

Cariótipo multicolorido: mapeamento cromossômico através do uso de sondas de DNA fluorescentes

Daniel Siquieroli Vilas Boas

*Faculdade de Ciências e Tecnologia, Departamento de Ciências Biológicas,
Universidade Santa Cecília (UNISANTA)*

Recebido em 09/03/09; Aceito em 20/04/09, Publicado em 30/06/09

RESUMO. A cariotipagem com bandeamento G dos cromossomos humanos tem sido extremamente útil para determinar as anormalidades cromossômicas, embora a análise dos esfregaços de metáfase exija considerável experiência. Além disso, a variação na incorporação dos corantes pelas bandas de uma preparação e outra e as semelhanças entre os grupos de bandas em diferentes cromossomos dificulta a automatização destas análises. Todavia, o advento dos métodos de hibridização fluorescente *in situ*, da PCR, das bibliotecas cromossomo-específicas e de um conjunto crescente de corantes fluorescentes possibilitou a coloração individual dos cromossomos metafásicos. Esse artigo consiste em uma breve revisão das principais técnicas usadas em citogenética molecular para o mapeamento cromossômico. A utilização de corantes específicos para os cromossomos, em vez do padrão de bandeamento, provavelmente venha a facilitar a identificação das alterações cromossômicas e automatizar as análises cariotípicas.

Palavras-chave. mapeamento cromossômico, cariótipo, hibridização *in situ* fluorescente, pintura cromossômica, citogenética molecular

1. INTRODUÇÃO

A citogenética consiste em uma área comum de conhecimentos tanto de biologia celular quanto de genética, que desde a época de Mendel vem se expandindo enormemente e se inserindo em vários outros campos da Biologia, como a taxonomia, a bioquímica, a medicina clínica e o melhoramento animal e vegetal. Sendo a citogenética o estudo da e genética por meio da biologia celular, esta área da ciência engloba todo qualquer estudo relacionado com o cromossomo, isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, tanto no que diz respeito à sua morfologia, organização, função e replicação, quanto à sua variação e evolução.

A citogenética clássica desenvolveu-se principalmente a partir do início do século passado e seu crescente progresso acompanhou o aprimoramento de técnicas e equipamentos de microscopia.

Na citogenética molecular, a análise cromossômica tem sido de grande importância para o entendimento da evolução, genética e estabilidade cariotípica dos materiais estudados. Por muito tempo, a caracterização cromossômica foi baseada especialmente em parâmetros morfológicos, como o tamanho dos braços, posição dos centrômeros e localização das constrições secundárias (GUERRA, 1988). Com a implantação de técnicas de bandeamento (CASPERSSON *et al*, 1970), que permitem a visualização de blocos diferenciados (bandas), a caracterização cromossômica foi melhorada significativamente.

Com a introdução das técnicas moleculares, os então chamados “corpos corados” da biologia celular estão cada vez mais “brilhantemente corados”, em cores e pseudo-cores das mais variadas.

O uso da Hibridização Fluorescente *In Situ* (FISH) na citogenética tem a vantagem de fornecer resultados rápidos, que podem ser convenientemente contados a olho, utilizando-se um microscópio de fluorescência (CHEUNG *et al*, 1977; NG *et al*, 2007; CHO *et al*, 2009). Em espalhamento de cromossomos metafásicos, sinais positivos aparecem como pontos duplos, correspondendo à hibridização das sondas em ambas as cromátides-irmãs. Utilizando-se um equipamento sofisticado para o processamento de imagens e de moléculas, ligadas a repórteres carregando fluoróforos diferentes, é possível mapear e ordenar vários clones de DNA simultaneamente (WANG *et al*, 2009). Existem numerosas

aplicações para a FISH cromossômica, mas uma especial é a pintura cromossômica, que permite uma forma de cariotipagem molecular (RIED *et al*, 1998).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Citometria de Fluxo

Os cromossomos humanos apresentam uma variação considerável em tamanho e conteúdo de DNA. Além disso, a composição de base pode variar consideravelmente: cromossomos sabidamente ricos em genes ou pobres em genes possuem, comparativamente, uma elevada % de (G + C) ou (A + T), respectivamente. Por exemplo, os cromossomos 21 e 22 são semelhantes em tamanho e em conteúdo de DNA, mas o cromossomo 21 é pobre em genes e possui uma % relativamente elevada de (A + T), enquanto que o cromossomo 22 é rico em genes e possui uma % relativamente elevada de (G + C). Como resultado das diferenças de tamanho e diferenças na composição de bases, os cromossomos humanos podem ser separados pela distribuição de fluxo (citometria de fluxo) (BARTHOLDI *et al*, 1987; KARABINUS, 2009). Nessa técnica, preparações cromossômicas são coradas com um corante que se liga ao DNA, que pode fluorescer em um feixe de *laser*. A quantidade de fluorescência exibida por um determinado cromossomo é proporcional à quantidade de corante ligado, a qual, por sua vez, é significativamente proporcional à quantidade de DNA e, assim, ao tamanho do cromossomo. Adicionalmente, certos corantes, tais como cromomicina A₃, mostram ligação preferencial a sequências ricas em GC, enquanto outros, como Hoechst 33258, ligam-se preferencialmente a regiões ricas em AT (ASBURY *et al*, 1996; VANDERBYL *et al*, 2001).

