



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Cristina Ferreira Ramos Rossetto

**Avaliação do Bandeamento Cromossômico por Digestão
Enzimática e Tratamento com Solução Tampão Citratado.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestra em Pesquisa e
Desenvolvimento – Biotecnologia Médica.

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Izoete Aparecida Thomazini Santos

**Botucatu
2015**

Cristina Ferreira Ramos Rossetto

Avaliação do Bandeamento Cromossômico por
Digestão enzimática e Tratamento com Solução
Tampão Citratado.

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestra
em Pesquisa e Desenvolvimento -
Biotecnologia Médica.

Orientadora: Prof(a).Dr(a). Izoete Aparecida Thomazini Santos

Botucatu
2015

Cristina Ferreira Ramos Rossetto

Avaliação do Bandejamento Cromossômico por Digestão enzimática e Tratamento com Solução Tampão Citratado.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Pesquisa e Desenvolvimento - Biotecnologia Médica.

Comissão examinadora

Profª Drª Izoete Thomazini Santos

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu.
(Orientadora)

Prof. Dr. Newton Key Hokama

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu.

Profª Drª Michele Janegitv Acorsi Valério

Universidade Paulista – UNIP, Campus de Bauru.

Botucatu, 25 de Fevereiro de 2015.

Dedicatória

Minha dedicatória a Deus ...

*Que permitiu a oportunidade de continuar meus estudos,
oferecendo força, coragem e bom animo nos momentos de fraqueza, e
que colocou no meu caminho pessoas fundamentais na concretização dos
meus ideais.*

Minha dedicatória a Prof. Dra. Izoete Aparecida Thomazini Santos

*Aquela que se fez presente em todos os momentos, possibilitando
que este trabalho se desenvolvesse com amor, dedicação e
profissionalismo sempre.*

*Por ter sido a guia quando eu estava perdida,
Por ter sido a luz clareando o caminho,
Por ser severa quando eu era displicente,
Por ter ensinado e não simplesmente mostrado como fazer,
Por ter compartilhado comigo os seus aprendizados e
conhecimentos. Por sua amizade, o meu muito obrigada!*

"Durma com um barulho desse"

"Menos, Cristina!"

"Ai que mimo!"

Agradeço especialmente

Meus pais, Teresa e Hélio, independente dos meus erros ou acertos sempre estiveram ao meu lado oferecendo apoio e acreditando na minha capacidade. Sou imensamente grata pelo amor, paciência, orações, colaboração que foram base fundamental para meu equilíbrio emocional no desenvolvimento deste projeto.

Meu amigo e companheiro, Du, pelo apoio, respeito, tolerância, paciência, parceria e por suas palavras e atitudes que sempre me conferiram força e alegria nos momentos em que essas me faltaram, por contribuir para que eu alcançasse esse objetivo, o meu amor e a minha eterna gratidão.

Meus filhos, João Pedro e José Vitor, por trazerem luz e alegria a minha vida e nas horas mais difíceis me fizeram rir e me descontraíram... “Neeeeega”

Meus familiares, que conseguiam aliviar as minhas preocupações com um simples sorriso, sem saber se quer o que estava acontecendo, pela alegria da convivência, pela amizade de todos.

A minha querida cunhada Adelina, pela valiosa contribuição durante a fase de correção dessa tese.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Newton Key Hokama, Professor da Disciplina de Hematologia da UNESP – HCFMB, pelo despertar da citogenética em mim, pois sem isso não seria possível esse trabalho

A Prof^a Dr^a Ligia Niero–Mello, Professora Adjunta da Disciplina de Hematologia da UNESP – HCFMB, pelo incentivo e palavras amigas que tanto me ajudou.

Ao meu grande amigo, Valdir, pela amizade, colaboração e conselhos. “Menino de Ouro”, “Cadê o Val?”

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Hematologia do Hemocentro Marcos, José Roberto, Marinalva e Juliana pela amizade, incentivo e momentos de convivência.

Ao funcionário, Gilberto que colaborou no desenvolvimento deste trabalho realizando as coletas de sangue.

Aos indivíduos voluntários participantes do projeto, pela doação da amostra sanguínea, compreensão e incentivo.

Aos professores componentes da banca examinadora que gentilmente aceitaram o convite para avaliarem esta dissertação de Mestrado.

Muito obrigada !

RESUMO

Rossetto, C. F. R. **Avaliação do Bandeamento Cromossômico por Digestão enzimática e Tratamento com Solução Tampão Citratado**. 2015. 60 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

A Citogenética humana é o estudo dos cromossomos, sua estrutura e sua herança, aplicado à prática da genética médica. Há quase 50 anos as anomalias cromossômicas, alterações microscopicamente visíveis no número e/ou na estrutura dos cromossomos, podem ser responsáveis por uma série de condições clínicas denominadas aberrações cromossômicas, que constituem uma categoria de doenças genéticas constitucionais ou adquiridas. Diversas alterações foram descritas em doenças genéticas e doenças neoplásicas de origem hematológica, auxiliando no diagnóstico, prognóstico, classificação e monitoramento da doença. O objetivo do presente estudo foi padronizar a técnica clássica em citogenética através da avaliação do bandeamento G pela digestão enzimática com tripsina e pela desnaturação com tampão citratado em alta temperatura, auxiliando na visualização do cariótipo. Neste estudo utilizamos amostras de sangue periférico de indivíduos normais. A cultura celular foi realizada pelo método de cultura *in situ*, seguindo a metodologia de Moorhead *et al.* modificada (1960). Em todos os casos foram obtidas metáfases adequadas para análise e o índice mitótico foi satisfatório. Os resultados obtidos pelo emprego de diferentes técnicas de bandeamento cromossômico revelaram que o bandeamento G pela ação enzimática da tripsina embora considerado padrão-ouro é mais sensível, trabalhoso e ocorre com um número maior de tentativas devido a variabilidade do tempo para que ocorra a degradação das proteínas, sendo necessário o retrabalho tornando-se ineficiente em amostras com baixo índice mitótico e aumentando conseqüentemente o custo do exame. Enquanto o bandeamento pela técnica utilizando tampão citratado em alta temperatura é simples, produtivo, ágil e de menor custo.

Palavras-chave: Bandeamento cromossômico; Cariótipo; Citogenética.

ABSTRACT

Rossetto, C. F. R. **Evaluation of Chromosome banding by enzymatic digestion and treatment with Buffer citrated.** 2015. 60 f. Thesis (Master) - Faculty of Medicine of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu , 2015 .

Human Cytogenetics is the study of chromosomes, their structure and their inheritance, applied to the practice of medical genetics. For nearly fifty years the chromosomal abnormalities, microscopically visible changes in the number and / or structure of chromosomes, may be responsible for a number of clinical conditions known as chromosomal aberrations, which are a category of constitutional or acquired genetic diseases. Several amendments were described in genetic diseases and neoplastic diseases of hematologic origin, aiding in the diagnosis, prognosis, classification and monitoring of the disease. The aim of this study was to standardize the classical technique in cytogenetics by evaluating the banding G by enzymatic digestion with trypsin and by denaturation with citrate buffer at high temperature, assisting in the karyotype view. In this study we used peripheral blood samples of normal individuals. Cell culture was performed by culturing in situ method, following the method of Moorhead et al. modified (1960). In all cases appropriate metaphases were obtained for analysis and the mitotic index was satisfactory. The results obtained by using different chromosome banding techniques revealed that the G banding by the enzymatic action of the trypsin although considered the gold standard it is more sensitive, cumbersome and it occurs with a larger number of retries due to a variability of the time for degradation of the proteins, requiring rework, this way becoming inefficient in samples with low mitotic index and consequently increasing the cost of the exam. While the banding technique using citrate buffer in high temperature is simple, productive, agile and less expensive.

Keywords: chromosome banding; karyotype; Cytogenetics.

Lista de ilustrações

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Cromossomo formado a partir de DNA representado pelas bases nitrogenadas..... | 17 |
| Figura 2 – Cromossomo | 18 |
| Figura 3 – Classificação dos cromossomos em relação ao centrômero..... | 19 |
| Figura 4 – Cromossomos 1,2 e 3 – banda G, idiograma e banda R..... | 20 |
| Figura 5 – Cromossomos 4 e 5 – banda G, idiograma e banda R..... | 21 |
| Figura 6 – Cromossomos 6 ao 12, incluindo o cromossomo X – banda G, idiograma e banda R..... | 21 |
| Figura 7 – Cromossomos 13, 14 e 15 – banda G, idiograma e banda R..... | 23 |
| Figura 8 – Cromossomos 16,17 e 18 – banda G, idiograma e banda R..... | 23 |
| Figura 9 – Cromossomos 19 e 20 – banda G, idiograma e banda R..... | 24 |
| Figura 10 – Cromossomos 21 e 22, incluindo o cromossomo Y – banda G, idiograma e banda R..... | 24 |
| Figura 11 – Formação de cromossomos com deleção. Par do cromossomo 5 – Síndrome de Cri-Du-Chat..... | 27 |
| Figura 12 – Formação de cromossomos com segmento duplicado..... | 28 |
| Figura 13 – Formação de cromossomos em anel..... | 29 |
| Figura 14 – Formação de Isocromossomo..... | 30 |
| Figura 15 – Formação de inversão cromossômica..... | 31 |
| Figura 16 – Formação de translocação cromossômica..... | 32 |
| Figura 17 – Cariótipo normal do sexo masculino 46, XY, obtido através do bandeamento G..... | 37 |
| Figura 18 – Metáfase corada através do bandeamento C..... | 38 |

| | |
|--|----|
| Figura 19 – Idiograma Humano..... | 40 |
| Figura 20 – Bandeamento pela tripsina..... | 50 |
| Figura 21 – Bandeamento pelo tampão citratado..... | 50 |

Lista de tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Classificação dos cromossomos..... | 35 |
| Tabela 2 – Abreviações das anomalias cromossômicas pelas normas do Sistema Internacional de Nomenclatura em Citogenética Humana..... | 41 |
| Tabela 3 – Sequência de lâminas para o bandeamento cromossômico..... | 51 |
| Tabela 4 – Bandeamento cromossômico pela tripsina..... | 52 |
| Tabela 5 – Bandeamento cromossômico pelo tampão citratado..... | 53 |
| Tabela 6 – Comparação das técnicas para o bandeamento..... | 54 |
| Tabela 7 – Custo das soluções utilizadas para o bandeamento cromossômico..... | 54 |

