



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

(11) (21) **PI 0602793-8 A**

(22) Data de Depósito: 11/07/2006
(43) Data de Publicação: **26/02/2008**
(RPI 1938)



(51) *Int. Cl.*.:
C12Q 1/68 (2008.01)

(54) Título: **PROCESSO IN VITRO PARA
DIAGNÓSTICO CARIOTÍPICO E KIT PARA
DIAGNÓSTICO CARIOTÍPICO IN VITRO**

(71) Depositante(s): Universidade Federal do Rio Grande do Sul
(BR/RS)

(72) Inventor(es): José Cláudio Fonseca Moreira, Antônio Alves
Castro, Maria Cunha de Almeida, Gunnar Hugo Onsten

(57) Resumo: Processo in vitro para Diagnóstico Cariotípico e Kit para Diagnóstico Cariotípico in vitro. A presente invenção é relacionada a um kit e a um processo in vitro para estimar a diversidade cariotípica de um eucarioto, ou de um grupo de eucariotos, através da análise de células e/ou tecidos dos mesmos. O processo e o kit da presente invenção são particularmente úteis para avaliação diagnóstica e prognóstica de pacientes com neoplasias sólidas, incluindo carcinomas e adenocarcinomas, tumores mesenquimais e tumores do sistema nervoso central, bem como neoplasias hematológicas, entre outras. O processo da invenção também proporciona a avaliação indireta da instabilidade genômica.

RELATÓRIO DESCRITIVO

Processo *in vitro* para Diagnóstico Cariotípico e Kit para Diagnóstico Cariotípico *in vitro*

5 Campo da invenção

A presente invenção é relacionada a um kit e a um processo *in vitro* para estimar a diversidade cariotípica de um eucarioto, ou de um grupo de eucariotos, através da análise de células e/ou tecidos dos mesmos. Mais especificamente, a presente invenção descreve um processo *in vitro* para
10 avaliar o número e a morfologia dos cromossomos presentes em cada célula da amostra, proporcionando: a construção do cariótipo de cada célula; o agrupamento dos cariótipos com igual número de aberrações cromossomais; a obtenção da proporção de cada grupamento de cariótipos em relação ao número total de células analisadas; a classificação de parâmetros de cariótipos
15 de acordo com suas diversidades cariotípicas; a obtenção de índices de diversidade intraneoplásica e interneoplásicas, no caso do uso no diagnóstico cariotípico de humanos. O processo e o kit da presente invenção são particularmente úteis para avaliação diagnóstica e prognóstica de pacientes com neoplasias sólidas, incluindo carcinomas e adenocarcinomas, tumores
20 mesenquimais e tumores do sistema nervoso central, bem como neoplasias hematológicas, entre outras. O processo da invenção também proporciona a avaliação indireta da instabilidade genômica.

Antecedentes da invenção

25 A morfologia e o número de cromossomos de uma célula são representados pelo seu cariótipo, o qual pode ser construído por diferentes métodos de citogenética. Estes métodos são rotineiramente empregados em humanos para o diagnóstico e prognóstico de neoplasias hematológicas como, por exemplo, leucemias e linfomas, sendo de extrema importância para o
30 tratamento dos pacientes. Estes métodos também podem ser empregados em desordens cromossômicas, tais como Síndrome de Down, porém são muito

pouco utilizados em neoplasias sólidas: tumores epiteliais malignos causam cerca de 80% das mortes humanas por câncer, porém constituem apenas 10% das neoplasias cariotipadas. Esta desproporção decorre de um grande número de problemas analíticos, sendo o principal deles a elevada heterogeneidade dos tumores sólidos, com aberrações cromossômicas muito complexas e de difícil caracterização. Em geral, o grau de desordem dos cromossomos é tão severo que impossibilita a identificação de aberrações recorrentes, as quais poderiam ter algum valor diagnóstico. Apenas a constatação de um cariótipo com muitas aberrações tem significado prático, pois indica, em geral, um mau prognóstico. Porém, esta informação tem baixa sensibilidade e especificidade, resultando na subutilização da cariotipagem.

A literatura Patentária encontrada contempla alguns documentos relacionados ao assunto, porém sem antecipar ou sugerir os objetos da presente invenção.

