

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar**  
**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**Estabelecimento de Metodologias de Análise do DNA  
Livre Plasmático para o Diagnóstico Pré-Natal Não  
Invasivo: Sexagem Fetal**

**Bruno Garcia Rocha**

São Carlos  
2012

**Bruno Garcia Rocha**

**Estabelecimento de Metodologias de Análise do DNA  
Livre Plasmático para o Diagnóstico Pré-Natal Não  
Invasivo: Sexagem Fetal**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Biotecnologia  
da Universidade Federal de São Carlos  
para a obtenção do título de Mestre.

**Orientadores:**

Prof. Dr. Euclides Matheucci Junior  
Prof. Dr. Fernando Manuel Araújo Moreira

São Carlos  
2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

R672em

Rocha, Bruno Garcia.

Estabelecimento de metodologias de análise do DNA livre plasmático para o diagnóstico Pré-natal não invasivo : sexagem fetal / Bruno Garcia Rocha. -- São Carlos : UFSCar, 2012.  
73 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Biologia molecular. 2. Reação em cadeia de polimerase (PCR). 3. LAMP. 4. Sexagem fetal. 5. DNA fetal. 6. Biotecnologia. I. Título.

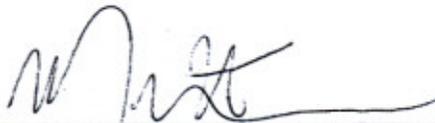
CDD: 574.88 (20<sup>a</sup>)

**Bruno Garcia Rocha**

Dissertação de Mestrado submetida  
à Coordenação do Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia,  
da Universidade Federal de São  
Carlos, como requisito parcial para  
a obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia

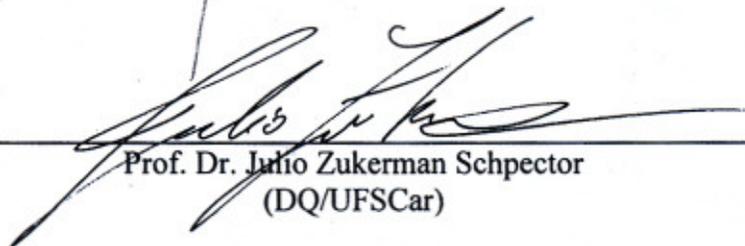
**Aprovado em: 18/02/2011.**

**BANCA EXAMINADORA**



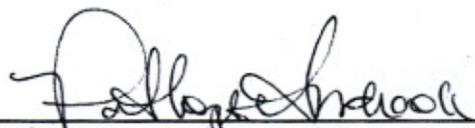
---

Prof. Dr. Euclides Matheucci Junior (Orientador)  
(DGE/UFSCar)



---

Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector  
(DQ/UFSCar)



---

Profa. Dra. Patrícia de Fátima Lopes Andrade  
(Universidade Federal Fluminense)

“Você pode sonhar, criar, desenhar e construir o lugar mais maravilhoso do mundo. Mas é necessário ter pessoas para transformar seu sonho em realidade.”

Walt Disney

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço acima de tudo a Deus e a minha família pelo amor e apoio durante toda minha vida, meu pai Eurico, minha mãe Maria, meu irmão Richard e minha cunhada Marília, que já é da família.

Ao meu orientador Prof. Dr. Euclides Matheucci Jr. pela paciência, dedicação, amizade e pelos ensinamentos não só como professor como também de vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Manuel Araújo Moreira pela disposição e pelos ensinamentos nas aulas.

À Dra. Adriana Medaglia, que acreditou em mim desde o primeiro dia de laboratório, me ensinou e acima de tudo me incentivou.

Agradeço aos meus amigos do grupo de jovens Brasa, principalmente ao Dú, Marcinho, Gui Santos, Naldo e Loy, que sempre me ajudaram nos momentos difíceis e também estiveram presentes nas alegrias e bagunças.

Aos meus amigos do laboratório DNA Consult e QGene: Fernanda, Fábio, Milena, Jussara e Carla, que me ajudaram neste trabalho e estão ao meu lado todos os dias.

A minha namorada Flávia pelo carinho, amor e paciência com que me apoiou ao longo do período de elaboração desta dissertação.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## Resumo

Neste trabalho propusemos e analisamos metodologias empregadas no uso da tecnologia dos Ácidos Nucléicos Livres de Células Fetais (cffDNA = *Cell Free Fetal DNA*) no diagnóstico pré-natal não invasivo (DPIN = *Non-invasive Prenatal Diagnosis*). Dada a modernidade das tecnologias empregadas e a sua repercussão nas famílias envolvidas, procuramos discutir algumas implicações éticas, sociais e legais. Ao contrário da crença popular de que a placenta constitui uma barreira impermeável entre mãe e filho, há tráfego bidirecional entre o feto e a mãe durante a gravidez. Vários estudos têm demonstrado que tanto células fetais intactas e ácidos nucleicos livres de células fetais (cffNA, ou seja, DNA e RNA) atravessam a placenta e circulam na corrente sanguínea materna. Identificamos quatro diferentes aplicações da tecnologia de análise do cffDNA: a) Determinação pré-natal do sexo, utilizada em gestações com risco de uma doença ligada ao sexo e realizada através da detecção do cromossomo masculino Y; b) O diagnóstico de certas doenças de gene único, normalmente através da detecção de mutação herdada paternalmente; c) Aneuploidia fetal, tal como a Síndrome de Down, onde há alterações cromossômicas; d) Detecção do tipo de sangue fetal em gestações com risco de incompatibilidade, sobretudo RhD. Para realizar este trabalho utilizamos a determinação pré-natal do sexo em 53 gestantes em diferentes períodos gestacionais. Para tal, testamos e propusemos metodologias de extração do DNA; amplificação do DNA extraído através da técnica da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e de uma nova metodologia denominada LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification*); e a análise final dos resultados. Além disso, comparamos a eficiência da PCR e LAMP amplificando diferentes segmentos do cromossomo Y: DSY14 e TSPY. Em três casos as amostras foram descartadas porque não houve a confirmação do sexo fetal após os testes moleculares devido à perda de contato com as gestantes. Em outros dois casos os resultados apontaram para fetos masculinos, entretanto, no ultra-som eles foram confirmados como femininos, provavelmente devido a uma contaminação. No final obtivemos 28 amostras (58,33%) masculinas, com a amplificação das sequências do cromossomo Y e 20 amostras (41,67%) femininas que não amplificaram a

sequência do cromossomo Y e apenas para o controle. Nossos resultados demonstraram que a amplificação por LAMP é mais eficiente que a PCR na análise de DSY14, sendo que o limite de detecção é de 10 pg e 0,1 pg, para a PCR e o LAMP, respectivamente. Concluímos que a amplificação utilizando a metodologia de LAMP é mais rápida (60 minutos) e apresenta uma alta especificidade, sensibilidade e não requer equipamentos sofisticados para reação, comparada com a técnica da PCR. Tais características viabilizam esta metodologia em laboratórios com poucos recursos.

Palavras-chave: DNA Fetal, PCR, LAMP, fentograma, sexagem fetal.

## **Abstract**

In this paper we proposed and analyzed methodologies using the technology of Cell-Free Fetal Nucleic Acid-Free (cffDNA = Cell Free Fetal DNA) in noninvasive prenatal diagnosis (NIPD). Due to the modern technologies employed and their repercussion among the involved families, we sought to discuss some ethical, social and legal implications. Contrary to the popular belief that the placenta forms an impermeable barrier between mother and child, there is bidirectional traffic between the fetus and mother during pregnancy. Several studies have shown that not only intact cells but also fetal cell-free fetal nucleic acids (cffNA, ie, DNA and RNA) cross the placenta and travels in the mother's bloodstream. Four different applications of analysis technology were identified: cffDNA: a) Prenatal Sex Determination, used in pregnancies under the risk of sexual transmitted diseases and performed through the detection of the Y chromosome b) The diagnosis of certain diseases of a single gene through the detection of paternally inherited mutation c) Fetal Aneuploidy, such as Down syndrome, where chromosomal abnormalities may occur d) identifying the type of fetal blood in pregnancies under the risk of incompatibility, especially RhD. To carry out this work it was used the pre-natal determination of sex in 53 pregnant women at different gestational periods. For that it was proposed and tested methods of DNA extraction, amplification of DNA obtained by PCR (Polymerase Chain Reaction) and a new methodology called LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) and the analysis of final results. Furthermore, the efficiency of LAMP and PCR was compared by amplifying different segments of the Y chromosome: DSY14 and TSPY. In three cases the samples were discarded because there was no fetal sex confirmation after molecular tests due to loss of contact with pregnant women. In two other cases the results pointed to male fetuses whilst the ultrasound confirmed these fetuses as females due to contamination. Finally it was obtained 28 male samples (58.33%) with amplification of the sequences of the Y chromosome and 20 female samples (41.67%) that did not amplify the sequence of the Y chromosome but only for the control. These results showed that the amplification

lamp is more efficient than PCR, in the analysis of DSY14, the limit of detection is 10 pg and 0.1 pg for LAMP and PCR respectively. It was concluded that the amplification using the LAMP method is faster (60 min) and has a high sensitivity and specificity and does not require sophisticated equipment for reaction if compared to the PCR method. These characteristics make this methodology feasible in laboratories with limited resources.

Keywords: Fetal DNA, PCR, LAMP, femtogram, fetal sexing.

## Lista de Figuras:

**Figura 1:** Esquema do cromossomo Y humano mostrando a localização do gene TSPY e DYS14 (modificado de Donabela, 2008).....13

**Figura 2:** Imagem da página do *NCBI Map Viewer* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>) mostrando a localização do gene DYS14 e o TSPY no cromossomo Y, com diferença de 2 Mb.....14

**Figura 3:** Representação esquemática da reação em cadeia da polimerase (PCR) com as três etapas utilizadas: 1ª Etapa: Desnaturação da fita de DNA; 2ª Etapa: Anelamento dos iniciadores; 3ª Etapa: Extensão pela DNA polimerase. Cada ciclo é formado pelas três etapas, que se repetem por cerca de 30 a 35 vezes.....19

**Figura 4:** Representação esquemática da reação em cadeia da polimerase (PCR) com as três etapas utilizadas 1, 2 e 3 (desnaturação, anelamento e extensão) com os ciclos. Note que existe uma fase de inicialização, 1', usada para DNA Polimerases com características de *hot-start*.....21

**Figura 5:** Representação esquemática da *Nested PCR*, mostrando as duas reações que são realizadas. Note que na primeira reação são utilizados iniciadores na cor verde. O produto da primeira amplificação é utilizado como molde para uma segunda rodada de amplificação, cujos iniciadores estão em cor vermelha.....23

**Figura 6:** Representação esquemática do desenho dos quatro iniciadores (F3, FIP, B3 e BIP) para LAMP e suas respectivas regiões de anelamento. Note que: FIP é constituído por dois iniciadores, F1C e F2, separados por quatro timinas; BIP é constituído por dois iniciadores B1C e B2, separados por quatro timinas.....27

**Figura 7:** Representação esquemática da etapa não cíclica da amplificação por LAMP (passo de 1 a 8) com a geração da estrutura básica em forma de halteres (modificado Eiken Chemical Co. Ltda, Japan).....29

**Figura 8:** Representação esquemática da etapa cíclica da amplificação por LAMP (passos de 8 a 11). Amplificação exponencial da estrutura básica do LAMP (modificado Eiken Chemical Co. Ltda, Japan).....30

**Figura 9:** Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio da *Nested PCR* para o gene DYS14. (*Ladder*) – marcador de massa molecular 1kb Plus Invitrogen®; (1 e 3) fragmento de 198 pb, DNA extraído de plasma de gestante de feto masculino; (2 e 4) sem amplificação, DNA extraído de plasma de gestante de feto feminino, (C -) controle negativo da reação..... 45

**Figura 10:** Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio da *Nested-PCR* para o gene *TSPY*. (*Ladder*) - marcador de massa molecular 1kb Plus Invitrogen®; (1 e 2) fragmento de 250 pb, DNA extraído de plasma de gestante de feto masculino; (3 e 4) sem amplificação, DNA extraído de plasma de gestante de feto feminino, (C -) controle negativo da reação.....45

**Figura 11:** Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio da *PCR* para o gene  $\beta$ -*Globina* com um fragmento de 620 pb. (*Ladder*) – marcador de massa molecular 1kb Plus Invitrogen®; (1 e 2) DNA extraído de plasma de gestante de feto masculino, (3 e 4) DNA extraído de plasma de gestante de feto feminino, (C -) controle negativo da reação..... 46

**Figura 12:** Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio da reação de amplificação por *LAMP* para o gene *DYS14*. (*Ladder*) – marcador de massa molecular 1kb Plus Invitrogen®; variação do tempo de amplificação de 30 até 90 minutos.....47

**Figura 13:** Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio da reação da *Nested-PCR* e *LAMP* para o gene *DYS14*. As amplificações foram realizadas a partir de diferentes concentrações de DNA total de um homem saudável, 100 ng até 1 fg. (*Ladder*) – marcador de massa molecular 1kb Plus Invitrogen®; concentração variando de 100 ng/ $\mu$ L até 1 fg/ $\mu$ L; (C-) controle negativo da reação.....48

**Figura 14:** Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio da reação da *Nested PCR* e *LAMP* para gene *TSPY*. As amplificações foram realizadas a partir de diferentes concentrações de DNA total de um homem saudável, 100 ng até 1 fg. (*Ladder*) – marcador de massa molecular 1kb Plus Invitrogen®; concentração variando de 100 ng/ $\mu$ L a 1 fg/ $\mu$ L; (C -) controle negativo da reação.....49

**Figura 15:** Foto do resultado da eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para os genes *DYS14* e *TSPY*, mostrando um resultado de sexagem. (*Ladder*) – marcador de massa molecular 1kb Plus Invitrogen®; (1 e 2) DNA extraído de plasma de gestante de feto masculino; (3 e 4) DNA extraído de plasma de gestante de feto feminino; (C -) controle negativo da reação.....50

## Lista de tabelas

<u>Tabela 1</u> : Resumo das principais propriedades dos elementos do feto e da placenta no sangue materno.....	3
<u>Tabela 2</u> : Aplicações da técnica de LAMP para a detecção de doenças virais dos seres humanos e animais.....	25
<u>Tabela 3</u> : Amostras de gestantes coletadas em diferentes idades gestacionais...	34
<u>Tabela 4</u> : Sequências dos iniciadores para amplificação por PCR dos genes TSPY, DYS14 e $\beta$ -Globina.....	39
<u>Tabela 5</u> : Sequências dos iniciadores para amplificação por LAMP dos genes TSPY e DYS14.....	41
<u>Tabela 6</u> : Protocolos utilizados para extração do DNA fetal com as variáveis testadas.....	42
<u>Tabela 7</u> : Padrões de reações de amplificação dos genes DSY14 e TSPY utilizadas na primeira reação da PCR.....	43
<u>Tabela 8</u> : Padrões de reações de amplificação dos genes DSY14 e TSPY utilizadas na segunda reação da PCR.....	44
<u>Tabela 9</u> : Componentes da reação de LAMP com suas concentrações e volume para amplificação dos genes DSY14 e TSPY.....	47
<u>Tabela 10</u> : Resultados obtidos por amplificação por PCR e LAMP comparado com o resultado do ultra-som.....	51

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	Adenina
<i>Bst</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
C	Citosina
cffDNA	<i>Cell Free Fetal DNA</i>
CONEP	Comitê Nacional de Ética em Pesquisa
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DPIN	<i>Non-invasive Prenatal Diagnosis</i>
DYS14	Região específica do cromossomo Y
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
fg	Fentograma
G	Guanina
<i>g</i>	Gravidade
H <sub>2</sub> O	Água
HAC	Hiperplasia Adrenal Congênita
kb	Kilo base
kD	Kilo dalton
LAMP	<i>Loop Mediated Isothermal Amplification</i>
M	mol/L
Mb	Mega Base

MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Normal
NaOH	Hidróxido de Sódio
ng	Nanograma
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de Amônio
pb	Pares de bases
P.A.	Puro para Análise
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da Polimerase)
pg	Picograma
pmol	Picomol
Q-PCR	PCR-Quantitativo
RNA	Ácido Ribonucléico
RT-PCR	PCR-Transcriptase Reversa
SDS	Dodecil Sulfato de sódio
SRY	<i>Sex Determining Region of the Y chromosome</i>
SNPs	Polimorfismos de Nucleotídeo Único
STRs	Short Tandem Repeat
T	Timina
TAE	Tris-Ácido Acético-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris(Hidroximetil) Aminometano
TSPY	<i>Testis Specific Protein, Y Encoded</i>

<i>T<sub>m</sub></i>	Temperatura de Melting
μL	Microlitro
U	Unidade
U.V.	Ultravioleta
V	Volt
Y <sub>p</sub>	Braço curto do cromossomo Y
Y <sub>q</sub>	Braço longo do cromossomo Y
°C	Grau Celsius

## Sumário

1	Introdução .....	3
1.1	Diagnóstico pré-natal.....	3
1.2	Aspectos Éticos.....	8
1.3	Aplicações da detecção de DNA livre fetal.....	10
1.4	Sexagem Fetal .....	11
1.5	Região estudada TSPY .....	12
1.6	PCR - Reação em cadeia da Polimerase.....	15
1.6.1	Apresentação da técnica .....	15
1.6.2	Aplicações.....	15
1.6.3	Reagentes utilizados na PCR.....	16
1.6.4	Processo.....	19
1.6.5	Detecção dos produtos da PCR .....	21
1.6.6	Variações sobre a técnica da PCR .....	22
1.7	LAMP - Loop mediated isothermal amplification .....	23
1.7.1	Aplicações.....	24
1.7.2	Reagentes utilizados.....	25
1.7.3	Processo.....	28
1.7.4	Detecção dos produtos da LAMP .....	30
2	Objetivos .....	32
2.1	Objetivo Geral .....	32
2.2	Objetivos Específicos .....	32
3	Material e Métodos .....	33
3.1	Local de Coleta e Pacientes .....	33
3.2.1	Protocolo de extração de DNA a partir do plasma descrito por David Stirling (2003). .....	35
3.2.2	Protocolo de extração de DNA a partir do plasma utilizando Brazol <sup>®</sup> -LGC por Chomczynski & Sacchi (1987). .....	36
3.2.3	Protocolo de extração de DNA a partir do plasma utilizando Kit comercial Qiamp Blood Mini Kit da Qiagen. ....	36
3.2.4	Protocolo de extração de DNA a partir do plasma modificado por Bello et al. (2001) .....	37
3.3	Reações de amplificação.....	37
3.3.1	PCR - Reação em Cadeia da Polimerase .....	37
3.3.2	LAMP - Loop mediated isothermal amplification.....	40
4	Resultados .....	42
4.1	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	43
4.2	LAMP - Loop mediated isothermal amplification .....	46

5	Discussão .....	53
6	Conclusões .....	58
7	Referências Bibliográficas.....	59
	Anexo I .....	67
	Anexo II.....	68
	Anexo III.....	70
	Parecer nº.323/2010 .....	73

# 1. Introdução:

## 1.1 Diagnóstico pré-natal

Em 1997, Dennis Lo, então pesquisador na Universidade de Oxford e atualmente professor de medicina na Universidade de Hong Kong, publicou um artigo seminal na Lancet. Pela primeira vez demonstraram a possibilidade de análise de DNA do cromossomo Y fetal circulando no plasma materno (LO et al., 1997).

Este DNA provém de células da placenta, que expulsam o seu DNA para a circulação materna durante a morte de células normais, quebrando os cromossomos em fragmentos curtos. Além disso, RNA livre fetal derivado de genes placentários também foi detectado no sangue materno em 2000 (POON et al., 2000), para comprovar que tem propriedades similares às cffDNA (*Cell Free Fetal DNA*). Ao contrário das células fetais, que podem persistir por décadas, cffDNA é rapidamente eliminado da circulação materna e são indetectáveis duas horas após o parto (LO e CHIU, 2007). Apesar dos ácidos nucleicos fetais serem diluídos no sangue materno, a quantidade de cffDNA aumenta com a idade gestacional e abrange cerca de 5-10% do DNA total livre de células no sangue materno durante o primeiro e segundo trimestres de gestação (LUN et al., 2008). A quantidade exata de cffDNA varia entre indivíduos, mas pode ser detectado com segurança em torno da 7ª semana de gestação (Tabela 1).

Tabela 1: Resumo das principais propriedades dos elementos do feto e da placenta no sangue materno

Propriedades	cffDNA	Células Fetais
Detecção precoce	Quatro semanas	~ Sete semanas
Proporção	5 a 10%	0,0001 a 0,01%
Persistência no Sangue Materno	< 24 horas	< 27 anos
Propriedades Físicas	Fragmentos Pequenos	Núcleo Denso

O desenvolvimento e aprimoramento de técnicas não invasivas de diagnóstico são objetivos constantemente almejados pela Medicina. As técnicas de diagnóstico por imagem, como ultrassom e tomografia computadorizada, representam um lado muito importante deste processo e os métodos laboratoriais baseados em amostras biológicas uma segunda vertente.