Lista de abreviaturas e siglas

| | |
|----------------------------------|--|
| Ag | prata |
| AT | bases nitrogenadas adenina e timina |
| CG | bases nitrogenadas citosina e guanina |
| CLSI | Clinical and Laboratory Standards Institute |
| CO ₂ | gás carbônico |
| DNA | ácido desoxirribonucleico |
| HCl | ácido clorídrico |
| i | isocromossomo |
| ISCN | International System for Human Cytogenetics Nomenclature |
| KCl | cloreto de potássio |
| KH ₂ PO ₄ | fosfato de potássio monobásico |
| LLA | leucemia linfoblástica aguda |
| LMC | leucemia mielóide crônica |
| Na ₂ HPO ₄ | fosfato de sódio dibásico |
| NaCl | cloreto de sódio |
| NaOH | hidróxido de sódio |
| NORs | regiões organizadoras de nucléolos |
| p | braço curto do cromossomo |
| PBS | tampão fosfato salino |
| Ph | cromossomo filadélfia |
| PHA | fitohemaglutinina, lecetina de phaseolus vulgaris |

| | |
|------|--|
| q | braço longo do cromossomo |
| RNA | ácido rubonucleico |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| t | translocação cromossômica |
| TCLE | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |

Lista de símbolos

| | |
|-----|-----------------------------|
| ° | grau |
| °C | graus celsius |
| % | porcentagem |
| ® | marca registrada |
| + | mais |
| - | menos |
| ml | mililitros |
| n° | número |
| µg | micrograma |
| M | molar |
| pH | potencial hidrogênio iônico |
| mM | massa molecular |
| rpm | rotações por minuto |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1.0 INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1 Histórico..... | 15 |
| 1.2 Estrutura e classificação dos cromossomos humano..... | 17 |
| 1.3 Aberrações Cromossômicas..... | 25 |
| 1.3.1 Aberrações Cromossômicas Numéricas..... | 25 |
| 1.3.1.1 Euploidia..... | 26 |
| 1.3.1.2 Aneuploidia..... | 26 |
| 1.3.2 Aberrações cromossômicas Estruturais..... | 26 |
| 1.3.2.1 Rearranjos Cromossômicos Não Balanceados..... | 26 |
| 1.3.2.1.1 Deleção Cromossômica..... | 27 |
| 1.3.2.1.2 Duplicação Cromossômica..... | 27 |
| 1.3.2.1.3 Cromossomo em anel..... | 28 |
| 1.3.2.1.4 Isocromossomo..... | 29 |
| 1.3.2.1.5 Cromossomo Dicêntrico..... | 30 |
| 1.3.2.2 Rearranjos Cromossômicos Balanceados..... | 30 |
| 1.3.2.2.1 Inversão Cromossômica..... | 30 |
| 1.3.2.2.2 Translocação Cromossômica..... | 31 |
| 1.4 Citogenética Clássica..... | 33 |
| 1.4.1 Cultura de Linfócito do Sangue Periférico..... | 34 |
| 1.4.2 Bandeamento Cromossômico..... | 35 |
| 1.4.3 Cariótipo Humano..... | 39 |
| 2.0 OBJETIVO | 42 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 42 |
| 2.2 Objetivo Específico..... | 42 |
| 3.0 MATERIAL E MÉTODOS | 43 |
| 3.1 Seleção..... | 43 |
| 3.2 Materiais..... | 43 |
| 3.2.1 Meio de Cultura para Cariótipo..... | 43 |
| 3.2.2 Colchicina..... | 44 |
| 3.2.3 Solução Hipotônica de Cloreto de Potássio 0,075M..... | 44 |
| 3.2.4 Fixador..... | 44 |
| 3.2.5 Corante Giemsa..... | 45 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.5.1 Solução Estoque..... | 45 |
| 3.2.5.2 Solução de Giemsa para uso diário..... | 45 |
| 3.2.6 Solução de Tripsina..... | 45 |
| 3.2.6.1 Solução mãe..... | 45 |
| 3.2.6.2. Solução de tripsina para uso diário..... | 45 |
| 3.2.7 Tampão Fosfato..... | 46 |
| 3.2.7.1 Tampão Fosfato 0,06 M pH 6,8..... | 46 |
| 3.2.7.2 Tampão Fosfato Salino pH 7,2 – 7,3..... | 46 |
| 3.2.7.3 Tampão Salino Citratado..... | 46 |
| 3.2.8 Preparo das Lâminas..... | 46 |
| 3.3 Métodos..... | 47 |
| 3.3.1 Coleta de Amostras..... | 47 |
| 3.3.2 Cultura Celular..... | 47 |
| 3.3.3 Colheita..... | 48 |
| 3.3.4 Lâminas..... | 48 |
| 3.3.5 Bandeamento G..... | 49 |
| 3.3.6 Análises das Preparações Citológicas..... | 49 |
| 4.0 RESULTADOS..... | 51 |
| 5.0 DISCUSSÃO..... | 55 |
| 6.0 CONCLUSÃO..... | 57 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 58 |

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

O termo Citogenética atualmente refere-se a todo e qualquer estudo relativo ao cromossomo isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, tanto no que diz respeito a sua morfologia, organização, função e replicação, quanto a sua variação e evolução (GUERRA, 1988).

O início da citogenética humana foi atribuído a Walter Flemming, em 1882 que publicou ilustrações dos cromossomos humanos em mitose. Em 1890, David Von Hansemann descreveu informações sobre a relação entre anormalidades cromossômicas e o desenvolvimento do câncer. Quase 25 anos após as observações iniciais de Hansemann, Theodor Boveri postulou a teoria mutacional do câncer, dizendo que aberrações cromossômicas seriam responsáveis pelo comportamento maligno das células cancerosas. Hansemann e Boveri foram os principais pesquisadores sobre a relação entre alterações cromossômicas, tumorigênese e malignidades. Seus estudos datados de 1890 e 1914, respectivamente, foram os primeiros com observações relevantes sobre a origem e desenvolvimento do câncer (HARDY; ZACHARIAS, 2005).

Em 1952, Tao-Chiuh Hsu estudando células em solução hipotônica observou uma separação adequada dos cromossomos, possibilitando a definição de 46 cromossomos como o número correto nas células somáticas humanas (TIJO; LEVAN, 1956). A seguir, Lejeune e colaboradores estudando cromossomos em cultura de pacientes portadores de Síndrome de Down, observaram a presença de um cromossomo extra em suas células. Estes descreveram a primeira aberração cromossômica numérica envolvendo um dos menores cromossomos, sendo referida como a trissomia 21, presença de 47 cromossomos em vez de 46 nas células somáticas levando a descrever a primeira doença genética conhecida (MALUF; RIEGEL, 2011). Neste mesmo período anomalias dos cromossomos sexuais também foram observadas pela primeira vez por Ford e colaboradores, relataram que mulheres com Síndrome de Turner apresentavam 45 cromossomos, aparentemente um único cromossomo X e Jacobs e Strong, em pacientes com disfunção sexual relataram a presença de um cromossomo sexual extra tanto no

sexo feminino quanto no sexo masculino denominada Síndrome de Klinefelter (JACOBS; STRONG, 1959).

Em, 1960, Moorehead e colaboradores publicaram um método para preparação de cromossomos a partir de cultura de linfócitos com algumas modificações, este vem sendo aplicado nos laboratórios de citogenética de todo o mundo. Neste período foi descrita uma alteração cromossômica relacionada a uma doença neoplásica: o cromossomo Philadelphia (Ph), observado em pacientes com leucemia mieloide crônica (L.M.C.) e, mais tarde, reconhecida como uma translocação equilibrada ou recíproca, entre os cromossomos 9 e 22.

Desde então passou-se a estudar os cromossomos, suas estruturas, herança, função, comportamento biológico, patológico e hereditariedade, assim milhares de alterações cromossômicas nos diversos cânceres hematológicos foram descritas, totalizando mais de 46000 catalogadas. Pela primeira vez um defeito genético específico que estava ligado a um câncer, foi descrito.

A partir da década de 70, a citogenética humana teve um notável desenvolvimento na medida em que as análises cariotípicas puderam ser aprofundadas, devido ao emprego de técnicas de bandeamento cromossômico.

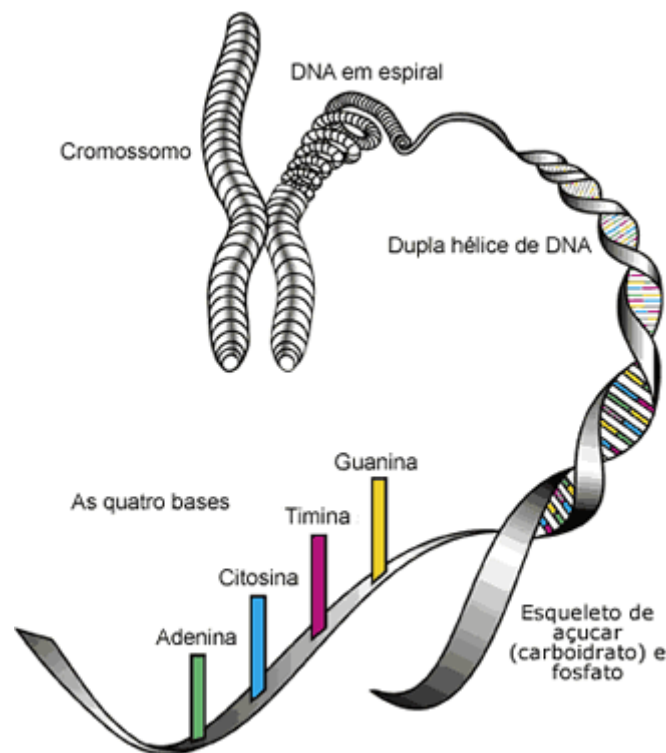
Em, 1976, Yunis introduziu a técnica de bandeamento cromossômico com alto poder de resolução na análise cromossômica, o que permitiu a identificação individual de cada cromossomo, além da detecção de aberrações cromossômicas.