O pedido internacional de patente WO 98/13525 de titularidade de Applied Spectral Imaging Ltd e intitulado "Method For Chromosome Classification By Decorrelation Statistical Analysis and Hardware Therefore", descreve uma técnica de cariotipagem espectral com propósitos diagnósticos para detectar aberrações cromossômicas em diferentes tipos celulares, tais como células fetais, câncer etc., sendo mais sensível que as técnicas convencionais de bandeamento. O método descrito nesse documento realiza classificação *in situ* de cromossomos corados com diferentes fluoróforos, interpretando os resultados por meios estatísticos e matemáticos para posterior classificação dos cromossomos e obtenção do cariótipo. O foco principal do documento é a descrição de uma metodologia para obtenção do cariótipo, de forma mais sensível. Entretanto, o método descrito não proporciona a interpretação do nível de complexidade do cariótipo obtido, ou seja, não descreve o grau de diversidade cariotípica.

O pedido internacional de patente WO 04/046370, de titularidade de ANPA Research Institute e intitulado "Method and apparatus for inserting a bundle of newspaper inserts into a hopper", descreve a obtenção do cariótipo

de modo sistemático e quantitativo a partir da análise do DNA genômico de células eucarióticas empregando técnicas biologia molecular. O documento descreve a estimativa da frequência de certas partes ou segmentos dos cromossomos, o que permite detectar alguns tipos de alterações cromossomais (principalmente deleções e ampliações). É descrito o cariótipo de modo sistemático, sem interpretar o grau de diversidade.

A patente europeia EP 1533618, de titularidade de Ludwig-Maximilians-Universität München e intitulada "Method for distinguishing prognostically definable AM", descreve um método para distinguir subtipos de leucemias mielóides agudas (LMA) que apresentam cariótipos normais. É descrito e reivindicado o uso de um painel de marcadores de expressão gênica que, uma vez detectados de acordo com o método, permitem diferenciar subgrupos de LMAs com valor prognóstico. Portanto, não é descrito o uso de cariotipagem, não há interpretação das LMAs, os quais são declarados normais para os subtipos definidos.

O pedido internacional de patente WO 02/054074, de titularidade de Erasmus Universiteit Rotterdam e intitulado "Recognition of Tumor-Specific Gene Products in Cancer", descreve um método de citometria de fluxo para detecção de aberrações cromossomais associadas a produtos gênicos específicos, tais como proteínas de fusão encontradas em translocações cromossomais que podem causar leucemias ou outras neoplasias como, por exemplo, cromossomo Philadelphia. O documento propõe identificar aberrações cromossomais com valor diagnóstico e não se propõe a descrever o conjunto de todas as aberrações (ou da maior parte) necessário para obtenção de um cariótipo. Portanto, o método desse documento não proporciona a estimativa da diversidade das aberrações cromossomais, diferentemente do método proposto na presente invenção.

A Patente norte-americana US 5,567,593, intitulada "Cytodiagnostic method using alstonine as a selective marker, and diagnostic kit containing marker", descreve o uso de um alcalóide (alstonina) que exhibe a propriedade de se associar com o DNA de células tumorais, além de apresentar

propriedades fluorescentes (atua como um corante diferencial). Destas propriedades, resulta a possibilidade de obtenção do cariótipo da célula tumoral de forma específica, diferenciando das demais células normais que por ventura possam estar presentes numa amostra de tecido. Portanto, este documento

5 descreve um método de cariotipagem aplicado a células tumorais e não se propõe estimar a diversidade das aberrações cromossomais que possam estar presentes no cariótipo.

Nenhum dos documentos encontrados na literatura patentária relacionada à presente invenção antecipam ou sugerem os objetos da presente

10 invenção, pois não fornecem uma estimativa do grau de desordem dos cariótipos, ou seja, o estado da técnica atual não proporciona meios para quantificar a desorganização dos cromossomos. A presente invenção, por outro lado, proporciona a quantificação do grau de aberração cromossomal, fornecendo estimativas de diversidade cariográfica. O processo descrito na

15 presente invenção apresenta diversas vantagens em relação aos processos *in vitro* já existentes, pois além de proporcionar a interpretação dos resultados de exames citogenéticos de uma forma inovadora, quantifica o grau de desordem, criando uma escala de diversidade que outras tecnologias até o momento não conseguiram realizar.

