



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

(21) BR 10 2013 025668-4 A2



(22) Data de Depósito: 04/10/2013

(43) Data da Publicação: 01/09/2015
(RPI 2330)

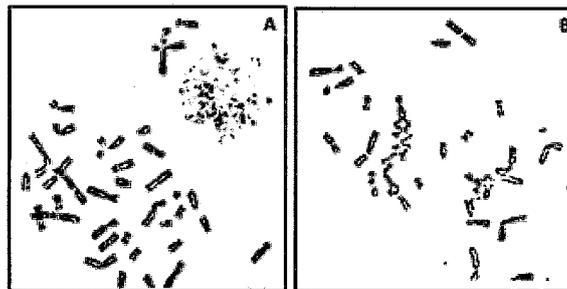
(54) **Título:** MÉTODO DE CARACTERIZAÇÃO DE SUSCETIBILIDADE DE QUEBRA CROMOSSÔMICA

(51) **Int.Cl.:** G01N33/48; C12N5/078

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

(72) **Inventor(es):** ADEMIR DE JESUS AMARAL, EDVANE BORGES DA SILVA, HEBERTON FERREIRA, MARCELA MARIA PEREIRA DE LEMOS PINTO, NEYLIANE FRANSSINETTI GONÇALVES DOS SANTOS, SUELEN CRISTINA DE LIMA, TEREZINHA DE JESUS MARQUES SALLES

(57) **Resumo:** MÉTODO DE CARACTERIZAÇÃO DE SUSCETIBILIDADE DE QUEBRA CROMOSSÔMICA. A presente invenção apresenta método inovador de caracterização de quebras e rearranjos cromossômicos, sendo aplicado em diagnóstico de Anemia de Fanconi. As principais vantagens da presente invenção são a diminuição dos custos referentes aos ensaios laboratoriais que utilizam Diepoxibutano (DEB) ou Mitomicinas C (MMC), redução do tempo necessário para o envio dos resultados, além de garantir maior segurança ao meio ambiente e aos laboratoristas na realização dos ensaios.



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

MÉTODO DE CARACTERIZAÇÃO DE SUSCETIBILIDADE DE QUEBRA CROMOSSÔMICA

5 **Campo da Invenção**

A presente invenção apresenta método de caracterização de suscetibilidade de quebra cromossômica, mais especificamente, uso de um agente clastogênico alternativo, que pode ser aplicado como teste laboratorial da Anemia de Fanconi. A presente invenção situa-se nas áreas de Física Nuclear, Engenharia Biomédica e Medicina.

Antecedentes da Invenção

A Anemia de Fanconi (AF) é uma síndrome genética caracterizada pela ocorrência de malformações congênitas envolvendo coração, rins e membros, alterações na pigmentação da pele, baixa estatura, pancitopenia, falência progressiva da medula óssea e predisposição ao câncer em idade precoce.

Aproximadamente dois terços dos pacientes com AF apresentam significativa heterogeneidade interfamiliar e intrafamiliar tanto em relação à gravidade quanto à presença dos sintomas, o que provavelmente indica a participação de um componente estocástico na doença. O terço restante exibe fenótipo normal e, por este motivo, o diagnóstico da doença torna-se difícil e geralmente ocorre tardiamente, apenas com a manifestação de sintomas relacionados a disfunções hematológicas.

Outro fator que dificulta a identificação desta doença exclusivamente com base na manifestação de achados clínicos é o fato de as características fenóticas dos pacientes com AF serem semelhantes às de outras patologias, como a síndrome de Seckel, a síndrome de quebra de Nijmegen, a síndrome de Dubowitz e a síndrome de Holt-Oram. Por esta razão, a caracterização do fenótipo celular, iniciada na década de 60, foi de extrema importância na criação de um teste diagnóstico laboratorial mais específico para a AF, em complementação ao exame clínico.

Os atuais testes laboratoriais utilizam o Diepoxibutano (DEB) e a Mitomicina C (MMC) como alquilantes clastogênicos, que induzem complexas anomalias citogenéticas características dos indivíduos com essa doença.

O teste de sensibilidade ao DEB é considerado o método de referência devido a sua alta sensibilidade, boa reprodutibilidade e maior especificidade em relação à MMC. A utilização do DEB e da MMC para fins de diagnóstico, contudo, possui uma série de restrições no que se refere a sua obtenção, transporte, manipulação e descarte. A aplicação de tais agentes químicos, na indução de alterações cromossômicas para diagnóstico, referente à AF, possui sérias restrições quanto ao manuseio desses alquilantes pelos profissionais de saúde responsáveis pelo exame, requerendo a utilização obrigatória de equipamentos de proteção coletiva e individual.

