

PAULO ZANCHETTA PASSAMANI

Adaptação das metodologias de PRINS, micromanipulação e DOP-PCR para construção de sonda da região sub-centromérica do cromossomo-X

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P285a  
2013

Passamani, Paulo Zanchetta, 1987-  
Adaptação das metodologias de PRINS, micromanipulação e  
DOP-PCR para construção de sonda da região  
sub-centromérica do cromossomo-X / Paulo Zanchetta  
Passamani. – Viçosa, MG, 2013.  
viii, 25 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Carlos Roberto de Carvalho.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 19-25.

1. Citogenética. 2. Biologia molecular. 3. Micromanipulação.  
4. Cromossomos humanos. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação  
em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 572.8


PAULO ZANCHETTA PASSAMANI


Adaptação das metodologias de PRINS, micromanipulação e DOP-PCR para construção de sonda da região sub-centromérica do cromossomo-X

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 19 de março de 2013

  
\_\_\_\_\_  
Andrea Dias Koehler

  
\_\_\_\_\_  
Wellington Romildo Clarindo  
(Coorientador)

  
\_\_\_\_\_  
Carlos Roberto de Carvalho  
(Orientador)

*À minha família e amigos, meus alicerces.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, por toda a estrutura oferecida e pela oportunidade de realização do curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa fundamental para a condução desse trabalho.

Ao Prof. Carlos Roberto de Carvalho, pela orientação e por todos os ensinamentos transmitidos.

A todos os meus professores, tanto da graduação quanto da pós-graduação, que contribuíram para a minha formação acadêmica na UFV.

A todos os meus amigos do Laboratório, que compartilharam essa fase comigo e tornaram esses anos muito mais agradáveis: Ana Paula, Denise, Guilherme, Thaís, Isabella, Sirlei, Maíra, Andrea, Chris. Em especial à Fernanda e Maria Andréia, que foram as principais parceiras nesse trabalho e sem elas nada disso teria sido possível.

Aos meus amigos de Viçosa, que compartilharam comigo esse 7 anos e fizeram de Viçosa minha cidade: Lica, Carol Minete, Priscila, Lorena, Marcelinha, Ju, David. Em especial ao Mak's, que foi mais que um amigo, foi um irmão que fiz aqui. E aos novos amigos, que tornaram esses últimos meses os melhores: Ana Clara, Carol Brás e Bruno.

Aos amigos de Castelo, que mesmo de longe sempre me apoiaram nesse caminho.

A todos os meus familiares, que são os meus exemplos de vida. Em especial aos meus tios Juarez e Marilza e minhas primas Carol, Marina e Juana, por todo carinho que tive no ano que morei com vocês.

Aos meus irmãos André e Lucas, que sem eles no meu pé a vida não teria a mesma graça.

Aos meus pais Osmar e Tânia, pelo amor incondicional e por todo apoio. Vocês são meus maiores exemplos.

À Deus, por todas essas bênçãos conquistadas.

## BIOGRAFIA

**Paulo Zanchetta Passamani**, filho de Osmar Passamani e Tânia Maria Zanchetta Passamani, nasceu em Castelo-ES, no dia 26 de junho de 1987.

Em 2006, ingressou no curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa-MG. Iniciou seus trabalhos de pesquisa no Laboratório de Biologia Celular em 2008, sob a orientação da professora Mara Garcia Tavares, onde desenvolveu o projeto intitulado: Variabilidade genética em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini) utilizando marcadores microssatélites. Foi bolsista da FAPEMIG e do CNPq nesse projeto, que desenvolveu até a formatura. Em janeiro de 2011, se formou como bacharel em Ciências Biológicas.

Em agosto de 2011, iniciou o mestrado no Laboratório de Citogenética e Citometria, sob orientação do professor Carlos Roberto de Carvalho, onde desenvolveu o trabalho de construção de sonda cromossomo-específica, utilizando as técnicas de micromanipulação e DOP-PCR.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
3.1. Material biológico.....	6
3.2. Cultura de linfócitos.....	6
3.3. Amplificação in situ.....	6
3.4. Micromanipulação.....	7
3.5. Amplificação dos moldes (DOP-PCR).....	7
3.6. Marcação das sondas.....	8
3.7. Hibridização in situ (FISH).....	8
3.8. Captura das imagens.....	9
4. RESULTADOS.....	10
5. DISCUSSÃO.....	15
6. CONCLUSÃO.....	18
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

## RESUMO

PASSAMANI, Paulo Zanchetta. M Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2013. **Adaptação das metodologias de PRINS, micromanipulação e DOP-PCR para construção de sonda da região sub-centromérica do cromossomo-X.** Orientador: Carlos Roberto de Carvalho. Coorientadores: Sérgio Oliveira de Paula e Wellington Ronildo Clarindo.

Com o advento da hibridização in situ fluorescente, a citogenética foi introduzida na era molecular, com avanços metodológicos que possibilitaram a investigação em vários níveis da ciência dos cromossomos. Destaca-se entre esses avanços a identificação de pares de cromossomos homólogos de forma inequívoca, a localização de sequências específicas, a prospecção direta de anormalidades cromossômicas, além de proporcionar informações de alta-resolução sobre a estrutura e organização dos cromossomos. Dentro das estratégias da citogenética molecular, as técnicas de microdissecção e de DOP-PCR têm sido muito utilizadas na construção de sondas cromossomo-específicas. Entretanto, a ausência de protocolos bem estabelecidos e reprodutíveis, além da necessidade de captura por micromanipulação de um número relativamente grande de cromossomos, essa técnica tem sido limitada quanto à sua aplicação mais ampla. O presente trabalho teve como objetivo padronizar uma metodologia para construção de sondas cromossomo-específicas, associando as técnicas de micromanipulação e DOP-PCR. Culturas de linfócitos humanos foram realizadas para a obtenção de lâminas contendo metáfases, tanto de origem masculina quanto feminina. A reação de amplificação in situ (PRINS) foi realizada sobre uma lâmina contendo metáfases, aplicando uma mistura de 50 µl de reação, contendo 1,0 U de Platinun® Taq DNA Polymerase High Fidelity, tampão de reação da enzima, 2 mM de MgSO<sub>4</sub>, 200 µM de dNTPs e 4 µM de primer. Em seguida, dez fragmentos de cromossomos X foram microdissectados utilizando microagulhas acopladas a um microscópio de contraste de fase e transferidos para um tubo de 0,2mL contendo proteinase K, de onde seguiu para a desproteinização a 37 °C por 24 horas. O material foi amplificado por DOP-PCR em 15 µl de reação, e marcado com Tetramethylrhodamine-5-dUTP. A sonda foi desnaturada por 10 minutos a 99 °C em 35 µL de uma mistura de hibridização contendo: 50 % Formamida, 2X SSC, 10 % Dextran Sulfato, 1 µg de Cot-1 e 200 ng da sonda marcada. Essa mistura foi aplicada na lâmina, que foi

desnatura a 75 °C por 8 minutos e depois foi submetida à hibridização a 37 °C por 20 horas. Após a hibridização, foram realizadas as lavagens de estringência, contra-coloração com DAPI, e visualização do material em microscópio de fluorescência acoplado a um sistema de captura de imagens. Uma sonda específica para a região subcentromérica do cromossomo X foi obtida, apresentando uma marcação em metáfases de indivíduos masculinos e duas marcações em metáfases de indivíduos femininos, além de um ou dois sinais fluorescentes nos núcleos interfásicos.

## ABSTRACT

PASSAMANI, Paulo Zanchetta. M Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2013. **PRINS, micromanipulation and DOP-PCR methodologies adaptation for chromosome X sub-centromeric probe construction.** Adviser: Carlos Roberto de Carvalho. Co-advisers: Sérgio Oliveira de Paula and Wellington Ronildo Clarindo.

The fluorescent in situ hybridization advent introduced the cytogenetics in molecular era, with methodological advances that enable the investigation of chromosome science at different levels. Among these advances, it stands out the unequivocally identification of homologous chromosomes pairs, the specific sequences location, the direct prospecting of chromosomal abnormalities, besides providing high-resolution information on the structure and organization of chromosomes. Within the strategies of molecular cytogenetics, microdissection and DOP-PCR techniques have been widely used in the chromosome-specific probes construction. However, the absence of well-established and reproducible protocols, besides the need for relatively large number of chromosomes for micromanipulation, this technique has been limited. The present study aimed to standard a methodology for chromosome-specific probes construction, involving micromanipulation and DOP-PCR techniques. Human lymphocyte cultures were carried out to obtain metaphases, both male and female origin. In situ amplification (PRINS) reaction was performed on a slide containing metaphase, applying 50 µL of reaction mix with Platinun<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase High Fidelity 1 U, enzyme reaction buffer, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, dNTPs 200 µM and primer 4 µM. Then, ten X chromosomes fragments were microdissected using microneedles coupled to a phase contrast microscope and transferred to a tube containing 0.2 µL proteinase K, where deproteinized at 37 °C for 24 hours. The material was amplified by DOP-PCR in 15 µL of reaction, and marked with Tetramethyl-rhodamine-5-dUTP. The probe was denatured for 10 minutes at 99 °C in 35 µL of hybridization mix containing: formamide 50 %, SSC 2X, Dextran Sulfate 10 %, 1 mg of Cot-1 and 200 ng of labeled probe. This mix was applied on the slide, which was denatured at 75 °C for 8 minutes and then subjected to hybridization at 37 °C for 20 hours. After hybridization, stringency washes and counter-staining with DAPI were performed, and the material was analyzed with a fluorescence microscope coupled to an image capture system. A subcentromeric X chromosome specific probe was obtained, with an unique mark in male metaphase and

two marks in female metaphases, with one or two fluorescent signals in interphase nuclei.