Diversos avanços nas técnicas de cultura, análise e a introdução de metodologias permitiram as investigações citogenéticas e o estudo citogenético é uma das ferramentas mais tradicionais em genética humana, utilizada para a detecção de aberrações cromossômicas numéricas e/ou estruturais capazes de auxiliar no esclarecimento etiológico de várias condições mórbidas, tais como: câncer, aborto espontâneo, retardo mental e síndromes malformativa no diagnóstico, prognóstico, classificação da doença, monitoramento do tratamento e acompanhamento da doença (BARCH; KNUTSEN; SPURBECK, 1997).

1.2 Estrutura e Classificação dos Cromossomos Humano

Os cromossomos (Kroma=cor, soma=corpo) que se encontram dentro dos núcleos das células, são filamentos espiralados de cromatina constituído pelo DNA e diversos tipos de proteínas, formado por bases nitrogenadas, entre elas as purinas, representadas pela adenina e guanina, e pelas pirimidinas, representadas pela citosina e timina (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014) (Figura 1).

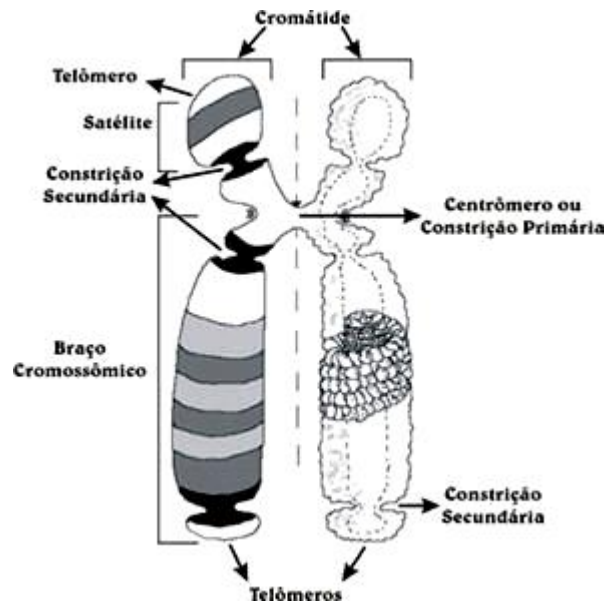
Figura1: Cromossomo formado a partir de DNA representado pelas bases nitrogenadas.



Fonte: sobiologia.com.br/biogenoma.php

O estudo da morfologia dos cromossomos por fixação e coloração permite na divisão celular identificar durante a metáfase e anáfase, 46 cromossomos agrupados em 23 pares. Destes, 22 são cromossomos autossomos e 2 são sexuais: XX no sexo feminino e XY no masculino. O cromossomo metafásico é formado por duas cromátides irmãs, uma delas oriunda do processo de duplicação da cromatina. As cromátides se encontram presas por uma região delgada, chamada de constrição primária ou centrômero, principal estrutura, que desempenha uma importante função na divisão celular como a região na qual, as fibras do fuso se fixam, sendo um ponto de referência citológico básico (MALUF; RIEGEL, 2011) (Figura 2)

Figura 2: Cromossomo

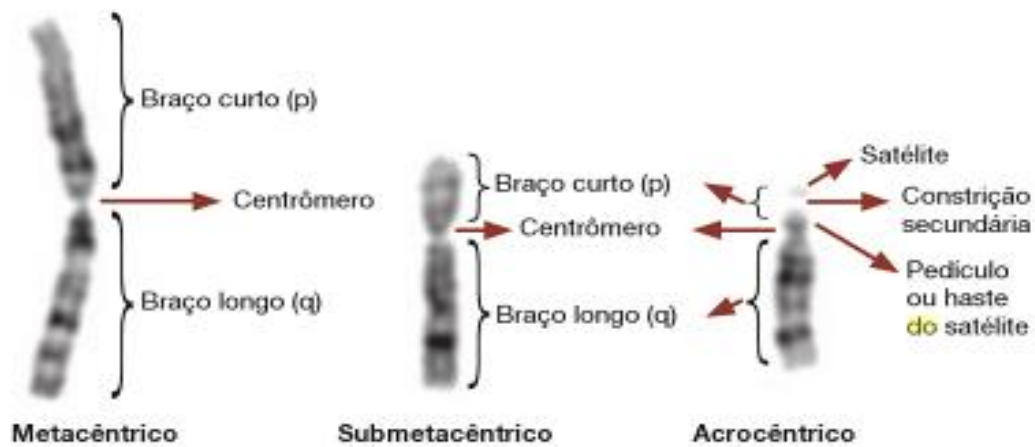


Fonte: citogenética/cromossomometafásico

O centrômero divide a cromátide em dois braços cromossômicos, denominados em braço curto ou “p” (do francês *petit* = pequeno) e braço longo ou “q” (por ser a próxima letra do alfabeto). Os braços são indicados pelo número do cromossomo seguido da letra “p” ou “q” (BARCH; KNUTSEN; SPURBECK,1997; THARAPEL,1999; THOMPSON *et al*, 1993).

Com base na localização do centrômero os cromossomos humano podem ser classificados em: metacêntricos, onde o centrômero está localizado na porção mediana do cromossomo, em consequência tanto o braço longo como o braço curto, apresentam tamanhos semelhantes; os submetacêntricos, o centrômero é excêntrico e apresenta braços de comprimento nitidamente desiguais; os acrocêntricos, o centrômero está localizado próximo a uma das extremidades, denominada de telômero. O acrocêntrico caracteriza-se por apresentar um apêndice denominado de “satélite” (THOMPSON *et al*, 1993) (Figura 3).

Figura 3: Classificação dos cromossomos em relação ao centrômero



Fonte: Citogenética Humana (Maluf; Riegel,2011)

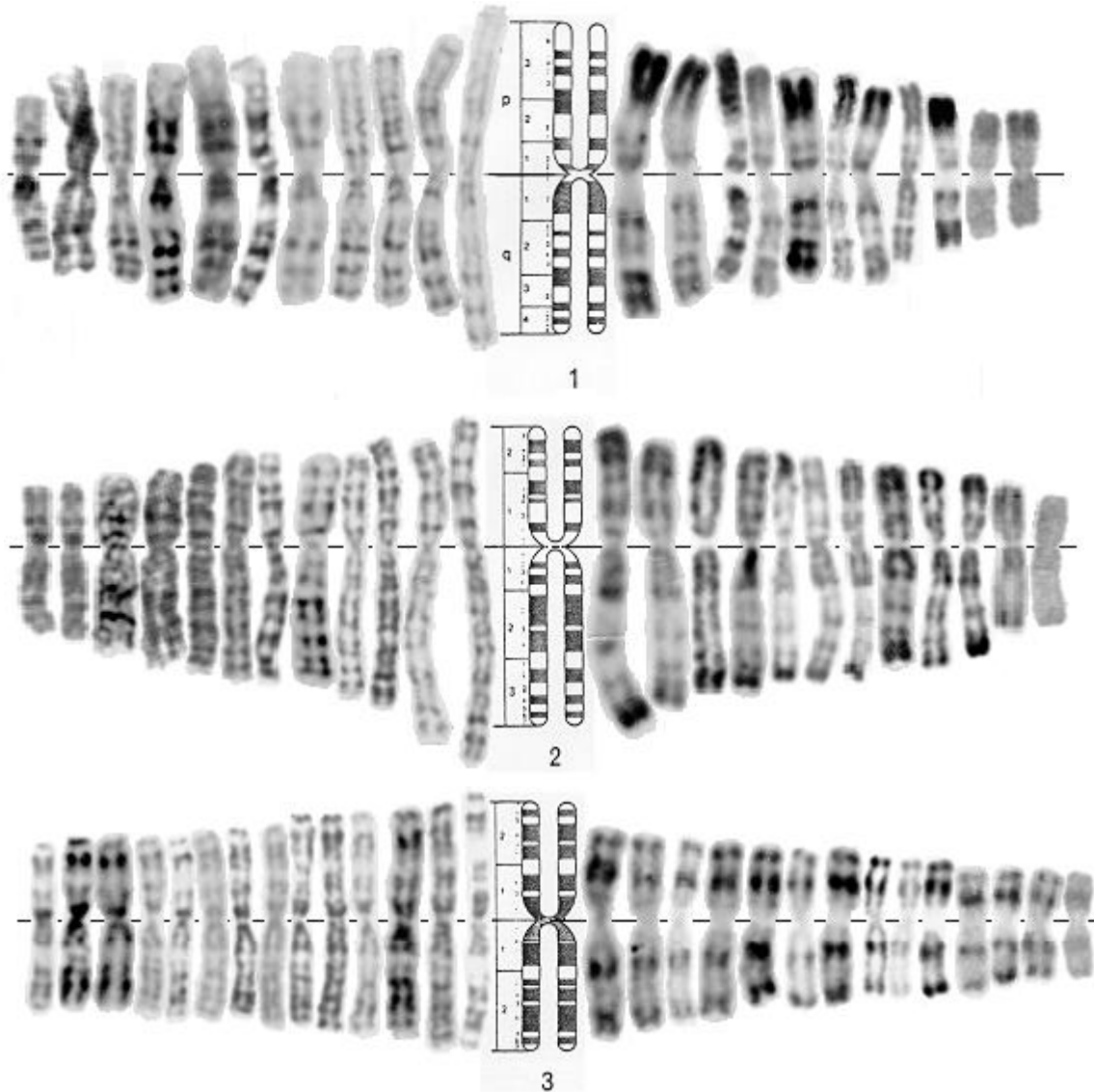
A primeira classificação formal dos cromossomos humano foi feita na Conferência de Dener em 1960 e subsequentemente aprimorada como na Conferência de Londres (1963), na Conferência de Chicago (1966) e na Conferência de Paris (1971). Posteriormente, devido ao desenvolvimento de inúmeras técnicas citogenéticas, houve a necessidade cada vez mais de se atualizar e unificar rapidamente a nomenclatura cromossômica, através de regras precisas estabelecidas pelo Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética (ISCN,1995).