O DEB é um carcinogênico volátil que pode ser inalado e/ou absorvido quando há contato direto com a pele, por isso sua fabricação é controlada. Por outro lado, a MMC é um quimioterápico que possui ação destrutiva aos tecidos. Mais recentemente outros métodos de diagnóstico complementar têm sido desenvolvidos e utilizados, a exemplo do diagnóstico por Western Blot para FANCD2, por ensaios de complementação e por pesquisa de mutações. No entanto, a maioria apresenta alguma limitação de uso, o que tem gerado uma constante busca para o desenvolvimento das técnicas já existentes, visando a obtenção de melhores resultados.

O documento US2006070134 apresenta um novo gene (FLJ11011) que é capaz de codificar uma enzima de conjugação ubiquitina (E2) humana, assim como fragmentos de genes, sequências de codificação, variantes de mRNA e proteínas codificadas. Ainda, o dito documento apresenta um método de identificação dos compostos com potencial para tratar ou melhorar a Anemia de Fanconi, e método de diagnóstico e tratamento de um paciente que possui AF, ou suspeita, ou aumento de susceptibilidade ao câncer, ou diminuição da capacidade de reparo do DNA. O documento US2006070134 difere da presente invenção, tendo em vista que a presente invenção apresenta uma

solução para uma técnica de diagnóstico laboratorial da Anemia Fanconi já existente e, sem o uso de qualquer gene, mesmo o FLJ11011.

O documento WO9845428 apresenta gene associado à Anemia Fanconi patofisiologicamente relevante, um polipeptídeo codificado a partir do mesmo, um anticorpo dirigido contra o polipeptídeo, e aplicações farmacêuticas do ácido nucleico, polipeptídeo e anticorpo. O documento WO9845428 difere da presente invenção, visto que este não apresenta um novo método de diagnóstico para a Anemia Fanconi, e sim uma alternativa para o tratamento desta, enquanto que a presente invenção vem solucionar o problema de diagnóstico desta anemia, frente ao estado da técnica que utiliza o diepoxibutano, composto altamente tóxico.

O documento WO9851792 apresenta compostos relacionados ao grupo de complementação C da Anemia de Fanconi (FAC), ainda, a presente invenção relaciona-se com métodos de utilização de tais moléculas FAC e conjugados no tratamento e ou diagnóstico de doenças, tais como a Anemia de Fanconi. O documento WO9851792 difere-se da presente invenção por apresentar uma proposta diferente para a solução do mesmo problema, o diagnóstico da Anemia Fanconi. Enquanto o dito documento trabalha por meio de compostos relacionados à FAC, a presente invenção trabalha por meio da substituição do DEB (diepoxibutano) utilizado em ensaios laboratoriais, por meio de um agente clastogênico mais seguro e menos nocivo ao laboratorista e ao paciente, sem a utilização de qualquer molécula ou composto relacionado à FAC.

Em se tratando da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Sumário da Invenção

Em um aspecto, a presente invenção vem resolver o problema relacionado aos agentes clastogênicos utilizados nos ensaios de quebra

cromossômica para quantificação da suscetibilidade de quebra cromossômica. As principais vantagens da presente invenção são: a diminuição dos gastos referentes ao diagnóstico da doença, redução do tempo necessário para o envio dos resultados, além de garantir maior segurança aos laboristas na realização do diagnóstico laboratorial da Anemia Fanconi.

É, portanto, um objeto da presente invenção método de caracterização de suscetibilidade de quebra cromossômica compreendendo:

- coleta de amostra;
- aplicação de radiação ionizante;
- quantificação de quebra e alterações cromossômicas.

Em uma realização preferencial, a caracterização de suscetibilidade de quebra compreende comparação da quantidade de quebra cromossômica com um padrão de referência.

Em uma realização preferencial, as quebras cromossômicas são avaliadas em metáfases linfocitárias.

Em uma realização preferencial, o método é aplicado para o diagnóstico da Anemia de Fanconi.

Em uma realização preferencial, a radiação ionizante compreende energia de 6 MeV.

Em uma realização preferencial, a radiação ionizante compreende taxa de dose de 2 Gy por minuto.

Em uma realização preferencial, a amostra a ser irradiada situa-se em um fantoma posicionado a 100 cm da origem do campo de irradiação de acelerador linear.