A distinção ou o isolamento de cffDNA do sangue materno, o qual possui o seu próprio DNA livre em grandes quantidades, é um desafio técnico por algumas razões: a) a concentração de todo o DNA de células livres no sangue é relativamente baixa; b) as concentrações de cffDNA são substancialmente menores que o DNA livre da própria mãe; c) o feto herda metade de suas sequências de DNA da mãe, fazendo com que grande parte do cffDNA seja indistinguível .

Uma série de métodos foram desenvolvidos para resolver esses problemas. Durante o isolamento do cffDNA, seguido pela extração de DNA, é fundamental garantir que não seja extraído o DNA presente nas células e que o máximo de DNA seja isolado. Após o isolamento do DNA, pequenas diferenças entre as sequências de DNA fetal e materno são exploradas a fim de detectar especificamente o DNA fetal. Desde que a proporção de DNA fetal seja relativamente pequena, uma técnica altamente sensível deve ser usada para detectar sequências de DNA fetal específicas. Comumente, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é usada para identificação de sequências específicas. A PCR funciona de forma a amplificar exponencialmente cópias de uma sequência específica, aumentando tremendamente a proporção de DNA com a sequência fetal em relação às sequências maternas.

Como alternativa à amplificação da sequência específica do DNA foi descrita uma metodologia denominada LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification*), descrita por Notomi et al. (2000). A tecnologia LAMP é bastante precisa e eficiente e foi utilizada pela primeira vez neste trabalho para análise de cffDNA.

Atualmente, constitui-se uma importante área de pesquisa identificar marcadores moleculares fetais específicos e universais, que possam ser utilizados tanto como testes de diagnósticos ou para confirmar e quantificar a presença de DNA fetal, independente de sexo ou outros testes diagnósticos. Estes marcadores podem ser como um controle positivo para a presença de cffDNA, a fim de identificar

resultados falsos negativos causados por problemas com o processo de extração do DNA ou níveis de DNA circulante abaixo do limite de detecção. Um marcador molecular fetal sob pesquisa é a detecção de sequências específicas de DNA localizadas nos cromossomos autossômicos herdados do pai, incluindo polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e sequências de STRs (*short tandem repeat*), onde o número de repetições varia entre o genoma materno e paterno.

Até o momento, foram propostos dois métodos, ainda em fase de pesquisa, capazes de cumprir todos os requisitos para um marcador molecular fetal universal baseado na exploração de diferenças na atividade de certos genes, tais como aqueles necessários para o crescimento e desenvolvimento, entre os genes fetais, da placenta e da mãe:

- Mudanças epigenéticas entre o feto e a mãe resulta em diferentes níveis de atividade gênica, mais especificamente na metilação do DNA. Por exemplo, o supressor da região promotora de dois tumores - maspin e RASSF1A - são diferencialmente metilados na placenta em relação às células maternas (LO, 2006);
- Identificação de RNA mensageiro que é exclusivamente derivado de DNA fetal ativo. Em pesquisas realizadas têm sido demonstrado que inúmeras espécies de RNA serem de origem placentária sendo assim detectável no plasma materno durante a gravidez (NG et al., 2003).

Toda gestação possui um risco do feto apresentar uma anomalia, inclusive cromossômica. Estas anomalias podem ocorrer devido a erros na formação dos gametas ou mesmo no desenvolvimento embrionário, podendo ser de origem exclusivamente genética ou estarem sujeitas a fatores ambientais (DENNERY et al., 2007).

O diagnóstico precoce de algumas alterações permite a prevenção de determinadas doenças e/ou o tratamento das mesmas, o que torna os exames pré-natais essenciais (THAPAR et al., 2007). Na maioria das vezes a determinação de fenótipos no feto e a suspeita de anomalias cromossômicas levam à indicação de exames invasivos, tais como: a amniocentese ou a biópsia de vilosidade coriônica, e ambos apresentam risco de uma infecção ou alguma complicação que pode levar à perda do feto (STEWART et al., 2004).

Em estudos realizados por Seeds (2004) o risco de perda fetal devido à amniocentese encontra-se entre 0,5 e 1%. Já Cavallotti et al. (2004) encontraram uma incidência de perdas de 1% para biópsia de vilosidade coriônica e 1,7 % para amniocentese. Visando anular tal risco de morte fetal, diversas pesquisas têm buscado a utilização de novas tecnologias para o diagnóstico pré-natal (LEVI et al., 2003).

Em 1966 foi demonstrado que a constituição cromossômica de um feto podia ser determinada pela análise de cultura das células do líquido amniótico (STEELE et al., 1966). Após quase 40 anos, grandes avanços na área de diagnóstico pré-natal têm sido alcançados e cada vez mais se estudam métodos não invasivos que propiciem o diagnóstico precoce de distúrbios fetais (OGILVIE et al., 2005).

A descoberta de que ocorre passagem de células fetais para o sangue materno foi um fato demonstrado em 1989, por Lo et al., através de uma técnica de biologia molecular, a PCR. O isolamento de células fetais da circulação materna é tecnicamente bastante complexo, sendo ainda hoje pouco realizado, aumentando o interesse por técnicas que prescindam do isolamento das células fetais (BIANCHI, 1998).

Alguns anos mais tarde, pesquisadores da área de Oncologia demonstraram a existência de DNA tumoral livre (*cell-free*) no plasma de pacientes. Estes achados tiveram grande repercussão e estimularam inúmeras pesquisas que comprovaram a presença do DNA tumoral em diferentes tipos de neoplasia, sendo atualmente empregadas no diagnóstico precoce de recidiva e na avaliação do prognóstico (BIANCHI, 2004).

Baseados nestes dados, em 1997, Lo et al. demonstraram um fenômeno análogo: a presença de DNA fetal no plasma de mulheres grávidas. A partir daí, vários grupos de pesquisas reproduziram estes achados, demonstrando claramente a superioridade do DNA fetal plasmático em relação às preparações de células fetais isoladas do sangue materno (LEVI et al., 2003).

Lo et al. (1999) conseguiram demonstrar que no primeiro e segundo trimestres de gestação, o DNA fetal corresponde a uma concentração média de 3,4% de todo o DNA presente no plasma, chegando a 6,2% no terceiro trimestre.

Já Rijnder et al. (2004) sugeriram que o DNA livre fetal de uma gravidez anterior não pode ser detectado em soro materno mesmo sendo utilizadas técnicas altamente sensíveis. A partir destes resultados, outros estudos evidenciaram a superioridade prática do DNA fetal plasmático em relação às preparações de células isoladas do sangue materno.

O conceito de triagem e diagnóstico pré-natal, e sua associação com as decisões da mãe em relação à gestação, levantam uma série de questões éticas, jurídicas e sociais (SCOTT, 2003).

O teste pré-natal por meio de cfDNA levanta novas questões em virtude do fato de que ele atravessa fronteiras entre o teste pré-natal profissional, que até agora tem sido dirigido por profissionais e instituições responsáveis pela prestação de cuidados de saúde, e testes diretos ao consumidor. Os princípios éticos da autonomia, beneficência, não maleficência e da justiça, sem dúvida, proporcionam um quadro útil de análise de todas as implicações da DPIN (*Non-invasive Prenatal Diagnosis*). Quando falamos de cuidados no pré-natal é importante que o fornecimento de diagnósticos mais seguros é útil na redução de danos tanto para mãe quanto para feto. No entanto, várias características dos testes utilizando cfDNA levantam inúmeras questões como particulares, éticas e sociais, devido a um aumento no número de testes que seria realizados que são elas:

- Aumento da segurança - removendo qualquer risco direto de danos ao feto. A técnica de cfDNA também é mais segura para a mãe, ao contrário de técnicas invasivas, pois não há risco de infecção ou trauma físico;
- Deteção precoce - a capacidade de diagnosticar doenças genéticas específicas do feto no primeiro trimestre, e até mesmo com sete semanas de gestação, significa que os pais e o médico têm mais tempo para tomada de decisões;
- O teste mais fácil - a partir da perspectiva do paciente, a simplicidade prática de uma simples coleta de sangue para DPIN em relação a testes invasivos de diagnóstico ou de um processo de múltiplos estágios pode significar que algumas mulheres não poderão fazer uma escolha devidamente informada. Isto porque o significado e a complexidade dos

diagnósticos nem sempre são claramente compreendidos ou explicados adequadamente antes do teste.

## **1.2 Aspectos Éticos**

Um dos grandes desafios éticos da implantação do DPIN é apoiar as escolhas autônomas das mulheres. No contexto da assistência pré-natal, o consentimento informado (no qual o paciente é capaz de tomar decisões independentes sobre a própria saúde) exige que o paciente esteja plenamente informado sobre quais testes estão disponíveis, sobre as consequências de se realizar um teste, o que significam os resultados, quais opções estão disponíveis para cada resultado possível do teste. Além de disposição adequada de informações, o paciente toma uma decisão na ausência de pressões ou coerção. Tendo em conta a segurança dos DPINs, é plausível supor que muitas mulheres podem consentir nos testes pré-natais.

No entanto, outros podem estar menos dispostos à autorização, dada a percepção de que o teste também pode levar a uma pressão para se finalizar a gravidez. Além disso, a relativa facilidade com que uma amostra de sangue pode ser colhida para os testes (juntamente com inúmeros outros testes-padrão realizados durante o atendimento pré-natal) pode resultar na falta de consentimento verdadeiro, devido a uma falha em se educar e informar os pais sobre as consequências de se fazer o teste. Além disso, se os testes baseados em cfDNA representam uma mudança de triagem para o diagnóstico, não está claro qual dos dois modelos tradicionalmente associados à triagem (escolha informada) ou tratamento (consentimento informado) é mais apropriado (WRIGHT et al., 2009).

A autonomia futura da criança deve ser considerada ao testar o feto, especialmente se o teste diagnosticar uma doença que irá se manifestar na idade adulta. A prática corrente é a de recusa do teste até que a criança esteja apta para tomar sua própria decisão sobre o que está sendo testado. Além disso, ácidos nucleicos fetais extraídos do sangue da mãe também têm o potencial de produção de informação genética sobre o pai, como é o caso com diagnóstico invasivo tradicional pré-natal. Uma vez que atualmente apenas a mulher grávida é

obrigada a dar consentimento para os ensaios realizados em seu sangue, assegurar o respeito e a autonomia do pai, bem como a autonomia futura da criança esta prática torna-se cada vez mais difícil.

Uma possível consequência da popularização dos testes de cffDNA seria um aumento da pressão social para finalizar as gestações, em particular se o diagnóstico for de doenças e condições raras na sociedade, resultando em um declínio de serviços de apoio (por exemplo, para famílias com Síndrome de Down). Na prática, poderia tornar-se cada vez mais difícil para um paciente que tenha recebido um diagnóstico deixar de “escolher” o aborto. No entanto, o uso de DPIN como uma forma de eugenia passiva (KITCHER, 1997) pode se tornar problemático se ele realmente refletir a desvalorização sistemática da vida das pessoas com deficiência. Portanto, é importante assegurar que as políticas nesta área sejam motivadas pela preocupação com a autonomia dos pais, mais do que qualquer sentido de reduzir o "peso" financeiro e social.

No futuro, a popularização dos testes de cffDNA poderá ocorrer sem justificativa médica ou fiscalização formal. Notavelmente, testes cffDNA já foram utilizados para determinação do sexo pré-natal em famílias em risco de hemofilia, desde que o conhecimento do sexo fetal é útil para a gestão do nascimento. Entretanto, muitos destes testes não seriam autorizados a serem realizados por métodos invasivos. Os testes cffDNA também têm sido utilizados como uma alternativa ao diagnóstico genético pré-implantacional em casais com reprodução assistida que apresentam risco de doenças específicas herdadas (ligadas ao sexo). Embora estas aplicações específicas possam ser medicamente justificáveis, é provável que um número crescente de aplicações venham a ser oferecidas simplesmente porque a tecnologia torna possível, ao invés do teste ser uma recomendação médica.

O rigor técnico levanta uma série de questões sobre a beneficência e a não maleficência do DPIN. Um resultado falso-negativo pode levar ao fracasso de um tratamento ou o nascimento de uma criança doente, enquanto um resultado falso positivo pode levar à interrupção da gravidez saudável, bem como uma desnecessária angústia. Portanto, como todas as novas metodologias, o debate sobre o uso de testes de cffDNA para o DPIN deve reconhecer que, apesar de parecer uma questão puramente técnica, também tem uma dimensão ética complexa.

### **1.3. Aplicações da detecção de DNA livre fetal**

Muitos dos testes de cfDNA podem ter ambas as aplicações: clínicas e não-clínicas. Por exemplo, a determinação do sexo fetal pode ser clinicamente útil se o feto está em risco de uma doença ligada ao sexo, mas também poderia ser usada para a seleção do sexo social. A crescente disponibilidade de NIPD direto ao consumidor através da Internet, principalmente para a determinação do sexo fetal, sugere que o uso da tecnologia para fins não médicos poderia tornar-se generalizado. Isto levanta questões sobre a necessidade de se desenvolver políticas para regular o acesso a esses testes, e até que ponto elas poderiam ser eficazes.

A natureza não invasiva utilizando do DNA fetal representa a maior vantagem sobre métodos convencionais de diagnóstico pré-natal. Além da utilização do DNA livre para a sexagem do embrião e/ou feto, muitas doenças genéticas causadas por mutações que resultam em diferenças sutis entre as sequências de DNA materno e fetal, como acondroplasia, doença de Huntington, fibrose cística e a presença de Hemoglobina E, também poderiam ser diagnosticadas, significando a detecção ou exclusão do alelo mutante paterno no plasma materno (DING et al., 2004).

Em outras doenças, nas quais a quantidade de DNA fetal na circulação materna é elevada, a quantificação do mesmo pode ser um dos primeiros indícios de que algo está errado na gestação (BIANCHI, 2004).

Uma vez comprovada a reprodutibilidade e a sensibilidade do método de identificação do DNA fetal, outras aplicações vêm sendo estudadas. Uma delas que envolve a sexagem fetal é a Hiperplasia Congênita de Adrenal (HCA), uma doença genética com padrão de herança autossômica recessiva. A alteração mais comum é a deficiência da enzima 21-hidroxilase (RAMOS, 2006).

As meninas homozigotas para a deficiência nascem com a masculinização da genitália externa, muitas vezes exigindo correção cirúrgica. Os meninos afetados apresentam genitália externa normal. O tratamento pré-natal da HCA com dexametasona para prevenir a ambigüidade genital tem sido utilizado com sucesso (NEW, 2004). No entanto, para minimizar os efeitos secundários, a interrupção da terapia tem sido indicada nos casos de embriões masculinos

normais ou afetados e nos casos de meninas normais. Por essa razão, a sexagem fetal é necessária durante a gravidez e é geralmente realizada através de métodos invasivos. A incidência de HCA na população é aproximadamente de 1:15.000 nascimentos (<http://www.nupad.medicina.ufmg.br/seminario/hcsr.htm>).

Com isso a determinação do sexo fetal não invasiva, baseada no DNA fetal em plasma materno pode apresentar a vantagem adicional da interrupção precoce da medicação no caso de embriões masculinos (RIJNDERS et al., 2001).

Outro problema de grande importância na prática médica e da obstetrícia clínica é a aloimunização Rh, que pode levar a doença hemolítica do recém-nascido. Para as gestantes Rh negativas (15% da população), um embrião Rh positivo envolve um risco de 16% de sensibilização ao antígeno Rh (RAMOS, 2006). Terapias invasivas podem ser necessárias para reduzir a mortalidade pré-natal de embriões Rh positivos (LO et al., 1999). Portanto, a detecção precoce do status Rh fetal através da DNA fetal no plasma de mães Rh negativas é de grande importância na definição da necessidade de intervenções, com riscos de perda fetal ou de imunoprofilaxia gestacional.

São inúmeros os casos em que o DNA fetal pode ser útil na investigação de alguns genótipos ou doenças, como a determinação a  $\beta$ -talassemia (CHIU et al., 2002), a acondroplasia (SAITO et al., 2000) e até mesmo a síndrome de Down (LO et al., 1999), contudo estas pesquisas estão em um estágio inicial.

#### **1.4. Sexagem Fetal**

A descoberta de que o DNA fetal circula no plasma materno proporcionou a análise do sexo do feto a partir do plasma da mãe. Sabendo que as mulheres apresentam dois cromossomos sexuais X e os homens apresentam os cromossomos sexuais X e Y, fica clara a estratégia utilizada para sexagem do feto. A análise é realizada extraindo-se DNA do plasma materno e amplificando sequências específicas do cromossomo Y através da técnica da PCR. As gestantes (XX) com um feto do sexo masculino (XY) apresentavam o exame positivo, com amplificação de sequência específica do cromossomo Y. Já na gestação de um feto feminino (XX), os exames dão resultados negativos, isto é, não apresentam amplificação de sequência específica do cromossomo Y.

Apesar da tecnologia de amplificação de sequências específicas de DNA, através da técnica da PCR, ser bastante sólida, existe um problema de sensibilidade, já que a quantidade de DNA fetal é estimada em 35 cópias genômicas por mililitro de plasma materno. Assim sendo, dependendo da concentração de DNA fetal presente no plasma materno podem ser gerados falsos resultados de feto feminino (SEKIZAWA et al., 2001).

Métodos mais recentes utilizam equipamento de detecção em tempo real (*real-time* PCR) possibilitando menor risco de contaminação e a obtenção de níveis mais altos de sensibilidade (BISCHOFF et al., 2002; BIANCHI, 2004). Apesar de ser mais sensível, esta tecnologia tem os reagentes e o próprio equipamento muito caros. Com isso, o preço de realização deste tipo de exame é elevado impossibilitando muitas mães de realizá-lo.

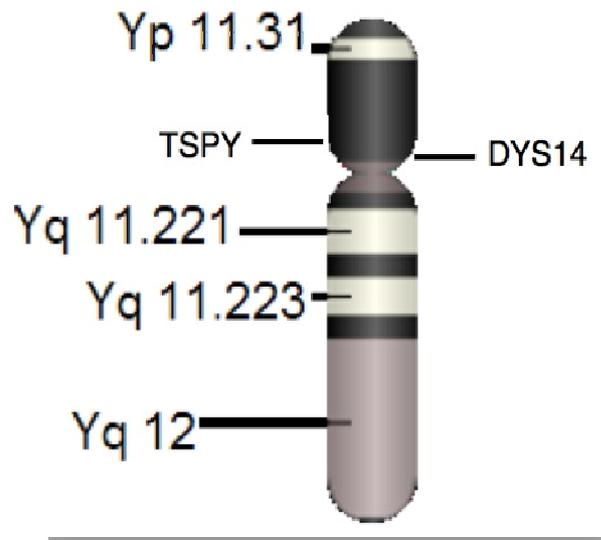
### **1.5. Região estudada TSPY**

O TSPY (*Testis specific Protein, Y-encoded*) é um dos genes Y-específicos (ARNEMANN et al., 1991; AFFARA et al., 1996). Na espécie humana, é repetitivo com cerca de 30 a 60 cópias por cromossomo Y (ARNEMANN et al., 1987; JAKUBICZKA et al., 1993; MANZ et al., 1993).

Os genes da família de TSPY são organizados em clusters ao longo do cromossomo Y de várias espécies de mamíferos (VOGEL; SCHMIDTKE, 1998) e diversos estudos evidenciaram a existência de homólogos desse gene em várias espécies, dentre elas estão as bovinas, equinas e humanas (JAKUBICZKA et al., 1993; SCHEMPP et al., 1995; VOGEL et al., 1997).

Este gene faz parte de uma família de genes repetitivos heterogêneos descrita na parte proximal do Yp humano, com 20 a 40 cópias estimadas de sequências relacionadas. As cópias adicionais foram mapeadas no braço longo do cromossomo Y (Yq11.23) (RATTI et al., 2000). Ele é quase que exclusivamente expresso em espermatogônia e mais raramente em espermátócitos primários, sugerindo um papel do produto do gene na espermatogênese (SCHNIEDERS et al., 1996) atuando, de fato, como um dos principais fatores de fertilidade do homem (VOGT, 1997).