## 1. INTRODUÇÃO

A hibridização *in situ* foi descrita pela primeira vez em 1969 por dois grupos de pesquisadores: John et al. (1969) e Gall e Pardue (1969). Esses pesquisadores desenvolveram de forma independente essa técnica utilizando fitas simples de DNA marcadas com radioatividade. Em 1981, Langer et al. utilizaram sondas com nucleotídeos marcados com biotina, introduzindo o termo hibridização *in situ* fluorescente (FISH). O desenvolvimento dessa técnica revolucionou a citogenética, iniciando a era da citogenética molecular (Jiang e Gill, 2006; Cabral-de-Mello e Martins, 2010).

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) consiste na hibridização de uma sonda específica de DNA, marcada com fluorocromo, em uma sequência de DNA alvo em uma preparação citológica (Langer-Safer et al., 1982; Jiang e Gill, 2006). Essa hibridização baseia-se na complementariedade das bases nitrogenadas, assim como nas propriedades que permitem a desnaturação e renaturação da fita de DNA, sob determinadas condições de estringência (Garimberti e Tosi, 2010).

O interesse crescente na hibridização *in situ* (FISH e GISH – hibridização *in situ* genômica) reside no fato dessa técnica ampliar consideravelmente o nível de análise e o campo de atuação da biotecnologia, pois essa ferramenta tem sido empregada para:

- i. auxiliar na identificação de pares de homólogos nas espécies que apresentam cromossomos de tamanho e morfologia semelhantes (Leitch et al., 1994; Hamon et al., 2009);
- ii. localizar sítios específicos ou marcar de forma diferencial um par de cromossomos, possibilitando o estabelecimento de cariótipos acurados (Leitch et al., 1994; Hamon et al., 2009);
- iii. prover a integração dos mapas físicos e genéticos, importantes aos programas de melhoramento de plantas (Ohmido et al., 2010, Brenna-Hansen et al., 2012);
- iv. verificar a presença de seqüências de DNA e possíveis rearranjos cromossômicos estruturais, auxiliando na comparação dos cariótipos em estudos de citotaxonomia (Guerra, 2004; Cheng et al., 2002, Danilova et al., 2012);
- v. auxiliar em investigações de estrutura, função e evolução dos cromossomos e genomas. Isso ocorre por meio da análise da composição da heterocromatina, do DNA satélite, dos centrômeros e telômeros, e do estudo da

variabilidade e localização do DNA repetitivo disperso (Leitch et al., 1994; Lim et al., 2008; Qi et al., 2008; Lou et al., 2010);

vi. identificar os genomas parentais em organismos aloploplóides (Zhang et al., 2006; Zwierzykowski et al., 2008; Markova e Vyskot, 2009; Pendinen et al., 2012);

vii. evidenciar e caracterizar cromossomos sexuais em plantas (Shibata et al., 1999; Hobza et al., 2004; Lan et al., 2008; Wai et al., 2012).

Além dessas aplicações citadas, com o surgimento da genômica funcional, o desenvolvimento de mapas físicos vem recebendo grande destaque. Uma vez que possibilitam compreender a organização cromossômica e a evolução cariotípica de uma espécie, auxiliam na reunião de sequências durante o sequenciamento genômico e no isolamento de genes mapeados geneticamente (Harper e Cande, 2000; Guerra, 2004; Stephens et al., 2004; Lukaszewski et al., 2005; Wang e Chen, 2005; Yamamoto e Mukai, 2005; Hamon et al., 2009; Ohmido et al., 2010).

Uma sonda fluorescente a ser utilizada no FISH pode ser obtida a partir da associação das técnicas de micromanipulação e DOP-PCR (degenerate oligonucleotide-primed PCR). A micromanipulação se baseia na coleta de cromossomos, ou de partes destes, com auxílio de micropipetas de vidro controladas por um micromanipulador acoplado a um microscópio invertido (Scalenghe et al., 1981). Essa técnica foi primeiramente utilizada em cromossomos politênicos de *Drosophila melanogaster*, posteriormente sendo aplicada em cromossomos de outros animais e humanos (Scalenghe et al., 1981; Röhme et al., 1984; Bates et al., 1986). Em vegetais, o primeiro relato de micromanipulação ocorreu somente em 1991, quando Sandery e colaboradores conseguiram isolar cromossomos B de centeio.

A metodologia de microdissecção tem se tornado um método de escolha para construção de sondas cromossomo-específicas em estudos de genomas de animais e humanos (Guan et al., 1994; Christian et al., 1999). No entanto, a realização de procedimentos de microdissecção de cromossomos em plantas apresenta maiores dificuldades do que em animais em virtude da dificuldade de obtenção de cromossomos metafásicos isolados em preparações citogenéticas de células vegetais (Zhou et al., 2007). Nesse sentido, a padronização de metodologias que permitam obter cromossomos mitóticos com qualidade satisfatória para aplicação de metodologias de microdissecção e hibridização *in situ* é de grande importância.

Outro fator limitante do uso da microdissecção é a necessidade de coleta de muitas cópias (em torno de 20) de um determinado cromossomo. No entanto, modificações em protocolos têm sido realizadas para reduzir esse número (por volta de

1 a 5 cromossomos), tornando o procedimento de micromanipulação menos exaustivo e de mais rápida execução (Guan et al., 1994; Christian et al., 1999; Henning et al., 2008).

Além da micromanipulação utilizando micropipetas de vidro, foi desenvolvido um mecanismo de microdissecção por meio da utilização de raios laser (Kubickova et al., 2002). Este procedimento é realizado por um sistema computadorizado de laser acoplado a um microscópio óptico invertido. Esse laser é direcionado para cortar a membrana em volta do cromossomo selecionado e depois o mesmo sistema catapulta o cromossomo através de um pulso único para um tubo, tornando assim o método de captura do cromossomo mais preciso.

A metodologia de DOP-PCR também tem sido utilizada, juntamente com a micromanipulação, para a construção de sondas. Essa metodologia foi desenvolvida por Telenius et al. (1992) com o objetivo de obter DNA amplificado para estudos citogenéticos (Kiss et al., 2002). Com a introdução dessa estratégia molecular, para gerar sondas cromossômicas de qualidade, observou-se um amplo emprego desse tipo de sonda como ferramenta dentro da metodologia de FISH (Christian et al., 1999; Barbaux e Poirier, 2001; Zhou et al., 2001).

DOP-PCR é uma técnica relativamente rápida e eficiente, que pode ser utilizada para amplificação de cromossomos de qualquer espécie, uma vez que utiliza primers parcialmente degenerados que se ligam aleatoriamente ao genoma durante ciclos iniciais de baixa estrigência (Zhou et al., 2007). Apenas em ciclos subsequentes, sob altas temperaturas, o anelamento mais específico entre os produtos do primeiro PCR e os primers é realizado, explorando a maior especificidade da região 5' do *primer* degenerado (Barbaux e Poirier, 2001). Esse tipo de metodologia tem sido aplicada em análises comparativas da estrutura genômica (Kuukasjarvi et al., 1997), genotipagem de amostras com baixa concentração de DNA (Barbaux e Poirier, 2001), programas de melhoramento (Liu et al., 2004; Zhou et al., 2007), projetos de sequenciamento e mapeamento genéticos (Gribble et al., 2004; Lo et al., 2009).

Juntamente com a micromanipulação, o DOP-PCR tem sido amplamente utilizado na construção de sondas cromossomo-específicas em humanos (Christian et al., 1999; Engelen et al., 1998; Gribble et al., 2004; Weimer et al., 1999), animais (Henning et al., 2008), e também em plantas (Hobza et al., 2004; Houben et al., 1997, Houben, 2012).