Os cromossomos individuais podem se ligar a quantidades diferentes de corantes fluorescentes, motivo pelo qual podem ser fracionados em um citômetro de fluxo. Um jato de partículas contendo cromossomos corados é passado por um feixe de *laser* precisamente focado, em uma frequência de cerca de 1000 a 2000 cromossomos por segundo e a fluorescência dos cromossomos individuais, presente em partículas individuais, é monitorada por um fotomultiplicador. A intensidade de fluorescência de cromossomos diferentes pode então ser registrada utilizando-se um tipo de janela para definir a faixa de intensidades de fluorescência

correspondentes a um tipo determinado de cromossomo. Pode ser dada uma carga elétrica nas partículas contendo o cromossomo desejado e essas podem ser desviadas do jato principal para uma grade coletora separada (KURIKI e TAKAHASHI, 1997).

O cariograma de fluxo resultante pode apresentar boa separação de alguns cromossomos humanos; outros, tais como os cromossomos 9-12, não são bem separados. No entanto, híbridos de células somáticas monocromossômicas podem ser utilizados e, frequentemente, resultam em boa separação do cromossomo humano. Como resultado, painéis de DNA cromossomo-específicos foram obtidos, representando cada um dos 24 cromossomos humanos. Esses podem ser utilizados para ter-se a localização cromossômica de qualquer fragmento de DNA humano: o fragmento é marcado e hibridizado com *dot-blot*s de DNA dos 24 cromossomos ("*blots* de fluxo") ou pode ser utilizado um experimento de PCR, se for conveniente. Adicionalmente, o DNA purificado a partir de um tipo cromossômico específico pode ser amplificado por clonagem de DNA de base celular ou baseada em PCR, para gerar bibliotecas de DNA cromossomo-específicas (DAVIES *et al*, 1981; McCORMICK *et al*, 1993a; McCORMICK *et al*, 1993b).

2.2. FISH e Pintura Cromossômica (*Chromosome Painting*)

Um procedimento simples para o mapeamento de genes e de outras sequências de DNA é o de hibridizar uma sonda adequada de DNA marcado com o DNA cromossômico que foi desnaturado *in situ*. Inicialmente, a técnica de "pintura" do cromossomo, com uma cor específica utilizava um banco de cromossomos selecionados por fluxo como a fonte de sondas cromossômicas específicas (RIED *et al*, 1998). Essas sondas eram então marcadas diretamente pela incorporação de um nucleotídeo com um corante fluorescente durante a reação de marcação (figura 1) ou indiretamente, pela incorporação de nucleotídeos portadores de um grupo de afinidade (molécula repórter), tais como biotina ou digoxigenina que, após a incorporação no DNA é, então, ligada por afinidade a uma molécula marcada por fluorescência (BAYANI e SQUIRE, 2004).

A obtenção de cromossomos metafásicos ou prometáfásicos se dá a partir de linfócitos de sangue periférico ou de linhagens celulares. Esses cromossomos são secados ao ar em uma lâmina de microscópio e tratados com RNase e proteinase K o que resulta em DNA cromossômico parcialmente purificado, que é então

desnaturado por exposição à formamida. O DNA agora desnaturado está disponível para a hibridização *in situ* com uma solução contendo uma sonda de ácido nucléico marcada (GUERRA, 1988).

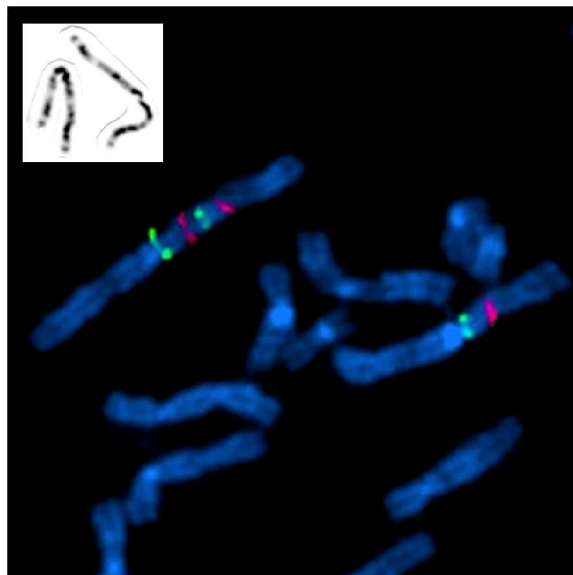


Figura 1. Duplicação direta do cromossomo 3 observada através da hibridização com YACs contendo seqüências únicas do 3p. Banda G do referido cromossomo no detalhe.

Após a reação de hibridização, a fluorescência pode ser visualizada diretamente através de microscopia fluorescente ou indiretamente através do tratamento das lâminas com um corante fluorescente conjugado ao grupo de afinidade da sonda para posteriormente ser examinada para fluorescência (figura 2).

Para aumentar a intensidade do sinal de hibridização, grandes sondas de DNA são preferidas, normalmente clones em cosmídeos contendo ao redor de 40kb de inserto. Tais seqüências grandes irão conter muitas seqüências de DNA repetitivas, espalhadas, sendo necessário utilizar a hibridização por supressão *in situ* (LICHTER *et al*, 1990). Essencial-mente, isso é uma forma de hibridização por competição: antes da hibridização principal, a sonda é misturada com um grande excesso de DNA genômico total, não-marcado e desnaturado, saturando, dessa forma, os elementos repetitivos na sonda, de forma que eles não irão mais mascarar o sinal gerado por seqüências únicas (MONACO e LARIN, 2001).