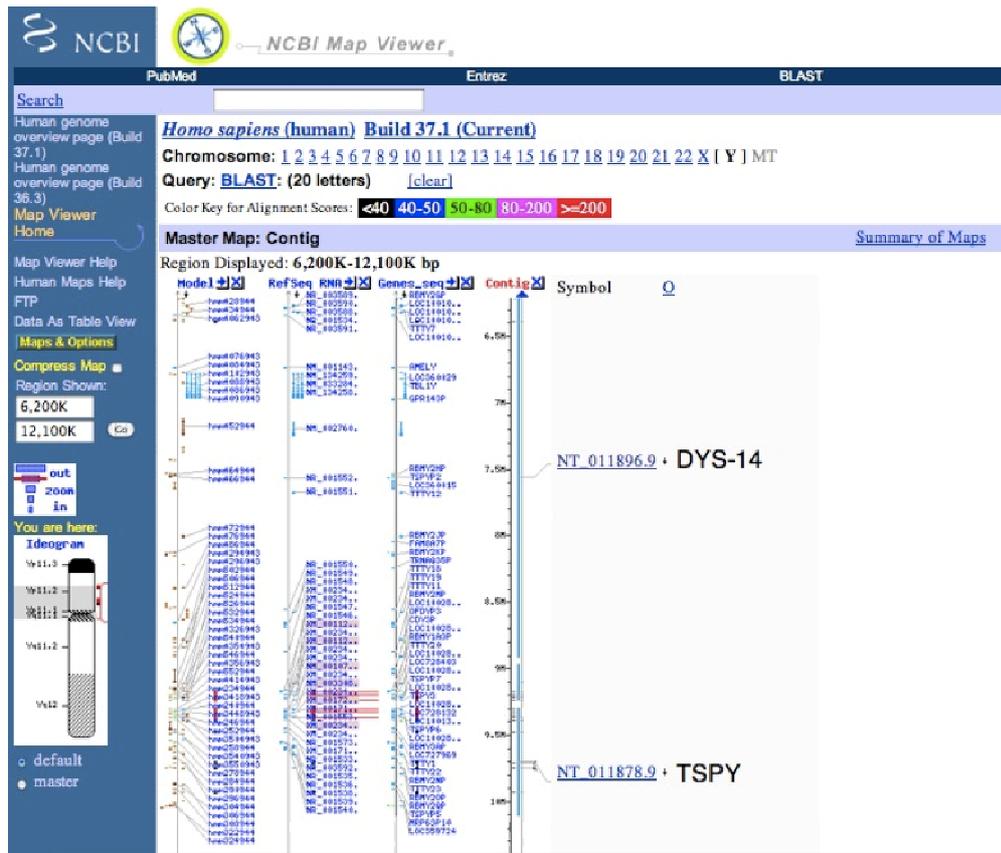
O gene TSPY que está presente na forma de múltiplas cópias no genoma masculino, também foi utilizado para detecção do cromossomo Y em pequenas amostras de DNA em substituição ao gene SRY (cópia única) em pesquisas com blastocisto único humano (PIERCE et al., 2000) para a sexagem fetal em sangue de bovinos (LEMOS, 2004) e em pesquisas com a síndrome de Turner (BARTMANN et al., 2004) (Figura 1).



**Figura 1:** Esquema do cromossomo Y humano mostrando a localização do gene TSPY e DYS14 (modificado de Donabela, 2008).

A sexagem fetal vem sendo descrita por muitos autores de diferentes países, com resultados relativamente precisos (COSTA et al., 2001; BOON et al., 2007). Para a sexagem fetal pelo plasma materno, diversos marcadores moleculares têm sido utilizados, dentre eles pode-se destacar o gene SRY e a região Y específica DYS14 (Figura 1).

No presente trabalho foram escolhidas duas regiões do cromossomo Y para a realização da sexagem, o gene TSPY (DONABELA, 2008) e o seu pseudogene DYS14 (AL-YATAMA et al., 2001). Estes dois genes Y específicos apresentam múltiplas cópias e estão separados aproximadamente 2Mb um do outro (Figura 2). Já o gene SRY possui cópia única na espécie humana (PIERCE et al., 2000; BARTMANN et al., 2004) e é mais difícil de ser detectado. Por esta razão decidimos trabalhar com TSPY e DYS14.



**Figura 2:** Imagem da página do *NCBI Map Viewer* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>) mostrando a localização do gene DYS14 e o TSPY no cromossomo Y, com diferença de 2 Mb.

## **1.6. PCR- Reação em cadeia da Polimerase**

### *1.6.1. Apresentação da técnica*

A reação da polimerase em cadeia, do inglês (*Polymerase chain reaction*) possibilita a amplificação de pequenas amostras de DNA, o suficiente para permitir a identificação dos fragmentos amplificados através de diferentes técnicas. Embora criado por Mullis et al. (1986) e descrito por Saiki et al. (1985), o princípio da reação da polimerase em cadeia (PCR) foi descrito anteriormente, por Kleppe et al. (1971). O conceito da amplificação do DNA por essa técnica é simples, entretanto, seu impacto nas ciências biológicas foi extraordinário, tanto que, em 1993, Kary Mullis recebeu o prêmio Nobel de Química.

Apesar de que Kleppe e Saiki tenham descrito anteriormente a técnica, Mullis inovou, pois conseguiu especificidade na cópia de apenas segmentos específicos, introduzindo o conceito de primer ou oligonucleotídeo (uma única fita curta de DNA, específica para o gene que se quer estudar), e na utilização de uma DNA polimerase termoestável. Até então, a precursora da PCR demandava grandes quantidades de enzima DNA polimerase, adicionadas a cada ciclo de amplificação. Além disso, desenvolveram-se vários equipamentos para a automatização da adição da enzima após cada ciclo, todos de alto custo (os primeiros “termocicladores”) (VIEIRA, 2005).

Para isso Mullis utilizou uma Taq DNA Polimerase termoestável isolada da bactéria de fontes termais *Thermus aquaticus*. Ela se mantém estável em temperaturas altas (até 117°C) e sua atividade ótima é de 72°C.

### *1.6.2. Aplicações*

As aplicação da PCR são inúmeras, uma delas pode ser na Medicina Forense onde a quantidade de DNA é reduzida e com isso amostras biológicas (bulbo capilar, gotas de sangue e saliva entre outras) podem ser retiradas da cena de um crime e serem amplificadas e analisadas pelo método de DNA *fingerprinting*.

A tecnologia da PCR trouxe um grande avanço na Medicina diagnóstica e prognóstica, permitindo identificar agentes patogênicos e marcadores moleculares com rapidez e precisão.

A PCR também é usada para detectar inúmeros marcadores moleculares de interesse comercial, tais como: identificação de clones vegetais, sementes transgênicas, identificação e parentesco em humanos e animais, etc.

Ela também é rotineiramente utilizada em procedimentos científicos de diversas áreas da ciência como geração de mutação sítio-específica, detecção de mutações ou preparação de fragmentos de DNA para clonagem, como também pode ser utilizada para identificação de patógenos que estão presentes em amostras.

### 1.6.3. Reagentes utilizados na PCR

#### *Taq* DNA Polimerase

A *Taq* DNA polimerase é a catalisadora da extensão dos iniciadores que incorpora os nucleotídeos à fita complementar de DNA. Ela é uma DNA polimerase, termoestável, isolada do *Eubacterium termofílico Thermus aquaticus*. Ela consiste numa cadeia polipeptídica simples, com um massa molecular de aproximadamente 95 kDa e uma temperatura ótima de atividade de 75°C. Esta DNA polimerase catalisa a síntese do DNA de 5'-3'. Por outro lado, de 3'-5' não há atividade exonucleásica. Para muitos ensaios a quantidade ótima é de 0,5 e 2,5 unidades e o aumento da concentração pode resultar em redução da especificidade.

## Solução tampão

Normalmente, a maioria das DNA polimerases disponíveis no mercado são fornecidas conjuntamente com uma solução tampão específica, cuja composição varia de acordo com o fabricante. O tampão mais frequentemente utilizado em PCR é o Tris 10 mM, com pH variando entre 8,5 e 9,0 a 25°C. Com o aumento da temperatura pelo termociclador o pH diminui para 7,4, o que representa um valor ótimo para a atividade da Taq polimerase na temperatura de 72°C (VIEIRA , 2005).

Alguns tampões contêm ainda detergentes (Tween 20, Triton X-100, Nonidet P-40), inibindo a formação de dímeros das cadeias enzimáticas. Alguns trazem consigo proteínas estabilizantes (BSA = *Bovine Serum Albumin* ou Albumina Sérica Bovina) e algumas substâncias que agem na desnaturação da cadeia molde de DNA (DTT = Dithiothreitol,  $\beta$ -mercaptanoethanol), facilitam a desnaturação do DNA.

## Cloreto de Magnésio ( $MgCl_2$ )

Um reagente de importância crítica é o  $MgCl_2$  , doador muito estável de íons  $Mg^{2+}$  , que são cofatores indispensáveis para a atividade da enzima. Algumas enzimas utilizam outros íons metálicos como cofatores. Um desses casos, e talvez o mais interessante seja a enzima *Tth* (*Thermus thermophilus*) Polimerase. Esta enzima possui atividade DNA polimerásica em presença de íons  $Mg^{2+}$ ; porém, na presença de  $Mn^{2+}$  esta mesma enzima apresenta atividade de uma transcriptase reversa, ou seja, sintetiza o DNA a partir de uma cadeia de RNA.

## Nucleotídeos (dNTP's)

Os desoxinucleotídeos são a matéria-prima propriamente dita para a síntese das fitas-filhas. São compostos por nucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) desoxilados no carbono 5' da desoxirribose. São adicionados pela polimerase complementarmente à fita-mãe. Adiciona-se uma mistura de todos os dNTP's em concentrações iguais à reação. Os dNTP's são ligados à fita-mãe pela polimerase numa área delimitada pelos iniciadores.

## *Primers* ou Iniciadores

Na maioria das aplicações da PCR, é a sequência dos oligonucleotídeos (*primers* ou iniciadores) que determinarão o sucesso geral da reação. Geralmente eles são desenhados ou projetados para serem exatamente complementares às sequências alvo (BAUMFORTH et al., 1999).

O projeto dos iniciadores pode ser obtido na literatura ou realizado pelo pesquisador através de programas específicos (*Gene Runner Version 3.01* - <http://www.generunner.net/>, *Primer3* - <http://frodo.wi.mit.edu/> ou *OLIGO Primer Analysis Software* - <http://www.oligo.net/>).

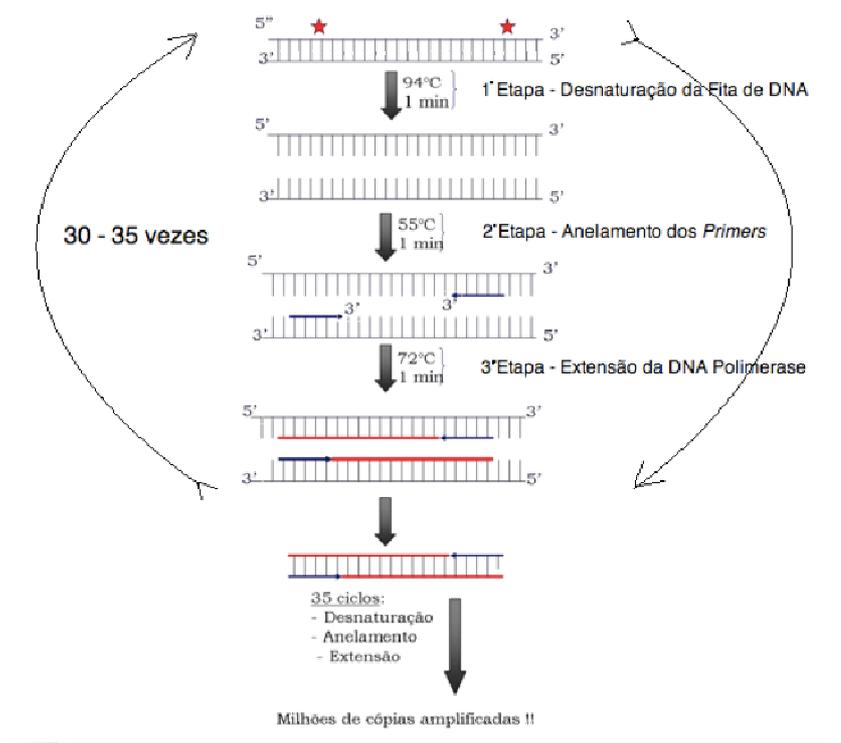
Para o projeto dos iniciadores devem ser seguidas algumas características básicas, como:

- Devem conter entre 18 a 30 bases;
- Não deve haver estruturas secundárias internas;
- A estrutura deve ser balanceada em sequências ricas em 40 a 60% G/C e A/T;
- Ausência de complementaridade entre as extensões 3', para que não ocorra formação de dímeros;
- Sequências palindrômicas devem ser evitadas;
- A temperatura de *melting* ( $T_m$ ) deve permanecer entre 55 e 67°C;
- Na confecção dos iniciadores deve-se manter as  $T_m$ s do forward e do reverse próximas e não muito baixas, para evitar ligações inespecíficas.

As concentrações dos iniciadores, entre 0,5 pmol e 10 pmol, são geralmente ótimas. Concentrações mais altas podem resultar em acúmulo de produtos não específicos, reduzindo a concentração do produto desejado. Concentrações mais baixas podem ser esgotadas previamente ao final da reação, resultando em baixa concentração do produto desejado (INNIS et al., 1990).

#### 1.6.4. Processo

A reação em cadeia da polimerase consiste de uma série de mudanças de temperatura (95°C - 50°C) repetidas chamadas ciclos e cada ciclo consiste tipicamente de 2 ou 3 passos de temperaturas distintas. Rotineiramente a PCR é realizada utilizando três etapas de temperatura (Figura 3).



**Figura 3:** Representação esquemática da reação em cadeia da polimerase (PCR) com as três etapas utilizadas: 1ª Etapa: Desnaturação da fita de DNA; 2ª Etapa: Anelamento dos iniciadores; 3ª Etapa: Extensão pela DNA polimerase. Cada ciclo é formado pelas três etapas, que se repetem por cerca de 30 a 35 vezes.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

A duração de cada ciclo e as temperaturas utilizadas em cada ciclo dependem de uma série de parâmetros. Estes incluem a enzima a ser utilizada para síntese de DNA, a concentração de íons divalentes e dNTPs na reação e a temperatura de fusão ou *melting* ( $T_m$ ) dos iniciadores (RYCHLIK et al., 1990).

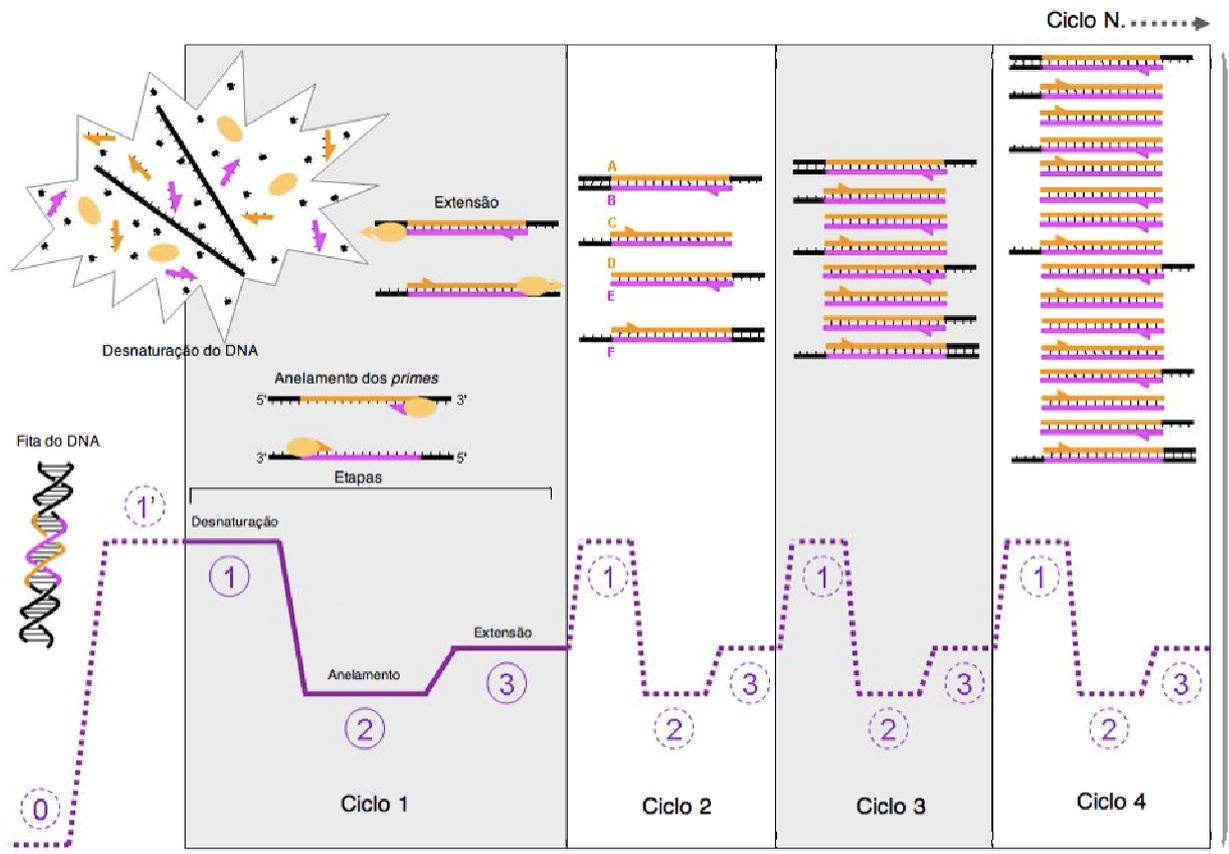
As etapas comumente realizadas nas reações da PCR são (Figura 4):

- Etapa de inicialização (1'): Esta etapa consiste em aquecimento da reação a uma temperatura de 94-96°C, que é realizada por 1-9 minutos. É necessária apenas para as DNA polimerases que requerem ativação de calor por *Hot-Start* – PCR (SHARKEY et al., 1994);
- Desnaturação (1): este passo é o primeiro evento do ciclo regular e consiste em aquecimento da reação a 94-98°C durante 20-60 segundos. Ela provoca a quebra das ligações de hidrogênio entre bases complementares, resultando em cadeias simples de DNA. Se o molde é apenas parcialmente desnaturado haverá uma tendência das fitas se juntarem novamente muito rapidamente, evitando a eficiência do anelamento e extensão;
- Anelamento (2): a temperatura da reação é reduzida para 50-65°C durante 30-40 segundos permitindo anelamento dos iniciadores ao DNA de fita simples. A escolha da temperatura de anelamento é talvez o fator mais crítico para a obtenção de uma alta especificidade. Se a temperatura for muito alta nenhum anelamento ocorrerá, mas se for muito baixa, o anelamento inespecífico aumentará dramaticamente;
- Extensão (3): a temperatura nesta etapa depende do DNA polimerase utilizado; a enzima tem a sua temperatura de atividade ótima de 72°C. Nesta etapa a DNA polimerase sintetiza uma nova fita de DNA complementar à fita molde pela adição de dNTPs que são complementares ao modelo de DNA no sentido 5' - 3', condensando o 5' - do grupo fosfato dos dNTPs com o 3' - do grupo hidroxila do DNA da fita em formação. O tempo de prorrogação depende tanto do DNA polimerase usado quanto do comprimento do fragmento de DNA a ser amplificado. Geralmente, na sua temperatura ideal, o DNA polimerase polimerizará mil bases por minuto (CHIEN et al., 1976).

Sob condições ideais, ou seja, se não existirem limitações de substratos ou reagentes, a cada etapa de extensão a quantidade de DNA alvo é duplicada, levando à exponencial amplificando o fragmento de DNA específico;

Extensão Final: este passo só é realizado a uma temperatura de 70-74°C por 5-15 minutos após o último ciclo de PCR para garantir que todo o DNA restante seja

totalmente estendido; Final: esta etapa de 4-15°C p or tempo indeterminado pode ser empregada para o armazenamento de curto prazo da reação (SHARKEY et al., 1994).



**Figura 4:** Representação esquemática da reação em cadeia da polimerase (PCR) com as três etapas utilizadas 1, 2 e 3 (desnaturação, anelamento e extensão) com os ciclos. Note que existe uma fase de inicialização, 1', usada para DNA Polimerases com características de *hot-start*.

Fonte: [http://fr.wikipedia.org/wiki/Réaction\\_en\\_chaîne\\_par\\_polymérase](http://fr.wikipedia.org/wiki/Réaction_en_chaîne_par_polymérase)

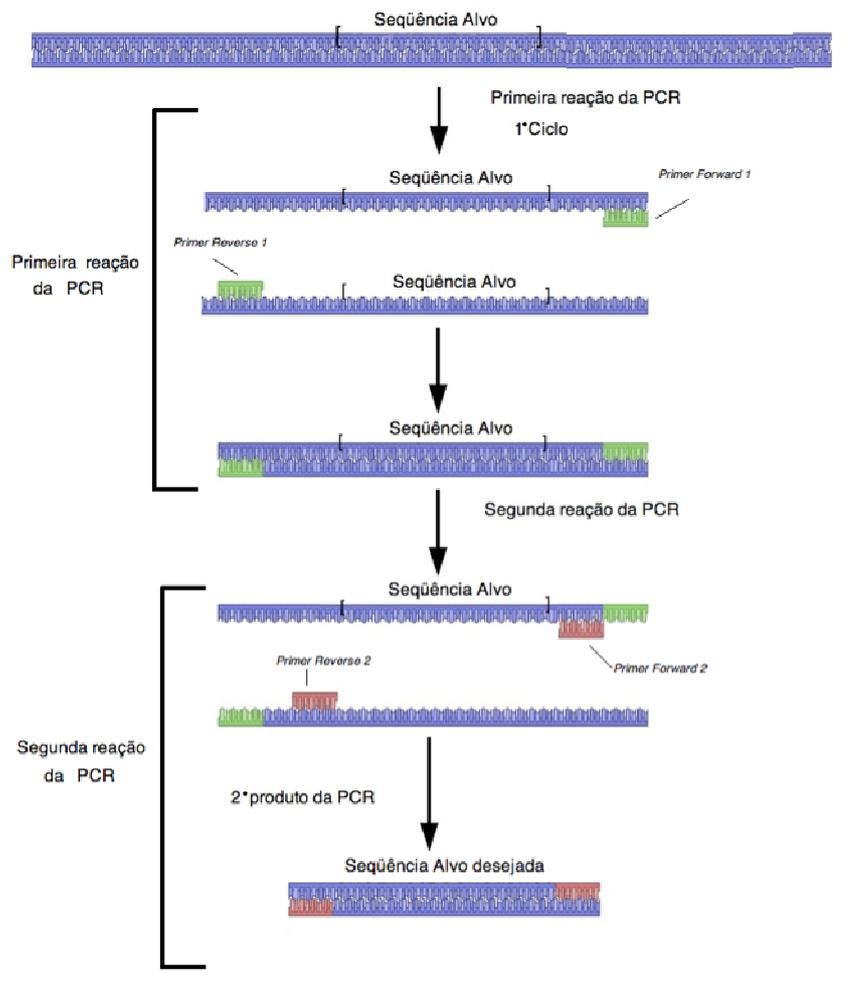
#### 1.6.5. Detecção dos produtos da PCR

Para verificar se a PCR gerou o fragmento de DNA esperado, é realizada uma eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida contendo brometo de etídio. A técnica envolve a separação de moléculas de diferentes tamanhos em um gel durante a aplicação de uma diferença de potencial. Em seguida a amostra é visível em transiluminador de luz ultravioleta.