Os pares de cromossomos autossomos são numerados de 1 a 22 em ordem decrescente de tamanho e os cromossomos sexuais recebem a notação X e Y. Os pares cromossômicos, incluindo os sexuais, são reunidos em 7 grupos designados pelas letras de A a G.

Dentro de cada grupo, a identificação individual dos cromossomos é possível somente quando se emprega técnicas de bandeamento cromossômico permitindo uma distribuição de bandas ao longo do cromossomo (ISCN,1995), distinguindo-o entre eles. Para a distribuição nos diferentes grupos, deve-se obedecer os seguintes critérios:

GRUPO A – Compreende os pares de cromossomos 1, 2 e 3 (Figura 4). O par 1 é metacêntrico, o 2 é submetacêntrico e o 3 é também metacêntrico, porém de tamanho menor que o par 1.

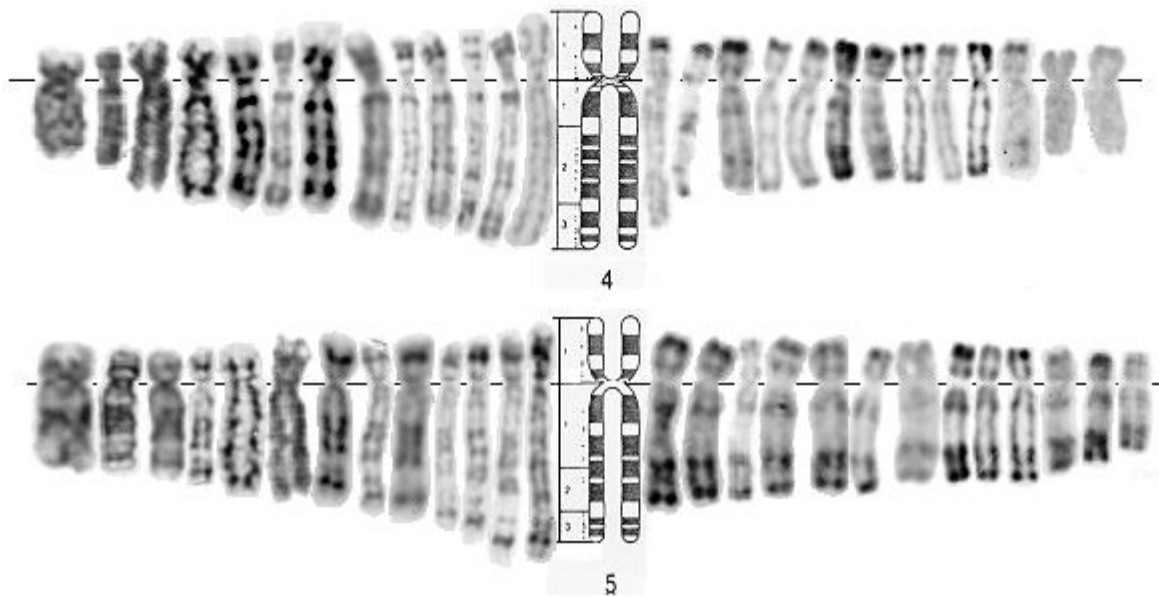
Figura 4: Cromossomos 1, 2 e 3 - banda G, idiograma e banda R.



Fonte: <http://atlasgeneticsoncology.org/> Claude Léonard, Jean-Loup Huret

GRUPO B – Inclui os pares 4 e 5 que são submetacêntricos (Figura 5). O tamanho de seus braços curtos equivale a 1/3 de seus braços longos. Os dois pares de homólogos não são distinguíveis morfologicamente entre si.

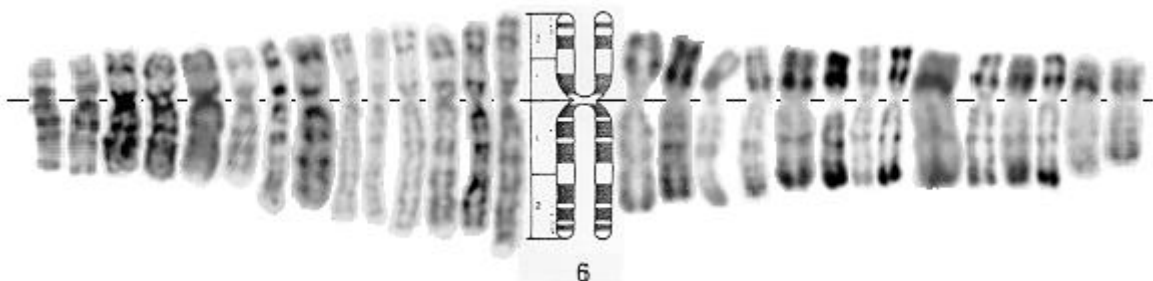
Figura 5: Cromossomos 4 e 5 - banda G, idiograma e banda R.

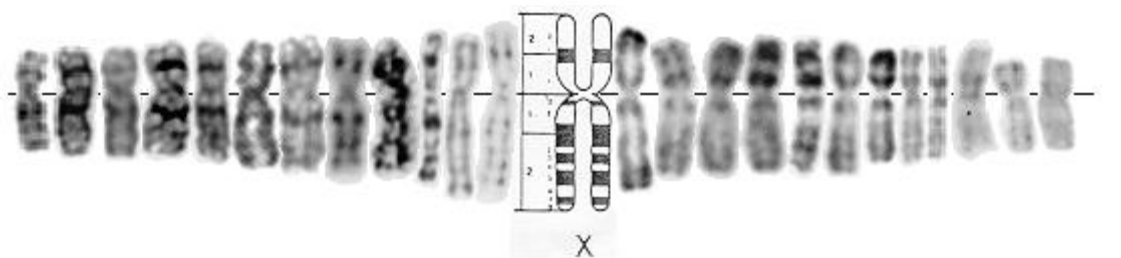
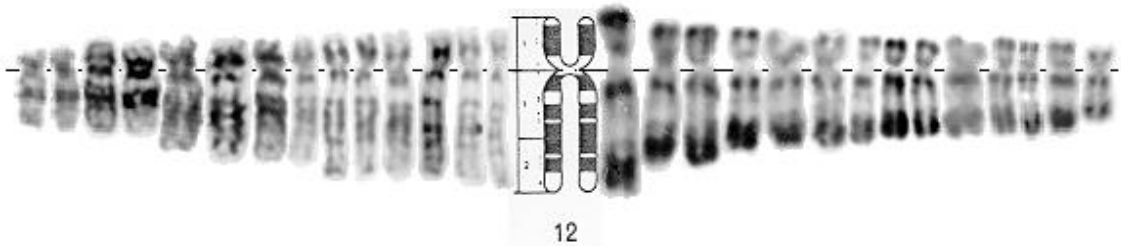
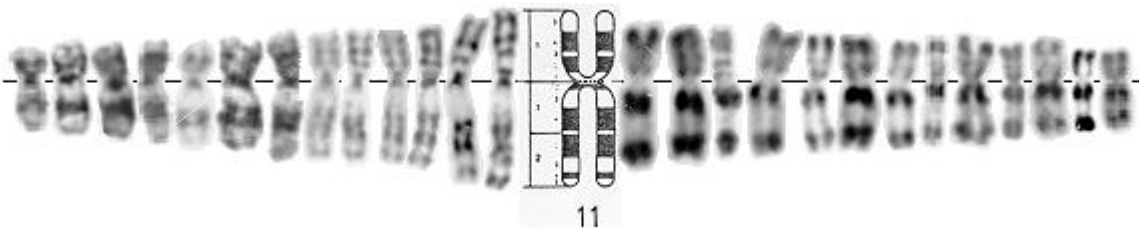
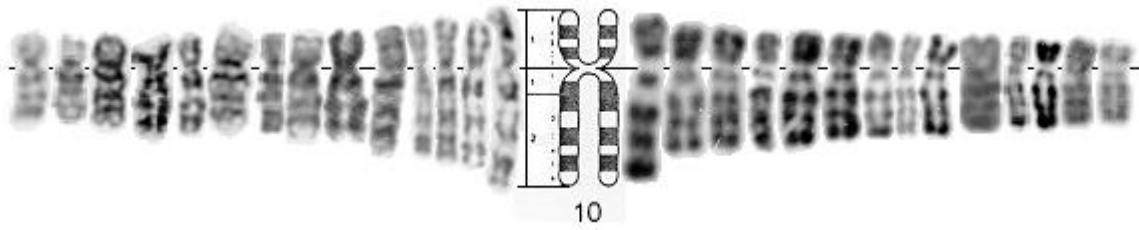
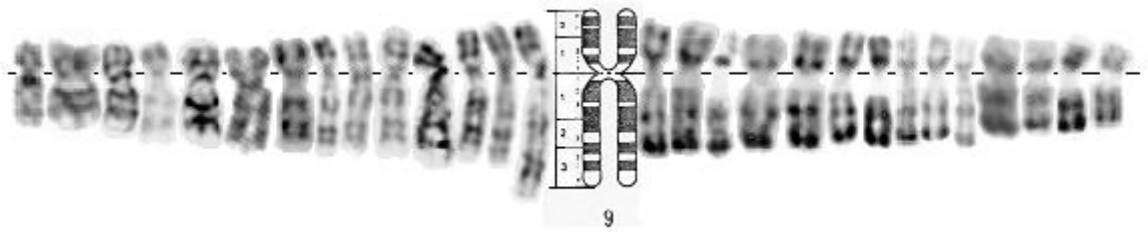
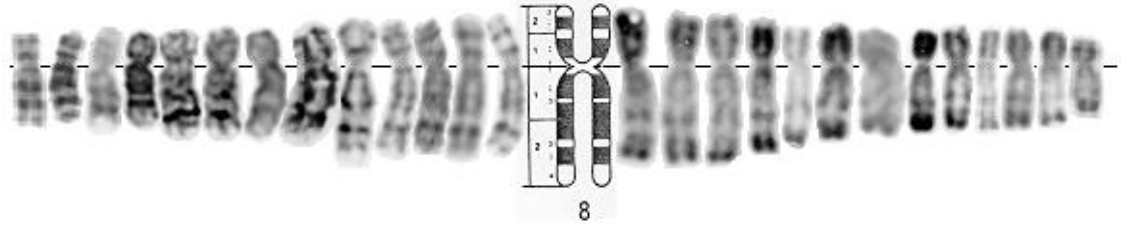
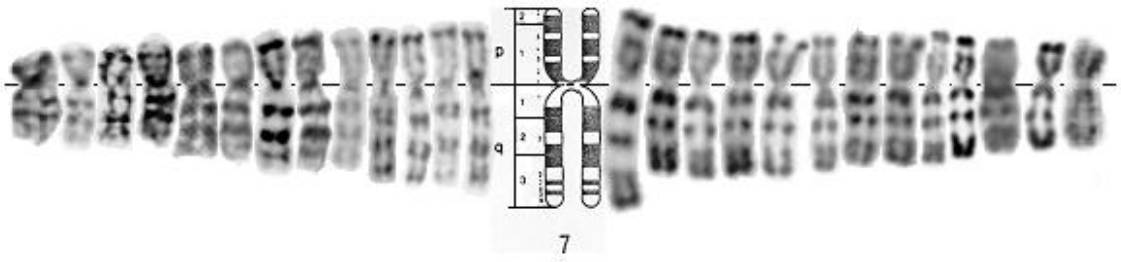