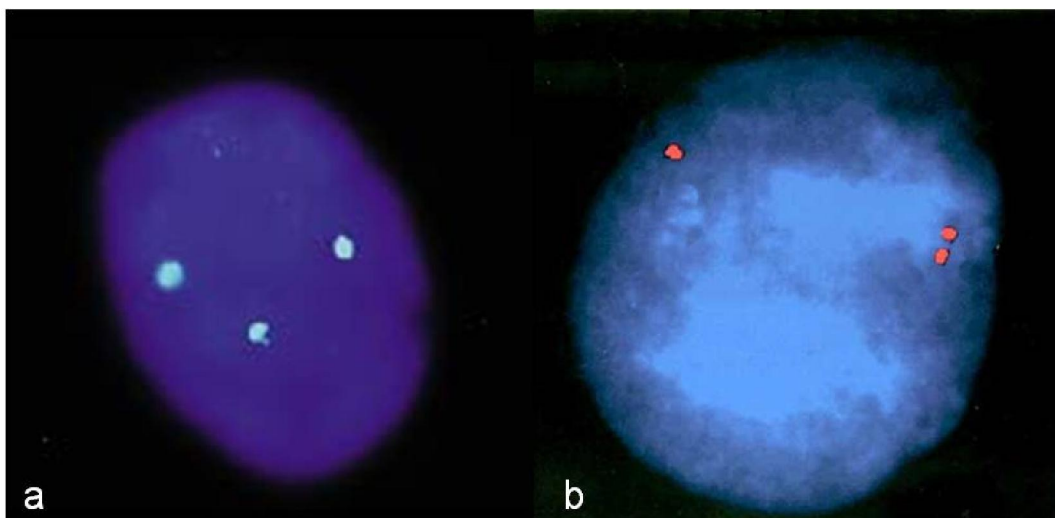


Figura 2. FISH em núcleos interfásicos de células do líquido amniótico.

*a) Sonda para o cromossomo 13 em paciente com diagnóstico pré-natal de síndrome de Patau
e b) Sonda para o cromossomo 21 em paciente com diagnóstico pré-natal de síndrome de Down.*

Recentemente o protocolo de PCR substituiu as bibliotecas de cromossomos separados por fluxo como fonte das sondas para coloração dos cromossomos. Especificamente, a síntese química da sequência 5'-CCGACTCGAGNNNNNATGTGG-3', onde N significa que qualquer um dos quatro nucleotídeos incorporados a estes sítios produz uma família de oligonucleotídeos. Com esta família, a amplificação por PCR ocorre em aproximadamente 10^6 sítios dispersos ao longo do genoma humano, ou seja, aproximadamente 21 mil sítios por cromossomo. Este tipo de PCR é denominado disparador oligonucleotídico degenerativo (DOP-PCR). Assim, seja com uma preparação de cromossomos selecionados por fluxo ou com uma região cromossômica microdissecada como o DNA molde, o DOP-PCR produz um grupo grande de sondas de um cromossomo inteiro ou de parte de um cromossomo. Este método de PCR elimina a necessidade de manutenção dos clones e fornece um rendimento elevado de sondas para um cromossomo específico (STAP *et al*, 2001).

Uma vez que existem apenas cinco ou seis corantes fluorescentes produzidos, adequados para a marcação do DNA e passíveis de diferenciação espectral, somente um pequeno número dos 24 cromossomos (22 autossomos, o X e o Y) pode ser pintado com diferentes cores simultaneamente. Se fosse possível diferenciar, do ponto de vista espectral, 24 corantes fluorescentes diferentes simultaneamente, seria possível identificar cada cromossomo individualmente por sua coloração. Além disso, as translocações cromossômicas poderiam ser reveladas

facilmente mediante a justaposição inesperada das cores. Comparativa-mente com a pesquisa de banda G em cariótipos para determinar as origens dos grupos deslocados de bandas, seria mais fácil identificar as mutações cromossômicas entre os cromossomos multicoloridos. Infelizmente, não existem 24 corantes fluorescentes diferentes que possam ser utilizados para colorir cada cromossomo humano. Todavia, alguns citogeneticistas moleculares consideram que hibridizar um cromossomo com conjuntos de sondas cromossomo-específicas, cada qual marcada com um corante fluorescente diferente, poderia produzir um espectro de emissão fluorescente combinada diferente de quando cada corante fluorescente é utilizado separadamente. Teoricamente, com cinco corantes fluorescentes, existem 31 ($2^n - 1$; $n = 5$) combinações possíveis. Em outras palavras, hipoteticamente, apenas cinco corantes fluorescentes geram combinações suficientes para produzir um espectro distinto de emissão fluorescente para cada cromossomo. Após testar várias combinações de sondas cromossomo-específicas marcadas, foram formulados 24 protocolos de cor para os cromossomos (SPEICHER *et al*, 1996; SCHRÖCK *et al*, 1996). A figura 3 mostra um exemplo de um esquema de diferentes combinações de sondas cromossômicas marcadas que produz uma resposta fluorescente única a partir de cada cromossomo.