Outra técnica que merece destaque nesse cenário é a amplificação *in situ* (PRINS). O PRINS consiste em uma reação de polimerização em cadeia (PCR) de uma sequência de DNA a ser amplificada diretamente sobre o material citológico, seja ele

um núcleo interfásico ou uma metáfase (Pellestor, 2006). O PRINS foi originalmente descrito por Koch et al. (1989). Neste trabalho, os autores utilizaram primers que hibridizaram em regiões específicas de cromossomos desnaturados a partir dos quais foram sintetizadas as novas fitas com nucleotídeos marcados com fluorescência. Como resultado, eles obtiveram marcações em regiões específicas dos cromossomos metafásicos, introduzindo assim o PRINS como uma alternativa eficiente para o FISH convencional.

O PRINS se tornou uma opção técnica utilizada principalmente na detecção de alvos de cópias únicas e de regiões repetitivas em cromossomos humanos e de animais (Koch, 2003). A utilização dessa técnica começou em plantas com Macas et al. (1995) e Pich et al. (1995) com a necessidade de um procedimento simples de marcação de regiões repetitivas em cromossomos mitóticos em suspensão, para análise utilizando citometria de fluxo.

A técnica de PRINS não tem sido apenas utilizada como uma forma alternativa para o FISH. Christian et al. (1999) utilizaram a reação de PCR in situ para amplificar a quantidade de DNA no cromossomo antes da micromanipulação. Para isso, os autores realizaram uma reação de PCR sobre a lâmina contendo as metáfases, sem a adição de nucleotídeos marcados. Isso possibilitou a microdissecção de um menor número de cromossomos para a obtenção de sondas para FISH.

## **2. OBJETIVOS**

### **Objetivo geral:**

Considerando a grande aplicabilidade das sondas cromossomo-específicas e a ausência de um protocolo eficaz para a obtenção das mesmas, o presente estudo tem como objetivo geral padronizar uma metodologia para construção de sondas cromossomo-específicas, utilizando as técnicas de PRINS, micromanipulação e DOP-PCR.

### **Objetivos específicos:**

- Obter lâminas contendo cromossomos metafásicos adequados, provenientes de cultura de linfócitos humanos;
- Adequar as condições de tempo e temperatura para as reações de PRINS e DOP-PCR;
- Padronizar a técnica de microdissecção cromossômica, a fim de estabelecer a forma de coleta mais adequada de cromossomos individuais e/ou fragmentos;
- Padronizar as técnicas de marcação da sonda e de hibridização in situ (FISH);
- Obter uma sonda específica para o cromossomo X humano como parâmetro de resolução e especificidade da técnica.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Material biológico**

O experimento foi desenvolvido a partir de material citogenético obtido por meio de cultura de linfócitos humanos, provenientes do sangue de indivíduos do sexo masculino e do sexo feminino. Todos doaram o sangue de forma voluntária.

A coleta de sangue, bem como os demais procedimentos a seguir, foi executada de acordo com as normas de segurança e Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução N°. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. O descarte do material biológico também foi realizado de acordo com as normas da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Citogenética e Citometria do Departamento de Biologia Geral (DBG) da UFV.

#### **3.2. Cultura de linfócitos**

A coleta do sangue foi realizada com seringa estéril, heparinizada e descartável. Para a cultura, foram adicionadas, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, 12 gotas de sangue em 5,0 ml de meio de cultura completo LymphoGrow™ (Cytogen), em fluxo laminar. A cultura foi incubada em câmara de CO<sub>2</sub>, a 37 °C, por 72 h. Passado o tempo de cultivo, foram adicionados 50 µl de Colcemid (Sigma), por 15 min a 37 °C. Em seguida, a cultura foi centrifugada, o sobrenadante descartado, e o pellet foi ressuspensionado em solução de KCl 0,075 M (pH 6,8) pré-aquecida a 37 °C, por 30 min, para a hipotonização das células. A fixação do material foi feita em metanol:ácido acético (3:1), por 5 trocas de 10 min. O material fixado foi armazenado em metanol puro, até o momento do uso. As lâminas foram preparadas pela técnica de gotejamento e secagem ao ar conforme descrito por Barch et al. (1997).

#### **3.3. Amplificação in situ**

Para realização do PRINS, lâminas contendo metáfases de indivíduos masculinos foram feitas sem a etapa de secagem ao ar e com posterior lavagem em água ultrapura, para retirar o excesso de fixador. Em seguida, um volume final de 50 µl de

mix de reação, contendo 1 U da enzima Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), 1X tampão de reação da enzima (Invitrogen), 2 mM de MgSO<sub>4</sub> (Invitrogen), 200 μM de dNTP (Promega) e 4 μM do primer (DOP-primer: 5'CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG3' - IDT) foi cuidadosamente pipetado sobre a lâmina (Christian et al., 1999). O material foi coberto com lamínula de plástico 22 mm x 60 mm, vedado com cola e colocado em termociclador Mastercycler<sup>®</sup> Gradient (Eppendorf) contendo placa adaptadora para reação de PCR in situ. As condições de reação consistiram de uma etapa de desnaturação inicial a 95 °C por 10 min, seguida de 8 ciclos de 94 °C por 1 min, 30 °C por 5 min, com rampa de 0,3 °C/s até 68 °C por 5 min, 12 ciclos de 94 °C por 1 min, 50 °C por 5 min com rampa de 0,3 °C/s até 56 °C por 5 min, e 68 °C por 5 min e uma etapa final de extensão de 68 °C por 5 min.

### **3.4. Micromanipulação**

Após a amplificação, as lâminas foram lavadas em solução de SSC 2X e Triton 0,1 % (Christian et al., 1999) e depois em água ultrapura. As lâminas foram analisadas em microscópio e as metáfases foram fotografadas para a identificação do cromossomo X antes da micromanipulação, uma vez que não seria possível fazer o bandeamento. Após identificados os cromossomos, estes foram micromanipulados com o auxílio de agulhas de vidro (Femtotips - Eppendorf) acopladas em um microscópio invertido de contraste de fase IX70 (Olympus<sup>™</sup>), com objetiva LUCPlanFLN – UIS 2 60X / 0,70 Ph2. Dez fragmentos do cromossomo X foram micromanipulados e colocados em um tubo de microcentrífuga de 0,2 ml contendo 2 μl de água ultrapura. Esses fragmentos cromossômicos foram então tratados com proteinase K 0,5 μg/ml a 37 °C por 24 horas, para a total desproteinização do DNA, e utilizados como moldes para a construção da sonda.

### **3.5. Amplificação dos moldes (DOP-PCR)**

Os fragmentos micromanipulados foram amplificados por meio de uma reação de DOP-PCR, com uma mistura de reação de 15 μl contendo 4 μM de DOP primer (IDT), 200 μM de dNTP (Promega), 2 mM MgSO<sub>4</sub> (Invitrogen), 1 U da enzima Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) e 1X do tampão específico da enzima (Invitrogen) (adaptado de Christian et al., 1999 e Hobza et al., 2004). A

amplificação foi realizada em um termociclador Mastercycler<sup>®</sup> Gradient (Eppendorf) sob as seguintes condições: uma etapa de desnaturação inicial a 95 °C por 10 min, seguida de 10 ciclos de 94 °C por 1 min, 30 °C por 2 min, com rampa de 0,3 °C/s até 68 °C por 2 min, 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 50 °C por 2 min com rampa de 0,3 °C/s até 56 °C por 2 min, e 68 °C por 2 min e uma etapa final de extensão de 68 °C por 5 min.

Após essa etapa, os produtos dessa reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% para verificação da qualidade do material amplificado. A quantificação dos mesmos foi realizada por meio do Nanodrop (Thermo). Os produtos do DOP-PCR que apresentaram fragmentos amplificados entre 200 e 600 pares de base e em quantidade satisfatória foram então selecionados para a etapa de marcação.

### **3.6. Marcação das sondas**

As amostras selecionadas foram submetidas à marcação fluorescente do tipo direta por meio de outra reação de DOP-PCR, utilizando como fluorocromo a Tetramethyl-rhodamine-5-dUTP (Roche).

Para a marcação, foi utilizada a seguinte mistura de reação: 4 µM DOP-primer (IDT), 200 µM dNTP (Promega), 2 mM MgSO<sub>4</sub> (Invitrogen), 40 µM Tetramethyl-rhodamine-5-dUTP (Roche), 1X do tampão da enzima (Invitrogen), 1 U Platinun<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), 200 ng do DNA molde amplificado, para um volume final de 50 µl para cada reação. A reação foi realizada em um termociclador Mastercycler<sup>®</sup> Gradient (Eppendorf), sob as seguintes condições: 95 °C por 5 min, seguida de 25 ciclos a 94 °C por 1 min, 30 °C por 1 min, com rampa de 0,3 °C/s até 68 °C por 3 min e uma etapa final de extensão de 68 °C por 5 min.

### **3.7. Hibridização in situ (FISH)**

As lâminas utilizadas para a técnica de FISH continham metáfases originadas de culturas de linfócitos de indivíduos masculinos e femininos. A hibridização foi realizada nos dois sexos para avaliar a eficiência da marcação do cromossomo X.

