	<b>RELATÓRIO DE VALIDAÇÃO</b>	<b>Página s</b>
	<b>SONDA FISH – BCR/ABL1</b> Vysis LSI BCR/ABL1 Dual Color Dual Fusion (Abbott)	<b>1 - 3</b>

### Introdução

A técnica de Hibridização In Situ com Fluorescência (FISH) permite a localização de sequências de DNA específicas nos cromossomos possibilitando o diagnóstico, estadiamento e indicação de tratamentos de diversos tipos de doenças. A sonda FISH Vysis LSI BCR/ABL1 Dual Color Dual Fusion (Abbott) tem sua utilização recomendada para a detecção da translocação (9;22) que resulta no gene de fusão BCR-ABL1.


### Amostras

Foram utilizadas para validação do método de FISH cinco (5) amostras de sangue de medula óssea de indivíduos normais. As amostras de sangue foram processadas de acordo com procedimento padrão de processamento de amostras para FISH. Os pellets citogenéticos preservados em fixativo de Carnoy foram armazenadas no freezer -20°C até o momento do uso.

### Método

Lâminas de vidro foram identificadas e uma gota do pellet citogenético foi pingado sobre cada lâmina, após estarem totalmente secas foram avaliadas quanto a concentração de núcleos sob microscópio de contraste de fase.

No primeiro dia do procedimento de FISH as lâminas foram incubadas no tampão SSC 0,1x por 1 minutos, em seguida no tampão SSC 2x, 75°C por 30 minutos e novamente no tampão SSC 0,1x por 4 minutos. Em seguidas as lâminas foram mergulhadas na solução de NaOH 75mM para desnaturação do DNA, lavadas em SSC 2x (4°C) e mergulhadas em série de álcoois 70%, 85% e álcool absoluto, todos a 4°C. As lâminas foram deixadas na estufa 37°C para evaporação do álcool absoluto. A sonda de FISH Vysis LSI BCR/ABL1 Dual Color Dual Fusion (Abbott) foi preparada de acordo com as instruções do fabricante em um microtubo de 200 uL e colocada no termociclador no programa nomeado “DesnatFISH” (75°C - 5 min; 50°C - infinito) para desnaturação da sonda FISH. Foram aplicados 3 uL da sonda FISH

	<b>RELATÓRIO DE VALIDAÇÃO</b>	<b>Página s</b>
	<b>SONDA FISH – BCR/ABL1</b> Vysis LSI BCR/ABL1 Dual Color Dual Fusion (Abbott)	<b>2 - 3</b>

sobre cada amostra pingada na lâmina de vidro, cobertas com lamínulas de vidro de tamanho 18x18mm e seladas com a cola rubber cement. As lâminas foram colocadas no hibridizador de lâminas no programa “FISH” (37°C) e deixados por um tempo mínimo de 12h.

No segundo dia as lâminas foram marcadas com caneta risca vidro para marcação da área de hibridização, a cola rubber cement foi removida e as lâminas foram mergulhadas no tampão SSC 2x durante 2 min para remoção das lamínulas. Em seguida as lâminas foram lavadas em mistura de SSC 0,4x e igepal 0,3% aquecida à 72°C por 2 minutos, depois foram colocadas na mistura de SSC 2x e igepal 0,1% (temperatura ambiente) por 30 segundos e desidratadas em série de álcoois 70%, 85% e álcool absoluto, todos a 4°C. As lâminas foram secas na estufa 37°C durante 5 minutos, a seguir 10 uL do meio de montagem com antifade e DAPI foi aplicada em lamínulas de 24x50mm e as lâminas foram montadas.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência utilizando filtros para identificação da luz azul, verde e vermelha e também os filtros duplo (verde e vermelho) e triplo (azul, verde e vermelho).

### Resultados

Não foram considerados na análise núcleos com sobreposição, aglomerados celulares e núcleos não íntegros, além disso sinais de hibridização fracos também não foram analisados. Para cada uma das cinco amostras foram contados e registrados os padrões de sinais de hibridização em 500 núcleos, conforme demonstrado na tabela 1.

Após a tabulação das contagens dos núcleos e os padrões de sinais identificados, foi utilizada a função binomial descrita no artigo de Ciolino et al (2009) para a determinação dos valores limites de alterações em amostras de indivíduos normais para os testes de FISH com a sonda BCR-ABL1 (tabela 2).


	<b>RELATÓRIO DE VALIDAÇÃO</b>	<b>Página s</b>
	<b>SONDA FISH – BCR/ABL1</b> Vysis LSI BCR/ABL1 Dual Color Dual Fusion (Abbott)	<b>3 - 3</b>

Tabela 1. Contagens de núcleos e padrões de hibridizações identificados em amostras de indivíduos normais

Padrão de sinais FISH	IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS				
	DVMO - ARD	DVMO - BMP	DVMO - BRG	DVMO - GAS	DVMO - JM
2G+2R	429	434	446	411	409
1F+1G+1R	60	43	40	59	59
2G+1R	5	15	8	11	10
1G+2R	5	4	2	12	13
3G+2R	0	1	3	2	3
2F	0	1	0	2	3
1G+1R	1	1	1	3	2
TOTAL	500	500	500	500	500

G = sinal verde; R = sinal vermelho; F = sinal de fusão

Tabela 2. Valores de corte para análise da sonda BCR-ABL1

Valores de corte na avaliação de 200 núcleos						Valores de corte na avaliação de 500 núcleos					
Sinais	n	BCR-ABL1	Cutoff	%	p	Sinais	n	BCR-ABL1	Cutoff	%	p
2G2R	2131	-	-	-		2G2R	2131	-	-	-	
1G1R1F	261	1G1R1F	28	14.0%	10.4%	1G1R1F	261	1G1R1F	64	12.8%	10.4%
2G1R	49	2G1R	7	3.5%	2.0%	2G1R	49	2G1R	15	3.0%	2.0%
1G2R	36	1G2R	6	3.0%	1.4%	1G2R	36	1G2R	12	2.4%	1.4%
1G1R	8	1G1R	2	1.0%	0.3%	1G1R	8	1G1R	4	0.8%	0.3%
2F	6	2F	2	1.0%	0.2%	2F	6	2F	3	0.6%	0.2%
3G2R	9	3G2R	2	1.0%	0.4%	3G2R	9	3G2R	4	0.8%	0.4%
Total	2500				14.8%	Total	2500				14.8%

G = sinal verde; R = sinal vermelho; F = sinal de fusão

### Conclusão

Os resultados obtidos com a sonda Vysis LSI BCR/ABL1 Dual Color Dual Fusion (Abbott) mostraram-se satisfatórios e permitem o início da realização de testes em amostras clínicas.

Elaboração	Joselito Getz	Data: 31/08/2018
Verificação	Carolina Amaral Dias	
Aprovação	Karine dos Anjos	