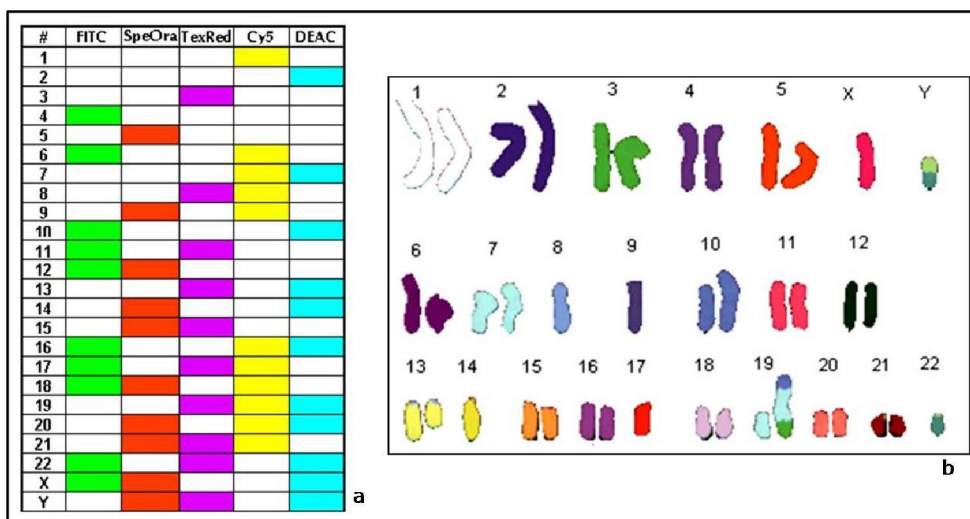


Figura 3. Esquema de diferentes combinações de sondas cromossômicas marcadas (a) que produz uma resposta fluorescente única a partir de cada cromossomo (b). O Cy5 detectado no cromossomo 1, codificado como branco; o DEAC detectado no cromossomo 2, codificado como azul escuro; o TexRed detectado no cromossomo 3, codificado como verde claro e o FITC + SpeOra detectados no cromossomo 12, codificados como verde escuro, são exemplo de representação de pseudocores em um cariógrama.

A resolução máxima da FISH convencional em cromossomos metafásicos é de várias megabases. A utilização de cromossomos prometafásicos mais estendidos pode permitir a resolução de 1Mb mas, devido a problemas como o dobramento da cromatina, dois sinais de sondas diferentemente marcadas podem parecer estar lado a lado, a menos que eles estejam separados por distâncias maiores que 2Mb. Recente-mente, no entanto, novas variações foram desenvolvidas, permitindo resoluções muito elevadas (BAYANI e SQUIRE, 2004).

Dependendo da técnica específica utilizada, o bandeamento dos cromossomos pode ser arranjado antes ou depois da etapa de hibridização. Graças a isso, o sinal obtido após a remoção do excesso da sonda pode ser correlacionado com o padrão de bandas cromossômicas para identificar a localização no mapa de seqüências de DNA reconhecidas por ela (figura 4).

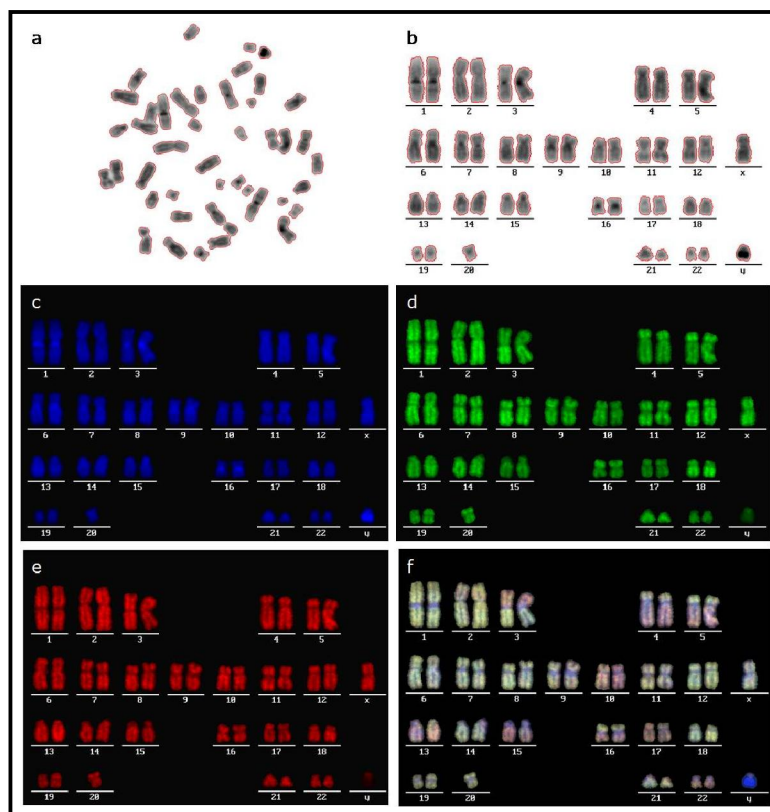


Figura 4. Correlação do padrão de bandas cromossômicas com o sinal emitido pelas sondas fluorescentes. a) Bandeamento G dos cromossomos metafásicos; b) Cariograma monocromático por banda G; c) Cariograma fluorescente marcado com DAPI; d) Cariograma fluorescente marcado com FITC; e) Cariograma fluorescente marcado com TRITC e f) Sobreposição da banda G, DAPI, FITC e TRITC. (Cortesia do Institut für Pathologie "Rudolf-Virchow-Haus" - University Hospital Charité).