#### 1.6.6. Variações sobre a técnica da PCR

A versatilidade da PCR levou a um grande número de variantes da técnica, muitas vezes apenas uma pequena alteração precisa ser feita do protocolo padrão para atingir um objetivo desejado. Na literatura existem inúmeras variações como: PCR-Multiplex que permite a análise simultânea de múltiplos alvos em uma única amostra e PCR-Quantitativo (Q-PCR) que é utilizada para medir a quantidade específica do produto amplificado da reação. (VANGUILDER et al., 2008).

Neste trabalho a variante da técnica da PCR é a *Nested-PCR* que é utilizada para aumentar a especificidade e a sensibilidade da amplificação do DNA. Dois conjuntos de iniciadores são utilizados em duas reações sucessivas. Na primeira reação um par de iniciador é utilizado para gerar o produto de DNA inicial. Os produtos da primeira PCR são então utilizados como molde em uma segunda reação, utilizando outro par de iniciador diferente cujos sítios de ligação estão localizados (*nested*) dentro do primeiro conjunto, aumentando assim a especificidade e a sensibilidade da técnica (Figura 5).



**Figura 5:** Representação esquemática da *Nested* PCR, mostrando as duas reações que são realizadas. Note que na primeira reação são utilizados iniciadores na cor verde. O produto da primeira amplificação é utilizado como molde para uma segunda rodada de amplificação, cujos iniciadores estão em cor vermelha.

Fonte: [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Nested\\_PCR.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Nested_PCR.png)

### 1.7. LAMP (*Loop mediated isothermal amplification*)

A metodologia de amplificação isotérmica LAMP (*Loop mediated isothermal amplification*) foi desenvolvida em 2000, por Tsugunori Notomi, uma equipe de pesquisadores japoneses e a empresa Eiken Chemical Co. Ltda É caracterizada

pelo uso de quatro diferentes iniciadores especificamente projetados para reconhecer seis regiões distintas do gene alvo. A reação de amplificação ocorre em temperatura constante devido ao uso de uma enzima chamada de *Bst* DNA Polimerase, com atividade de deslocamento de fita, tornando desnecessário o aumento da temperatura para que ocorra a desnaturação. Através desta técnica isotérmica é possível amplificar DNA ou RNA da ordem de  $10^9$  -  $10^{10}$  em um tempo relativamente pequeno comparado com a PCR (NOTOMI et al., 2000).

A técnica de LAMP tem atraído muita atenção por ser rápida, precisa e de custo baixo para a amplificação de ácidos nucleicos. Como resultado, mais de 443 (Web of science, acesso em 10 de janeiro de 2011) relatórios e artigos científicos sobre a avaliação da técnica foram publicados nos últimos anos (Web of science, acesso em 10 de janeiro de 2011). Através do método LAMP têm sido desenvolvidos kits comerciais e alguns deles foram adotados como métodos oficialmente recomendados para identificação e fiscalização de rotina de patógenos no Japão (MORI et al., 2009).

#### 1.7.1. Aplicações

Apesar de o início do LAMP remeter a 2000, a técnica tornou-se popular depois de 2003, após a emergência do vírus do Nilo Ocidental e do vírus da SARS (PARIDA et al., 2008). Desde então o LAMP tem sido cada vez mais utilizado por pesquisadores, a maioria japoneses, para o diagnóstico de doenças emergentes. Entretanto, a maioria das pesquisas publicadas foi dirigida para vírus de RNA, talvez devido ao aumento da incidência desses vírus no passado recente, sob a forma de grandes epidemias de importância para a saúde pública (Tabela 2).

Tabela 2: Aplicações da técnica de LAMP para a detecção de doenças virais dos seres humanos e animais

Hospedeiro	Vírus	Referência
Humano (DNA)	Adenovirus Cerato conjuntivite	Wakabayashi et al. (2004)
	Vírus do papiloma humano tipo 6, 11, 16 e 18	Hagiwara et al. (2007)
	Citomegalovírus	Suzuki et al. (2006)
	Vírus da Herpes Humano 6, 7 e 8	Yoshikawa et al. (2004); Ihira et al. (2007)
Humano (RNA)	Síndrome respiratória aguda severa (SARS) Coronavírus	Hong et al. (2004)
	Vírus da encefalite japonesa	Toriniwa et al. (2006)
	Vírus do Nilo Ocidental	Parida et al. (2004)
	Vírus da Dengue 1,2 3 & 4	Parida et al. (2005)
Animal (RNA)	Parvovírus canino	Cho et .al. (2006)
	Vírus Febre aftosa	Dukes et al. (2006)

### 1.7.2. Reagentes utilizados

Os reagentes utilizados na técnica de LAMP são muito parecidos com os da PCR, são de fácil aquisição no Brasil e não são caros. Além do tampão, que vem junto com a enzima e os dNTPs, a amplificação por LAMP utiliza alguns outros componentes, tais como:

#### *Bst* DNA Polimerase

É uma DNA polimerase utilizada para amplificação de fragmentos longos incorporando os nucleotídeos à fita filha. Esta enzima é extraída do *Bacillus stearothermophilus*, contém a atividade de polimerização 5'- 3' e não possui a atividade exonucleásica. A *Bst* DNA Polymerase Large Fragment é preparada a partir de uma cepa de *E. Coli* contendo uma fusão do gene da polimerase do *Bacillus stearothermophilus*.

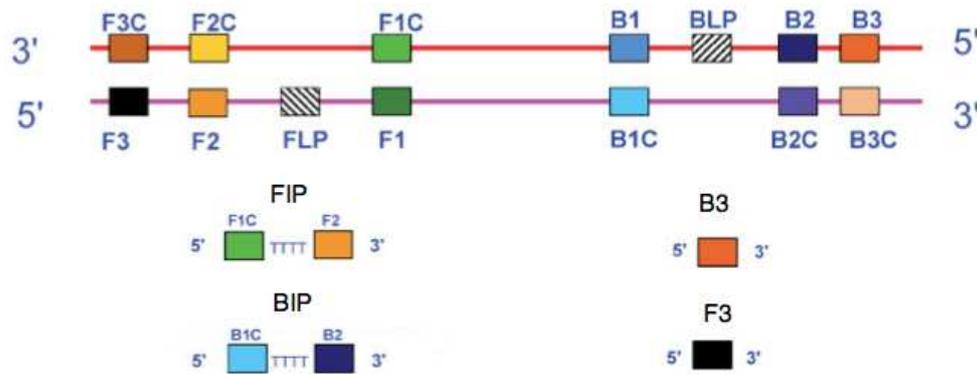
## Betaína

É qualquer composto químico neutro com uma carga positiva de um grupo catiônico funcional como o íon amônio, que não tem átomo de hidrogênio e com um grupo de carga negativa funcional como um grupo carboxilato, que não pode ser adjacente ao local catiônico. Neste trabalho utilizamos a betaína de fórmula linear  $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$ , adquirida da empresa Sigma-Aldrich.

A adição de Betaína em uma concentração final de 0,8-1,6M melhora a amplificação do DNA na reação do LAMP, reduzindo a formação de estruturas secundárias ricas em G/C. A adição de betaína foi relatada para realçar a especificidade da reação em cadeia da polimerase, eliminando a dependência da composição base par de fusão do DNA (REES, 1993).

## *Primers* ou Iniciadores

O projeto dos iniciadores *do LAMP* é fundamental para a realização de uma amplificação correta e específica. Para isso é utilizado um software chamando *Primer Explorer* versão 4.0, que a própria empresa Eiken Chemical Co. Ltda disponibiliza gratuitamente na internet (<http://primerexplorer.jp/e/>). Os iniciadores utilizados para amplificação por LAMP incluem: dois internos (BIP e FIP) que auxiliam na formação do ciclo e dois externos (F3 e B3) que têm o papel no deslocamento da fita durante a amplificação (Figura 6).



**Figura 6:** Representação esquemática do desenho dos quatro iniciadores (F3, FIP, B3 e BIP) para LAMP e suas respectivas regiões de anelamento. Note que: FIP é constituído por dois iniciadores, F1C e F2, separados por quatro timinas; BIP é constituído por dois iniciadores B1C e B2, separados por quatro timinas.

Fonte: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/primer.html>

O software delimita as seis regiões da sequência alvo desejada que são: F3c, F2c, F1c na região 3' e B1, B2 e B3 na região 5' da fita do DNA. E com isso ele forma os seguintes iniciadores:

- FIP: consiste da região F2 (3' final), que é complementar à região F2c mais a sequência da região F1c no final 5';
- BIP: consiste da região B2 (3' final), que é complementar para região B2c mais a sequência do B1c no final 5';
- F3: consiste da região F3, que é complementar a região F3c;
- B3: consiste da região B3, que é complementar a região B3c.

Para um bom projeto dos iniciadores de LAMP a empresa Eiken Chemical Co. Ltda sugere alguns critérios como:

- A distância entre os 5' final de F2 e B2 deve ser de 120-180 bp, e a distância entre F2 e F3, assim como B2 e B3, deve ser de 0-20 bp;
- A distância para a formação de regiões loop (5' de F2 para 3' da F1, 5' de B2 para 3' B1) é de 40-60 bp;
- A *T<sub>m</sub>* dos iniciadores deve ser entre 60-65 °C, no caso de iniciadores ricos em G/C e de 55-60 °C para iniciadores ricos em AT;

- A quantidade de G e C dos iniciadores deve ser cerca de 50-60% e 40-50% de A e T, respectivamente.

Além disso, no momento da síntese deve haver a ligação dos iniciadores internos (BIP e FIP). Isto é feito adicionando um conjunto de quatro timinas (TTTT) entre os iniciadores F1c + F2 e o B1c e B2 e é útil para dar maior flexibilidade ao iniciador para reconhecer a fita do DNA e no momento da amplificação quando ele forma uma alça.

### 1.7.3. Processo

O método de LAMP é uma reação que amplifica uma sequência alvo de DNA com alta sensibilidade e especificidade sob uma mesma temperatura. O mecanismo da reação pode ser explicado em duas etapas, um passo não cíclico e uma etapa cíclica (USHIKUBO, 2004). Uma animação no site da Eiken Chemical Co. Ltda é útil para uma melhor compreensão do princípio do LAMP (<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/anim.html>).

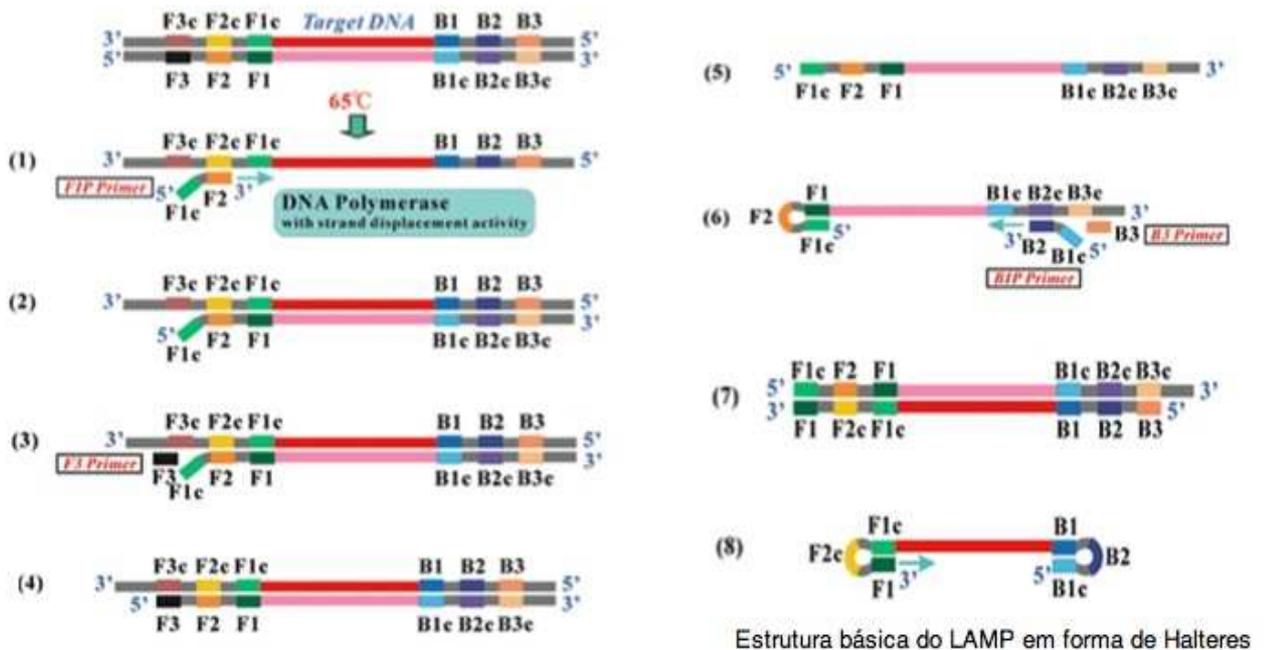
#### Etapa não cíclica

Com o método do LAMP, ao contrário da PCR, não há necessidade de desnaturação da fita dupla de DNA em fita simples devido ao uso da Bst DNA polimerase com atividade de deslocamento de fita. A amplificação se inicia com o anelamento do iniciador FIP à fita de DNA (região F2) e a síntese da fita complementar com a incorporação dos nucleotídeos. Em seguida, o iniciador F3 se anela à fita de DNA (região F3c) e ocorre a síntese da fita com o deslocamento da fita formada pelo BIP para fora.

Então esta fita simples de DNA (FIP) forma uma estrutura 'haste-laço' na extremidade 5' por causa da F1c e da região F1. Esta fita simples de DNA serve, por sua vez, como modelo para o iniciador BIP iniciando a síntese do DNA.

Na extremidade 3' do BIP ocorre o mesmo fato, o iniciador BIP se anela na fita de DNA e acontece o início da síntese da fita complementar do DNA. Em seguida, o iniciador B3 se anela na região exterior do BIP e através da DNA polimerase ocorre o deslocamento da fita liberando a fita contendo o BIP complementar. Com

a liberação desta fita de DNA é formada uma estrutura parecida com um halter com dois laços nas suas extremidades e através desta estrutura básica se inicia a fase cíclica da técnica de LAMP (Figura 7).



**Figura 7:** Representação esquemática da etapa não cíclica da amplificação por LAMP (passo de 1 a 8) com a geração da estrutura básica em forma da halteres (modificado Eiken Chemical Co. Ltda, Japan).

Fonte: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>

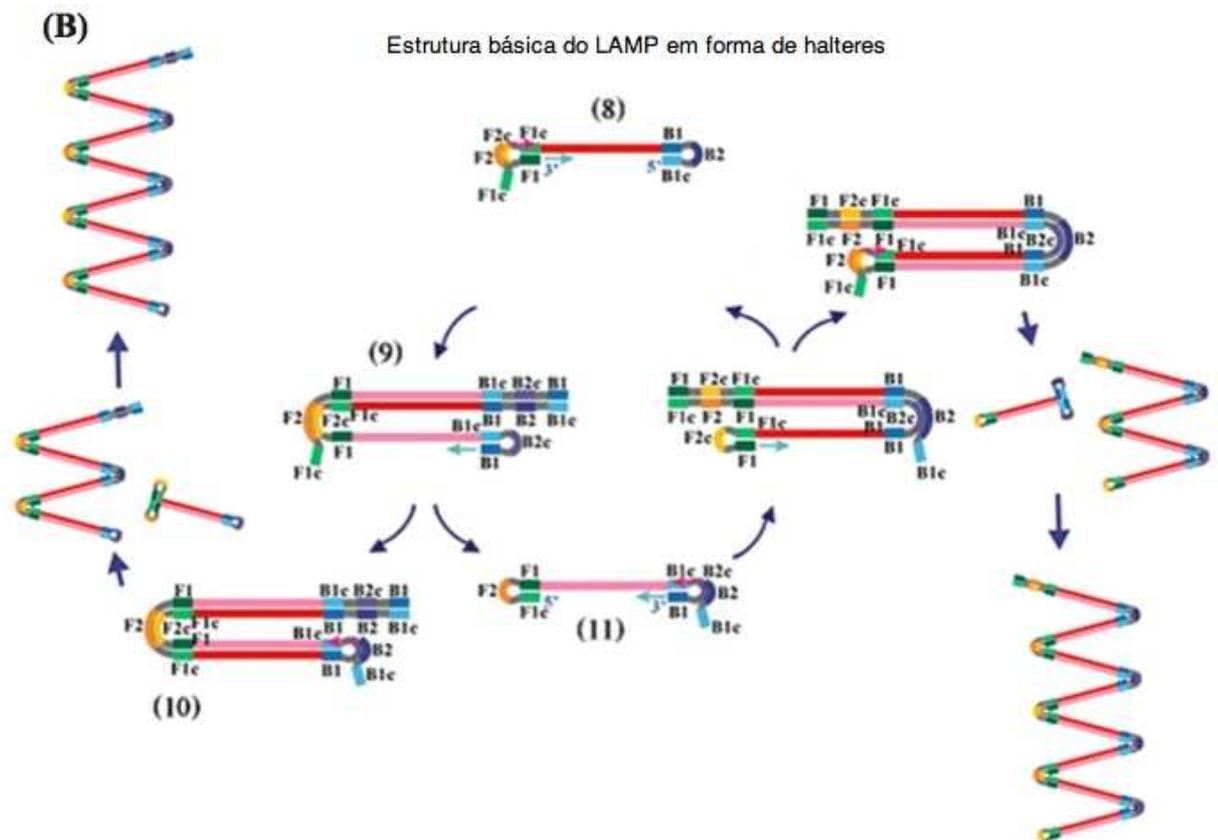
### Etapa cíclica

Nesta etapa os iniciadores se hibridizam na estrutura básica e se inicia a síntese do DNA por deslocamento, gerando a partir do halter original uma nova fita de DNA a cada novo ciclo. Resumidamente, o iniciador FIP se anela na região de fita simples de DNA do halter e se inicia a síntese do DNA por deslocamento liberando uma fita filha. Esta fita simples de DNA forma apenas um lado do halter na extremidade 3' por causa do B1c e da região B1.

Em seguida, a partir da extremidade 3' da região B1, a síntese do DNA começa usando sua própria estrutura como modelo e liberando a fita FIP da cadeia complementar. Esta fita, logo após, forma a estrutura do halter com ambas as extremidades F1 – F1c e B1c – B1. Concomitante o iniciador BIP se anela na

região B2c e a síntese do DNA ocorre deslocando a fita e liberando-a (NAGAMINE et al., 2002).

Como resultado deste processo, várias estruturas são formadas em formas alternadamente invertidas da sequência alvo. A etapa cíclica acumula no final de uma hora aproximadamente  $10^9$  cópias da sequência alvo (Figura 8).



**Figura 8:** Representação esquemática da etapa cíclica da amplificação por LAMP (passos de 8 a 11). Amplificação exponencial da estrutura básica do LAMP (modificado Eiken Chemical Co. Ltda, Japan).

Fonte: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>

#### 1.7.4. Detecção dos produtos do LAMP

Para verificar se o LAMP gerou o padrão de bandas esperado de DNA amplificado, pode ser realizada uma eletroforese em gel de agarose contendo brometo de etídio, um processo parecido com o que ocorre na PCR.

Alguns autores têm descrito na literatura que a visualização a olho nu é possível uma vez que facilita a aplicação da técnica em pequenos laboratórios em países

emergentes ou até mesmo em campo. Com isso, é possível acompanhar a amplificação sob a forma de turvação visual (pirofosfato de magnésio) ou através de fluorescência usando o agente intercalante SYBR Green I (PARIDA et al., 2008).