Fonte: <http://atlasgeneticsoncology.org/> Claude Léonard, Jean-Loup Huret

GRUPO C - Compreende 15 cromossomos no homem e 16 na mulher, pois o cromossomo X é incluído nesse grupo (Figura 6). São metacêntricos ou submetacêntricos, sendo difícil a identificação individual dos mesmos. Contudo, por serem os maiores do grupo, os pares 6 e 7 são freqüentemente identificados, assim como o X, cujo tamanho está entre os pares 7. e 8. Algumas vezes, um dos elementos do par 9 (raramente ambos) pode ser reconhecido, devido a uma constrição secundária proximal nos braços longos.

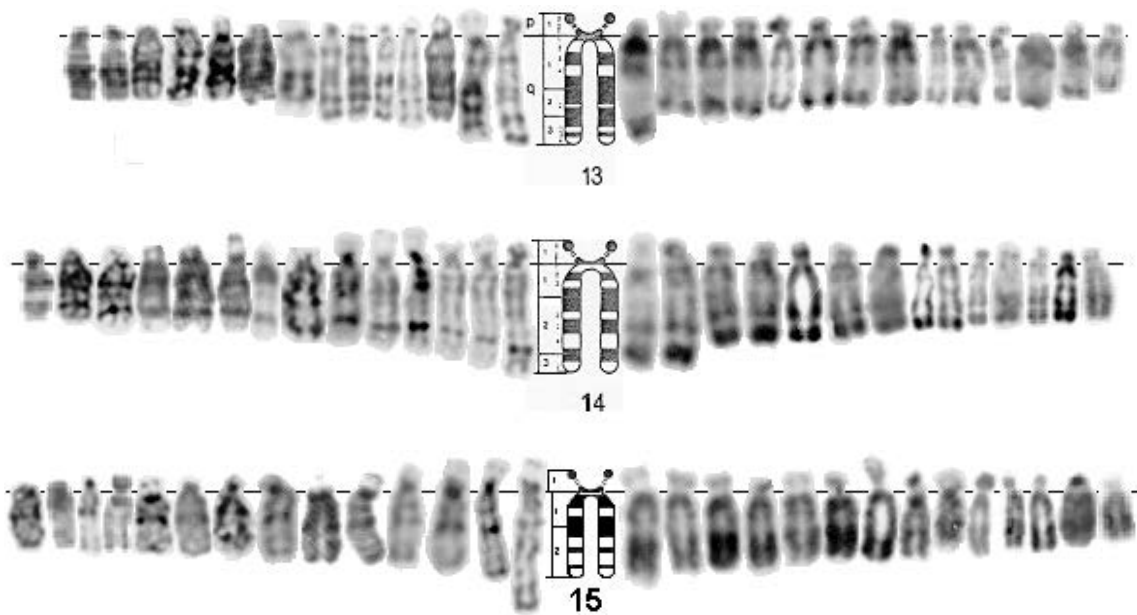
Figura 6: Cromossomos 6 ao 12, incluindo o cromossomo X - banda G, idiograma e banda R.





GRUPO D – Compreende três pares de acrocêntricos de tamanho médio (Figura 7). São cromossomos portadores de constrição secundária e satélite nos braços curtos, porém nem sempre visíveis. Os pares 13, 14 e 15 não são distinguíveis morfologicamente entre si.

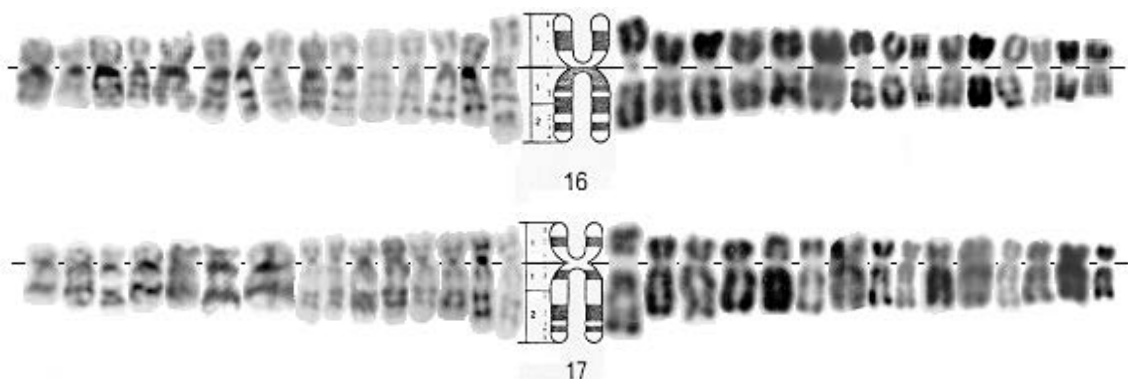
Figura 7: Cromossomos 13,14 e 15 - banda G, idiograma e banda R.

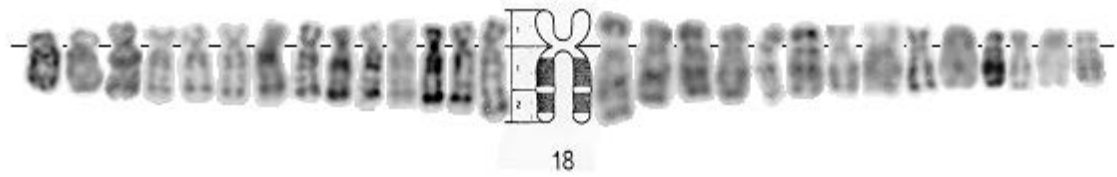


Fonte: <http://atlasgeneticsoncology.org/> Claude Léonard, Jean-Loup Huret

GRUPO E – Inclui três pares de cromossomos dos quais o 16 é metacêntrico enquanto o 17 e 18 são submetacêntricos (Figura 8). O par 16 é identificado morfologicamente, o que nem sempre acontece com os demais, embora o par 17 tenha os braços curtos ligeiramente maiores que os do par 18.

Figura 8: Cromossomos 16,17 e 18 - banda G, idiograma e banda R.

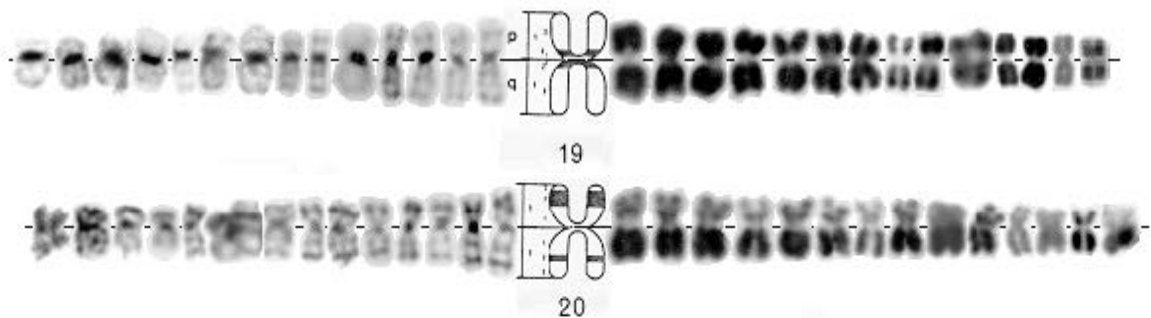




Fonte: <http://atlasgeneticsoncology.org/> Claude Léonard, Jean-Loup Huret

GRUPO F – Inclui os pares 19 e 20. (Figura 9). São os menores cromossomos metacêntricos, não distinguíveis morfologicamente entre si.

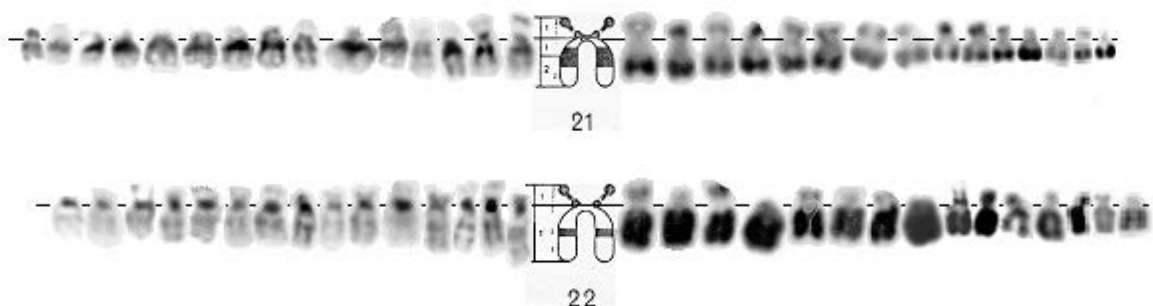
Figura 9: Cromossomos 19 e 20 - banda G, idiograma e banda R.