Essas lâminas foram submetidas a uma série de tratamentos de pré-hibridização: primeiramente, foram lavadas em tampão PBS por 5 min (sob agitação) e submetidas à série alcoólica (etanol 70%, 85% e 100%) por 5 min cada. Em seguida foram tratadas com 0,4 % RNase 2 mg/ml, diluída em SSC 2X, a 37 °C por 1 h, lavadas em SSC 2X

por 3 vezes de 5 min cada e em PBS por 5 min; o material foi então incubado em 0,005 % de pepsina diluída em 10 mM HCl, por 10 min a 37 °C; depois as lâminas foram lavadas em PBS por 2 trocas de 2 min cada (sob agitação), pós-fixadas (2 % formaldeído, PBS, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>) por 10 min, lavadas em PBS por duas vezes de 2 min cada (sob agitação) e submetidas à série alcoólica gelada (etanol 70 %, 85 % e 100 %) por 5 min cada.

Paralelamente, a sonda foi desnaturada por 10 min a 99 °C em 35 µl de uma mistura de hibridização contendo: formamida 50 %, SSC 2X, dextran sulfato 10 %, 1 µg de DNA competidor Cot-1 (Invitrogen) e 200 ng da sonda marcada. Após desnaturada, a sonda foi imediatamente colocada a -20 °C, onde permaneceu até a etapa de hibridização.

Em seguida, a mistura de reação previamente desnaturada foi aplicada sobre as lâminas. Essas foram cobertas com lamínula de plástico 22 mm x 40 mm e seladas com cola. As lâminas e a sonda passaram por uma nova etapa de desnaturação simultânea a 75 °C por 8 min e depois foram submetidas à hibridização a 37 °C por 20 horas no Thermobrite™.

Após a hibridização, as lamínulas foram cuidadosamente removidas e foram realizadas as lavagens de estringência a 45 °C, que consistiram em três trocas de 5 min cada em solução contendo 50 % formamida e 2X SSC (pH = 7,0), uma lavagem em solução de SSC 2X por 5 min e uma lavagem em solução de SSC 2X e 1% Triton X-100 por 5 min. Posteriormente, as lâminas foram desidratadas em série alcóolica (etanol 70 %, 85 % e 100%) gelada, contra-coradas com 50 µl de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) 5 µM por 5 min.

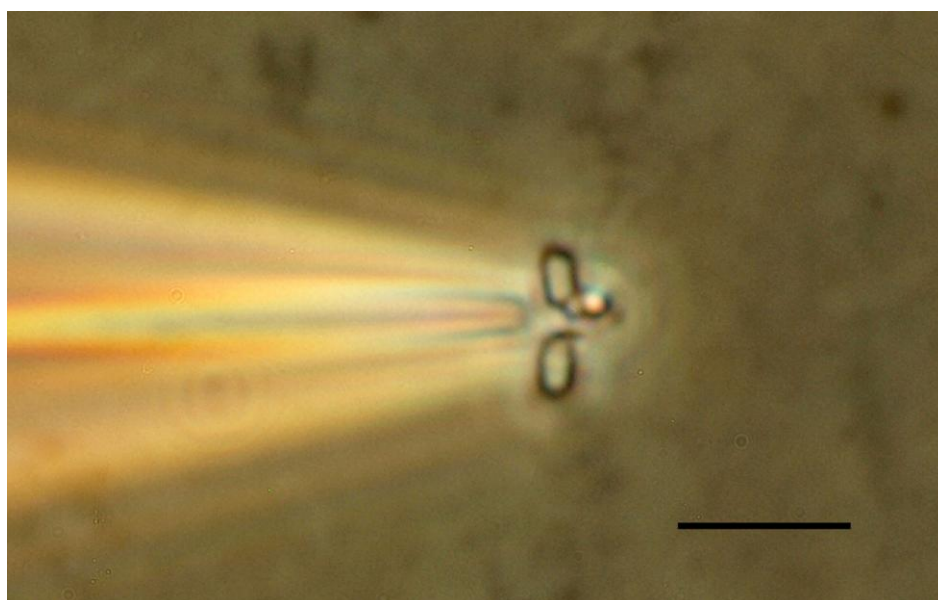
### **3.8. Captura das imagens**

As lâminas contendo as metáfases hibridizadas foram observadas em fotomicroscópio Olympus™; modelo BX60, equipado com acessórios de análise de imagem, iluminação de campo claro e de fluorescência; com objetiva de imersão de 100X. As imagens foram capturadas diretamente por uma vídeo-câmera CCD (Olympus™ DP71) acoplada ao microscópio e a um computador equipado com placa digitalizadora.

#### 4. RESULTADOS

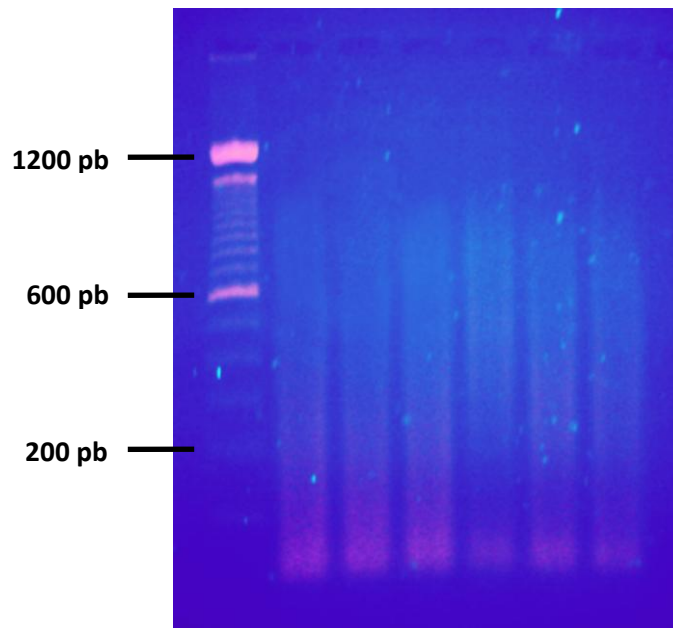
As culturas de linfócitos humanos originaram metáfases em quantidade e morfologia adequadas para utilização nos procedimentos de PRINS, micromanipulação e FISH. As metáfases apresentaram cromossomos espalhados, sem sobreposições, com morfologia preservada e diferentes níveis de compactação que possibilitaram a distinção dos pares homólogos.

As lâminas foram submetidas ao PRINS e, após todos os tratamentos, os cromossomos mantiveram as morfologias adequadas para a micromanipulação. Nessa etapa, foi micromanipulada uma porção da região subcentromérica de 10 cromossomos X (Figura 1).



**Figura 1:** Micrografia do processo de micromanipulação, evidenciando a remoção mecânica da região subcentromérica do cromossomo X, previamente identificado. Barra = 10  $\mu$ m.

Os fragmentos amplificados pela técnica de DOP-PCR geraram fragmentos de DNA na faixa de 200 a 600 pares de base, verificada pela eletroforese em gel de agarose 1,5 % (Figura 2). Esse material quantificado no Nanodrop (Thermo) apresentou uma quantidade de DNA de 354,2 ng/ $\mu$ l, com razão 260/280 de 1,72.