20

Sumário da Invenção

É um objeto da presente invenção descrever um processo *in vitro* para estimar a diversidade cariográfica de um eucarioto, ou de um grupo de eucariotos, através da análise de células e/ou tecidos dos mesmos.

25 Um objeto adicional da presente invenção é descrever um processo *in vitro* para avaliar o número e a morfologia dos cromossomos presentes em cada célula da amostra.

Um outro objeto da invenção é um processo para construir o cariótipo de cada célula, agrupando os cariótipos com igual número de aberrações

30 cromossomais.

Ainda outro objeto da presente invenção é um processo para obter a proporção de cada grupamento de cariótipos em relação ao número total de células analisadas

5 Um objeto adicional da presente invenção é proporcionar um processo para classificar parâmetros de cariótipos de acordo com suas diversidades cariotípicas.

Outro objeto da presente invenção é descrever um processo para obter o índice de diversidade intraneoplásica.

10 É também um objeto da presente invenção proporcionar um kit para diagnóstico cariotípico *in vitro* de um eucarioto, ou de um grupo de eucariotos, através da análise de células e/ou tecidos dos mesmos.

Estes e outros objetos da presente invenção ficarão mais evidentes a partir da descrição detalhada da invenção e das reivindicações anexas.

15 **Breve descrição das figuras**

As figuras descritas a seguir integram a presente invenção e estão incluídas para melhor demonstrar certos aspectos de concretizações preferenciais do processo *in vitro* para diagnóstico cariotípico da invenção.

20 A figura 1 mostra os índices de diversidade cariotípica que caracterizam um conjunto de amostras biológicas (neste caso, biópsias humanas).

A figura 2 mostra os índices de diversidade intracariotípica (*H_i*) obtidos para cada um dos cinco tipos de cariótipos.

A figura 3 mostra os índices de diversidade intraneoplásica (*H_{alfa1}*) obtidos para cada um dos cinco tipos de biópsias humanas.

25

Descrição detalhada da invenção

O relato a seguir descreve um kit e um processo *in vitro* para estimar a diversidade cariotípica de um eucarioto, ou de um grupo de eucariotos, através da análise de células e/ou tecidos dos mesmos. Embora a invenção possa ser aplicada a qualquer eucarioto contendo organização genômica e/ou cromossomal detectável, será feita referência à concretização preferencial de

30

uso na análise de cariótipos humanos. Os versados na arte saberão prontamente, a partir da presente descrição, que os objetos da presente invenção podem ser aplicados a outros eucariotos. Conseqüentemente, a descrição a seguir tem o intento de exemplificar, mas não de limitar, as aplicações da presente invenção.

O processo *in vitro* para diagnóstico cariotípico da presente invenção compreende os passos de:

- a) obter o cariótipo de uma ou mais amostras de células e/ou tecidos de pelo menos um eucariota;
- 10 b) analisar a morfologia dos cromossomos presentes em cada célula da amostra;
- c) agrupar os cariótipos com igual número de aberrações cromossomais;
- e) obter a proporção de cada agrupamento de cariótipos em relação ao total de células analisadas; e
- 15 f) obter um índice de diversidade através da contagem de aberrações cromossomais.

A etapa de obter o cariótipo de uma ou mais amostras de células e/ou tecidos de pelo menos um eucariota é conhecida dos versados na arte. Tal etapa em geral faz uso de marcador(es) colorimétrico(s) conhecidos dos versados na arte. Exemplos incluem aqueles descritos nos documentos citados aqui como antecedentes da invenção, sendo, portanto, incorporados à mesma por referência. Tais marcadores fornecem a cor espectral dos cariótipos e possibilitam a detecção de aberrações cromossômicas. Na presente descrição todas as amostras biológicas podem ser preparadas utilizando-se uma solução aquosa saturada de um reagente específico (*i.e.* *Giemsa* ou *Wright* - solução de eosina - azul de metileno) e um suporte para incubação da amostra do tecido neoplásico para, posteriormente, visualizar a metáfase em microscopia óptica e então compor o cariótipo.