Em uma realização preferencial, o número mínimo de células em metáfases a serem contabilizadas compreende 200 células.

Em uma realização preferencial, o tempo de cultivo de linfócitos compreende 48 horas em incubadora de CO₂ (5%) a 37 °C.

Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

A Figura 1 (A e B) representa as quebras cromossômicas observadas com o método padrão DEB e a Figura 2 (A, B, C e D) com o método inovador de quebra cromossômica, no qual é utilizada radiação ionizante.

A Figura 1 representa as quebras cromossômicas observadas com o método padrão, ou seja, alterações cromossômicas espontâneas (A) e induzidas por exposição ao DEB (B) em células linfocitárias.

A Figura 2 representa as quebras cromossômicas observadas com o método inovador da presente invenção, apresentando alterações encontradas em amostras de sangue venoso periférico de Pacientes AF+ irradiadas com 2 Gy: (A) Metáfase apresentando rearranjo e fragmento (apontado pela seta); (B) Metáfase apresentando quadrirradial; (C) Metáfase apresentando trirradial; (D) Metáfase apresentando trirradial e quebra de cromátide (apontada pela seta), pelo método da presente invenção.

Descrição Detalhada da Invenção

A invenção compreende um novo método de quebra cromossômica, em que tal quebra cromossômica pode ser utilizada para uso em diagnóstico laboratorial para paciente com Anemia de Fanconi. O método de caracterização de suscetibilidade de quebra cromossômica baseia-se no uso de bioindicadores citogenéticos, tendo a radiação ionizante como agente clastogênico.

No processo de desenvolvimento da invenção foram padronizados os parâmetros metodológicos: tempo de cultivo dos linfócitos, dose de irradiação das amostras biológicas e número mínimo de células a serem contabilizadas.

Aspectos éticos

A pesquisa foi do tipo experimental analítico, tendo sido realizada no Laboratório de Modelagem e Biodosimetria Aplicada - LAMBDA, localizado no Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco -

DEN/UFPE. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde CCS/UFPE (Parecer número: 196.555).

Os indivíduos inclusos nesta pesquisa foram informados acerca dos objetivos deste estudo e, mediante concordância, esclarecidos quanto aos procedimentos a serem realizados. Uma vez de acordo, cada indivíduo assinou um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), através do qual declararam terem sido informados sobre a proposta do estudo e seu aceite em participar, como voluntários, da pesquisa.

10 **Exemplo 1. Realização Preferencial**

Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo, sem limitar o escopo da mesma.

Neste exemplo de realização, o método de quebra cromossômica foi empregado em indivíduos normais, indivíduos com Anemia Fanconi e indivíduos com suspeita de terem Anemia de Fanconi. A energia empregada para a radiação ionizante foi suficiente para garantir a clivagem cromossômica dos indivíduos com Anemia Fanconi apenas, devido ao fato das células de indivíduos com Anemia Fanconi clivarem com facilidade.

Ao fim do método, empregou-se a contabilização das células, a fim de determinar uma proporção de clivagem entre elas para cada grupo de indivíduos estudados neste exemplo de realização preferencial.

Perfil da população estudada

Foram avaliados indivíduos normais, indivíduos com Anemia de Fanconi e indivíduos com suspeita de terem Anemia de Fanconi. Os pacientes sabidamente com AF haviam sido previamente diagnosticados com o teste padrão de sensibilidade ao DEB, cujo resultado foi em todos os casos confirmado pelo processo de diagnóstico aqui apresentado, que envolve o uso de radiação ionizante.

A confirmação do diagnóstico dos pacientes com suspeita de AF foi obtida a partir da complementação do diagnóstico clínico, com o teste de sensibilidade ao DEB e com o processo de diagnóstico utilizando radiação ionizante.

5

Coleta das amostras

Foram coletados, de cada indivíduo, 9 mL de sangue venoso periférico (SVP) em tubos a vácuo, contendo o anticoagulante heparina sódica. As amostras foram aliqüotadas em seringas de 3 mL, e então acondicionadas em recipiente térmico. Uma parte foi irradiada e a outra foi mantida como controle (não irradiada).

10

Arranjo experimental da irradiação

As amostras acondicionadas em seringas de 3 mL e irradiadas em um Acelerador Linear (Marca Siemens, modelo Primus), utilizando Raios X com energia de 6 MeV e taxa de dose de 200 cGy por minuto. As seringas foram mantidas dentro de um fantoma ($\rho = 1,0 \text{ g/cm}^3$), o qual foi posicionado a uma distância de 100 cm da origem do campo de irradiação.