**Figura 2:** Produtos do DOP-PCR analisados em gel de agarose 1,5 %. Marcador de 100 pares de base.

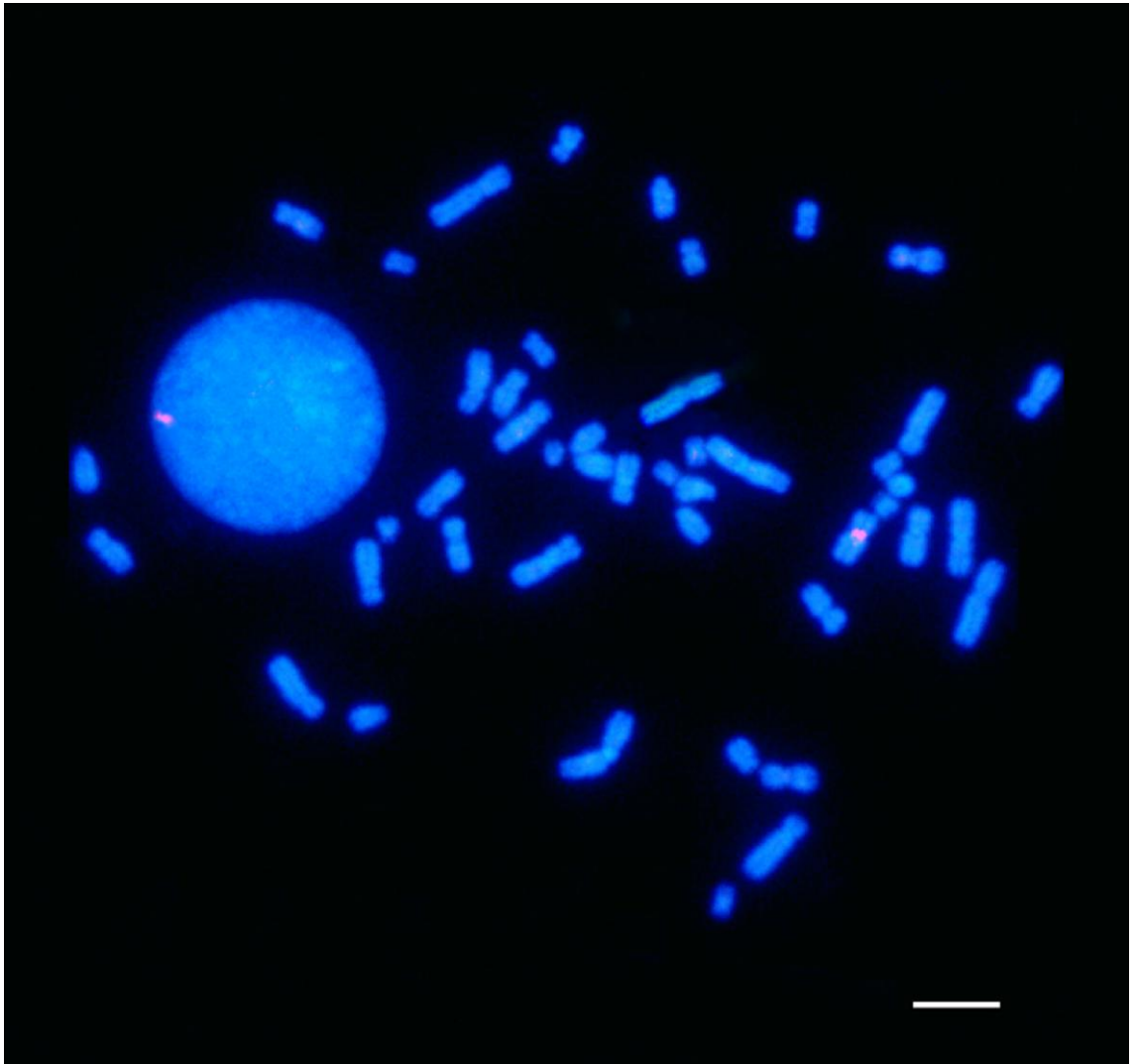
As lâminas foram visualizadas e analisadas por microscopia de fluorescência e foram capturadas um total de 130 metáfases completas hibridizadas (Tabela 1).

**Tabela 1:** Número de metáfases analisadas após a hibridização.

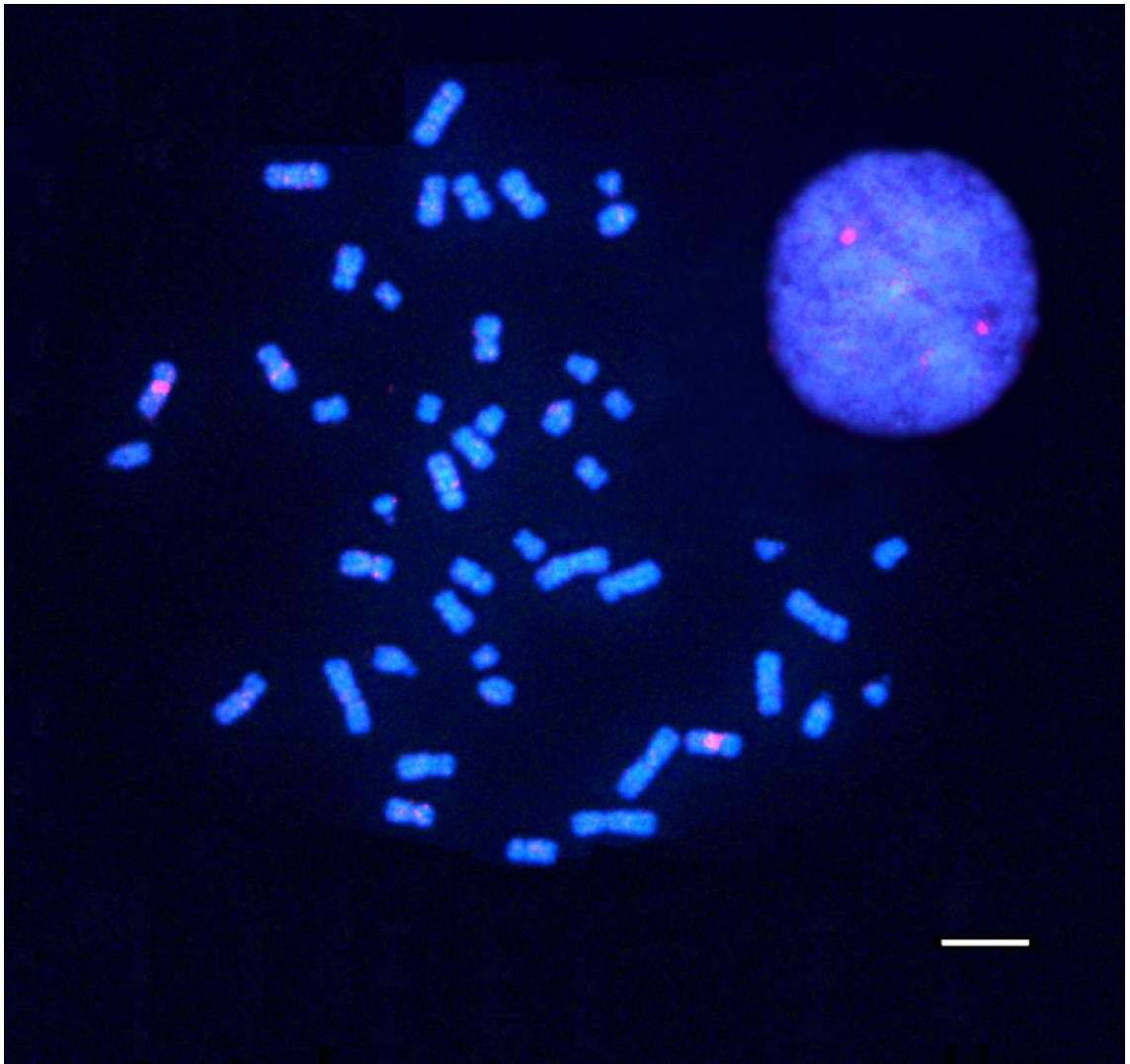
Lâminas	Sexo do indivíduo	Número de metáfases	Total
G1	Masculino	12	37
G2		16	
G3		9	
P1	Masculino	11	42
P2		13	
P3		18	
F1	Feminino	14	51
F2		17	
F3		20	
<b>Total</b>			<b>130</b>

Após a hibridização, foi visualizada uma marcação da região subcentromérica de um único cromossomo X em metáfases de indivíduo masculino, com um único sinal fluorescente correspondente em núcleo interfásico (Figuras 3). A hibridização em

metáfases de indivíduo feminino apresentou o par de cromossomos homólogos X marcados na região subcentromérica, com dois sinais fluorescentes correspondentes no núcleo interfásico (Figuras 4).

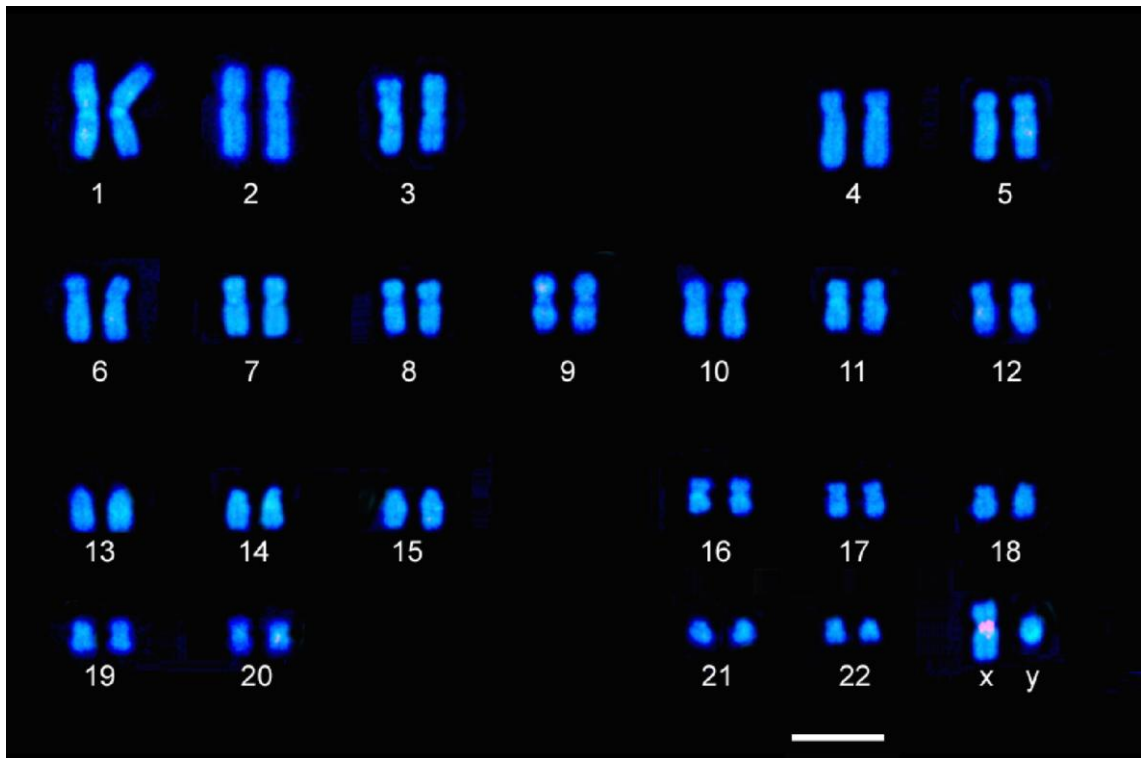


**Figura 3:** Hibridização *in situ* fluorescente em cromossomos metafásicos humanos de indivíduos do sexo masculino, evidenciando a marcação da região subcentromérica do cromossomo X, como também uma marcação única em um núcleo interfásico. Contracoloração com DAPI. Barra = 10  $\mu$ m.