O kit para diagnóstico cariotípico *in vitro* da presente invenção compreende:

a) meios para a obtenção do cariótipo de uma ou mais amostras de células e/ou tecidos de pelo menos um eucariota;

b) meios para proporcionar a análise da morfologia dos cromossomos presentes em cada célula da amostra;

5 c) meios para proporcionar o agrupamento dos cariótipos com igual número de aberrações cromossomais;

d) meios para proporcionar a obtenção da proporção de cada agrupamento de cariótipos em relação ao total de células analisadas; e

10 e) meios para proporcionar a obtenção de um índice de diversidade cromossomal.

Os meios para a obtenção do cariótipo do kit da presente invenção podem ser obtidos por um grande número de variações metodológicas. A título exemplificativo, são citados aqui dois métodos preferenciais, que incluem reativos de técnicas de citogenética clássica (*i.e.* bandeamento G), e/ou reativo/técnicas de citogenética molecular (*i.e.* hibridização *in situ*). A técnica de bandeamento G consiste basicamente dos seguintes passos: (i) Bloqueio da divisão celular no estágio de metáfase adicionando-se ao material uma solução diluída de *colchicina* ou um agente similar (*colcemida*); (ii) Dispersão dos cromossomos adicionando-se ao material uma *solução hipotônica* (KCL) para inchar o núcleo da célula e facilitar o espalhamento; (iii) Fixação das células adicionando-se uma solução de *metanol* e *ácido acético* (3:1); (iv) Aquecimento das lâminas por 6 horas a 45° C; (v) Tratamento das células com uma solução de *tripsina* (vi) Bandeamento dos cromossomos com o corante *Giemsa* ou *Wright* (solução de *eosina - azul de metileno*); e (vii) Após a coloração, os cromossomos podem ser visualizados ao microscópio e/ou fotografados para posterior interpretação e construção do cariótipo.

As demais etapas do processo da invenção, a partir da etapa b) indicada acima, bem como os demais meios do kit da presente invenção, a partir de seu item b) descrito acima, serão descritas em referência a uma ou mais de suas configurações preferenciais, na(s) qual(is) o processo e o kit da presente invenção permitem quantificar o grau de desordem dos componentes de

células neoplásicas. O processo descrito nessa concretização preferencial fornece cinco índices de diversidade, os quais se aplicam a diversas situações, desde a caracterização mais fundamental, que se refere ao fornecimento do grau de desordem de uma única neoplasia até estudos epidemiológicos, onde se fornece o grau de desordem de muitas neoplasias de um mesmo tipo. Uma vez obtidos os índices de diversidade, pode-se classificar tanto neoplasias pouco alteradas do ponto de vista citogenético até as mais aberrantes, numa escala que varia de zero a um.

A materialização do processo da invenção pelos inventores foi conduzida de diferentes formas, sendo aqui descritas algumas. Numa concretização, o processo da presente invenção foi aplicado a um painel de noventa e um tipos de tumores sólidos, sendo demonstrada existência de correlação entre os índices que compõem a escala de diversidade da presente invenção e a sobrevivência em cinco anos de pacientes com tumores sólidos. Primeiramente foi quantificada a proporção de clones, incluindo sub- clones e variantes celulares, as quais são presentes em uma amostra de tecido, em biópsia, por exemplo. Para isso, toma-se o número necessário de células, obtendo-se o cariótipo de cada célula por técnicas de citogenética clássica ou molecular (*i.e.* etapa b descrita acima). Os diferentes cariótipos são então agrupados conforme o número de aberrações cromossomais que possuem (*e.g.* aberrações numéricas ou aberrações estruturais). A forma de composição deste agrupamento de cariótipos pode gerar cinco parâmetros de diversidade cariotípica, que podem ser classificados em diversidade intraneoplásica; diversidade interneoplásica; diversidade intercariotípica; diversidade intracariotípica; e por fim a diversidade global de cariótipos.