2.3. M-FISH e SKY

As diferenças em espectro entre as várias combinações de corantes fluorescentes são sutis e a detecção exige equipamento e programas de computador especializados. O problema para decifrar as diferenças de espectro vem sendo contornado de duas maneiras. Um método utiliza um conjunto de cinco filtros diferentes, cada qual transmitindo a emissão de um dos corantes fluorescentes. O equipamento captura a imagem de cada cromossomo e, após cinco leituras separadas dos cromossomos coloridos, cada qual com um filtro diferente, um programa de computador combina os dados espectrais de cada cromossomo (assinatura espectral) e atribui uma cor. A cor atribuída pelo computador não é necessariamente a cor real, mas uma cor que reflete a informação espectral composta de cada cromossomo e facilita o reconhecimento dos cromossomos. Esta forma de distinguir cada um dos 24 cromossomos de um único esfregaço metafásico foi denominada de FISH-fluor multicombinatória (M-FISH) (LEE *et al*, 2001) (figura 5).

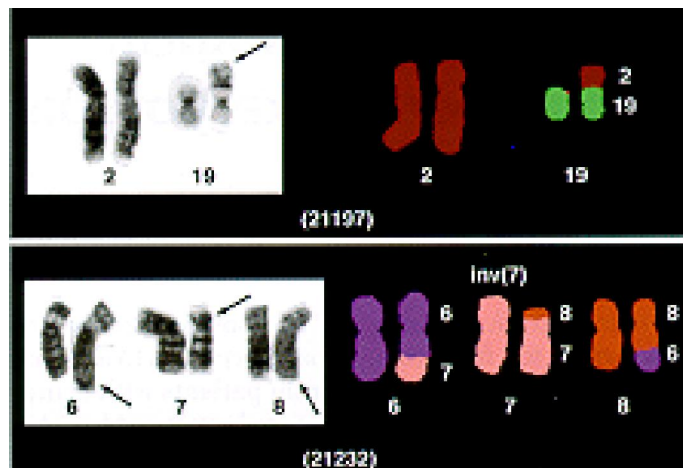


Figura 5. Identificação da origem das mutações cromossômicas através da técnica de hibridização fluorescente *in situ* multicolorida.

Um método alternativo para identificar as diferenças espectrais, que utiliza o mesmo tipo de protocolo de marcação cromossômica que a estratégia M-FISH, é denominado cariotipagem espectral multicolorida (SKY). Neste caso, é determinado todo o espectro emitido de cada cromossomo e, a cada cromossomo, é atribuída uma pseudocor (figura 6). De maneira resumida, uma câmara acoplada a um dispositivo carregado capta as imagens dos cromossomos metafásicos, as emissões

são passadas por um interferômetro, os dados são processados em informação espectral e uma cor é alocada a cada cromossomo (SCHRÖCK *et al*, 1996).

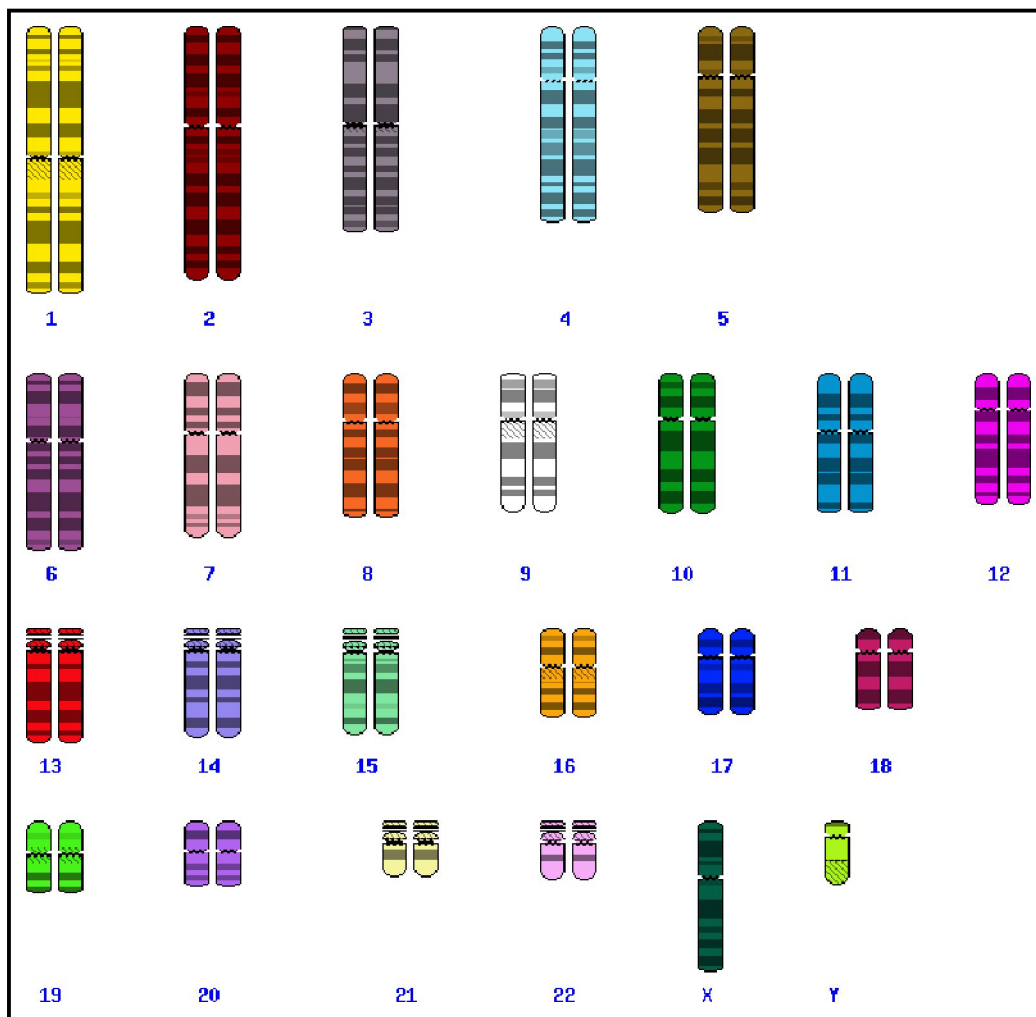


Figura 6. SKYgrama humano normal (SKY/M-FISH & CGH Database: NCBI-NLM-NIH).