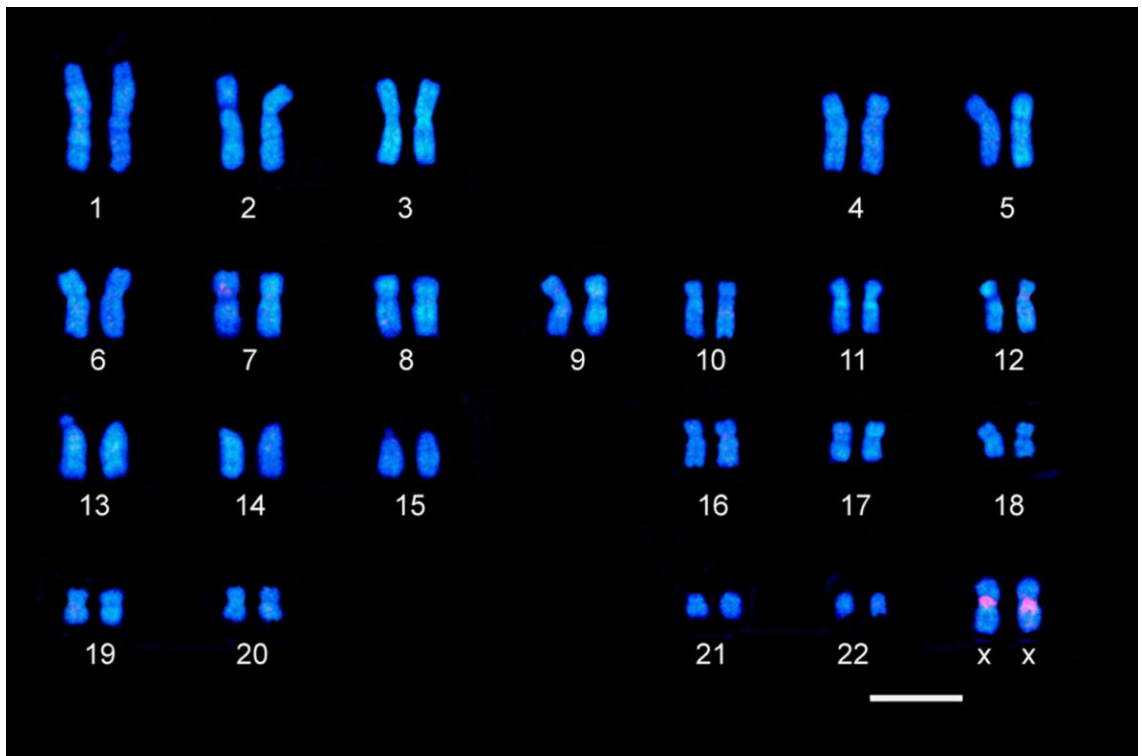


**Figura 4:** Hibridização in situ fluorescente em cromossomos metafásicos humanos de indivíduos do sexo feminino, evidenciando a marcação da região subcentromérica dos dois cromossomos X, além de duas marcações correspondentes em um núcleo interfásico. Contracoloração com DAPI. Barra = 10  $\mu$ m.

A análise morfológica dos cromossomos, seguida da montagem dos cariótipos (Figuras 5 e 6) indicaram que a sonda construída é específica para o cromossomo X, sendo denominada SCX.



**Figura 5:** Cariograma humano de um indivíduo do sexo masculino. Marcação do cromossomo X pela sonda SCX. Barra = 10  $\mu$ m.



**Figura 6:** Cariograma humano de um indivíduo do sexo feminino. Marcação dos dois cromossomos X pela sonda SCX. Barra = 10  $\mu$ m.

## 5. DISCUSSÃO

A micromanipulação foi realizada em lâminas contendo cromossomos sem nenhum processo de coloração. Muitos autores micromanipulam cromossomos corados, o que facilita a identificação dos mesmos (Engelen et al., 1998; Weimer et al., 2001). No entanto, optou-se por não realizar a coloração dos cromossomos para que eles não perdessem os fragmentos amplificados no PRINS. Henning et al. (2008) realizaram a microdissecção em lamínulas, justificando tal necessidade pelo fato de se utilizar o microscópio invertido. Apesar das lamínulas serem relativamente mais finas, permitindo uma melhor visualização do material, essa espessura confere fragilidade indesejada, podendo ocasionar perda do material.

Os cromossomos micromanipulados foram facilmente retirados do fragmento alvo desejado, sem perda de material. Isso foi possível porque antes da etapa de micromanipulação foi realizada uma re-hidratação dos cromossomos, conforme descrito por Engelen et al. (1998). Durante o processo de obtenção dos cromossomos, a partir da cultura de linfócitos, e no preparo das lâminas contendo metáfases, etapas de fixação e desidratação foram realizadas, o que faz com que os cromossomos fiquem fortemente aderidos à lâmina. Consequentemente, esses cromossomos não são adequadamente coletados pela micropipeta, tornando o processo de captura mais laborioso (Claussen et al., 1994; Bussey, 1996).

A sonda SCX foi construída a partir de 10 fragmentos pequenos de cromossomos X, oriundos de PRINS. Muitos trabalhos reportam a necessidade de grande quantidade de cromossomos micromanipulados para a construção de uma sonda (em torno de 20 cromossomos). No entanto, alguns autores têm relatado que é possível a construção de sondas com menor número de cromossomos. Guan et al. (1994), Engelen et al. (1998) e Henning et al. (2008) construíram sondas a partir da micromanipulação de 2 a 5 fragmentos de cromossomos. Christian et al (1999) foram os que obtiveram mais sucesso, originando uma sonda a partir de um único cromossomo micromanipulado. A amplificação *in situ* (PRINS) foi uma estratégia adotada para diminuir a quantidade de cromossomos necessária, considerando que o cromossomo será micromanipulado com seu DNA amplificado. Entretanto, a metodologia utilizada por esses autores não apresentou repetibilidade. Não há relatos de trabalhos utilizando esses protocolos, e nem mesmo os autores deram continuidade a linha de pesquisa.

O tratamento dos fragmentos cromossômicos micromanipulados com proteinase K é recomendado, para que haja o processo de desproteínização do DNA (Weimer et

al., 1999). Porém, alguns autores apontam outros métodos para a digestão das proteínas. Guan et al. (1994) recomendaram o tratamento do material microdissectado com topoisomerase I. Engelen et al. (1998) realizaram um procedimento utilizando a temperatura como agente desproteinizante, submetendo o material a ciclos de 30 °C e 50 °C. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho foram positivos utilizando apenas a proteinase K por 24 horas.

O material micromanipulado foi amplificado por DOP-PCR e analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5 %, apresentando como resultado um arraste de DNA na região entre 200 e 600 pares de base, sem uma banda evidente. A amplificação do material amplificado por meio de DOP-PCR tem sido amplamente utilizada na construção de sondas (Christian et al., 1999; Barboux e Poirier, 2001; Zhou et al., 2001). As condições do DOP-PCR têm que ser otimizadas para evitar amplificações preferenciais e para gerar fragmentos de 200 a 600 pares de base, tamanho ideal para uma sonda (Hobza et al., 2004).

Para a amplificação do material, foi utilizada como enzima a Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase. Christian et al. (1999) utilizaram a Thermosequenase como DNA polimerase nas reações de DOP-PCR. Os resultados obtidos pelas duas foram semelhantes, uma vez que ambas apresentam alta processividade. Pelo fato dessas enzimas serem altamente processivas em altas temperaturas, recomenda-se a utilização de rampa entre as temperaturas de anelamento e extensão (Henning et al., 2008).