15

Cultivo de linfócitos

O cultivo de linfócitos foi realizado em triplicata para cada indivíduo. Nessa etapa foram utilizadas garrafas de cultura de 40 mL do tipo VENT, nas quais foram adicionados 4 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 0,5 mL de soro fetal bovino, 0,1 mL de fitohemaglutinina e 0,4 mL do SVP. Em seguida, as garrafas de cultura foram cultivadas em incubadora de CO₂ (5%) a 37°C por 48 horas. Três horas antes do término da cultura celular foram adicionados 0,1 mL de Colcemid.

25

Processamento das culturas

As células cultivadas foram submetidas a choque hipotônico (solução de KCl a 0,56%) em banho-maria a 37°C por 7 minutos. Posteriormente foram

30

fixadas com solução de metanol e ácido acético (proporção 3:1) até que o sedimento tornar-se claro.

Análise citogenética

5 As preparações cromossômicas foram coradas com solução de Giemsa a 5% durante 2 minutos. Em seguida, o excesso do corante foi removido com água destilada. As lâminas coradas foram então analisadas ao microscópio óptico de campo claro.

10 Os critérios empregados na análise das alterações cromossômicas presentes nas metáfases linfocitárias foram os mesmos utilizados nas análises com o teste DEB. No total foram contabilizadas 200 metáfases das amostras controle e irradiadas.

15 Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

MÉTODO DE CARACTERIZAÇÃO DE SUSCETIBILIDADE DE QUEBRA CROMOSSÔMICA

- 5 **1.** Método de caracterização de suscetibilidade de quebra cromossômica **caracterizado** por compreender:
- coleta de amostra;
 - aplicação de radiação ionizante;
 - quantificação de quebras e alterações cromossômicas.
- 10 **2.** Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela caracterização de suscetibilidade de quebra compreender comparação da quantidade de quebra cromossômica com um padrão de referência.
- 3.** Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pela quebra cromossômica ser analisada em metáfases linfocitárias.
- 15 **4.** Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** por ser aplicado para o diagnóstico de Anemia de Fanconi.
- 5.** Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pela radiação ionizante compreender energia de 6 MeV.
- 6.** Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 5, **caracterizado** pela radiação ionizante compreender taxa de dose de 2 Gy por
- 20 minuto.
- 7.** Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pela amostra a ser irradiada situar-se em um fantoma posicionado a 100 cm da origem do campo de irradiação.
- 25 **8.** Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo número mínimo de células em metáfases a serem contabilizadas ser 200 células.
- 9.** Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizado** pelo tempo de cultivo de linfócitos compreender 48 horas em
- 30 incubadora de CO₂ (5%) a 37 °C.