Cada um destes parâmetros tem uma finalidade distinta na avaliação da diversidade dos cromossomos, os quais podem ser utilizados para dois tipos de análise que são divididas em: análise de uma única amostra individualmente, tal como uma biópsia ou um conjunto de diferentes amostras que podem ser biópsias de um grupo de pacientes com um dado tipo de neoplasia, de acordo com os exemplos abaixo:

Exemplo 1: Protocolo para estimar a diversidade cariotípica em um único paciente, através da realização de uma única biópsia:

A partir de uma biópsia de tecido neoplásico, por exemplo, uma amostra de tumor ou neoplasia maligna, descreve-se *in vitro* o número e a morfologia dos cromossomos presentes em cada célula da amostra. O número total de células a ser analisada é dependente do grau de confiabilidade desejado. Em seguida é necessário construir o cariótipo de cada célula e, após isto, cariótipos com igual número de aberrações são, então, agrupados. Deve-se considerar separadamente aberrações numéricas e aberrações estruturais para análise. Feito isso, obtém-se a proporção $p(i)$ de cada agrupamento de cariótipos em relação ao número total de células analisadas. A análise do índice de diversidade pode ser conduzida de diferentes formas, sendo aqui apresentada uma forma simples e prática. Embora o tratamento dos dados mostrado a seguir simplifique a condução da presente invenção, tal tratamento não constitui, em si, nenhum dos objetos da invenção. Uma das melhores maneiras de se obter o índice de diversidade intraneoplásica H_{α_1} é pela soma de $-p(i)\ln p(i)$, através da fórmula descrita a seguir:

$$H_{\alpha_1} = -\frac{1}{\ln(M)} \sum_i p(i) \ln p(i)$$

onde M representa o número de possibilidades na contagem de aberrações, sendo que o valor M pode ser estimado tanto para um dado tipo neoplasia como para o conjunto de todas as neoplasias humanas (neste caso, $M \cong 181$ para aberrações numéricas e $M \cong 81$ para aberrações estruturais). A divisão pelo fator $\ln(M)$ normaliza o índice H_{α_1} e, desta forma, o índice de diversidade intraneoplásica pode variar de 0 (zero) a 1,0 (um).

Exemplo 2: Protocolo para estimar a diversidade cariotípica em grupos de pacientes com o mesmo tipo de neoplasia:

A análise é realizada a partir de uma amostra de cariótipos de n biópsias de um dado tipo de neoplasia, tais como neoplasias sólidas ou hematológicas, onde cada biópsia α da amostra ($\alpha = 1, \dots, n$) tem K_α diferentes cariótipos, entre M possíveis cariótipos. Os cariótipos são caracterizados pelo tipo de alterações que possuem (aberrações numéricas e aberrações estruturais). Considere, por ora, i como indicando o número de cromossomos, o qual pode variar de i_0 a i_f , por exemplo. Nesse caso, o número de possíveis cariótipos será $M = i_f - i_0 + 1$. Assim, para cada biópsia α , define-se $s(i, \alpha)$ como sendo o número de cariótipos com i cromossomos. K_α é dado por:

$$K_\alpha = \sum_{i=i_0}^{i=i_f} s(i, \alpha)$$

Em seguida, obtêm-se outras quantidades a partir dos valores de $s(i, \alpha)$ para toda amostra. Começar pelo número L_i de cariótipos do tipo i para toda amostra de n biópsias

$$L_i = \sum_{\alpha=1}^n s(i, \alpha)$$

Agora, obtêm-se a partir de K_α ou L_i o número total de N cariótipos:

$$N = \sum_{\alpha=1}^n K_\alpha = \sum_{i=i_0}^{i=i_f} L_i$$

Em seguida, a partir das equações citadas anteriormente, definiu-se as diferentes funções normalizadas de probabilidade que seguem. Inicia-se, pela mais geral de todas, $z(i, \alpha)$, ou seja a probabilidade de escolher aleatoriamente, entre todos os N cariótipos, um que é do tipo i e pertence à biópsia α e a expressão é definida como segue:

$$z(i, \alpha) = \frac{s(i, \alpha)}{N}$$

Definiu-se também para cada biópsia α a probabilidade $p(i, \alpha)$ de escolher aleatoriamente um cariótipo do tipo i , a qual foi calculada pela seguinte expressão:

$$p(i, \alpha) = \frac{s(i, \alpha)}{K_\alpha}$$

- 5 e, para cada tipo i de cariótipo, definiu-se a probabilidade $\eta(i, \alpha)$ de escolher aleatoriamente um cariótipo que pertence à biópsia α ,

$$\eta(i, \alpha) = \frac{s(i, \alpha)}{L_i}$$

Finalmente, definiu-se P_α como a probabilidade de escolher aleatoriamente, entre todos os N cariótipos, um que pertence à biópsia α :