Outro fator relevante durante a amplificação é a concentração do primer. No presente trabalho, com a utilização de ciclos de amplificação relativamente longos, optou-se pela utilização do primer na concentração de 4 µM. Para aplicações padrão, a quantidade de primer recomendada é entre 0,1 µM e 1 µM, e o primer raramente é todo utilizado durante a reação (Rolfs et al., 1992). No entanto, Engelen et al. (1998) utilizaram a concentração do primer de 4 µM, uma vez que a limitação de primer pode atenuar a taxa de amplificação nos últimos ciclos de PCR (Czerny, 1996).

A hibridização *in situ* mostrou-se eficiente, com marcação apenas no cromossomo correspondente ao que originou a sonda, sem marcações inespecíficas. Essas hibridizações indesejadas são suprimidas pela adição do Cot-1, que compete na ligação das possíveis regiões repetitivas da sonda em cromossomos que não seriam alvo (Craig et al., 1997).

A sonda SCX marcou especificamente a região subcentromérica do cromossomo X, identificado por sua morfologia e pela razão entre o braço longo e curto. O cromossomo X é classificado como submetacêntrico, sendo semelhante em forma e

tamanho aos cromossomos de número 6 a 12, o que torna difícil sua identificação sem bandeamento (Barch et al., 1997; Czepulkowski, 2001). Essa sonda SCX poderá ser usada como marcador desse cromossomo, além de servir para analisar possíveis anomalias estruturais.

## 6. CONCLUSÃO

A micromanipulação, juntamente com a técnica de DOP-PCR, tem se mostrado importantes ferramentas na obtenção de sondas cromossomo-específicas. Entretanto, os protocolos existentes na literatura apresentam diferenças metodológicas e estas não são facilmente reprodutíveis diante das diferenças inter-laboratórios. O presente trabalho possibilitou adaptar e padronizar essas metodologias para a construção de sonda cromossomo-específica, detalhando as etapas mais críticas.

A técnica de PRINS também foi padronizada e possibilitou a micromanipulação de uma menor quantidade de moldes cromossômicos para a construção da sonda.

A sonda SCX obtida poderá ser utilizada como marcador do cromossomo X humano possibilitando a identificação sem necessidade de bandeamento. Além disso, essa sonda poderá auxiliar na análise de alterações físicas e numéricas envolvendo o cromossomo X.

Essa nova metodologia disponível não está restrita a utilização em cromossomos humanos, podendo ser amplamente aplicada a outros organismos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBAUX, S.; POINIRIER, O. Use of degenerate nucleotide primed PCR (DOP-PCR) for the genotyping of low-concentration DNA samples. *J Mol Med* 79: 329-332, 2001.

BARCH, M.J.; KNUTSEN, T.; SPURBECK, J.L. The AGT cytogenetics laboratory manual. 3 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997.

BATES, G.P.; WAINWRIGHT, B.J.; WILLIAMSON, R.; BROWN, S.D.M. Microdissection and microcloning from the short arm of human chromosome 2. *Mol. Cell. Biol.*, 6: 3826-3830, 1986.

BRENNAN-HANSEN, S.; LI, J.; KENT, M.P.; BOULDING, E.G.; DOMINIK, S.; DAVIDSON, W.S.; LIEN, S. Chromosomal differences between European and North American Atlantic salmon discovered by linkage mapping and supported by fluorescence in situ hybridization analysis. *BMC Genomics*, 13: 432, 2012.

BUSSEY, K.J. Chromosome microdissection: on the cutting edge. *Appl. Cytogenet.* 22(2): 30-36, 1996.

CABRAL-DE-MELO, D.C.; MARTINS, C. Breaking down the genome organization and karyotype differentiation through the epifluorescence microscope lens: insects and fish as model. *Microscopy: Science, technology, applications and education*. P. 658-669, 2010.

CHENG, Z.; BUELL, C.R.; Wing, R.A.; Jiang, J. Resolution of fluorescence *in-situ* hybridization mapping on rice mitotic prometaphase chromosomes, meiotic pachytene chromosomes and extended DNA fibers. *Chromosome Res* 10: 379-387, 2002.

CHRISTIAN, A.T.; Garcia, H.E.; Tucker, J.D. PCR *in situ* followed by microdissection allows whole chromosome painting probes to be made from single microdissected chromosomes. *Mamm Genome* 10: 628-631, 1999.

CLAUSSEN, U.; MAZUN, A.; RUBTSOV, N. Chromosomes are highly elastic and can be stretched. *Cytogenet. Cell Genet.* 66: 120-125, 1994.

CRAIG, J.M.; KRAUS, J.; CREMER, T. Removal of repetitive sequences from FISH probes using PCR-assisted affinity chromatography. *Hum. Genet.* 100: 472-476, 1997.

- CZEPULKOWSKI, B. Analyzing chromosomes. BIOS Scientific Publishers, 2001.
- CZERNY, T. High primer concentration improves PCR amplification from random pools. *Nucleic Acids Res.* 24(5): 985-986, 1996.
- DANILOVA, T.V.; FRIEBE, B.; GILL, B.S. Single-copy gene fluorescence in situ hybridization and genome analysis: Acc-2 loci mark evolutionary chromosomal rearrangements in wheat. *Chromosoma*, 121: 597-611, 2012.
- ENGELLEN, J.J.M.; ALBRECHTS, J.C.M.; HAMERS, G.J.H.; GERAEDTS, J.P.M. A simple and efficient method for microdissection and micro-FISH. *J. Med. Genet.* 35: 265-268, 1998.
- GALL, J.G.; PARDUE, M.L. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *PNAS*, vol: 63, n. 2, p. 378-383.
- GARIMBERTI, E.; TOSI, S. *Methods in molecular biology*, vol. 659: Fluorescence in situ hybridization (FISH), Humana Press Inc. p.3-20, 2010.
- GRIBBLE, S.; BEE, N.L.; PRIGMORE, E.; BURFORD, D.C.; CARTER, N.P. Chromosome paints from single copies of chromosomes. *Chromosome Res* 12: 143-151, 2004.
- GUAN, X.Y.; MELTZER, P.S.; TRENT, J.M. Rapid generation of whole chromosome painting probes (WCPs) by chromosome microdissection. *Genomics* 22: 101-107, 1994.
- GUERRA, M. Hibridização *in situ*: princípios básicos. In: Guerra, M. (Ed.). *FISH: conceitos e aplicações na citogenética*. 1. ed. Brasil: Sociedade Brasileira de Genética, 2004, 176 p.
- HAMON, P.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; SRISUWAN, S.; ROBIN, O.; PONCET, V.; HAMON, S.; DE KOCHKO, A. Physical mapping of rDNA and heterochromatin in chromosomes of 16 *Coffea* species: A revised view of species differentiation. *Chromosome Res* 17(3): 291-304, 2009.
- HARPER, I.C.; CANDE, W.Z. Mapping a new frontier: development of integrated cytogenetics maps in plant. *Funct Integrat Genomics* 1: 89-98, 2000.
- HENNING, F.; TRIFONOV, V.; TOLEDO, L.F.A. Use of chromosome microdissection in fish molecular cytogenetics. *Genet Mol Biol* 31(1): 279-283, 2008.

- HOBZA, R.; LENGEROVA, M.; CERNOHORSKA, H.; RUBES, J.; VYSKOT, B. FAST-FISH with laser beam microdissected DOP-PCR probe distinguishes the sex chromosomes of *Silene latifolia*. *Chromosome Res* 12: 245-250, 2004.
- HOUBEN, A. Plant genetics and genomics: crop and models. Vol: 9, Plant cytogenetics: Genome structure and chromosome function, Springer, p. 257-270, 2012.
- HOUBEN, A; LEACH, C.R.; VERLIN, D.; ROFE, R.; TIMMIS, J.N. A repetitive DNA sequence common to the different B chromosomes on the genus *Brachycome*. *Chromosoma*, 106: 513-519, 1997.
- JIANG, J.; GILL, B.S. Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome*, 49(9): 1057-1068, 2006.
- JOHN, H.A.; BIRNSTIEL, M.L.; JONES, K.M. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*, 223: 582-587, 1969.
- KISS, C.; KOST-ALIMOVA, M.; KLEIN, G.; SZEKELY, L. Optimisation of degenerate oligonucleotide primed PCR (DOP-PCR) for capillary thermocycler. *Biomol Eng* 19: 31-34, 2002.
- KOCK, J. *Methods in molecular biology*, vol. 204: Molecular cytogenetics: protocols and application, Humana Press Inc. p.70-82, 2003.
- KOCK, J.E.; KOLVRAA, S.; PETERSEN, K.B.; GREGERSEN, N.; BOLUND, L. Oligonucleotide-priming methods for the chromosome-specific labelling of alpha satellite DNA in situ. *Chromosoma*, 98: 259-265, 1989.
- KUBICKOVA, S.; CERNOHORSKA, H.; MUSILOVA, P.; RUBES, J. The use of laser microdissection for the preparation of chromosome-specific painting probes in farm animals. *Chromosome Research*, 10: 511-517, 2002.
- KUUKASJARVI, T.; TANNER, M.; PENNANEN, S.; KARKHU, R.; VISAKORPI, T.; ISOLA, J. Optimizing DOP-PCR for universal amplification of small DNA samples in comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 18: 94-101, 1997.
- LAN, T.Y.; CHEN, R.Y.; LI, X.L.; DONG, F.P.; QI, Y.C.; SONG, W.Q. Microdissection and painting of the W chromosome in *Ginkgo biloba* showed different labeling patterns. *Bot. Studies* 49: 33-37, 2008.