Mais de 400 mil análises cariotípicas são conduzidas anualmente nos EUA e Canadá, para determinar as condições cromossômicas de fetos, recém-nascidos e células malignas. O cariótipo multicolorido possibilitará determinar com maior facilidade a perda ou ganho cromossômico (aneuploidia) e os rearranjos estruturais complexos (figura 7). Por exemplo, em um contexto clínico, dado que as células cancerosas apresentam anomalias cromossômicas distintas, o cariótipo

multicolorido pode ser utilizado para determinar a eficácia do protocolo terapêutico na redução da população de células malignas no paciente (READ e DONNAI, 2007).

Em seu formato atual, os protocolos de coloração dos 24 cromossomos não identificam prontamente os rearranjos intracromossômicos como inversões, pequenas duplicações e pequenas deleções. Todavia, para resolver essa limitação, foi desenvolvido o método de FISH multicolorido com sondas marcadas dirigidas para regiões específicas nos cromossomos (SPEICHER *et al*, 1996). Além disso, outra técnica de FISH denominada de hibridização genômica comparativa (CGH) é utilizada para detectar variações nos números de cópias do DNA nas células cancerosas.

2.4. F-FISH e DIR-VISH

Os mapeamentos físicos, através da FISH de cromatina e de fibras possuem um limite de resolução inferior de uma a várias megabases; eles são complementados por métodos de mapeamento molecular, os quais podem mapear o DNA na faixa de 1pb a várias megabases. O seqüenciamento de DNA fornece o mapa físico mais moderno e atualizado, pela determinação da ordem linear de nucleotídeos individuais (HOUSEAL e KLINGER, 1994).

A extensão do DNA linear de um cromossomo de tamanho médio humano é de cerca de 5cm, mas ele é compactado, por meio de diversas hierarquias de dobramento nos cromossomos metafásicos, em poucas micra. Como resultado, a hibridização *in situ* padrão contra a cromatina altamente condensada de cromossomos metafásicos ou prometafásicos não apresenta grande resolução de mapeamento, com limites superiores típicos de cerca de uma a várias megabases de DNA. Para obter-se uma resolução maior, as sonda de DNA são hibridizadas com cromossomos interfásicos, naturalmente estendidos, ou com cromatina ou fibras de DNA artificialmente espalhadas (figura 8) e preparadas por vários métodos diferentes (CHEN *et al*, 2007).

Os cromossomos do núcleo interfásico estão muito mais estendidos do que os cromossomos metafásicos ou prometafásicos. Como resultado, as análises de FISH de cromossomos do núcleo interfásico podem permitir uma resolução de mapeamento elevada e auxiliar na determinação da ordem de mapeamento físico de alguns clones de DNA sintênicos. Os cromossomos estendidos podem voltar-se para trás em certas regiões, motivo pelo qual uma ordem linear precisa para clones

de DNA sintéticos necessita da análise estatística dos resultados de mapeamento de muitos núcleos interfásicos individuais. Assim mesmo, o método é mais apropriado para ordenar sequências separadas por intervalos dentro da faixa de 50 a 500kb.