Fonte: <http://atlasgeneticsoncology.org/> Claude Léonard, Jean-Loup Huret

GRUPO G – Compreende 4 cromossomos na mulher e 5 no homem, pois o cromossomo Y está incluído neste grupo (Figura 10). Os pares 21 e 22 e o Y são os menores acrocêntricos. Os pares 21 e 22 apresentam constrição secundária e satélite, nem sempre visíveis, nos braços curtos. Não é possível a distinção morfológica desses dois pares. O Y é identificável em muitos casos pelo tamanho maior ou menor que o dos outros autossomos, bem como pela posição paralela dos braços longos. O cromossomo Y se caracteriza também pela ausência de constrição secundária e satélite, não participando da associação de acrocêntricos.

Figura 10: Cromossomos 21, 22 , incluindo o cromossomo Y - banda G, idiograma e banda R.





Fonte: <http://atlasgeneticsoncology.org/> Claude Léonard, Jean-Loup Huret

1.3 Aberrações Cromossômicas

As aberrações cromossômicas constituem uma categoria importante de doenças genéticas, respondendo por uma proporção significativa dos insucessos reprodutivos, malformações congênitas e retardo mental (GARDNER; SUTHERLAND, 1996). As aberrações cromossômicas de maior ocorrência têm permitido o esclarecimento das alterações genéticas, dos padrões de evolução cariotípica e revelado os danos cromossômicos relacionados com as doenças humanas, contribuindo como uma importante ferramenta no prognóstico e diagnóstico clínico (HENG *et al.*, 2006).

Quanto à origem das aberrações cromossômicas, sabe-se que resultam de quebras cromossômicas espontâneas ou induzidas por agentes mutagênicos. As quebras nas extremidades tendem se unir, podendo originar uma deficiência ou uma reorganização estrutural do cromossomo durante os estágios da mitose ou meiose do ciclo celular.

As aberrações cromossômicas são alterações estruturais (perda de pedaços ou inversões) ou alterações numéricas (falta ou excesso) de cromossomos nas células. As mesmas podem ocorrer em um ou mais cromossomos autossomos, cromossomos sexuais ou em ambos (THOMPSON *et al.*, 1993; MOTTA, 2000).

1.3.1 Aberrações Cromossômicas Numéricas

As aberrações cromossômicas numéricas ocorrem quando correspondem ao aumento ou à perda de um ou mais cromossomos, são mais fáceis de serem observadas, mesmo em espécies com cromossomos muito pequenos e numerosos, e têm efeito mais drástico para o indivíduo e para a evolução da espécie. (GUERRA, 1988). Correspondem à mudanças no número dos cromossomos, resultantes de erros na distribuição dos cromossomos durante a fase de divisão celular e no

processo meiótico podendo produzir células com ausência de alguns cromossomos ou com presença. Classificam-se em: euploidia e aneuploidia.

1.3.1.1 Euploidia

Euploidia são alterações cromossômicas numéricas que se caracterizam pela alteração de todo um conjunto de cromossomos. É uma aberração que resulta de um processo chamado poliploidia, em que os cromossomos duplicados não se separam durante a anáfase das divisões celulares. Assim, formam-se mais de dois conjuntos completos de cromossomos, ou seja teremos conjuntos triploides ($3n$), tetraploides ($4n$), hexaploides ($6n$), que resultam em anomalias fenotípicas (NUSSBAUM et al, 2004).

1.3.1.2 Aneuploidia

Aneuploidia envolvem alterações no número cromossômico, que não representem múltiplo exato do valor haploide. Nesta aberração cromossômica numérica estão denominadas as síndromes genéticas, sendo a mais comum a Síndrome de Down ou trissomia do cromossomo 21 (presença de um cromossomo extra) (GRIFFITHS *et al.*, 2009) e a Síndrome de Turner ou monossomia do cromossomo X (ausência de um cromossomo) (GARDNER; SUTHERLAND, 1996).

1.3.2 Aberrações Cromossômicas Estruturais

As aberrações cromossômicas estruturais incluem todos os tipos de quebras e alterações dos cromossomos e são usualmente divididas em quebras do tipo cromossômico ou do tipo cromatídico (ALBERTINI *et al.*, 2000). Esse tipo de distúrbio pode ser definido como rearranjo não equilibrado ou não balanceado quando há perda ou adição de material genético e rearranjo equilibrado ou balanceado, quando não há modificação na quantidade do material genético (THOMPSON *et al*, 1993).

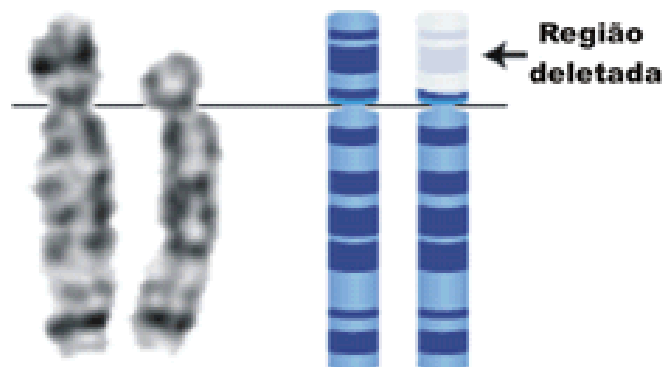
1.3.2.1 Rearranjos Cromossômicos Não Balanceados

Nos rearranjos não balanceados há alterações no número de genes, onde o fenótipo é anormal. São exemplos destas alterações, as deleções cromossômicas, as duplicações, o cromossomo em anel, o isocromossomo e os cromossomos dicêntricos (BEIGUELMAN, 1982).

1.3.2.1.1 Deleção Cromossômica

Segundo Thompson *et al.* (1993) e Lewis (2004) deleção é a perda de um segmento cromossômico, resultando em desequilíbrio da composição gênica. A deleção cromossômica resulta de quebras cromossômicas ou perda de fragmento cromossômico que podem ser de dois tipos, terminal: quando as quebras acontecem em uma da extremidade do cromossomo ou intersticial: quando ocorrem duas quebras com a perda da parte intercalar a estas duas quebras, seguidas da reunião das extremidades quebradas o que constantemente leva a perda de material genético. (Figura 11).

Figura 11: Formação de cromossomo com deleção. Par do cromossomo 5 – Síndrome de Cri-du-chat.



Fonte: <http://www.sobiologia.com.br/Genetica/genesnaoalelos10.php>

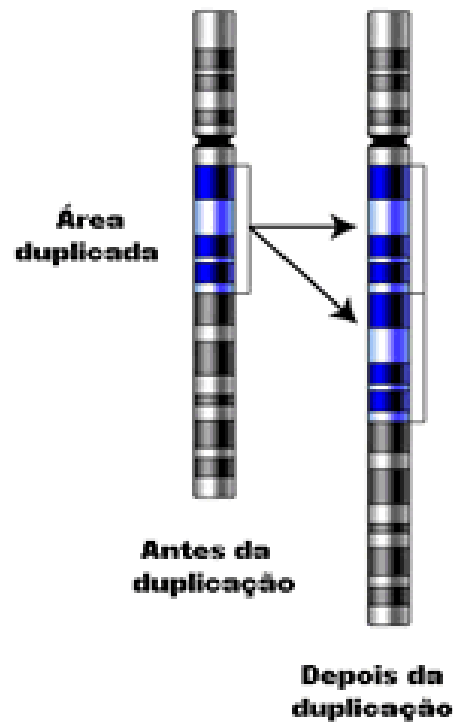
O portador de uma deleção cromossômica apresentará um cromossomo normal, e o seu homólogo, com deleção. As quebras cromossômicas podem ser determinadas por agentes externos físicos, radiações ionizantes e podem ser consequência do próprio metabolismo da célula (BAMSHAD, 2010).

1.3.2.1.2 Duplicação Cromossômica

A duplicação é uma repetição anormal de um segmento cromossômico qualquer (Figura 12). Em geral, as duplicações parecem produzir fenótipos menos prejudicial do que a deleção, podendo ser originada por crossing-over, uma troca de material genético entre cromossomos homólogos desigual ou por segregação anormal da meiose em um portador de uma translocação ou inversão. Embora na

literatura existam vários relatos de duplicações, o mecanismo de formação ainda necessita de esclarecimentos (SCHINZEL, 2001).

Figura 12: Formação de cromossomo com segmento duplicado.

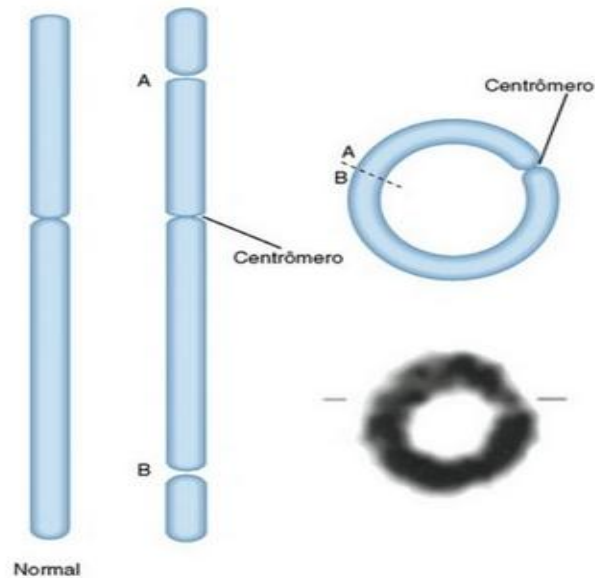


Fonte: <http://www.sobiologia.com.br/Genetica/genesnaoalelos10.php>

1.3.2.1.3 Cromossomos em Anel

A formação de um cromossomo em anel é uma alteração estrutural resultante de duas quebras simultâneas em um único cromossomo que ocorre nas extremidades do cromossomo (braço curto e braço longo) e uma subsequente fusão das extremidades rompidas (Figura 13). Segundo Thompson *et al.* (1993) os cromossomos em anel são bastante raros, no entanto já foram detectados em todos os cromossomos humanos.