10
$$P_\alpha = \frac{K_\alpha}{N}$$

e, analogamente, definiu-se a probabilidade Q_i de escolher aleatoriamente, entre todos os N cariótipos, um que seja do tipo i :

$$Q_i = \frac{L_i}{N}$$

- 15 Todas as funções de probabilidade acima são então normalizadas. As condições de normalização são escritas como:

$$\sum_i \sum_\alpha z(i, \alpha) = 1; \sum_i p(i, \alpha) = 1; \sum_\alpha \eta(i, \alpha) = 1; \sum_\alpha P_\alpha = 1 \text{ e } \sum_i Q_i = 1$$

- 20 Associa-se, para cada uma das funções de probabilidade descritas acima, uma função de informação, como segue:

$$H_{global} = -\frac{1}{\ln(Mn)} \sum_i \sum_\alpha z(i, \alpha) \ln z(i, \alpha)$$

$$H_\alpha = -\frac{1}{\ln(Mn)} \sum_i p(i, \alpha) \ln p(i, \alpha)$$

$$H_i = -\frac{1}{\ln(Mn)} \sum_\alpha \eta(i, \alpha) \ln \eta(i, \alpha)$$

$$H^* = -\frac{1}{\ln(Mn)} \sum_{\alpha} P_{\alpha} \ln P_{\alpha}$$

$$H' = -\frac{1}{\ln(Mn)} \sum_i Q_i \ln Q_i$$

onde dividiu-se todos os termos pelo fator $\ln(Mn)$ com objetivo de normalizar
 5 todas as quantidades. Dessa forma, todo H irá variar entre 0 (zero) e 1,0 (um).
 O valor obtido para cada um das funções acima revela um aspecto da
 diversidade cariotípica.

Para a interpretação dos índices de diversidade cariotípica, utilizou-se a função H_{global} , a qual reflete o espalhamento da distribuição $z(i,\alpha)$, ou seja,
 10 a diversidade global de cariótipos, enquanto que H_{α} representa o espalhamento
 existente no interior de uma dada biópsia., ou seja, mede a diversidade
 cariotípica que existe em uma amostra de tecido, denominada diversidade
 intraneoplásica. (quando $n=1$, o valor de H_{α} será igual à H_{α_1}). Analogamente,
 H_i é o espalhamento associado a um dado tipo i de cariótipo, denominado
 15 diversidade intracariotípica. A diversidade interneoplásica (H^*) fornece uma
 medida do espalhamento devido a diferenças no número de cariótipos entre
 biópsias. Finalmente, H' está relacionado ao espalhamento entre i tipos de
 cariótipos, que é denominada diversidade intercariotípica. A relação entre estas
 cinco funções de informação é dada por:

20

$$H_{\text{global}} = H^* + \sum_{\alpha} P_{\alpha} H_{\alpha} = H^* + H_i$$

A expressão acima relata o fato de H_{global} poder ser obtido como a soma
 25 de $H_i \equiv \sum_{\alpha} P_{\alpha} H_{\alpha}$ (média da diversidade intraneoplásica) e H^* , indicando uma
 possível diferença entre no número de cariótipos entre biópsias.