## **2 Objetivos**

### ***2.1. Objetivo Geral***

1. Entender a metodologia geral necessária para a análise de cffDNA.

### ***2.2. Objetivos Específicos***

1. Comparar diferentes metodologias para extração do DNA fetal a partir do plasma materno;
2. Comparar diferentes metodologias para a amplificação de cffDNA;
3. Comparar diferentes metodologias para a análise do DNA amplificado;
4. Desenvolver uma metodologia para o diagnóstico pré-natal para identificação do sexo fetal a partir do plasma materno;
5. Comparar a eficiência do diagnóstico da técnica de PCR com a técnica de LAMP.

## **3 Material e Métodos**

### ***3.1. Local de Coleta e Pacientes***

Este trabalho foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFSCar, nº do processo CAAE 0045.0.135000-10 e da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde.

Para iniciar este projeto foi firmado um convênio com o laboratório DNA Consult Genética e Biotecnologia, sediado na Rua São Paulo nº 557, São Carlos-SP. A empresa conta com mais de 15 anos e é especializada na análise de DNA de origem humana e animal na aplicação dos conhecimentos derivados destas análises nos mais diferentes ramos, como: paternidade, forense, sexagem e prognósticos. Com isso, ela disponibilizou toda a estrutura do laboratório como reagentes, equipamentos e local para coleta para a realização desta pesquisa.

Neste trabalho foram coletadas 53 amostras de mulheres grávidas, hípidas, com idade gestacional variando da 7<sup>a</sup> a 40<sup>a</sup> semana e excluídas mulheres não grávidas ou sem os requisitos de inclusão (Tabela 3).

Como controles foram incluídos: duas pacientes grávidas de feto masculino confirmado, um homem normal com fertilidade comprovada, uma paciente grávida de feto feminino sem gravidez anterior e uma mulher não grávida.

Antes da coleta do material biológico foram explicados, para as gestantes, os objetivos do trabalho e que se tratava de uma técnica experimental em fase de implantação e, como tal, sujeita a erros. Pedimos para que elas assinassem o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2) e preenchessem o formulário de coleta (Anexo 1). Os resultados obtidos foram encaminhados para as pacientes por e-mail ou telefone e era pedido para que elas retornassem quando tivessem o resultado do ultra-som ou então após o nascimento pelo exame físico.

Tabela 3: Amostras de gestantes coletadas em diferentes idades gestacionais

Número da Gestante	Semanas de gestação	Número da Gestante	Semanas de gestação
G001	13 semanas	G029	34 semanas
G002	11 semanas	G030	20 semanas
G003	10 semanas	G031	18 semanas
G004	14 semanas	G032	10 semanas
G005	16 semanas	G033	28 semanas
G006	18 semanas	G034	22 semanas
G007	8 semanas	G035	9 semanas
G008	13 semanas	G036	8 semanas
G009	9 semanas	G037	13 semanas
G010	41 semanas	G038	14 semanas
G011	38 semanas	G039	20 semanas
G012	11 semanas	G040	15 semanas
G013	10 semanas	G041	8 semanas
G014	7 semanas	G042	11 semanas
G015	38 semanas	G043	8 semanas
G016	39 semanas	G044	9 semanas
G017	32 semanas	G045	11 semanas
G018	25 semanas	G046	15 semanas
G019	8 semanas	G047	8 semanas
G020	30 semanas	G048	14 semanas
G021	11 semanas	G049	24 semanas
G022	11 semanas	G050	33 semanas
G023	13 semanas	G051	32 semanas
G024	17 semanas	G052	18 semanas
G025	39 semanas	G053	22 semanas
G026	12 semanas		
G027	19 semanas		
G028	15 semanas		

Para cada gestante foram coletados 5,0 mL de sangue por punção venosa em tubos a vácuo K3 EDTA com gel separador. Esse material foi centrifugado por 10 minutos a 1.100 g (temperatura ambiente) e o plasma foi transferido para tubos de 1,5 mL. Caso não fosse realizada a extração do DNA no mesmo dia, as amostras de plasma eram armazenadas a uma temperatura de -20°C.

## 3.2. Extração de DNA plasmático

Existem inúmeros protocolos descritos na literatura para obtenção do DNA a partir do plasma, que variam quanto à rapidez, quantidade de DNA extraído, qualidade da amplificação e degradação do DNA ao longo do tempo. Quatro metodologias serão testadas em relação a esses parâmetros, todas as amostras foram extraídas em duplicata utilizando-se sangue materno para a obtenção do DNA fetal.

### 3.2.1. *Protocolo de extração de DNA a partir do plasma descrito por David Stirling (2003)*

Nesse protocolo de extração de DNA, 300 µL de plasma foram acondicionados em tubos de 1,5 mL e em seguida foram adicionados 150 µL de uma solução de lise contendo SDS 10% mais 20 µL da enzima proteinase K 20 mg/mL e a solução foi incubada overnight a 60°C. Logo após, foi adicionado um volume de fenol/clorofórmio na solução e a amostra centrifugada a 1.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e novamente adicionado um volume de fenol/clorofórmio. A amostra foi centrifugada a 1.000 g por 10 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi transferido para um tubo novo, sendo adicionados 800 µL de etanol absoluto P.A. e 1/10 de acetato de amônio 7,5 M. A solução foi homogeneizada e centrifugada a 2.500 g durante 40 minutos. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 500 µL de etanol 70%. A solução foi centrifugada a 2.500 g durante 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e após secagem, o precipitado (DNA) foi ressuscitado em 30 µL de água ultra pura autoclavada ou T.E. (10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) e armazenado em freezer a -20°C.

### *3.2.2. Protocolo de extração de DNA a partir do plasma utilizando Brazol<sup>®</sup>-LGC (Chomczynski e Sacchi, 1987)*

Em um tubo de 1,5 mL já contendo 300 µL de Brazol (LCG Biotecnologia, São Paulo, Brasil) foram adicionados 100 µL de plasma. Após a solução ser homogeneizada por 2 minutos, foram adicionados 50 µL de clorofórmio e a solução novamente homogeneizada. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 13.000 g, durante 15 minutos. Após esta etapa, o sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo tubo etiquetado e a ele foram adicionados 300 µL de Isopropanol resfriado a 4°C. A solução foi centrifugada a 13.000 g por 20 minutos. Em seguida, foi descartado o sobrenadante e adicionados 800 µL de etanol absoluto PA. O material foi centrifugado a 13.000 g por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. O precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% e centrifugado a 13.000 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e após a secagem o precipitado foi ressuscitado em 30 µL de água ultra pura autoclavada ou T.E. (10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) e armazenado em freezer a -20°C.

### *3.2.3. Protocolo de extração de DNA a partir do plasma utilizado Kit comercial Qiamp Blood Mini Kit da Qiagen*

Nesse protocolo de extração de DNA, em um tubo de 1,5 mL foram adicionados 200 µL de amostra de plasma, 200 µL de buffer AL e 20 µL de enzima protease. Esta mistura foi agitada no vortex por 15 segundos e incubada a 56°C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µL de etanol absoluto resfriado a 4°C e agitada no vortex por 15 segundos novamente. A mistura foi transferida para a coluna montada do kit, centrifugada por 1 minuto a 8.000 g e o filtrado foi descartado e transferido à coluna para tubo novo. Na coluna foram adicionados 500 µL de buffer AW1, centrifugado por 1 minuto a 8.000 g e o filtrado foi descartado e transferido à coluna para tubo novo. Em seguida foram adicionados 500 µL de buffer AW2 e centrifugados por 3 minutos a 14.000 g. O filtrado foi descartado, a coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL, foram adicionados 100 µL de buffer AE, incubou-se à temperatura ambiente por 5

minutos e centrifugou-se por 1 minuto a 8.000 g. Após a centrifugação o DNA extraído foi armazenado em freezer a -20°C.

#### *3.2.4. Protocolo de extração de DNA a partir do plasma - modificado de Bello et al., 2001*

Em um tubo de 1,5 mL foram adicionados 400 µL de plasma materno e uma solução de lise que continha;

- 240 µL de água deionizada;
- 80 µL de Tampão de Proteinase K 5X (10 mM Tris-HCl, pH 7,8, 5 mM EDTA e 0,5% SDS);
- 40 µL de SDS 10%;
- 20 µL da enzima Proteinase K (20 mg/mL).

Esta solução foi homogeneizada e incubada a 56°C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 120 mL de NaCl 5M e o material foi centrifugado por 10 minutos a 13.000 g. Após a centrifugação o sobrenadante foi transferido para um tubo novo, o material foi precipitado com 800 mL de Etanol P.A. A solução foi centrifugada novamente a 13.000 g por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Em seguida, foram adicionados 500 mL de Etanol 70% e o material foi centrifugado a 13.000 g por 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, colocado para secar e o precipitado foi ressuscitado em 30 µL de água ultra pura autoclavada ou T.E. (10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) e armazenado em freezer a -20 °C.

### **3.3. Reações de amplificação**

#### *3.3.1. PCR- Reação em Cadeia da Polimerase*

Foram estudadas duas regiões do gene TSPY (*Testis-specific Protein, Y-encoded*) e um pseudo gene desta região, o DYS14, localizados no cromossomo Y. Como

controle da amplificação, para verificar a presença de DNA nas amostras de DNA, foi utilizado a  $\beta$ -globina que está presente em ambos os sexos localizados no cromossomo 11.

Foram realizadas três reações de amplificação para cada amostra: a) TSPY, com iniciadores forward 1 e reverse 1 e re-amplificação (nested) com os iniciadores forward 2 e reverse 2; b) DYS14, com iniciadores forward 1 e reverse 1 e re-amplificação (nested) com os iniciadores forward 2 e reverse 2 e c)  $\beta$ -globina, com os iniciadores  $\beta$ -globina forward e  $\beta$ -globina reverse.

As reações de amplificação utilizando a técnica da Nested PCR foram realizadas no equipamento termociclador com gradiente de temperatura da Applied Biosystems®, modelo Veriti 96 Well. A primeira reação foi constituída em um volume final de 15  $\mu$ L, contendo: 1X de solução tampão (20 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glicerol); 1,5 mM de  $MgCl_2$ ; 1,25 mM de cada nucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP e dATP – Promega Corp.); 10 pmol de cada um dos iniciadores externos (Forward 1 e Reverse 1) (Tabela 4); 1U de Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen®) e 30 ng DNA total. A segunda reação foi realizada em um volume final de 15  $\mu$ L, contendo: 1X de solução tampão (20 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glicerol); 2,5 mM de  $MgCl_2$ ; 2,0 mM de cada nucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP e dATP – Promega Corp.); 5,0 pmol de cada um dos iniciadores internos (Forward 2 e Reverse 2) (Tabela 4), 1U de Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen®) e 1,0  $\mu$ L do produto da PCR da primeira reação.

Em todas as séries de reações foi incluído um controle negativo de amplificação contendo todos os reagentes e o DNA era substituído por água, além de um controle positivo de uma gestante de um feto de sexo masculino (amostra 02) e um controle negativo de uma gestante de um feto de sexo feminino (amostra 03).

O programa do ciclo térmico iniciou-se com uma fase de desnaturação a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 95°C por 45 segundos (desnaturação da fita do DNA), 57 a 62°C por 45 segundos (anelamento dos iniciadores), 72°C por 1 minuto (incorporação dos nucleotídeos) e seguido de uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos gerados na PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (USB UltraPure<sup>®</sup>) a 2%, preparada com tampão TAE 1X e 1 µL de GelRed – Biotium<sup>®</sup> em uma mini cuba horizontal (BioAgency<sup>®</sup>). No momento de aplicar no gel as amostras foram ressuspensas em tampão Loading Buffer 6X e a corrida foi conduzida a uma tensão de 80 V por 30 minutos. O tampão utilizado para a corrida foi o mesmo utilizado no preparo do gel.

Após a corrida o gel foi visualizado em transiluminador de U.V. (UVP-BioResearch<sup>®</sup>) e os resultados registrados em um sistema de fotodocumentação e analisados pelo software (Doc-It 3.0<sup>®</sup>).

Foram consideradas positivas para o sexo masculino as amostras que apresentaram fragmentos de tamanho de 250 pb correspondentes à região TSPY e 198 pb correspondentes à região DYS14.

As amplificações que não apresentavam os fragmentos correspondentes para a região TSPY e DYS14, mas que apresentavam a amplificação do fragmento de 620 pb que corresponde à sequência do gene  $\beta$ -globina eram consideradas do sexo feminino.

**Tabela 4:** Sequências dos iniciadores para amplificação por PCR dos genes TSPY, DYS14 e  $\beta$ -Globina

Gene	Nome	Sequências dos iniciadores (5'-3')	T <sub>m</sub> (°C)	Tamanho (pb)
TSPY	TSPY <i>Forward 1</i>	5' GTG GAA GAA GAG AAG CAT CC 3'	56	350
	TSPY <i>Reverse 1</i>	5' GAG TGG AAT GAG AAG CCC TG 3'	59	
	TSPY <i>Forward 2</i>	5' CTG ACG AAG ATG AAG ACT TGC 3'	57	250
	TSPY <i>Reverse 2</i>	5' AGT CCC CTG ACG TCT CTG TT 3'	59	
DYS-14	DYS-14 <i>Forward 1</i>	5' CTA GAC CGC AGA GGC GCC AT 3'	58	240
	DYS-14 <i>Reverse 1</i>	5' TAG TAC CCA CGC CTG CTC CGG 3'	61	
	DYS-14 <i>Forward 2</i>	5' CAT CCA GAG CGT CCC TGG CTT 3'	59	198
	DYS-14 <i>Reverse 2</i>	5' CTT TCC ACA GCC ACA TTT GTC 3'	56	
$\beta$ -Globina	$\beta$ -Globina <i>Forward</i>	5' CCT GAG AGC TTG CTA GTG ATT 3'	54	620
	$\beta$ -Globina <i>Reverse</i>	5' TAG TCC CAC TGT GGA CTA CTT 3'	54	

### 3.3.2. LAMP- Loop mediated isothermal amplification

Para esta metodologia de amplificação foram estudadas as mesmas regiões da PCR: a região do gene TSPY (*Testis-specific Protein, Y-encoded*) e um pseudo gene desta região, o DYS14, localizado no cromossomo Y. O projeto dos iniciadores foi realizado utilizando-se o software Primer Explorer V4 (<http://primerexplorer.jp/e/>) e seguindo o protocolo padrão fornecido pela empresa que desenvolveu a técnica de LAMP.

As reações de amplificação foram realizadas em banho seco (Labmet® - Digital Dry Bath) e em termociclador com gradiente de temperatura da Applied Biosystems, modelo Veriti 96 Well. A reação foi constituída em um volume final de 25 µL, contendo: 1X de solução tampão (20 mM Tris-HCl, pH 8,8), 10 mM KCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1% Triton X-100, 1,6 mM de cada nucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP e dATP – Promega Corp.), 25 pmol de cada um dos iniciadores internos (FIP e BIP), 5 pmol de cada um dos iniciadores externos (B3 e F3) (Tabela 5), 1M de Betaína (Sigma), 8U de *Bst* DNA polymerase large fragment (New England Biolabs) e 30ng de DNA.

Em todas as séries de reações foi incluído um controle negativo de amplificação contendo todos os reagentes e o DNA era substituído por água, além de um controle positivo de uma gestante de um feto de sexo masculino (amostra 02) e um controle negativo de uma gestante de um feto de sexo feminino (amostra 03).

As amostras depois de preparadas foram incubadas variando a temperatura de 60 a 65°C e o tempo de 30 a 90 minutos.

Os produtos gerados no LAMP foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (USB UltraPure®) a 2%, preparados com tampão TAE 1X e 1 µL de GelRed – Biotium® em uma mini cuba horizontal (BioAgency®). No momento de aplicação no gel as amostras foram ressuspendidas em tampão Loading Buffer 6X e a corrida foi conduzida a uma tensão de 80 V por 30 minutos. O tampão utilizado para a corrida foi o mesmo utilizado no preparo do gel.

Após a corrida, o gel foi visualizado em transiluminador de U.V. (UVP-BioResearch®) e os resultados registrados em um sistema de foto-documentação e analisados no software Doc-It 3.0®.

Foram consideradas positivas para o sexo masculino as amostras que apresentaram o padrão de bandas específicas do LAMP. As amplificações que não apresentavam amplificação eram consideradas do sexo feminino.

**Tabela 5:** Sequências dos iniciadores para amplificação por LAMP dos genes TSPY e DYS14

Gene	Nome	Sequências dos <i>iniciadores</i> (5'-3')
TSPY	FIP_TSPY	5' GAG GGA CGC TCT GGA CGT TTT GGC AGC GGG AAA AGA TGG 3'
	BIP_TSPY	5' TGC AAA CCA CCC CCA GAT GTT TTT CCA TGT AGC TCA GCA TGT CT 3'
	F3_TSPY	5' GTT AAT GCC CAA GCC AGG AA 3'
	B3_TSPY	5' GCT TCT CTT CTT CCA CCT CC 3'
DYS14	FIP_DYS14	5' GCAACT CCC CTT TGT TCC CCAATT TTT CGG GGA AGT GTA AGT GAC C 3'
	BIP_DYS14	5' CTA TTG TCC TGC ATG CGG CAG ATT TTA AGA TGC CCC AAA CGT CTG 3'
	F3_DYS14	5' GGCCTTTCTAGTAGTGGAGAGGT 3'
	B3_DYS14	5' AACTCGCTTCTGCTCTTCAA 3'

## 4 Resultados

Neste trabalho foram testadas quatro metodologias de extração do DNA a partir do plasma materno e elas foram analisadas quanto à rapidez, qualidade e quantidade de DNA extraído, qualidade da amplificação, custo da extração e degradação do DNA ao longo do tempo.

Uma das grandes dificuldades enfrentadas foi a obtenção do DNA fetal a partir do plasma materno, uma vez que ele está em baixa concentração no sangue materno. Sekizawa et al. (2001), estimaram uma média de 35 cópias de DNA fetal circundante por mililitro de plasma materno no início da gravidez, por isso a grande dificuldade de se obter um protocolo no qual seja possível a extração e a amplificação deste DNA. A Tabela 6 mostra os resultados obtidos dos protocolos de extração segundo as variáveis testadas.

**Tabela 6:** Protocolos utilizados para extração do DNA fetal com as variáveis testadas

Variáveis	Protocolos de extração de DNA a partir do plasma materno			
Referências	Bello <i>et al.</i> (2001)	Brazol® LGC	Stirling (2003)	<i>Kit Qiamp Blood</i>
Tempo de extração do DNA	1h,30 min.	1h,15 min.	15 horas	45 minutos
*Qualidade do DNA	Ruim	Ruim	Boa	Boa
Quantidade do DNA obtido	< 2,0 ng/μL	< 2,0 ng/μL	10ng/μL	15ng/μL
**Degradação ao longo do tempo	Rápida	Rápida	Lenta	Lenta
***Custo da extração	Baixo (R\$3,00)	Baixo (R\$5,00)	Médio (R\$8,00)	Alto (R\$17,00)
Foi possível a amplificação	Não	Não	Sim	Sim

\*de acordo com a possibilidade de amplificação;

\*\*degradação: lenta até 30 dias; média até cinco dias e rápida 48 horas a -20°C;

\*\*\* somente o custo dos reagentes.

Os protocolos modificados de Bello et al. (2001) e o protocolo de extração utilizando o reagente Brazol<sup>®</sup> - LGC (CHOMCZYNSKI e SACCHI, 1987) são mais rápidos, o custo é menor e utilizam menos reagentes que o protocolo descrito por Stirling (2003) e o kit comercial *Qiamp Blood Mini Kit* da Qiagen, porém a obtenção do DNA fetal a partir do plasma materno não foi realizada com sucesso.

A quantificação do DNA obtido foi possível utilizando-se o equipamento NanoDrop 1000<sup>®</sup>, que é um espectrofotômetro capaz de analisar e quantificar a concentração de DNA em pequenos volumes. O valor encontrado no protocolo de Bello et al. (2001) e o protocolo utilizando o reagente Brazol<sup>®</sup> - LGC (CHOMCZYNSKI e SACCHI, 1987) foram muito baixos (< 2,0 ng/μL).

#### **4.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

A técnica da PCR já é muito utilizada para realização dos testes de sexagem. Como ponto de partida foi utilizado o mesmo protocolo descrito por Levi et al. (2003) e Al-Yatama et al. (2001).

Foram realizados inúmeros testes para padronizar a concentração e o volume dos reagentes para *Nested-PCR* (dados não mostrados). Os melhores resultados obtidos para as duas regiões estudadas estão descritos nas Tabelas 7 e 8.