Figura 13: Formação de anel cromossômico



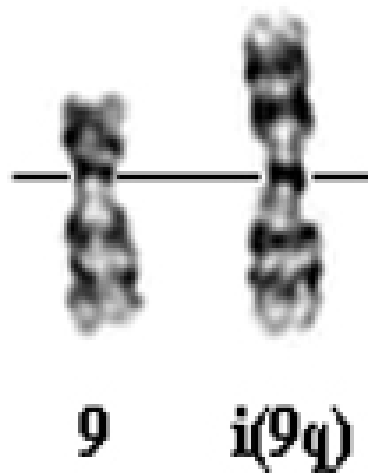
Fonte: Genética Médica, Bamshad, 2010

1.3.2.1.4 Isocromossomo

O isocromossomo é um cromossomo no qual um braço está ausente e o outro encontra-se duplicado à maneira de uma imagem no espelho (NUSSBAUM *et al.* 1993). Acontece quando a divisão dos centrômeros ocorre transversalmente, quando deveria ocorrer longitudinalmente, em consequência, os cromossomos resultantes apresentam dois braços duplicados e ausência do outro braço. Constituem uma deleção e uma duplicação, simultâneas e podem ocorrer nos cromossomos 6p, 7q, 9q e 17q. A presença do i (9q) em leucemia linfoblástica aguda (L.L.A.) pode ser encontrado como uma anomalia única ou em combinação com número diferentes de anomalias cromossômicas (SHIPPEY; LAWLOR; SECKER-WALKER, 1989) (Figura 14).

Ainda que a base da formação do isocromossomo não seja conhecida com precisão, documentou-se dois tipos de mecanismos: erro na divisão através do centrômero na meiose II e translocação de um braço de um cromossomo para seu homólogo na borda proximal do outro braço, adjacente ao centrômero, havendo a duplicação de um único braço cromossômico.

Figura 14: Formação de isocromossomo



Fonte: <http://atlasgeneticsoncology.org//Anomalies/i9qID1066.html>

1.3.2.1.5 Cromossomos Dicêntricos

Cromossomos dicêntricos são cromossomos que apresentam dois centrômeros, pela junção de dois segmentos cromossômicos. São eventos raros e em virtude de seus dois centrômeros, os cromossomos dicêntricos tendem a quebrar-se na anáfase; contudo, se os dois centrômeros estiverem próximos, ou se um for inativado, um cromossomo dicêntrico pode ser estável (THERMAN et al., 1974).

1.3.2.2 Rearranjos Cromossômicos Balanceados

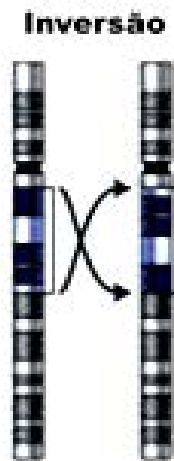
Nos rearranjos balanceados ocorrem mudanças na localização dos genes sem haver perda de material genético e as informações genéticas permanecem inalteradas, sendo que os rearranjos cromossômicos balanceados são classificados em: inversões e translocações.

1.3.2.2.1 Inversão Cromossômica

Inversão é a ocorrência de quebras em duas posições e o segmento intermediário gira em um ângulo de 180° e a sua consolidação ocorre em posição

invertida do fragmento ao restante do cromossomo (Figura 15). As inversões podem envolver quebras de um mesmo braço cromossômico, ser paracêntricas, ou inversões pericêntricas quando o fragmento cromossômico invertido envolver o centrômero (THOMPSON *et al.*, 1993).

Figura 15: Figura representativa da formação de inversão cromossômica



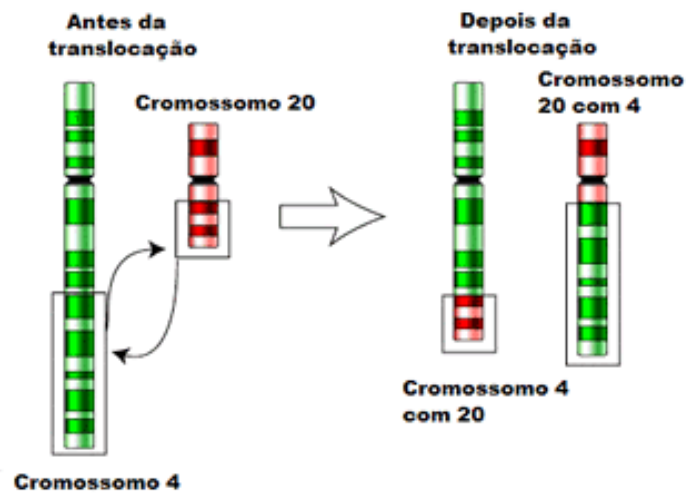
Fonte: <http://www.sobiologia.com.br/Genetica/genesnaoalelos10.php>

1.3.2.2 Translocação Cromossômica

As translocações cromossômicas consistem em trocas de segmentos entre cromossomos não homólogos (GUERRA, 1988) (Figura 16). Um gene de fusão pode ser criado quando a translocação se une a outros dois genes separados, este evento é comum no câncer. Isto é detectado na citogenética ou em um cariótipo das células afetadas. Existem dois tipos principais de translocação cromossômica: translocação recíproca ou a translocação Robertsoniana.

As translocações recíprocas são geralmente uma troca de material entre cromossomos não homólogos. Elas são encontradas em cerca de 1 em cada 625 recém-nascidos (VAN DYKE *et al.*, 1983).

Figura 16: Figura representativa da formação de traslocação cromossômica



Fonte: <http://www.sobiologia.com.br/Genetica/genesnaoalelos10.php>

As translocações Robertsonianas envolvem dois cromossomos acrocêntricos que se fundem próximo a região do centrômero com perda dos braços curtos. O cariótipo humano resultante tem apenas 45 cromossomos devido a união de dois cromossomos. As translocações Robertsonianas já foram observadas envolvendo todas as combinações de cromossomos acrocêntricos. Ohno e colaboradores, 1961 observou que há uma tendência para cromossomos acrocêntricos em formar um nucléolo comum durante a mitose e postularam que translocações Robertsonianas, poderiam ocorrer durante mitose ou meiose I como resultado da troca cromática entre acrocêntricos que foram associados pelos mesmos nucléolos.

Algumas doenças humanas podem ocorrer devido à translocações: câncer, principalmente leucemia mieloide aguda e leucemia mieloide crônica, infertilidade e uma pequena porcentagem de portadores da Síndrome de Down (MALUF; RIEGEL, 2011).

1.4 Citogenética Clássica

A citogenética clássica se iniciou em 1902, com a hipótese de que os fatores responsáveis pela transmissão de características estavam localizados nos cromossomos, formulada por Boveri e Sutton (LACADENA, 1996). Sendo esta uma das metodologias mais tradicionais em genética humana, utilizada para a detecção de alterações cromossômicas numéricas e estruturais as quais estão associadas a determinadas doenças e síndromes genéticas.

Para se estabelecer o número de cromossomos presentes em uma célula é necessário que, durante a preparação da amostra, a célula seja rompida e os cromossomos se espalhem pela lâmina. Isso era praticamente impossível antes de 1956 onde todas as preparações resultavam em cromossomos sobrepostos. Um procedimento extremamente simples, o tratamento das células com uma solução hipotônica (choque hipotônico), permitiu a observação inequívoca dos cromossomos humanos permitindo Tijo e Levan, neste mesmo ano, publicarem que células pulmonares de embrião humano têm 46 cromossomos. A partir dessa mudança nos métodos de preparação, a citogenética clássica inicia seu desenvolvimento e torna-se uma das áreas de pesquisa predominantes desde a década de 70.

Vários tipos de tecidos humanos podem ser usados para a preparação dos cromossomos e posterior análise do cariótipo. A escolha do tecido depende do tipo de paciente, propósito do diagnóstico e da indicação clínica. Conseqüentemente, as técnicas de cultura de tecidos tem se tornado parte integrante e fundamental da pesquisa cromossômica. O sangue é o tecido mais utilizado para o diagnóstico citogenético, devido a grande variedade de casos clínicos que podem ser elucidados com o cariótipo. A medula óssea também passou a ser utilizada devido o desenvolvimento dos estudos citogenéticos em relação às doenças hematológicas. Estes estudos genéticos ajudam no diagnóstico, prognóstico e na terapia das diferentes leucemias (MALUF; RIEGEL, 2011).

Qualquer que seja o tecido utilizado para a preparação cromossômica, este deve crescer em uma cultura de curta duração, 48 a 72 horas. Entretanto, algumas variações nas condições das culturas têm sido adotadas para maior e mais

rápida proliferação celular, bem como maior quantidade de células mitóticas e melhor resolução dos cromossomos.

As técnicas de citogenética clássica compreendem a cultura de linfócitos com bandamento G.

1.4.1 Cultura de Linfócito do Sangue Periférico

A cultura de linfócitos para a obtenção de metáfases se baseia na técnica de Moorhead *et al.* (1960). As melhores células para o cultivo são os leucócitos, mais especificamente os linfócitos T, por serem capazes de se dividir com maior facilidade e estarem em maior concentração na circulação.

O meio de cultura ideal utilizado para a cultura de linfócitos é o Roswell Park Memorial Institute, RPMI 1640. Para que as células sejam cultivadas este meio deve conter nutrientes e fatores de crescimento. O mesmo é suplementado com soro bovino fetal e como medida adicional de segurança, penicilina e estreptomicina também são adicionados. Faz-se necessário ativar e induzir a proliferação de linfócitos humanos *in vitro* adicionando fitohemaglutinina (PHA), lectina de *Phaseolus vulgaris* (NOWELL, 1960).

As células do sangue periférico são cultivadas a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂ por um período de 72 horas.

A divisão celular após 72 horas é interrompida pela adição de colchicina, KaryoMAX®, por 40 minutos. Esta substância impede a formação do fuso acromático estagnando as divisões celulares na metáfase, etapa onde os cromossomos estão mais individualizados e condensados, sendo mais apropriada para análise do cariótipo. Após a ação da colchicina a cultura é transferida para tubo cônico, quando então será iniciado o processo de coleta e fixação das células.

A cultura celular é submetida a uma solução salina hipotônica (KCl) por um período de 15 a 20 minutos, provocando inchaço e separação dos cromossomos.