LANGER, P.R.; WALDROP, A.A.; WARD, D.C. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. PNAS, vol: 78, n. 11, p. 6633-6637, 1981.

LANGER-SAFER, P.R.; LEVINE, M.; WARD, D.C. Immunological method for mapping genes on Drosophila polytene chromosome. PNAS, vol: 79, n. 14, p. 4381-4385, 1982.

LEITCH, A.R.; SCHWARZACHER, T.; JACKSON, D.; LEITCH, J. *In situ* hybridization: a practical guide. Royal Microscopical Society, Microscopy Handbooks, 27. 1. ed. Estados Unidos: Bios Scientific Publishers, 1994, 118 p.

LIM, K.Y.; SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; TATE, J.; MATYASEK, R.; et al. Rapid chromosome evolution in recently formed polyploids in *Tragopogon* (Asteraceae). PloS One 3: 1–13, 2008.

LIU, X.H.; WANG, H.W.; LI, Y.M.; TANG, Y.H.; LIU, Y.L.; HU, X.; JIA, P.X.; YING, K.; FENG, Q.; GUAN, J.P.; JIN, C.Q.; ZHANG, L.; LOU, L.R.; ZHOU, Z.; HAN, B. Preparation of single rice chromosome for construction of a DNA library using a laser microbeam trap. J Biotechnol 109: 217–226, 2004.

LO, K.; LIN, Y.; CHEN, L. Bor-yaw Lin Isolation and characterization of new maize B sequences from a microdissected library. Plant Mol Biol Rep 27: 350-354, 2009.

LOU, Q.; IOVENE, M.; SPOONER, D.M.; BUELL, C.B.; JIANG, J. Evolution of chromosome 6 of *Solanum* species revealed by comparative fluorescence *in situ* hybridization mapping. Chromosoma, 2010. DOI: 10.1007/s00412-010-0269-6.

LUKASZEWSKI, A.J.; LAPINSKI, B.; RYBKA, K. Limitations of *in situ* hybridization with total genomic DNA in routine screening for alien introgressions in wheat. Cytogenet Genome Res 109: 373-377, 2005.

MACAS, J.; DOLEZEL, J.; GUALBERTI, G.; PICH, U.; SCHUBERT, I.; LUCRETTI, S. Primer-induced labelling of pea and field bean chromosomes *in situ* and *in suspension*. BioTechniques, 19: 402-408.

MARKOVA, M.; VYSKOT B. New horizons of genomic *in situ* hybridization. Cytogenet Genome Res 126: 368-375, 2009.

OHMILDO, N.; FUKUI, K.; KINOSHITA, T. Recent advances in Rice genome and chromosome structure research by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Proc Jpn Acad Ser B* 86: 103-115, 2010.

PELLESTOR, F. *Methods in molecular biology*, vol: 334: PRINS and in situ PCR protocols, 2<sup>o</sup> edição. Humana Press Inc, p. 211-220, 2006.

PENDINEN, G.; SPOONER, D.M.; JIANG, J.; GAVRILENKO, T. Genomic in situ hybridization reveals both auto- and allopolyploid origins of different North and Central American hexaploid potato (*Solanum* sect. *Petota*) species. *Genome*, 55(6): 407-415, 2012.

PICH, U.; MEISTER, A.; MACAS, J.; DOLEZEL, J.; LUCRETTI, S.; SCHUBERT, I. Primed in situ labelling facilitates flow sorting of similar sized chromosomes. *Plant J.*, 7: 1039-1044.

QI, L.L.; PUMPHREY, M.O.; FRIEBE, B.; CHEN, P.D.; GILL, B.S. Molecular cytogenetic characterization of alien introgressions with gene *Fhb3* for resistance to *Fusarium* head blight disease of wheat. *Theor Appl Genet* 117: 1155–1166, 2008.

RÖHME, D.; FOX, H.; HERRMANN, B.; FRISCHAUF, A.M.; EDSTRÖM, J.E.; MAINS, P.; SILVER, L.M.; LEHRACH, H. Molecular clones of the mouse t complexe derived from microdissected metafase chromosomes. *Cell.*, 36 (3): 738-788, 1984.

ROLFS, A.; SCHULLER, I.; FINCKH, U. WEBER-ROLFS, I. PCR: clinical diagnostics and research. Berlin: Springer Verlag, 1992.

SANDERY, M.J.; FORSTER, J.W.; MACADAM, S.R.; BLUNDEN, R.; JONES, R.N.; BROWN, S.D.M. Isolations of a sequence common to A- and B-chromosomes of rye (*Secale cereale*) by microcloning. *Plant Molecular Biology Reporter*, vol: 9 (1): 21-30, 1991.

SCALENGHE, F.; TURCO, E.; EDSTROM, J.E.; PIRROTTA, V.; MELLI, M. Microdissection and cloning of DNA from a specific region of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Chromosoma* 82: 205-216, 1981.

SHIBATA, F.; HIZUME, M.; KUROKI, Y. Chromosome painting of Y chromosomes and isolation of a Y chromosome-specific repetitive sequence in the dioecious plant *Rumex acetosa*. *Chromosoma* 108: 266-270, 1999.

- STEPHENS, J.L.; BROWN, S.E.; LAPITAN, N.L.V.; KNUDSON, D.I. Physical mapping of barley genes using an ultrasensitive fluorescence *in situ* hybridization technique. *Genome* 47: 179-189, 2004.
- TELENIUS, H.; CARTER, N.P.; BEBB, C.E.; NORDENSKJOLD, M.; PONDER, B.A. AND TUNNACLIFFE, A. Degenerate oligonucleotideprimed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13: 718-725, 1992.
- WAI, C.M.; MOORE, P.H.; PAULL, R.E.; MING, R.; YU, Q. An integrated cytogenetic and physical map reveals unevenly distributed recombination spots along the papaya sex chromosomes. *Chromosome Research*, 20: 753-767, 2012.
- WANG, C.J.; CHEN, C.C. Cytogenetic mapping in maize. *Cytogenet Genome Res* 109: 63-69, 2005.
- WEIMER, J.; KIECHLE, M.; SENGER, G.; WIEDEMANN, U.; OVENS-READER, A.; SCHUIERER, E.; KAUTZA, M.; SIEBERT, R.; ARNOLD, N. An easy and reliable procedure of microdissection technique for the analysis of chromosomal breakpoints and marker chromosomes. *Chromosome Research*, 7: 355-362, 1999.
- WEIMER, J.; KOEHLER, M.R.; WIEDEMANN, U.; ATTERMAYER, P.; JACOBSEN, A.; KAROW, D.; KIECHER, M.; JONAT, W.; ARNOLD, N. Highly comprehensive karyotype analysis by a combination of spectral karyotyping (SKY), microdissection, and reverse painting (SKY-MD). *Chromosome Research*, 9: 395-402, 2001.
- YAMAMOTO, M.; MUKAI, Y. High-resolution physical mapping of the secalin-1 locus of rye on extended DNA fibers. *Cytogenet Genome Res* 109: 79-82, 2005.
- ZHANG, H.Q.; YANG, R.W.; DOU, Q.W.; TSUJIMOTO, H.; ZHOU, Y.H. Genome constitutions of *Hystrix patula*, *H. duthiei* ssp. *duthiei* and *H. duthiei* ssp. *longearistata* (Poaceae: Triticeae) revealed by meiotic pairing behaviour and genomic in-situ hybridization. *Chromosome Res* 14:595–604, 2006.
- ZHOU, R.N.; HU, Z.M. The development of chromosome microdissection and microcloning technique and its applications in genomic research. *Cur Genomics*, 8: 67-72, 2007.

ZHOU, Y.; DANG, B.; WANG, H.; HU, Z.; WANG, L.; CHEN, Z. Microdissection of a single chromosome and construction of the microclone library from soybean. *Euphytica* 121: 129-135, 2001.

ZWIERZYKOWSKI, Z.; ZWIERZYKOWSKA, E.; TACIAK, M.; JONES, N.; KOSMALA, A.; KRAJEWSKI, P. Chromosome pairing in allotetraploid hybrids of *Festuca pratensis* X *Lolium perenne* revealed by genomic *in situ* hybridization (GISH). *Chromosome Res* 16: 575–585, 2008.