**Tabela 7:** Padrões de reações de amplificação dos genes DSY14 e TSPY utilizadas na primeira reação da PCR

Reagente	Concentração	Volume
H <sub>2</sub> O (mili-Q Autoclavada)	-	7,2μL
Tampão	[1X]	1,5μL
MgCl <sub>2</sub>	[1,5mM]	0,45μL
dNTPs	[0,2mM]	2,4μL
Iniciadores externos (iniciador 1)	[10pmol]	1,0μL
<i>Taq</i> DNA Pol.	[2U]	0,4μL
DNA	[30ng/μL]	-

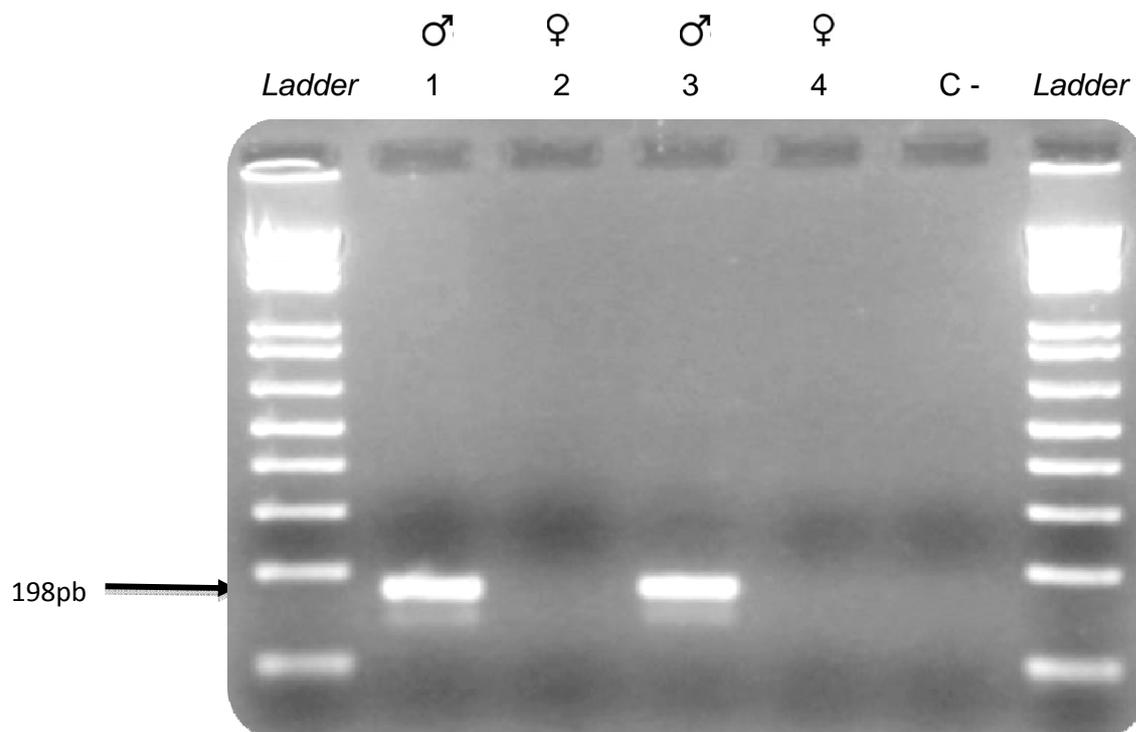
Tabela 8: Padrões de reações de amplificação dos genes DSY14 e TSPY utilizadas na segunda reação da PCR

Reagente	Concentração	Volume
H <sub>2</sub> O (mili-Q Autoclavada)	-	8,2μL
Tampão	[1X]	1,5μL
MgCl <sub>2</sub>	[1,5mM]	0,45μL
dNTPs	[0,2mM]	2,4μL
Iniciadores internos (iniciador 2)	[2pmol]	1,0μL
Taq DNA Pol.	[2U]	0,4μL
Produto da primeira reação de PCR	[30ng/μL]	-

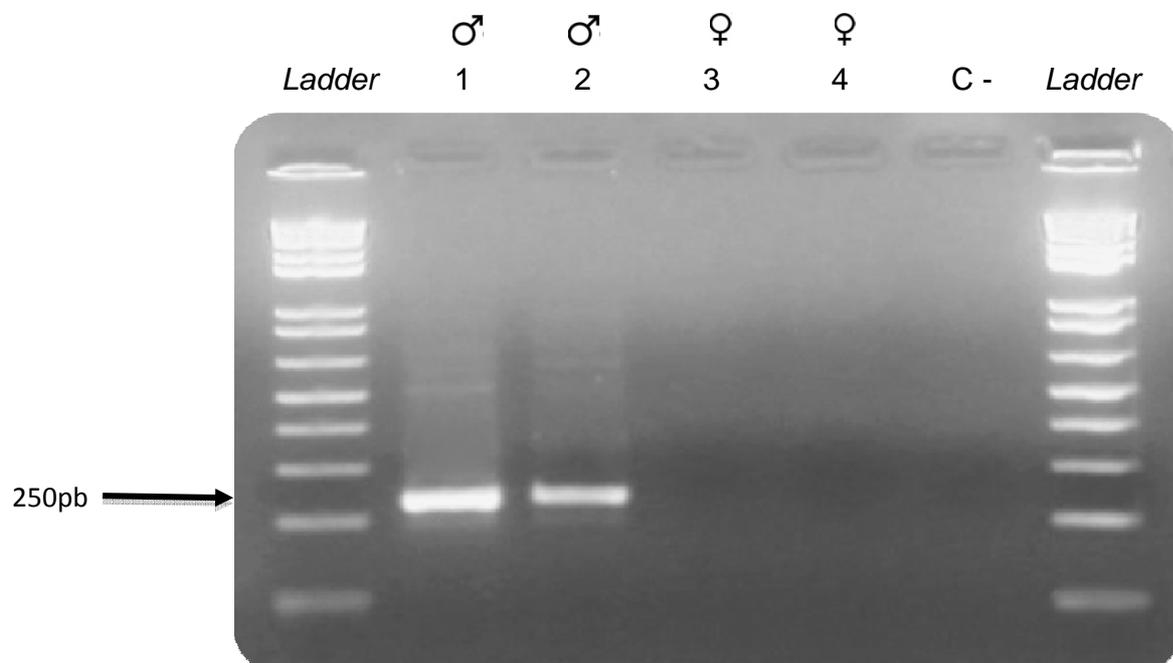
Na Figura 9 é apresentado o gel de agarose corado com brometo de etídio da sequência do gene DYS14, onde pode ser visualizado o fragmento de comprimento de 198 pb, correspondendo ao resultado positivo para o sexo masculino, já as amostras que não apresentaram o fragmento deste gene foram consideradas negativas e, conseqüentemente, do sexo feminino.

Na Figura 10 é apresentado o gel de agarose corado com brometo de etídio da sequência do gene TSPY, onde pode ser visualizado o fragmento de comprimento de 250 pb correspondendo ao resultado positivo para o sexo masculino, já as amostras que não apresentaram o fragmento do gene TSPY foram consideradas negativas e, conseqüentemente, do sexo feminino.

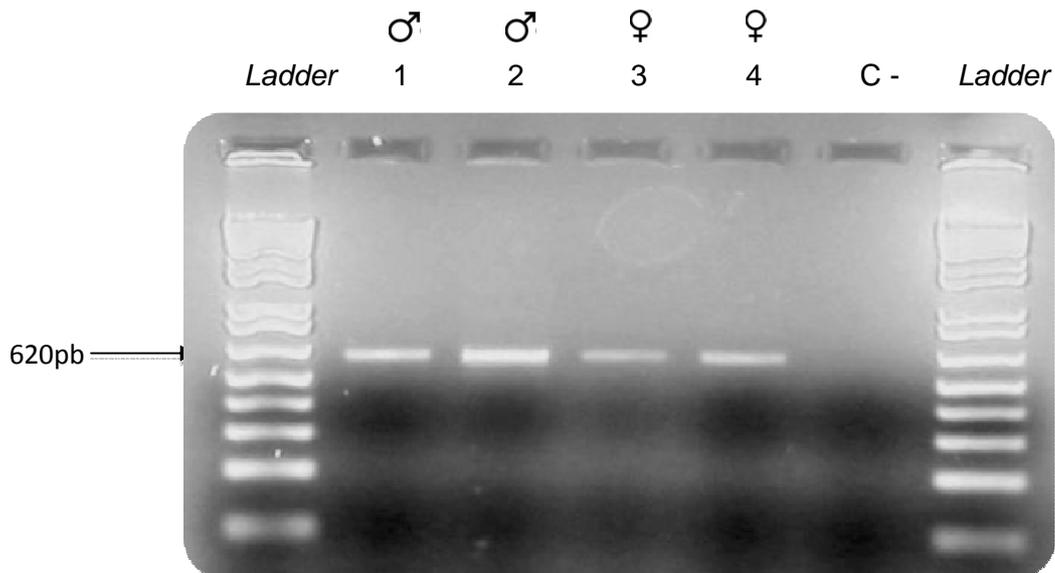
Para confirmação dos resultados das duas regiões estudadas era realizado outro gel correspondente ao fragmento do gene da  $\beta$ -globina, a qual indica a presença de DNA na reação que é o controle da amplificação (Figura 11).



**Figura 9:** Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio da *Nested* PCR para o gene DYS14. (*Ladder*) – marcador de massa molecular 1kb Plus Invitrogen®; (1 e 3) fragmento de 198 pb, DNA extraído de plasma de gestante de feto masculino; (2 e 4) sem amplificação, DNA extraído de plasma de gestante de feto feminino, (C -) controle negativo da reação.



**Figura 10:** Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio da *Nested-PCR* para o gene TSPY. (*Ladder*) - marcador de massa molecular 1kb Plus Invitrogen®; (1 e 2) fragmento de 250 pb, DNA extraído de plasma de gestante de feto masculino; (3 e 4) sem amplificação, DNA extraído de plasma de gestante de feto feminino, (C -) controle negativo da reação.



**Figura 11:** Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio da PCR para o gene  $\beta$ -Globina com um fragmento de 620 pb. (*Ladder*) – marcador de massa molecular 1kb Plus Invitrogen®; (1 e 2) DNA extraído de plasma de gestante de feto masculino, (3 e 4) DNA extraído de plasma de gestante de feto feminino, (C -) controle negativo da reação.

#### **4.2. LAMP- Loop mediated isothermal amplification**

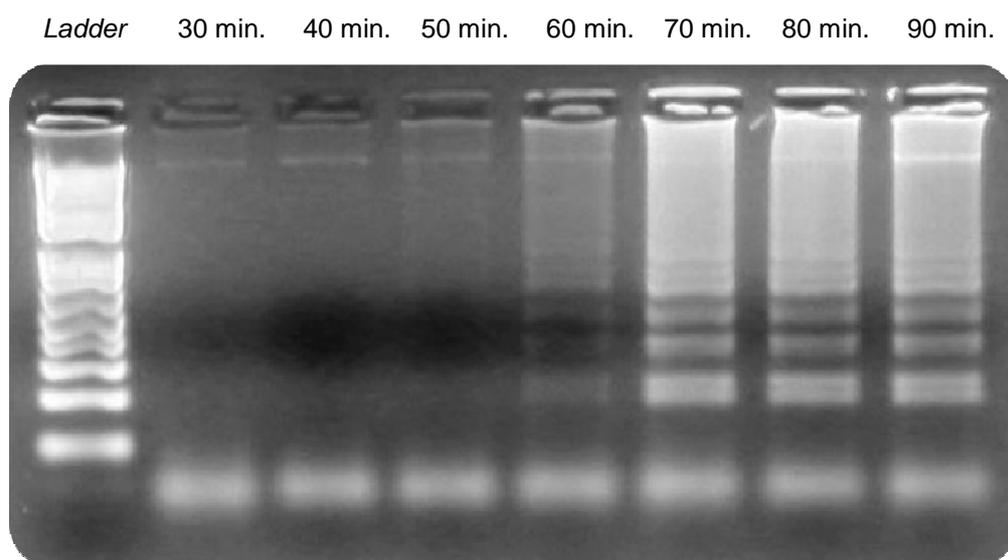
A técnica de LAMP é relativamente nova comparada com a da PCR e nenhum trabalho foi feito até o momento para a realização de sexagem fetal em humanos utilizando-a. Como referência inicial para padronização das reações foram utilizados os artigos originais da técnica (NOTOMI et al., 2000) e alguns artigos para identificação de vírus e protozoários considerando a baixa quantidade de DNA.

Foram realizados inúmeros experimentos para determinar a concentração dos reagentes (dados não mostrados) e os melhores resultados obtidos para concentração e volume dos reagentes, tanto para a região do gene do TSPY quanto para a do DYS14, estão apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9:** Componentes da reação de LAMP com suas concentrações e volume para amplificação dos genes DSY14 e TSP

Reagentes		Concentração	Volume
H <sub>2</sub> O		-	11,5μL
Tampão		[1X]	2,5μL
Betaína		[1,6 M]	4,0μL
dNTPs		[2,8mM]	1,0μL
Iniciadores	F3 e B3	[5pmol/μL]	1μL de cada iniciador
	BIP e FIP	[25pmol/μL]	
<i>Bst</i> DNA Polimerase		[8 U/mL]	1,0μL
DNA		[30ng/μL]	-

Após a padronização das concentrações dos reagentes foi realizado um experimento para verificar qual é a melhor temperatura e o menor tempo possível para uma amplificação. Nele foi realizado uma reação padrão (Tabela 9) contendo o DNA extraído de uma gestante com um feto masculino de 10 semanas, com um gradiente de temperatura variando de 60 a 65°C e tempo variando de 30 a 90 minutos. A melhor temperatura para realização da amplificação por LAMP foi de 63°C e podendo ser possível ver o sinal da amplificação com 60 minutos (Figura 12).

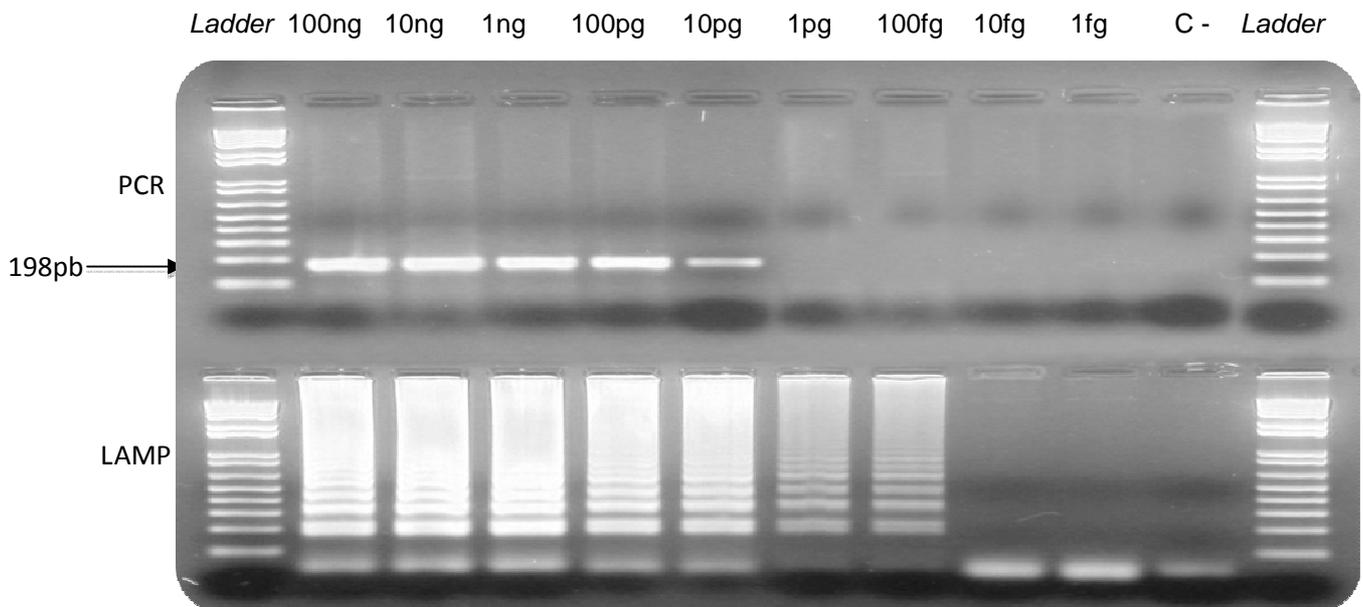


**Figura 12:** Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio da reação de amplificação por LAMP para o gene DYS14. (*Ladder*) – marcador de massa molecular 1kb Plus Invitrogen®; variação do tempo de amplificação de 30 até 90 minutos.

Note que a partir de 60 minutos é possível detectar a presença de fragmentos amplificados.

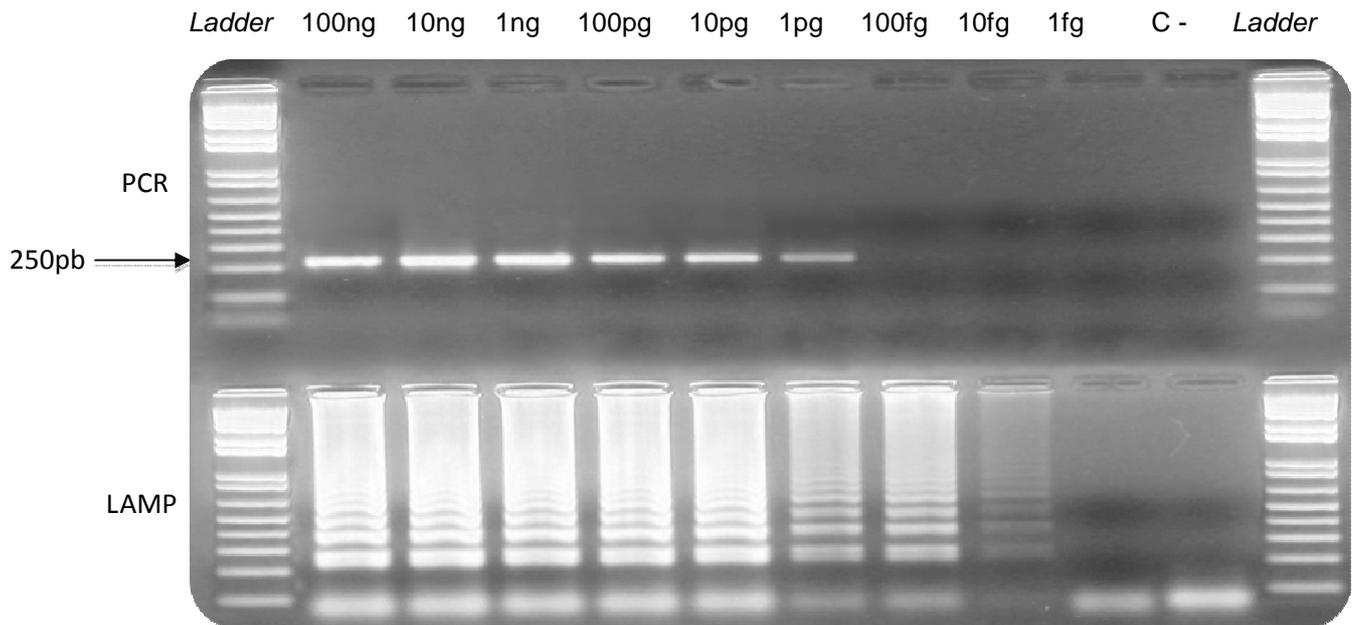
Uma vez demonstrada a eficiência da reação, sendo possível amplificar as amostras em 60 minutos, foi realizado um experimento com um gradiente de concentração do DNA comparando as duas técnicas de amplificação. Neste foi produzida uma reação de amplificação padrão da PCR (Tabelas 7 e 8) e LAMP (Tabela 9) com os dois genes TSPY e DYS14. Foi utilizado o DNA genômico de um homem saudável variando a concentração de DNA de 100 ng/μL a 1 fg/μL.

No experimento, variando a concentração de DNA utilizando a região DYS14, (Figura 13) foi possível amplificar a amostra com a técnica da PCR com até 10 ng. Na metodologia de LAMP foi possível amplificar até 100 ng de DNA.



**Figura 13:** Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio da reação da *Nested-PCR* e LAMP para o gene DYS14. As amplificações foram realizadas a partir de diferentes concentrações de DNA total de um homem saudável, 100 ng até 1 fg. (*Ladder*) – marcador de massa molecular 1kb Plus Invitrogen®; concentração variando de 100 ng/μL até 1 fg/μL; (C-) controle negativo da reação.

Em um segundo experimento, variando também a concentração de DNA utilizando a região TSPY, (Figura 14) foi possível amplificar a amostras com a técnica da PCR com até 1 pg de DNA, já na metodologia de LAMP foi possível amplificar até 10 fg de DNA.