Figuras

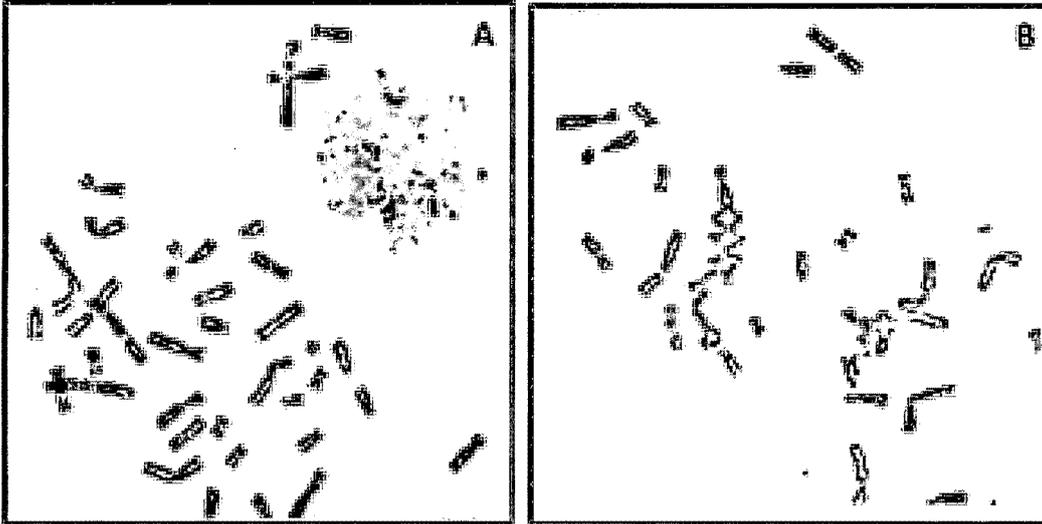


Figura 1

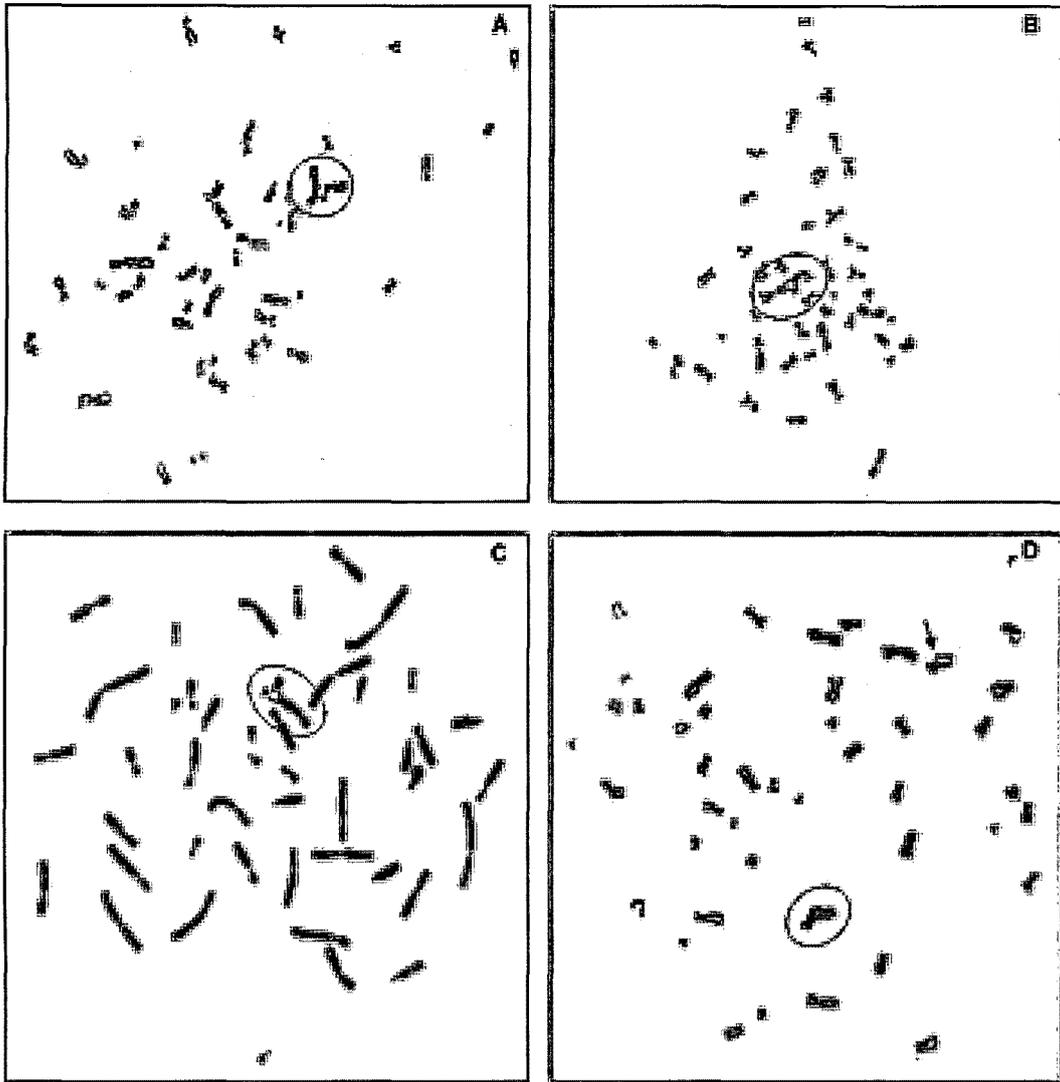


Figura 2

Resumo**MÉTODO DE CARACTERIZAÇÃO DE SUSCETIBILIDADE DE QUEBRA
CROMOSSÔMICA**

5 A presente invenção apresenta método inovador de caracterização de
quebras e rearranjos cromossômicos, sendo aplicado em diagnóstico de
Anemia de Fanconi. As principais vantagens da presente invenção são a
diminuição dos custos referentes aos ensaios laboratoriais que utilizam
Diepoxibutano (DEB) ou Mitomicinas C (MMC), redução do tempo necessário
10 para o envio dos resultados, além de garantir maior segurança ao meio
ambiente e aos laboratoristas na realização dos ensaios.