Por outro lado, a equação descrita abaixo fornece H_{global} pela soma de $H_k = \sum_i Q_i H_i$ (média da diversidade intracariotípica) e H' , indicando uma possível diferença entre os M tipos de cariótipos.

$$H_{global} = H' + \sum_i Q_i H_i = H' + H_k$$

Para a exemplificação dos ensaios laboratoriais, considere cinco biópsias de cinco diferentes neoplasias ($n=5,0$), com cinco possíveis cariótipos ($M=5,0$). Para uma dada biópsia α , $s(i,\alpha)$ representa o número de células com i cromossomos; K_α representa o número de células cariotipadas em cada biópsia. Para todas elas, $K_\alpha = 10,0$ e L_i representa o número de cariótipos do tipo i descritos entre todas as alfa-biópsias. Os resultados estão agrupados na tabela 1 demonstrada a seguir:

15 **Tabela 1:** Ilustração de tabulação amostral

biópsia α	<i>i cromossomos</i>					$K_\alpha = \sum s(i,\alpha)$
	47	48	49	50	51	
a	10	0	0	0	0	10
b	5	5	0	0	0	10
c	4	3	3	0	0	10
d	3	3	2	2	0	10
e	2	2	2	2	2	10
$L_i = \sum s(i,\alpha)$	24	13	7	4	2	$N = 50$

Os dados da tabela acima indicam que as diferentes distribuições de cariótipos podem ser consideradas tanto para aberrações numéricas, quanto para aberrações estruturais.

Os diferentes índices de diversidade obtidos a partir desta amostragem estão apresentados nas Figuras 1, 2 e 3. A figura 1 mostra os índices de diversidade cariotípica que caracterizam um conjunto de biópsias. A análise

dos resultados da Figura 3 indica que a biópsia α_a apresenta o menor índice de diversidade intraneoplásica ($H_{\alpha 1} = \text{zero}$), uma vez que possui um único tipo de cariótipo, ao passo que a biópsia α_5 apresenta o maior índice de diversidade ($H_{\alpha 1} = 1.0$), com cinco tipos de cariótipos representados em proporções iguais.

5 Os demais índices de diversidade caracterizam a amostra como um todo e seus significados estão também associados à caracterização da diversidade no conjunto amostral. O índice diversidade intracariotípica (H_i), pode ser observado na figura 2 e mostra que cariótipos com 47 cromossomos ($i=47$) estão mais distribuídos entre as biópsias, indicando maior recorrência
 10 desta aberração numérica. Em relação à diversidade global (H_{global}), quanto maior a distribuição do número total de cariótipos na tabulação dos dados maior será o índice de diversidade H_{global} . Da mesma forma, quanto mais distribuídos estiverem os cariótipos entre as M possibilidades, maior será a diversidade intercariotípica (H') e quanto mais distribuído o número total de
 15 cariótipos entre as biópsias, maior será a diversidade interneoplásica (H^*). Já em relação à média da diversidade intraneoplásica (H_t) e a média da diversidade intracariotípica (H_k), estas são utilizadas para identificar qual a principal contribuição para compor a diversidade global H_{global} , cuja origem pode vir tanto de uma grande diversidade intraneoplásica média (H_t alto) como
 20 de uma grande diversidade intracariotípica média (H_k alto).

Portanto, este processo quantifica a diversidade cariotípica sob
 diferentes aspectos. O mais fundamental deles diz respeito à produção de um
 índice de diversidade intraneoplásica, $H_{\alpha 1}$, o qual pode ser utilizado para o
 diagnóstico do grau de complexidade dos cariótipos encontrados na biópsia de
 25 um dado paciente. Os demais índices de diversidade dizem respeito à análise de conjuntos de biópsias, o que permite uma avaliação epidemiológica do grau de complexidade encontrado nos cariótipos de grupos de pacientes com o mesmo tipo de neoplasia.

Os versados na técnica apreciarão que outras formas de concretização
 30 da presente invenção são viabilizadas a partir dos conhecimentos fornecidos nesta descrição, e que, portanto, pequenas modificações na forma de

condução do processo aqui descrito devem ser incluídas dentro do espírito da invenção e do alcance das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

Processo *in vitro* para Diagnóstico Cariotípico e Kit para Diagnóstico Cariotípico *in vitro*

5 1. Processo *in vitro* para diagnóstico cariotípico, compreendendo a obtenção do cariótipo de uma ou mais amostras de células e/ou tecidos de pelo menos um eucariota, caracterizado por compreender os passos de:

a) analisar a morfologia dos cromossomos presentes em cada célula da amostra;

10 b) agrupar os cariótipos com igual número de aberrações cromossomais;

c) obter a proporção de cada agrupamento de cariótipos em relação ao total de células analisadas; e

d) obter um índice de diversidade através da contagem de aberrações cromossomais.