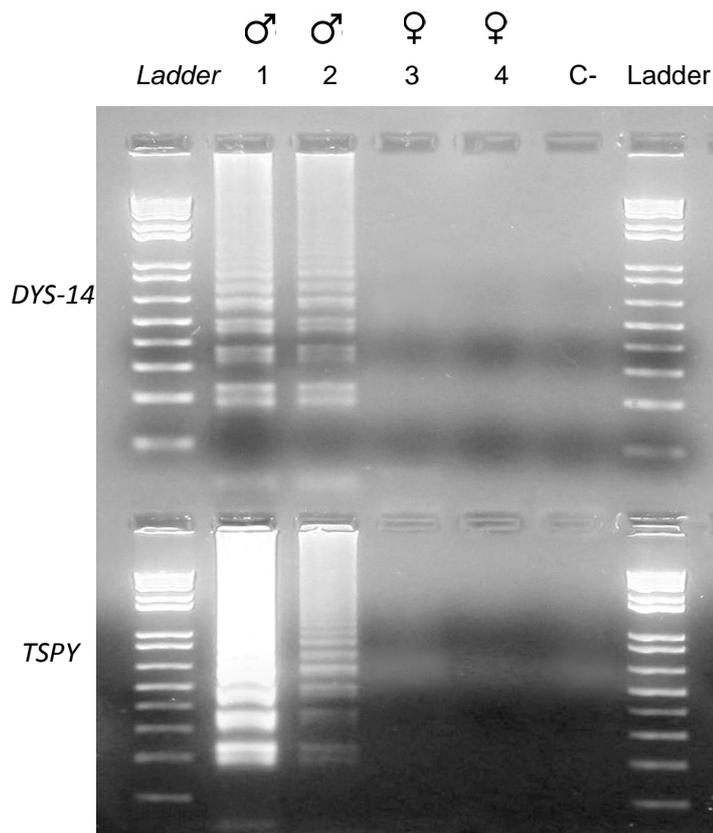


**Figura 14:** Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio da reação da *Nested* PCR e LAMP para gene TSPY. As amplificações foram realizadas a partir de diferentes concentrações de DNA total de um homem saudável, 100 ng até 1 fg. (*Ladder*) – marcador de massa molecular 1kb Plus Invitrogen®; concentração variando de 100 ng/ $\mu$ L a 1 fg/ $\mu$ L; (C -) controle negativo da reação.

A técnica de LAMP foi 100 vezes mais sensível que a técnica da PCR e a região TSPY foi 10 vezes mais sensível comparada com DYS14, amplificando a amostra com até 10 fg. Com isso foi demonstrado que em concentrações baixas de DNA a técnica de LAMP foi útil para a amplificação e como consequência seria possível amplificar a amostra de DNA fetal.

Após a realização dos experimentos de padronização onde foram obtidos os melhores resultados em relação às concentrações dos reagentes, ao tempo e à temperatura de amplificação, foi realizado o teste de sexagem utilizando a técnica de LAMP.

Na figura 15 é apresentado o gel de agarose corado com brometo de etídio da sequência dos genes TSPY e DYS14 para amplificação por LAMP, onde pode ser observado o padrão de bandas característico do LAMP para uma amplificação de um feto masculino. Quando não apresentavam sinal de amplificação dos dois genes foram considerados negativos e, conseqüentemente, do sexo feminino.



**Figura 15:** Foto do resultado da eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para os genes DYS14 e TSPY, mostrando um resultado de sexagem. (*Ladder*) – marcador de massa molecular 1kb Plus Invitrogen®; (1 e 2) DNA extraído de plasma de gestante de feto masculino; (3 e 4) DNA extraído de plasma de gestante de feto feminino; (C-) controle negativo da reação.

No total foram coletadas amostras de sangue de 53 gestantes em diferentes idades gestacionais e os resultados encaminhados para as pacientes (Tabela 10). Três casos não confirmaram o fenótipo devido à perda de contato com as gestantes (amostras 26, 37 e 46), em dois casos o resultado molecular não corroborou com o ultrassom (amostras 30 e 31) e foram descartadas desta pesquisa.

Tabela 10: Resultados obtidos por amplificação por PCR e LAMP comparado com o resultado do ultra-som

Número	Semanas de gestação	Resultado obtido por PCR (DYS14 e TSPY)	Resultado obtido por LAMP (DYS14 e TSPY)	Resultado do Ultra-som
G001	13 semanas	Masculino	Masculino	Masculino
G002	11 semanas	Masculino	Masculino	Masculino
G003	10 semanas	Feminino	Feminino	Feminino
G004	14 semanas	Masculino	Masculino	Masculino
G005	16 semanas	Masculino	Masculino	Masculino
G006	18 semanas	Feminino	Feminino	Feminino
G007	8 semanas	Feminino	Feminino	Feminino
G008	13 semanas	Masculino	Masculino	Masculino
G009	9 semanas	Feminino	Feminino	Feminino
G010	41 semanas	Feminino	Feminino	Feminino
G011	38 semanas	Masculino	Masculino	Masculino
G012	11 semanas	Masculino	Masculino	Masculino
G013	10 semanas	Feminino	Feminino	Feminino
G014	7 semanas	Masculino	Masculino	Masculino
G015	38 semanas	Masculino	Masculino	Masculino
G016	39 semanas	Masculino	Masculino	Masculino
G017	32 semanas	Feminino	Feminino	Feminino
G018	25 semanas	Masculino	Masculino	Masculino
G019	8 semanas	Feminino	Feminino	Feminino
G020	30 semanas	Feminino	Feminino	Feminino
G021	11 semanas	Masculino	Masculino	Masculino
G022	11 semanas	Masculino	Masculino	Masculino
G023	13 semanas	Masculino	Masculino	Masculino
G024	17 semanas	Feminino	Feminino	Feminino
G025	39 semanas	Feminino	Feminino	Feminino
<b>G026*</b>	<b>12 semanas</b>	<b>Masculino</b>	<b>Masculino</b>	-
G027	19 semanas	Masculino	Masculino	Masculino
G028	15 semanas	Feminino	Feminino	Feminino
G029	34 semanas	Masculino	Masculino	Masculino
<b>G030**</b>	<b>20 semanas</b>	<b>Masculino</b>	<b>Masculino</b>	<b>Feminino</b>
<b>G031**</b>	<b>18 semanas</b>	<b>Masculino</b>	<b>Masculino</b>	<b>Feminino</b>
G032	10 semanas	Feminino	Feminino	Feminino
G033	28 semanas	Masculino	Masculino	Masculino
G034	22 semanas	Masculino	Masculino	Masculino
G035	9 semanas	Masculino	Masculino	Masculino
G036	8 semanas	Feminino	Feminino	Feminino
<b>G037*</b>	<b>13 semanas</b>	<b>Masculino</b>	<b>Masculino</b>	-
G038	14 semanas	Masculino	Masculino	Feminino
G039	20 semanas	Masculino	Masculino	Feminino

G040	15 semanas	Feminino	Feminino	Feminino
G041	8 semanas	Feminino	Feminino	Feminino
G042	11 semanas	Feminino	Feminino	Feminino
G043	8 semanas	Feminino	Feminino	Feminino
G044	9 semanas	Masculino	Masculino	Masculino
G045	11 semanas	Feminino	Feminino	Feminino
<b>G046*</b>	<b>15 semanas</b>	<b>Masculino</b>	<b>Masculino</b>	-
G047	8 semanas	Masculino	Masculino	Masculino
G048	14 semanas	Masculino	Masculino	Masculino
G049	24 semanas	Masculino	Masculino	Masculino
G050	33 semanas	Feminino	Feminino	Feminino
G051	32 semanas	Masculino	Masculino	Masculino
G052	18 semanas	Masculino	Masculino	Masculino
G053	22 semanas	Masculino	Masculino	Masculino

\* perda do contato com a gestante;

\*\* resultado molecular não corroborou com o ultra-som.

Os resultados obtidos retirando as duas amostras que não corroboraram com o ultrassom e as três que houve a perda de contato com a gestante, foram de 28 amostras (58,33%) masculinas, com a amplificação das sequências do cromossomo Y e 20 amostras (41,67%) femininas que não amplificaram a sequência do cromossomo Y e apenas para o controle.

## 5 Discussão

O maior potencial de aplicação não clínica de cffNA é a determinação do sexo fetal na ausência de qualquer necessidade médica específica. As dimensões éticas e legais da determinação do sexo e seleção são complexas. Dentro da ética reprodutiva, os debates sobre a escolha do sexo foram caracterizados por três posições distintas, a saber: (WRIGHT et al., 2009)

- Liberalismo Extremo - a escolha do sexo não é uma problemática e a autonomia reprodutiva é primordial;
- Conservadorismo Extremo - a escolha do sexo nunca é eticamente justificável (com a possível exceção de determinadas circunstâncias de ordem médica);
- Posição Mista - a escolha do sexo é aceitável em algumas circunstâncias, mas não em outras, por exemplo, a seleção do sexo com a finalidade de equilíbrio familiar é aceitável, a menos que seja dirigida por um sexista com a atitude de que as mulheres são inferiores aos homens.

Embora a visão moderada seja atraente, pois tenta orientar um caminho entre os dois extremos, dificuldades teóricas e práticas permanecem. Além disso, em uma sociedade pluralista, pode ser um desafio alcançar um consenso sobre a sexagem pré-natal.

Regulamentação adicional aplica-se à seleção de embriões para reprodução assistida através de pré-implantação de diagnóstico genético, cuja licença para a Fertilização e Embriologia Humana é necessária. A seleção de embriões com base no sexo não é permitida atualmente, exceto quando a justificativa é a redução do risco relacionado à deficiência grave ou doença.

A descoberta da presença do DNA livre fetal no plasma materno de gestantes trouxe uma grande evolução nas técnicas de diagnóstico pré-natal não invasivo para o feto (LO et al., 1989). Existem alguns estudos mostrando a sensibilidade e especificidade do método de determinação do sexo fetal pelo plasma materno (JOHNSON et al., 2004).

A amplificação de ácidos nucleicos é uma ferramenta importante para o diagnóstico de doenças e características genéticas. Diversos métodos de amplificação estão disponíveis, dentre eles destacam-se: técnicas de amplificação de alvos-específicos como a PCR, PCR-transcriptase reversa (RT-PCR) e a PCR em tempo real.

As técnicas de amplificação baseadas na PCR necessitam de instrumentos precisos e elaborados, tendo vários inconvenientes intrínsecos, como a exigência de ciclos térmicos demorados. Além disso, eles têm um alto custo de implantação tornando a técnica não adaptável para o uso clínico de rotina.

O desenvolvimento da amplificação isotérmica LAMP por Tsugunori Notomi e pela empresa Eiken Chemical Co. Ltda possibilitou a identificação de uma sequência alvo desejada, com mínima estrutura laboratorial, não necessitando de equipamentos sofisticados, diminuindo o custo e viabilizando a utilização dessa metodologia de diagnóstico em qualquer laboratório de rotina clínica ou instituições de ensino, podendo assim, por exemplo, contribuir para a implantação em laboratório com pouco recurso.

A metodologia por LAMP, por ser relativamente simples, rápida, de baixo custo e de grande sensibilidade, trouxe grande contribuição para este trabalho de pesquisa. A grande sensibilidade do LAMP permite detectar pequenas quantidades de DNA fetal presente no plasma materno. Conforme a gravidez evolui aumenta-se a quantidade de DNA fetal no plasma materno que provém de diferentes tipos de células fetais (LO et al., 1999). Por não ser possível a separação do DNA fetal do DNA materno, igualmente presentes no plasma, o diagnóstico do genótipo fetal só é possível quando este apresentar sequências alvo diferentes do materno. No caso da sexagem, o filho difere da mãe em relação à presença do cromossomo Y (ZHONG et al., 2000).

Neste trabalho foi possível identificar o sexo fetal a partir da oitava semana de gestação, embora outros estudos descritos estabelecessem a sexagem fetal por PCR a partir da quinta semana (DONABELA, 2008). Esta diferença de sensibilidade é devida à utilização da PCR em tempo real, o que permite detectar ínfimas concentrações de DNA amplificado com maior segurança. A PCR em tempo real utiliza marcadores fluorescentes que amplificam o sinal do produto da

PCR. Além disso, a possibilidade de verificar a curva de dissociação do fragmento amplificado dá segurança de sua especificidade.

Uma das grandes dificuldades neste trabalho foi a escolha da metodologia de extração do DNA fetal a partir do plasma materno. Foram escolhidos quatro protocolos de extração, sendo que dois deles não obtiveram sucesso nas ampliações testadas (BELLO et al., 2001 e o reagente de extração Brazol®-LGC). Uma possível explicação para isso pode ser devido ao fato de que eles utilizam inúmeros passos e descartes manuais e com isso o DNA fetal pode ter se perdido durante a extração. Por isso, estes protocolos não foram utilizados para realização do exames de sexagem.

O protocolo de Stirling (2003) foi utilizado com sucesso no início da pesquisa apresentando bons resultados quanto à qualidade e quantidade de DNA extraído, a degradação foi lenta e o custo relativamente baixo, mas o tempo do protocolo de extração era longo e ele foi substituído por um kit comercial *Qiamp Blood Mini Kit* da Qiagen.

Este protocolo apresentou os melhores resultados comparados com os outros protocolos, o tempo de extração foi baixo, a quantidade e qualidade do DNA era boa e a degradação do DNA foi lenta, a desvantagem foi o custo elevado. Neste método o plasma é submetido a uma lise enzimática com proteinase K, tratado com o agente caotrópico hidrocloreto de guanidina, a solução é então filtrada em uma coluna de sílica, que possui afinidade por ácidos nucleicos. Após sucessivas lavagens o DNA aderido à sílica é eluído com tampão adequado, provido no kit (LEVI et al., 2003).

Foram coletadas 53 amostras de sangue total de grávidas em diferentes estágios gestacionais. Três casos foram descartados porque não houve a confirmação do sexo fetal após os testes moleculares devido à perda de contato com as gestantes. Em outros dois casos os resultados apontaram para fetos masculinos, entretanto, no ultra-som eles foram confirmados como femininos. Este fato certamente deve-se à grande sensibilidade das tecnologias utilizadas e à falta de possibilidade de utilizar controles nas reações de amplificação.

Devemos lembrar que a técnica de LAMP e PCR são muito sensíveis, pois a partir de uma única molécula de DNA (início da reação) há no final milhões de sequências alvo de interesse e caso o material for manuseado de forma incorreta

pode ocorrer uma contaminação. Outro fato é quem realizou os experimentos para esta pesquisa foi um indivíduo do sexo masculino. Para trazer maior confiabilidade à sexagem fetal sugerimos que os testes sejam realizados por mulheres, desde a extração do DNA até a sua amplificação. Além disso, é importante que sejam realizadas duas extrações de DNA e amplificações em diferentes datas.

Para minimizar o problema de contaminação algumas medidas foram tomadas:

- Os ambientes para as diferentes etapas do teste foram separados fisicamente: sala de extração, sala de preparação das reações e pós-reações (visualização dos resultados);
- Cada local de manipulação de amostra com o seu próprio conjunto de pipetas;
- Uso de ponteiros contendo filtro estéril e de uso exclusivo para PCR.

Apesar deste percalço, a técnica desenvolvida por Notomi et al. (2000) mostrou-se eficiente no diagnóstico do sexo fetal a partir da oitava semana de gestação, uma vez que este trabalho é pioneiro e ainda não foi descrito na literatura.

A utilização do LAMP comparado com a PCR, para realização da sexagem fetal, demonstrou um grande sucesso, uma vez que a grande dificuldade para este tipo de teste é a concentração de DNA fetal, que é muito baixa, ou seja, uma média de 35 cópias de DNA fetal circundante por mililitro de plasma materno no início da gravidez (SEKIZAWA et al., 2001).

Tanto para a amplificação de segmentos de DYS14 quanto de TSPY, o LAMP mostrou-se 100 vezes mais sensível que a PCR para os mesmos segmentos. Além disso, enquanto a amplificação por PCR tem a duração de aproximadamente 180 minutos, a reação do LAMP leva apenas 60 minutos.

A amplificação por LAMP não necessita de equipamentos sofisticados e pode ser realizada em um banho-maria. A visualização da amplificação por LAMP tampouco necessita de eletroforese, e pode ser verificada adicionando-se o agente intercalante fluorescente Sybr Green à reação (dados não mostrados).

A amplificação de segmento de TSPY mostrou-se mais sensível à detecção do DNA, conseguindo amplificar até 10 fg de DNA genômico, sendo indicada para o diagnóstico do sexo fetal a partir do DNA livre plasmático em gestantes.

A sexagem fetal precoce é importante para diminuir a ansiedade natural dos pais em saber o sexo do bebê. E contribui de forma decisiva no manejo das doenças genéticas. Podendo-se confirmar o sexo fetal precocemente não há a necessidade da realização de exames invasivos (coleta de vilosidade coriônica ou líquido amniótico) e mais tardios como o ultrassom.

Na recorrência da hiperplasia adrenal congênita, a sexagem fetal precoce é de grande utilidade devido ao esquema terapêutico profilático, que deve ser iniciado precocemente para prevenir a virilização dos fetos femininos afetados. Em fetos do sexo masculino, como não há necessidade de tratamento intra-útero, a parada precoce da medicação evitaria efeitos colaterais para a gestante (DONABELA, 2008).

A utilização de metodologias de amplificação mais rápidas e sensíveis como o LAMP permitem que laboratórios que não possuem recursos financeiros possam implantar esta técnica em sua rotina, diminuindo os custos de um diagnóstico e proporcionando uma maior abrangência e benefício para a população.

## 6 Conclusões

Os resultados obtidos nesse trabalho permitem concluir que:

1. O kit comercial *Qiamp Blood Mini Kit* da *Qiagen* apresenta os melhores resultados comparados com os outros protocolos; o tempo de extração é baixo, a quantidade e qualidade do DNA é boa e a degradação do DNA é lenta.
2. A técnica de LAMP se mostrou mais vantajosa que a metodologia da PCR devido a sua sensibilidade, tempo de execução e a não necessidade de um termociclador e tampouco de eletroforese.
3. A região TSPY mostrou uma maior sensibilidade para a detecção do DNA fetal que a região DSY14.

## 7 Referências Bibliográficas

- AFFARA, N.; BISHOP, C.; BROWN, W. **Report of the Second International Workshop on Y Chromosome Mapping 1995.** Cytogenet. Cell Genet.;73 (1-2):33-76, 1996.
- AL-YATAMA, M.K.; MUSTAFA, A.S.; OMU, A.E. **Establishment and Evaluation of Polymerase Chain Reaction for Detection of Y-Chromosome-Specific Fetal DNA in Maternal Blood Circulation during Pregnancy and after Delivery.** Med. Principles Pract. 10: 171-176, 2001.
- ARNEMANN, J.; JAKUBICZKA, S.; THÜRING, S. **Cloning and sequence analysis of a human Y-chromosome derived, testicular cDNA, TSPY.** Genomics, 11: 108-114, 1991.
- ARNEMANN, J.; EPPLEN, J.T.; COOKE, H.J. **A human Y-chromosomal DNA sequence expressed in testicular tissue.** Nucl. Acids Res., 15:8713-8742, 1987.
- BARTMANN, A.K.; RAMOS, E.S.; CAETANO, L.C. **TSPY detection in blood, buccal, and urine cells of patients with 45,X karyotype.** Am. J. Med. Genet.,15;130A(3):320-1, 2004.
- BAUMFORTH, K.R.; NELSON, P.N.; DIGBY, J.E. **Demystified the polymerase chain reaction.** Mol. Pathol., 52(1): 1-10, 1999.
- BELLO, N.; FRANCINO, O.; SANCHEZ, A. **Isolation of genomic DNA from feathers.** Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 13:162–164. PubMed, 2001.
- BIANCHI, D.W. **Circulating Fetal DNA: Its Origin and Diagnostic Potencial – A Review** Placenta, 25 Supplement A, Trophoblast Research, Vol. 18, S93-S101.01.005, 2004.
- BIANCHI, D.W. **Current knowledge about fetal blood cells in the maternal circulation.** J. Perinat. Med., 26:175-85, 1998.
- BISCHOFF, F.Z.; SINACORI, M.K.; DANG, D.D. **Cell-free fetal DNA and intact fetal cells in maternal blood circulation: implications for first and second trimester non-invasive prenatal diagnosis.** Hum. Reprod. Update; 8:493-500, 2002.