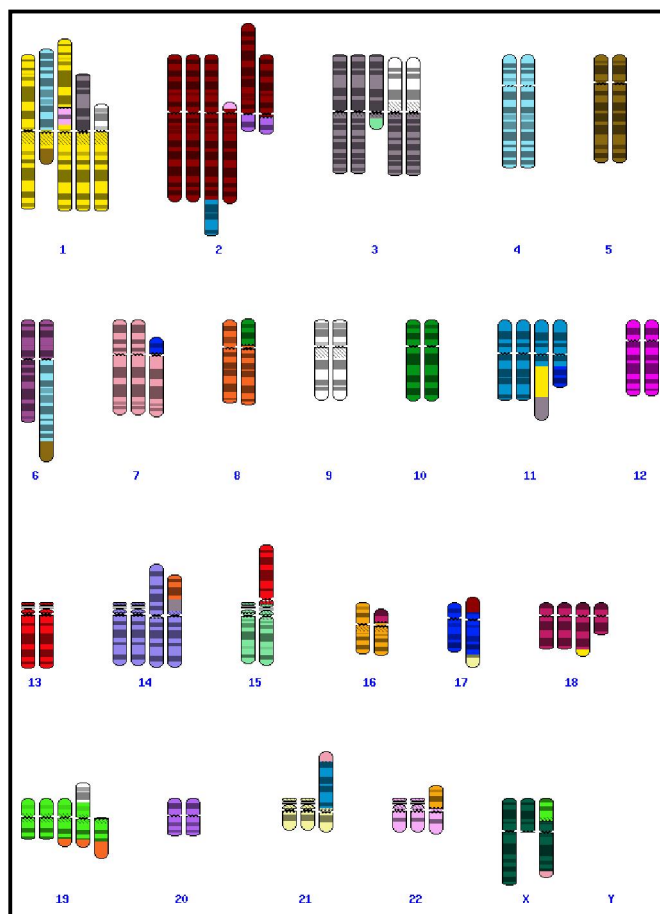


Figura 7. SKYgrama de células de carcinoma endometrióide pobremente diferenciado com o seguinte diagnóstico cariotípico: 50-53, X, der(X) t(X;15)(q11;?), +der(X)(19qter->q11::Xp11?->q25::7q35->qter), ins (1;22) (p13;q11q13), der(1)t(1;3)(p11;p11), +der(1;9)(q10: ?p10), +der(1)(4qter->p12 ::1p12->q21::5p21->?), der(2)t(2;11)(q37;q13), +der(2)t(2;22)(p11;?), +dic (2;20)(q11;p11), +der(3)t(3;15)(q11;?), +dic(3;9)(p12;p13), +dic(3;9)(?;?), der(6)(6pter->q10::4q10->q35::5p11->?), +der(7)t(7;17)(p11;?p11), +der(7) t(7;17)(p11;?p11), der(8)t(8;10)(p11;p11), der(11)t(11;17) (q13;q21), der(11) (11pter->q13::1?p->?:3?->?), dic(14;14)(p11;p11), der(14)t(3;14)(?;p11) t(3;8) (?;?q22), der(13;15)(q10;q10), der(16)t(16;18)(p11;p11), der(17) (2?->?:17p12 ->qter::21q21->qter), der(18)t(1;18)(?;q23), del(18)(q12), der(19)t(8;19) (?;p11), der(19)t(8;19)(?p11;q13), +der(19) (9pter->p13::19p13->q13::8?p11->p?), der(21)(7?->?:11p11q25::21p11-qter), -21, der(22)t(16;22)(p11;p11), -22. (caso clínico público depositado por Bayani e col. no SKY/M-FISH & CGH Database: NCBI-NLM-NIH)

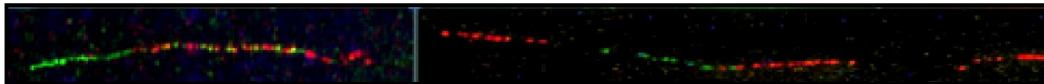


Figura 8. Hibridização in situ de cromossomos interfásicos estendidos.

A FISH de alta resolução pode também ser conduzida utilizando-se procedimentos que fazem com que o DNA dos cromossomos seja estendido em uma lâmina de microscópio antes da hibridização (FISH em fibra de cromatina estendida). Um de tais métodos, DIR-VISH (*Direct Visual Hybridization*), envolve a lise de células com detergente em uma extremidade de uma lâmina de vidro e a inclinação da lâmina, permitindo que o DNA em solução deslize para a outra extremidade da lâmina. Tais preparações permitem resoluções de mapeamento extremamente elevadas: de mais de 700kb a menos que 5kb. Mais recentemente, o princípio de espalhamento artificial de fibras de cromatina foi ampliado para o DNA livre de proteínas: o DNA-alvo é preparado a partir de células colocadas em blocos de géis de eletroforese de campo pulsado. Esse método de FISH com fibras de DNA utiliza fibras de DNA linearizadas não-fixadas em uma lâmina de microscópio e tem uma resolução de 500kb até poucas quilobases (HEISKANEN *et al.*, 1996).

3. CONCLUSÃO

A pintura cromossômica é uma variante da FISH em que a sonda marcada com a fluorescência é um completo coquetel de sequências de um determinado cromossomo. Em um espalhamento metafásico, esse cromossomo aparece com uma cor brilhante. Seu uso está ligado à identificação da origem de cromossomos anormais observados na cariotipagem padrão ou quando os pacientes apresentam pequenos cromossomos marcadores adicionais ou material extra inserido em um cromossomo, cuja origem pode ser impossível de se identificar sem a pintura cromossômica. Ampliando essa concepção as técnicas de M-FISH e SKY usam uma combinação de pinturas, uma para cada cromossomo, sendo cada um, marcado com uma mistura diferente de corantes fluorescentes, de maneira que cada cromossomo é pintado com uma cor diferente. Já a F-FISH e a DIR-VISH permitem

o mapeamento físico cromossômico de alta resolução através da hibridização de sondas em cromossomos estendidos ou cromatina ou fibras de DNA artificialmente estendidas. Essas novas técnicas inauguram uma nova era na citogenética – a citogenética molecular – que, sem dúvida, abrem espaço para diagnósticos mais precisos que proporcionarão a instituição de medidas terapêuticas mais precoces e eficientes contribuindo assim, para uma melhora da expectativa e/ou qualidade de vida dos pacientes e são, sem dúvida, uma das fontes geradoras de questionamentos que impulsionaram a genética molecular, embasando a tecnologia de ponta, como a biotecnologia e a engenharia genética, permanecendo junto às mesmas, como um dos recursos de avaliação em várias pesquisas dessa natureza.

REFERÊNCIAS

Asbury CL, Esposito R, Farmer C, van den Engh G. Fluorescence spectra of DNA dyes measured in a flow cytometer. *Cytometry*. 1996 Jul 1;24(3):234-42.

Bartholdi M, Meyne J, Albright K, Luedemann M, Campbell E, Chritton D, Deaven LL, Cram LS. Chromosome sorting by flow cytometry. *Methods Enzymol*. 1987;151:252-67.