15 2. Kit para diagnóstico cariotípico *in vitro* compreendendo meios para a obtenção do cariótipo de uma ou mais amostras de células e/ou tecidos de pelo menos um eucariota, caracterizado por adicionalmente compreender:

- meios para proporcionar a análise da morfologia dos cromossomos presentes em cada célula da amostra;

20 - meios para proporcionar o agrupamento dos cariótipos com igual número de aberrações cromossomais;

- meios para proporcionar a obtenção da proporção de cada agrupamento de cariótipos em relação ao total de células analisadas; e

25 - meios para proporcionar a obtenção de um índice de diversidade cromossomal.

3. Kit, conforme reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que os referidos meios para a obtenção do cariótipo incluem um suporte para incubação da amostra biológica; um marcador colorimétrico; e uma solução alcoólica.

FIGURAS

Figura 1

5

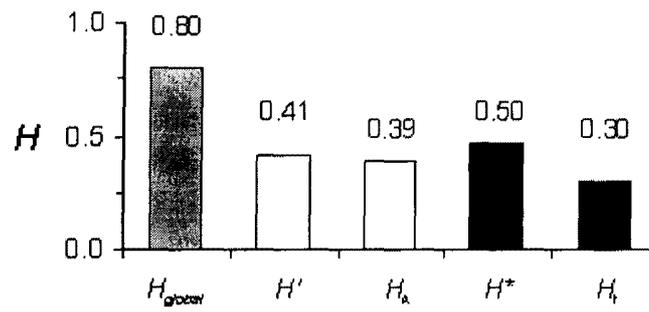


Figura 2

10

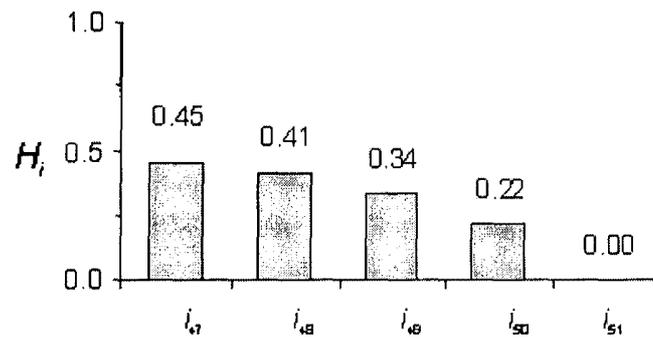
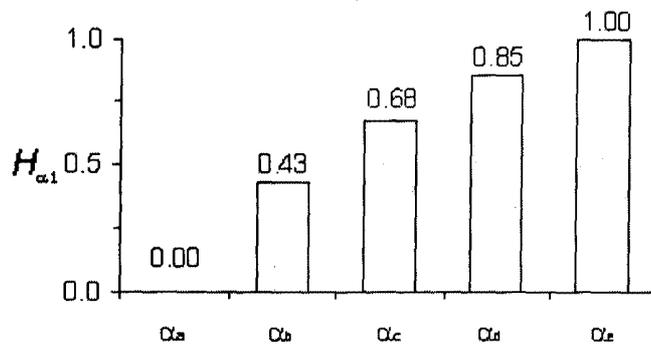


Figura 3



RESUMO**Processo *in vitro* para Diagnóstico Cariotípico e
Kit para Diagnóstico Cariotípico *in vitro***

5 A presente invenção é relacionada a um kit e a um processo *in vitro* para
estimar a diversidade cariotípica de um eucarioto, ou de um grupo de
eucariotos, através da análise de células e/ou tecidos dos mesmos. O processo
e o kit da presente invenção são particularmente úteis para avaliação
diagnóstica e prognóstica de pacientes, com neoplasias sólidas, incluindo
10 carcinomas e adenocarcinomas, tumores mesenquimais e tumores do sistema
nervoso central, bem como neoplasias hematológicas, entre outras. O processo
da invenção também proporciona a avaliação indireta da instabilidade
genômica.

15

20