- BOON, E.M.J.; SCHLECHT, H.B; MARTIN, P. **Y chromosome detection by Real Time PCR and pyrophosphorolysis-activated polymerisation using free fetal DNA isolated from maternal plasma.** Prenat. Diagn. DOI: 10.1002/pd.1804, 2007.
- CAVALLOTTI, D.; CASILLA, G.; PIANTELLI, G. **Early complications of prenatal invasive diagnostics: perspective analysis.** Acta Biomed Ateneo Parmense. 75(1): 23-26, 2004.
- CHIEN, A.; EDGAR, D.B.; TRELA, J.M. "Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*". J. Bacteriol. 174: 1550–1557, 1976.
- CHIU, R.W.; LAU, T.K.; LEUNG, T.N. **Prenatal exclusion of a  $\beta$ -talassaemia major by examination of maternal plasma.** Lancet 360:1170, 2002.
- CHO, H.S.; KANG, J.I.; PARK, N.Y. **Detection of canine parvovirus in fecal samples using loop-mediated isothermal amplification.** J. Vet. Diagn. Invest., 18(1): 81–84, 2006.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. **Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction.** Anal Biochem., 156-159,162, 1987.
- COSTA, J.M.; BENACHI, A.; GAUTIER, E. **First-trimester fetal sex determination in maternal serum using real-time PCR.** Prenat. Diagn.; 21:1070-4, 2001.
- DENNERY, P.A. **Effects of oxidative stress on embryonic development.** Birth defects research, (part C) 81:155-161, 2007.
- DING, C.; CHIU, R.W.K.; LAU, T.K. **MS analysis of single nucleotide differences in circulating nucleic acids: Application to noninvasive prenatal diagnosis.** Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 101(29): 10762-7, 2004.
- DONABELA, F. C. **Sexagem Fetal a partir do plasma materno.** Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2008.
- DUKES, J.P.; KING, D.P.; ALEXANDERSEN, S. **Novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of foot-and-mouth disease virus.** Arch. Virol., 151(6): 1093-1106, 2006.
- HAGIWARA, M.; SASAKI, H.; MATSUO, K. **Loop-mediated isothermal amplification method for detection of human papillomavirus type 6, 11,**

- 16, and 18. J. Med. Virol., 79(5): 605-615, 2007.
- HONG, T.C.; MAI, Q.L.; CUONG, D.V. **Development and evaluation of a novel Loop mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of SARS Corona virus.** J. Clin. Microbiol., 42(5): 1956-1961, 2004.
- IHIRA, M.; AKIMOTO, S.; MIYAKE, F. **Direct detection of human herpesvirus 6 DNA in serum by the loop-mediated isothermal amplification method.** J. Clin. Virol., 39(1): 22-26, 2007.
- INNIS, M.A.; GELFAND, D.H. **Optimization of PCRs. In: protocols a guide to methods and application.** New York Academic Press, 3-12, 1990.
- JAKUBICZKA, S.; SCHNIEDERS, F.; SCHMIDTKE, J. **A bovine homologue of the human TSPY gene.** Genomics, 17:732-735, 1993.
- JOHNSON, K.L.; DUKES, K.A.; VIDAVER, J. **Interlaboratory comparison of fetal male DNA detection from common maternal plasma samples by real-time PCR.** Clinical Chemistry, p. 516-521, 2004.
- KITCHER, P. **The lives to come: the genetic revolution and human possibilities.** New York: A Touchstone Book, 1997.
- KLEPPE, K.; OHTSUKA, E.; KLEPPE, R. **Studies on polynucleotides. XCVI: repair replications of short synthetic DNAs as catalyzed by DNA polymerases.** J. Mol. Biol., 56(2): 341-61, 1971.
- LEMOS D.C. **Gene TSPY: sexagem e expressão gênica em bovinos.** Tese de doutorado Universidade de São Paulo, FMRP-USP, 2004.
- LEVI, J.E.; WENDEL, S. **Prenatal fetal gender determination by analysis of DNA from Maternal Plasma.** RBGO 25(9): 687-690, 2003.
- LO, Y.M.; PATEL, P.; WAINSCOAT, J.S. **Prenatal sex determination y DNA amplification from maternal perpheral blood.** Lancet., 2: 1363-5,1989.
- LO, Y.M. **Fetal RhD genotyping from maternal plasma.** Ann. Med., 31(5): 308-12,1999.
- LO, Y.M.; CORBETTA, N.; CHAMBERLAIN, P.F. **Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum.** Lancet., 350:485-7, 1997.

- LO, Y.M.; LAU, T.K.; ZHANG, J. **Increased fetal DNA concentrations in plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21.** Clin. Chem., 45:1747-51 1999.
- LO, Y.M.D. **Fetal DNA in maternal plasma: progress through epigenetics.** Annals of the New York Academies of Science 1075: 74-80, 2006.
- LO, Y.M.D.; CHIU, W.K. **Prenatal Diagnosis: progress through plasma nucleic acids.** Nature Reviews Genetics 8: 71-77, 2007.
- LUN, F.M.; CHIU, R.W.; ALLEN CHAN, K.C. **Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma.** Clinical Chemistry 54: 1664-1672, 2008.
- MANZ, E.; SCHNIEDERS, F.; MULLER-BRECHLIN, A. **TSPY-related sequences represent a microheterogeneous gene family organized as constitutional elements in DYZ5 tandem repeat units on the human Y-chromosome.** Genomics, 17:726-731, 1993.
- MISAWA, Y.; YOSHIDA, A.; SAITO, R. **Application of loop-mediated isothermal amplification technique to rapid and direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in blood cultures.** J. Infect. Chemother, 13:134-40, 2007.
- MORI, Y.; NOTOMI, T. **Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases.** J. Infect. Chemother, 15:62-69, 2009.
- MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S. **Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.** Quant. Biol. 51(Part 1): 263-73, 1986.
- NAGAMINE, K.; HASE, T.; NOTOMI, T. **Accelerated reaction by loop mediated isothermal amplification using loop primers.** Mol. Cell. Prob. 16, 223-229, 2002.
- NEW, M.I. **Up date of Congenital Adrenal Hyperplasia.** Ann. N. Y. Acad. Sci.; 1038: 14-43, 2004.
- NG, E.K.; TSUI, N.B.; LAU, T.K. **mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma.** Proceedings of the National Academics of Science USA 100: 4748-4753 ,2003.

- NOTOMI, T.; OKAYAMA, H.; MASUBUCHI, H. **Loop-mediated isothermal amplification of DNA**. Eiken Chemical Co. Ltd. 1381-3, 2000.
- OGILVIE, C.M.; DONAGHUE, C.; FOX, S.P. **Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy using quantitative fluorescence-PCR (QF-PCR)**. *J. Histochem. Cytochem.*, 53(3), 285-8, 2005.
- PARIDA, M.; SANNARANGAIAH, S.; DASH, K. **Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases**. *Rev. Med. Virol.*, 18: 407-421, 2008.
- PARIDA, M.M.; GUILLERMO, P.; INOUE, S. **Real-Time reverse transcription loop mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile Virus**. *J. Clin. Microbiol.*, 42(1): 257-263, 2004.
- PARIDA, M.M.; HORIOKE, K.; ISHIDA, H. **Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay**. *J. Clin. Microbiol.*, 43: 2895-2903, 2005.
- PIERCE, K.E.; RICE, J.E.; SANCHEZ, J.A. **Real-time PCR using molecular beacons for accurate detection of the Y chromosome in single human blastomeres**. *Mol. Hum. Reprod.*, 6 (12):1155- 64, 2000.
- POON, L.L.; LEUNG, T.N.; LAU, T.K. **Presence of fetal RNA in maternal plasma**. *Clin. Chem.* 46: 1832-1834, 2000.
- RAMOS, E.S. **Cell-Free fetal DNA in maternal plasma and noninvasive prenatal diagnosis**. *Revista Latino Americana de Enfermagem*, 14(6): 964-7, 2006.
- RATTI, A.; STUPPIA, L.; GATTA, V. **Characterization of a new TSPY gene family member in Yq (TSPYq1)**. *Cytogenet. Cell Genet.*, 88:159-162, 2000.
- REES, W.A. **Betaine can eliminate the base pair composition dependence of DNA melting**. *Biochemistry*, 32:137-144, 1993.
- RIJNDERS, R. **Fetal sex determination from material in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia**. *Obstetric. Gynecology*, 98(3): 374-8, 2001.
- RIJNDERS, R.J.; CHRISTIAENS, G.C.; BOSSERS, B. **Clinical applications of cell-free DNA from maternal plasma**. *Obstetric. Gynecol.*, 103 (1): 157-64, 2004.

- RYCHLIK, W.; SPENCER, W.J.; RHOADS, R.E. **Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro.** Nucl. Acids Res., 18: 6409-6412, 1990.
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F. **Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.** Science, 230(4732): 1350-4, 1985.
- SAITO, H.; SEKIZAWA, A.; MORIMOTO, T. **Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma.** Lancet, 356:1170, 2000.
- SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory. 458-459,1982.
- SCHEMPP, W.; BINKELE, A.; ARNEMANN, J. **Comparative mapping of YRRM and TSPY-related cosmids in man and hominoid apes.** Chromosome Res., 3(4):227-34, 1995.
- SCHNIEDERS, F.; DÖRK, T.; ARNEMANN, J. **Testis-specific protein Y-encoded (TSPY) expression in testicular tissues.** Hum. Mol. Genet., 5:1801-1807, 1996.
- SCOTT, R. **Prenatal screening, autonomy and reasons: the relationship between the law of abortion and wrongful birth.** *Medical Law Review* 11: 265-325, 2003.
- SEEDS, J.W. **Diagnostic mid trimester amniocentesis: how safe?** Am. J. Obstetric. Gynecol., 191(2): 607-615, 2004.
- SEZIKAWA, A.; KONDO, T.; IWASAKI, M. **Accuracy of fetal gender determination by analysis of DNA in maternal plasma.** Clin. Chem., 47:1856-8, 2001.
- SHARKEY, E.R.; SCALICE, K.G.; CHRISTY, J.R. **Antibodies as Thermolabile Switches: High Temperature Triggering for the Polymerase Chain Reaction.** Bio Technology, 12: 506-509,1994.
- STEELE, M.W.; BREG, W.R. **Chromosome analysis of human amniotic-fluid cells.** Lancet; 1 (7434); 383-5, 1966.
- STEWART, T.L. **Screening for aneuploidy: the genetic sonogram.** Obstetric Gynecol. Clin. North Am., 31(1):21-33, 2004.

- STIRLING, D. **Methods in Molecular Biology: PCR Protocols**, Second Edition Human Press Inc., 63, 2003.
- SUZUKI, R.; YOSHIKAWA, T.; IHIRA, M. **Development of the loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of cytomegalovirus DNA**. *J. Virol. Methods*, 132(1-2): 216-221, 2006.
- THAPAR, A.; HAROLD, G.; RICE, F. **Do intrauterine or genetic influences explain the fetal origins of chronic disease? A novel experimental method for disentangling effects**. *BMC Medical Research Methodology*, 7:25, 2007.
- TORINIWA, H.; KOMIYA, T. **Rapid detection and quantification of Japanese encephalitis virus by real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification**. *Microbiol. Immunol.*, 50(5): 379–387, 2006.
- USHIKUBO, H. **Principle of LAMP method - a simple and rapid gene amplification method**. *Virus*, 54(1): 107–112, 2004.
- VANGUILDER, H.; VRANA, K.; FREEMAN, W. **Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis**. *Biotechniques* 44 (5): 619–626. 2008.
- VIEIRA, D. **Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações**. Apostila do Laboratório de Biologia Molecular-IPEN: 1 -10 ,2005
- VOGEL, T. **Organization and expression of bovine TSPY**. *Mammal Genome*, 8:491-496, 1997.
- VOGEL, T.; SCHMIDTKE, J. **Structure and function of TSPY, the Y-chromosomal gene coding for the “testis-specific protein”**. *Cytogenet. Cell Genet.*, 80:209-213, 1998.
- VOGT, P.H. **Human Y chromosome deletions in Yq11 and male infertility**. *Adv. Med. Biol.*, 424:17-30, 1997.
- WAKABAYASHI, T.; YAMASHITA, R.; KAKITA, T. **Rapid and sensitive diagnosis of adenoviral keratoconjunctivitis by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method**. *Curr. Eye Res.*, 28(6): 445-450, 2004.
- WRIGHT, C.F. **Cell-free fetal nucleic acids for non-invasive prenatal**

**diagnosis.** *Human Reproduction Update 2009.*

YOSHIKAWA, T.; IHIRA, M.; AKIMOTO, S. **Detection of human herpesvirus 7 DNA by loop-mediated isothermal amplification.** *J. Clin. Microbiol.*, 42(3): 1348-1352, 2004.

ZHONG, X.Y.; HOLZGREVE, W.; HAHN, S. **Detection of fetal Rhesus D and sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex polymerase chain reaction.** *BJOG.*, 107:766-9, 2000.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>) acessado dia 04 de maio de 2010.

(<http://primerexplorer.jp/e/>) acessado dia 03 de maio de 2010.

(<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/anim.html> ) acessado dia 04 de maio de 2010.

(<http://www.nupad.medicina.ufmg.br/seminario/hcsr.htm>) acessado dia 15 de março de 2010.

## Anexo I



**UFSCar – Universidade Federal de São Carlos**

**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Prof. Dr.  
Euclides Matheucci Junior**

Rod. Washington Luís, km 235 – CEP: 13565-905

Tel. (16) 3306-9787

E-mail: [euclimj@power.ufscar.br](mailto:euclimj@power.ufscar.br)



### Formulário de Coleta:

Nome da paciente: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_ CPF: \_\_\_\_\_

Data da última menstruação e/ou idade gestacional (semanas de gravidez) \_\_\_\_\_

Rh(positivo ou negativo): \_\_\_\_\_

Realizou alguma transfusão de sangue nos últimos três meses: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Assinatura da Paciente

Responsável pela coleta: Adriana Medaglia CRBM n°3390

Data da coleta \_\_\_\_\_

Obs:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## Anexo II

### UFSCar – Universidade Federal de São Carlos



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Prof. Dr.  
**Euclides Matheucci Junior**

Rod. Washington Luís, km 235 – CEP: 13565-905

Tel. (16) 3306-9787

E-mail: [euclimj@power.ufscar.br](mailto:euclimj@power.ufscar.br)



---

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**NOME DO PROJETO:** Determinação Pré-Natal do sexo fetal por meio da análise de DNA no plasma materno através da técnica de *LAMP*

**RESPONSÁVEIS:** Prof. Dr. Euclides Matheucci Jr.

Bruno Garcia Rocha

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que será desenvolvida pelo aluno de mestrado Bruno Garcia Rocha que está no programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSCar. Este trabalho está sendo feito em parceria com o Laboratório DNA Consult Genética e Biotecnologia que dará todo o apoio necessário para a sua realização.

**ESCLARECIMENTO:** O diagnóstico pré-natal é muito importante para o seguimento da gravidez. Algumas doenças podem ser tratadas com o bebê dentro do útero da mãe e outras logo após o nascimento.

A sexagem fetal é uma nova técnica para determinação do sexo do bebê, realizada com uma amostra de sangue da mãe. Durante a gestação existe a passagem de uma pequena quantidade de células fetais para o sangue materno. O exame dessas células revelaria as condições fetais por um procedimento não invasivo e sem risco.

Este teste se baseia na identificação de partes do cromossomo Y na circulação materna. Como indivíduos do sexo masculino possuem esse cromossomo dentro das suas células, sua presença indica um menino e sua ausência indica uma menina.

Nesta pesquisa que você está sendo convidada, através dos resultados de alguns exames que não afetam a sua saúde e de seu bebê, podemos conhecer o sexo de seu filho ou filha.

O estudo não trará nenhuma despesa para você. Você pode nos auxiliar neste trabalho através de um pouco de sangue (colhido como qualquer exame de rotina). Todo esse

material será utilizado apenas para identificação do sexo do bebê e não será utilizado para outros fins, que não esta pesquisa, sem um novo consentimento.

**OUTRAS INFORMAÇÕES:**

1 – Você tem a garantia de receber qualquer informação adicional ou esclarecimentos que julgar necessários, a qualquer tempo do estudo;

2 – A sua recusa em participar do estudo não lhe trará qualquer prejuízo no tratamento;

3 – Você estará livre para deixar o estudo a qualquer momento, mesmo que você tenha consentido em participar do mesmo inicialmente.

4 – As informações obtidas pelo estudo serão estritamente confidenciais, estando garantidos o seu anonimato e privacidade na apresentação e/ou divulgação dos resultados.

5 – Não haverá compensações financeiras, nem qualquer tipo de custo adicional para você, sendo sua participação neste estudo absolutamente livre e voluntária.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFSCar que funciona na Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de São Carlos, localizada na Rodovia Washington Luiz, Km. 235 - Caixa Postal 676 - CEP 13.565-905 - São Carlos - SP – Brasil. Fone (16) 3351-8110. Endereço eletrônico: [cephumanos@power.ufscar.br](mailto:cephumanos@power.ufscar.br)

Eu \_\_\_\_\_ portador do RG: \_\_\_\_\_, concordo com o presente termo de consentimento e com informações que me foram apresentadas e que, livremente manifesto a minha vontade em participar do projeto de pesquisa **“Determinação Pré-Natal do sexo fetal por meio da análise de DNA no plasma materno através da técnica de LAMP”**.

São Carlos, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

\_\_\_\_\_  
Assinatura da paciente

## **Anexo III**

### **Soluções utilizadas no trabalho:**

Essas soluções foram preparadas com água deionizada esterilizada e, quando necessário, foram esterilizadas por autoclavagem (à 121°C por 20 minutos ) conforme descrito em Sambrook et al., 1982.

#### **Solução Tampão Tris-HCl 1M pH 8.0.**

Tris-base (USB®).....12,11g  
Água deionizada.....100mL

Tris-base foi dissolvido em 80mL de água deionizada. O pH desejado foi ajustado com solução de HCl e o volume completado para 100mL com água deionizada. A solução foi esterilizada por autoclavagem e estocada a temperatura ambiente.

#### **Solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,5M pH 8.0.**

EDTA (Merck®).....18,61g  
Água deionizada.....100mL

O EDTA foi dissolvido em 80mL de água deionizada. O pH da solução foi ajustado para 8,0 com solução de NaOH e o volume completado para 100mL com água deionizada. A solução foi esterilizada por autoclavagem e estocada a temperatura ambiente.

#### **Solução Tampão TE pH 8.0. (10mM Tris-HCl e 1mM EDTA).**

1M Tris-HCL pH 8.0 .....1mL  
0,5M EDTA pH 8.0.....0,2mL  
Água deionizada.....100mL

A solução foi esterilizada por autoclavagem e estocada a temperatura ambiente.

#### **Solução de Dodecil Sulfato de Sódio (10%).**

SDS (Sigma®).....10g  
Água deionizada q.s.p. ....100mL

O SDS foi dissolvido em 50 mL de água deionizada aquecida a 60°C , sob agitação e o volume completado para 100mL. A solução foi estocada à temperatura ambiente.

### **Solução de Etanol a 70% (100mL).**

Etanol P.A. (Merck®).....	70mL
Água deionizada.....	30mL

A mistura foi homogeneizada e estocada a 4° C.

### **Solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) 10N.**

NaOH (Merck®).....	4g
Água deionizada q.s.p. ....	1000mL

As pastilhas de NaOH foram dissolvidas em 800mL de água e o volume completado para 1000mL. A solução foi autoclavada a 121°C por 20 minutos e estocada a temperatura ambiente.

### **Solução de Acetato de Amônia 7,5 M.**

Acetato de Amônia ( JT Baker®).....	57,81g
Água deionizada q.s.p. ....	100mL

O Acetato de amônia foi dissolvido em 70mL de água deionizada e após dissolução o volume foi completado para 100mL com água deionizada. A solução foi esterilizada por autoclavagem e estocada a temperatura ambiente.

### **Diluição da enzima Proteinase K 20mg/mL.**

Proteinase K ( Invitrogen ®) .....	20mg/mL
Água deionizada.....	1000mL

A enzima foi diluída em água deionizada e estocada a 4°C.

### **Solução de Loading Buffer 6X.**

Azul de Bromofenol (USB®) .....	25mg
Xileno Cianol (USB®) .....	25mg
Glicerol (Merck®).....	3mL
Água deionizada q.s.p.....	10mL

O azul de Bromofenol , xileno cianol e o glicerol foram diluídos em água deionizada e o volume foi completado para 10mL. A solução foi estocada a 4° C.

### **Solução de Cloreto de Sódio (NaCl) 5M.**

NaCl ( JT Baker®) .....146,1g  
Água deionizada q.s.p.....500mL

O NaCl foi dissolvido em 350mL de água e o volume foi completado para 500mL. A solução foi autoclavada a 121°C por 20 minutos e foi estocada a temperatura ambiente.

### **Solução de tampão de corrida TAE 50X.**

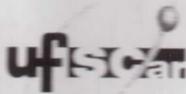
Tris-Base (USB®).....242g  
Ácido Acético Glacial (JT Baker ®).....57,1mL  
EDTA (Merck ®).....18,6 g  
Água deionizada q.s.p.....1000mL

Foi adicionado o Tris-Base, Ácido Acético Glacial e EDTA em 900mL de água deionizada. Homogeneizou-se a mistura e o volume foi completado para 1000mL. A solução foi estocada a temperatura ambiente.

### **Solução de tampão de corrida TAE 1X.**

TAE 50X .....20mL  
Água deionizada q.s.p.....1000mL

A mistura foi homogeneizada e estocada a temperatura ambiente.



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS  
Via Washington Luiz, Km. 235 - Caixa Postal 676  
CEP 13.565-905 - São Carlos - SP - Brasil  
Fones: (016) 3351-8028 Fax (016) 3351-8025 Telex 162369 - SCUUF - BR  
[cephumanos@power.ufscar.br](mailto:cephumanos@power.ufscar.br) <http://www.propq.ufscar.br>

### Parecer Nº. 323/2010

CAAE: 0045.0.135.000-10

**Título do projeto:** Determinação Pré-Natal do sexo fetal por meio da análise de DNA no plasma materno através da técnica de LAMP

**Pesquisadores (as):** BRUNO GARCIA ROCHA

#### Parecer

As pendências apontadas no Parecer nº. 199/2010 foram satisfatoriamente resolvidas. **Projeto aprovado.** Atende as exigências contidas na Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde.

#### Normas a serem seguidas

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
  - O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
  - O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
  - Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e).
  - Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente dentro de 1 (um) ano a partir desta data e ao término do estudo.
- São Carlos, 29 de setembro de 2010.

  
Prof. Dr. Daniel Vendruscolo  
Coordenador do CEP/UFSCar