Bayani J, Squire JA. Fluorescence in situ Hybridization (FISH). *Curr Protoc Cell Biol*. 2004 Sep;Chapter 22:Unit 22.4.

Bayani J, Brenton JD, Macgregor PF, Beheshti B, Albert M, Nallainathan D, Karaskova J, Rosen B, Murphy J, Laframboise S, Zanke B, Squire JA. Parallel analysis of sporadic primary ovarian carcinomas by spectral karyotyping, comparative genomic hybridization, and expression microarrays. *Cancer Res*. 2002 Jun 15;62(12):3466-76. Disponível no SKY/M-FISH & CGH Database: NCBI-NLM-NIH: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sky/skyweb.cgi?form_type=display_cases&submitter=jane.bayani&start_page=5&per_page=10&start_serial=42&end_serial=51&max_cases=53&case_info_edit=2533&id_case_edit_skycells=-1&id_case_edit_cgh=-1&case_detail=Case+Details#case_section> Acessado em 12/02/09.

Caspersson T, Zech L, Johansson C, Modest EJ. Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma*. 1970;30(2):215-27.

Chen L, Li J, Xu W, Qiu H, Zhu Y, Zhang Y, Duan L, Qian S, Lu H. Molecular cytogenetic aberrations in patients with multiple myeloma studied by interphase fluorescence in situ hybridization. *Exp Oncol*. 2007 Jun;29(2):116-20.

Cheung SW, Tishler PV, Atkins L, Sengupta SK, Modest EJ, Forget BG. Gene mapping by fluorescent in situ hybridization. *Cell Biol Int Rep*. 1977 May;1(3):255-62.

Cho EH, Park BY, Cho JH, Kang YS. Comparing Two Diagnostic Laboratory Tests for Several Microdeletions Causing Mental Retardation Syndromes: Multiplex Ligation-Dependent Amplification vs Fluorescent In Situ Hybridization. *Korean J Lab Med*. 2009 Feb;29(1):71-6.

Davies KE, Young BD, Elles RG, Hill ME, Williamson R. Cloning of a representative genomic library of the human X chromosome after sorting by flow cytometry. *Nature*. 1981 Oct 1;293(5831):374-6.

Guerra, M. Introdução a citogenética geral. Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro, RJ. 1988, 142p.

Heiskanen M, Peltonen L, Palotif A. Visual mapping by high resolution FISH. *Trends Genet*. 1996 Oct;12(10):379-82.

Houseal TW, Klinger KW. What's in a spot? *Hum Mol Genet*. 1994 Aug;3(8):1215-6.

Karabinus DS. Flow cytometric sorting of human sperm: MicroSort clinical trial update. *Theriogenology*. 2009 Jan 1;71(1):74-9. Epub 2008 Oct 26.

Kuriki H, Takahashi H. Standardization of bivariate flow karyotypes of human chromosomes for clinical applications. *J Clin Lab Anal*. 1997;11(3):169-74.

Lee C, Rens W, Yang F. Multicolor Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) approaches for simultaneous analysis of the entire human genome. *Curr Protoc Hum Genet*. 2001 May;Chapter 4:Unit4.9.

Lichter P, Tang CJ, Call K, Hermanson G, Evans GA, Housman D, Ward DC. High-resolution mapping of human chromosome 11 by in situ hybridization with cosmid clones. *Science*. 1990 Jan 5;247(4938):64-9.

McCormick MK, Campbell E, Deaven L, Moyzis R. Low-frequency chimeric yeast artificial chromosome libraries from flow-sorted human chromosomes 16 and 21. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993a Feb 1;90(3):1063-7.

McCormick MK, Buckler A, Bruno W, Campbell E, Shera K, Torney D, Deaven L, Moyzis R. Construction and characterization of a YAC library with a low frequency of chimeric clones from flow-sorted human chromosome 9. *Genomics*. 1993b Dec;18(3):553-8.

Monaco AP, Larin Z. Generating subclones from large-insert genomic clones. *Curr Protoc Hum Genet*. 2001 May;Chapter 5:Unit 5.11.

Ng BL, Yang F, Carter NP. Flow analysis and sorting of microchromosomes (<3 Mb). *Cytometry A*. 2007 Jun;71(6):410-3.

Read A, Donnai D (Eds.). *New Clinical Genetics*. Scion Publishing Limited, Oxfordshire, UK, 2007, 428 pp.

Ried T, Schröck E, Ning Y, Wienberg J. Chromosome painting: a useful art. *Hum Mol Genet*. 1998;7(10):1619-26.

Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science*. 1996 Jul 26;273(5274):494-7.

SKY/M-FISH & CGH Database: NCBI-NLM-NIH. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sky/human_sky.gif> Acessado em 12/02/09.

Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *at Genet.* 1996 Apr; 12(4):368-75.

Stap J, Aten JA, Lillington D, Shelling A, Young BD. Advanced preparative techniques to establish probes for molecular cytogenetics. *Curr Protoc Cytom.* 2001 May; Chapter 8: Unit 8.6.

Vanderbyl S, MacDonald N, de Jong G. A flow cytometry technique for measuring chromosome-mediated gene transfer. *Cytometry.* 2001 Jun 1; 44(2):100-5.

Wang X, Zheng B, Li S, Zhang R, Mulvihill JJ, Chen WR, Liu H. Automated detection and analysis of fluorescent in situ hybridization spots depicted in digital microscopic images of Pap-smear specimens. *J Biomed Opt.* 2009 Mar-Apr; 14(2):021002.

Contato do autor: daniel@unisanta.br