; GUSTERSON, B. Interphase fluorescence in situ hybridization and reverse transcription polymerase chain reaction as a diagnostic aid for synovial sarcoma. **Am J Pathol**, v.148, p.559-67, 1996.

SILVA, C.; AVELINO, A.; SOUTO-MOURA, C.; CRUZ, F. A light and electron microscopic histopathological study of human bladder mucosa after intravesical resiniferatoxin application. **BJU Int**, v.88, n.4, p.355-60, 2001.

SILVA, J. M.; MANÇO, A. R. X. **Aspectos epidemiológicos da mortalidade infantil em Ribeirão Preto**. Informativo Epidemiológico de Ribeirão Preto, Ano II, n.24, 1998.

TAYLOR, C. P. F.; MCGUCKIN, A. G.; BOWN, N. P.; REID, M. M.; MALCOLM, A. J.; PEARSON, A. D.J.; SHEER, D. Rapid detection of prognostic genetic factors in neuroblastoma using fluorescence in situ hybridization on tumour imprints and bone marrow smears. **Br J. Cancer**, v.9, p.445-51, 1994.

TEO, I. A.; SHAUNAK, S. PCR in situ: aspects which reduce amplification and generate false positive results. **Histochem J**, v.27, n.9, p.660-9, 1995.

THOMPSON, C. T.; LeBOIT, P.E.; NEDERLOF, P.M.; GRAY, J. W. Thick-section fluorescence in situ hybridization on formalin-fixed paraffin-embedded archival tissue provides a histogenetic profile. **Am J Pathol**, v.144, p.237-43, 1994.

TKACHUK, D. C.; WESTBROOK, C. A.; ANDREEF, M.; CONLON, T. A.; CLEARY, M.L.; SURYANARAYAN, K.; HOMBGE, M.; REDNER, A.; GRAY, J.; PINKEL, D. Detection of bcr-abl fusion in chronic myelogenous leukemia by in situ hybridization. **Science**, v.250, p. 559-62, 1990.

TRASK, B.J.; ALLEN, S.; MASSA, H.; FERTITTA, A.; SACHS, R.; VAN DEN ENGH, G.; WU, M. Studies of metaphase and interphase chromosomes using fluorescence in situ hybridization. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v.58, p.767-75; 1993.

TRASK, B. J. Fluorescence In Situ Hybridization. In: BIRREN, B.; GREEN, E. D.; HIETER, P.; KLAPHOLZ, S.; MYERS, R. M.; RIETHMAN, H.; ROSKAMS, J. Editors. **Genome Analysis – a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1998. v.4, p 303-17.



TRIBE, C. R. Cytological diagnosis of breast tumors by the imprint method. **J Clin Pathol**, v.18, p.31-9, 1965.

VAN DE KAA, C. A.; NELSON, K. A. M.; RAMAEKERS, F. C. S.; VOOIJS, P. G.; HOPMAN A. H. N. Interphase cytogenetics in paraffin sections of routinely processed hydatiform moles and hydropic abortions. **J Pathol**, v.165, p.281-7, 1991.

VAN DEKKEN, H.; BAUMANN, J. G. J. A new application of in situ hybridization: detection of numerical and structural chromosome aberrations with a combination centromeric-telomeric DNA probe. **Cytogenet Cell Genet**, v.78, p.251-9, 1989.

VERDOODT, B.; CASTELAIN, P.; BOURGAIN, C.; KIRSCH-VLODERS, M. Aneuploidy for chromosome 1 and overall DNA content in benign and malignant breast disease. **Cancer Genet Cytogenet**. v.78, n.1, p.53-63, nov, 1994.

VICTORIA, C., G.; BARROS, F., C. Infant mortality due to perinatal causes in Brazil: trends, regional patterns and possible interventions. **São Paulo Med J/ Rev Paul Med**. V. 119, n 1, p. 33-45, 2001.

WAYE, J. S.; WILLARD, I. I. F. Structure, organization and sequence of alpha satellite DNA from human chromosome 17: evidence for evolution by crossing-over and an ancestral pentamer repeat shared with the human X chromosome. **Mol Cell Biol**, v.6, p.3156-65, 1986.

WAYE, J. S.; ENGLAND, S. B.; WILLARD, H. F. Genomic organization of alpha satellite DNA on human chromosome 7: evidence for two distinct

alphoid domains on a single chromosome. **Mol Cell Biol**, v.7, p.349-56, 1987a.

WAYE, J. S.; DURFY, S. J.; PINKEL, D.; KENWRICK, S.; PATTERSON, M.; DAVIES, K. E.; WILLARD, H. F. Chromosome-specific alpha satellite DNA from human chromosome 1: Hierarchical structure and genomic organization of a polymorphic domain spanning several hundred kilobase pairs of centromeric DNA. **Genomics**, v.1, p.43-51, 1987b.

WEBER-MATTHIESEN, K.; DEERBERG-WIIRAM, J.; ROSENWALD, A.; POERSCH, M.; GROTE, W.; SCHLEGELBERGER, B. Translocation t(2;5) is not a primary event in Hodgkin's disease. **Am J Pathol**. v.149, p.463-8, 1996.

WERNER, M.; WILKENS, L.; AUBELE, M.; NOLTE, M.; ZITZELSBERG, H.; KOMMINOTH, P. Interphase cytogenetics in pathology: principles, methods, and applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) **Histochem Cell Biol**, v.108, n.4-5, p.381-90, Oct-Nov, 1997.

WIGGLESWORTH, J. S. Role of pathology in modern perinatal medicine. In WIGGLESWORTH, J. S & SINGER D. B. (Ed) Textbook of fetal and perinatal pathology. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1991. Chap. 1, p.3-9.

WILLARD, H. F. & WAYE, J. S. **Trends in Genet**. v. 3 n 7, p. 192-8, 1987.

WINTER, M. R. Analysing human developmental abnormalities. **Bioessays**. v. 18, n. 12, p. 965-71, 1996.

WOLF, K.Q.; HERRINGTON, C. S. Interphase cytogenetics and pathology: a tool for diagnosis and research. **J Pathol**, v.181, n.4, p.359-61, Apr 1997.

WOLMAN, S.R. Fluorescence in situ hybridization: a new tool for the pathologist. **Hum Pathol**, v.25, p.586-90,1994.

XIAO, S.; RENSHAW, A.; CIBAS, E. S.; HUDSON, T. J.; FLETCHER, J. A. Novel Fluorescence in Situ Hybridization Approaches in Solid Tumours.

Characterization of frozen specimens, touch preparations and cytological preparation. **Am J Pathol**. v.147, n.4, p.896-904, 1995.

YAN, J.; GUILBAULT, E.; MASSÉH, J.; BRONSARD, M.; DEGRANDPRÉ, P.; FOREST, J. C.; DROUIN, R. Optimization of the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique for high detection efficiency of very small proportions of target nuclei. **Clin Genet**, v.58, p.309-18, 2000.

ZANJANI, E. D.; ASCENSAO, J. L.; TAVASSOLI, M. Liver-derived fetal hematopoietic stem cells selectively and preferentially home to the fetal bone marrow. **Blood**, v.81, n.2, p.399-404, 1993.