O material é lavado com ácido acético e metanol na proporção de 1:3 por no mínimo três vezes para limpar os restos de citoplasma. Após a última lavada do material, retiramos o sobrenadante, deixando *pellet* suficiente para pingar 2 a 3

gotas, em no mínimo, 10 lâminas. As lâminas são armazenadas em estufa de 60°C. Este período é necessário para que as lâminas “envelheçam”, tornando melhor a resolução das bandas dos cromossomos. Há diversas formas de preparar lâminas para análise citogenética e todas visam obter um bom espalhamento cromossômico.

1.4.2 Bandeamento Cromossômico

Em 1966, no Congresso Mundial de Genética Humana, em Chicago, USA, os cromossomos passaram a ser classificados em sete grupos cromossômicos, A,B,C,D,E,F e G (Tabela 1). O progresso na identificação dos cromossomos teve origem em 1968 e 1969, com o trabalho de Caspersson e colaboradores na Suécia. Os cromossomos humanos eram corados uniformemente com corantes que tinham afinidade por cromatina, como orceína e o giemsa. Com este tipo de coloração, somente as aneuploidias, ou seja, alterações numéricas podiam ser caracterizadas (ANDRADES-MIRANDA; MATTEVI, 2011). As aberrações estruturais dificilmente eram distinguidas, ou eram impossíveis de serem detectadas, sendo também impossível identificar cada elemento do par cromossômico ou até mesmo o próprio par (KEAGLE; GERSEN, 2005).

Tabela 1: Classificação dos cromossomos

| Grupo | Características | | Nº de Cromossomos | Pares Cromossômicos |
|-------|-----------------|-------------------------|-------------------|----------------------|
| | Tamanho | Posição do Centrômero | | |
| A | Grandes | Meta Submeta Meta | 6 | 1 2 3 |
| B | Grandes | Submeta | 4 | 4 e 5 |
| C | Médios | Submeta | ♀16 ♂15 | 6,7,8,9,10,11,12 e X |
| D | Médios | Acro | 6 | 13,14 e 15 |
| E | Pequenos | Submeta | 6 | 16,17 e 18 |
| F | Pequenos | Meta | 4 | 19 e 20 |
| G | Pequenos | Acro | ♀4 ♂5 | 21, 22 e Y |
| Total | | | 46 | |

Fonte: Elaborado pelo autor

Somente a partir de 1970, com o intuito de solucionar essa dificuldade, várias técnicas de bandeamento cromossômico e coloração foram desenvolvidas e aprimoradas. As técnicas de bandeamento cromossômico "expandiram" os horizontes da citogenética, e a primeira aplicação do bandeamento permitiu o pareamento cromossômico. Essas técnicas têm possibilitado compreender melhor as alterações cromossômicas que se estabelecem em cada genótipo (GUERRA,1988).

Vários métodos de bandeamento são empregados rotineiramente nos laboratórios de citogenética para identificação dos cromossomos e análise da estrutura cromossômica. As técnicas desenvolvidas foram divididas em duas categorias: produzir bandas ou faixas ao longo de toda a extensão do cromossomo que são bandas Q, R, G e marcar regiões específicas de alguns cromossomos ou de todos os cromossomos que são as bandas C, NOR e T.

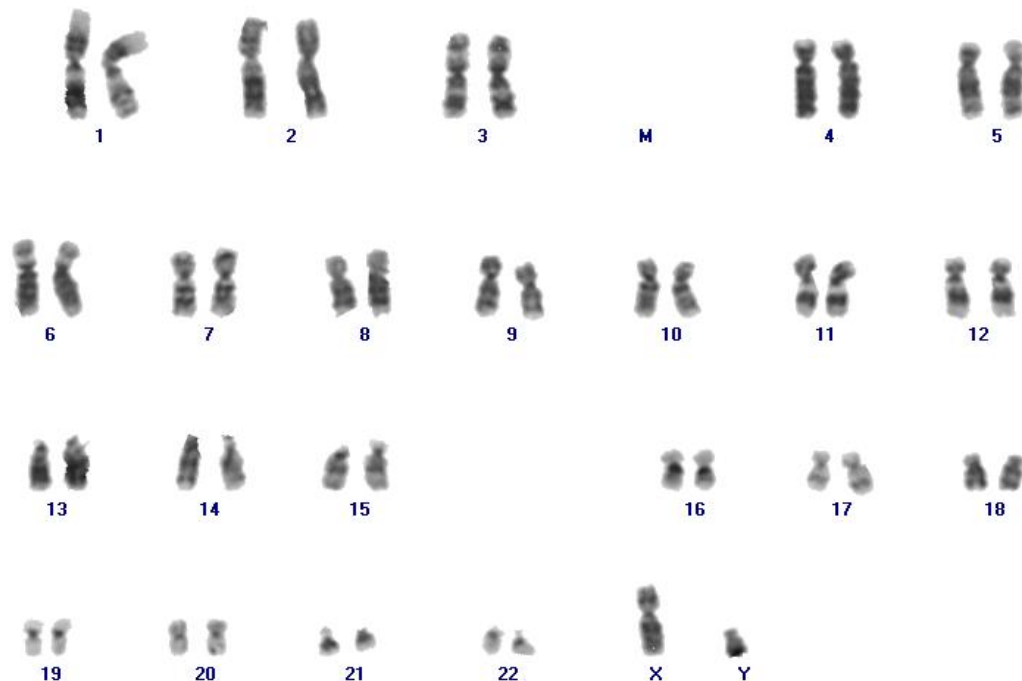
O bandeamento Q foi o primeiro método de marcação longitudinal, os cromossomos são submetidos a um tratamento com quinacrina mustarda, uma substância fluorescente e passam a apresentar faixas com diferentes intensidades de fluorescência, com um padrão de bandas brilhantes e opacas característico para cada par. Tais bandas foram designadas de bandas Q (de quinacrina). O material deve ser analisado em microscópio de fluorescência e as regiões brilhantes são ricas em AT. O bandeamento Q tem como importância a detecção de deleções, inversões e duplicações em seres humanos.

Para o bandeamento R, os cromossomos são tratados com solução salina e calor para desnaturação controlada e depois são corados com Giemsa. O resultado de bandas claras e escuras é típico de cada cromossomo e representa o inverso daquele produzido pelos bandeamentos Q e G, o que designa bandas reversas.

O bandeamento G é o método de diferenciação longitudinal dos cromossomos mais usados rotineiramente nos laboratórios de citogenética. Neste bandeamento os cromossomos são diferenciados por exibirem faixas transversais de espessura variável denominadas de bandas cromossômicas (Figura 17), onde cada cromossomo apresenta um padrão de bandas específico e intercalam bandas escuras com bandas mais claras, consoante a sua afinidade para a coloração. Esta

distinção é devida à diferente composição em bases nucleotídicas, ao tempo do ciclo em que ocorre a replicação, à conformação do cromossomo e ao número de genes e sequências repetitivas. As bandas escuras possuem regiões ricas em bases adenina e timina (AT), replicação tardia e poucos genes ativos. Já as bandas claras apresentam sequências ricas em citosina e guanina (CG), replicação precoce e muitos genes ativos, sendo, portanto biologicamente mais importantes (REGATEIRO,2003).

Figura 17: Cariótipo normal do sexo masculino 46, XY obtido através do bandeamento G



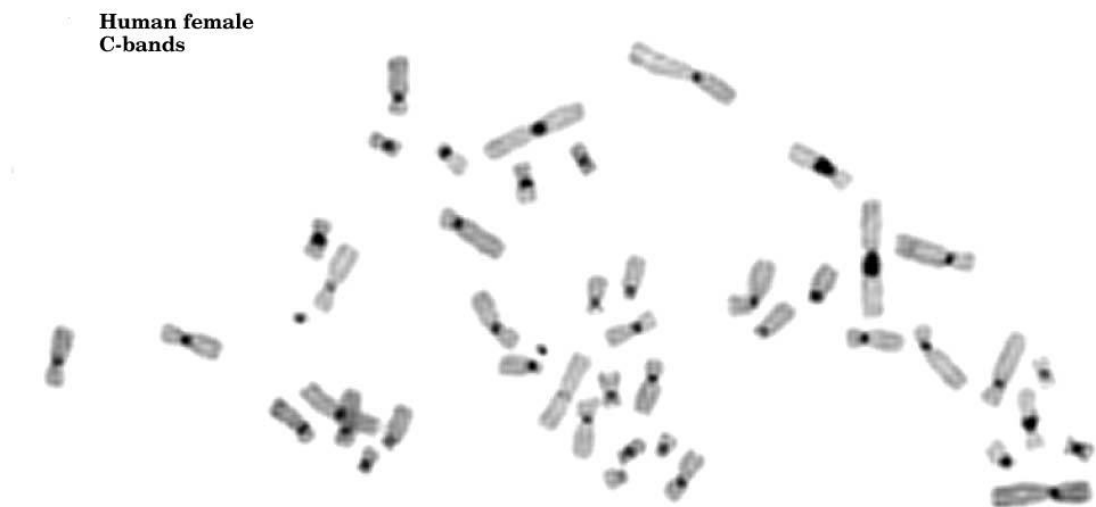
Fonte: Elaborada pelo autor

O bandamento G é o mais frequentemente usado e destina-se à identificação de forma precisa de cada par de cromossomos, suas diferentes regiões, tendo por base sua morfologia, tamanho e a presença de bandas, permitindo a detecção de aberrações numéricas e/ou estruturais, equilibradas ou não equilibradas. O padrão de bandas cromossômicas depende da técnica empregada e do corante. As bandas G constituem o bandamento “standart”, são produzidas por digestão enzimática das proteínas ou desnaturação das proteínas em alta temperatura.

Em 1972, Scheres descreveu que os cromossomos são tratados inicialmente com solução enzimática, tripsina, para a desnaturação das proteínas cromossômicas permitindo o bandamento cromossômico e em 1971, Seabright utilizando tampão citratado salino em alta temperatura observou que esta solução digere partes do DNA e permite visualizar faixas de coloração clara alternada com escura, quando corada por Giemsa, métodos de coloração convencional.

O bandamento C, cora especificamente regiões cromossômicas contendo heterocromatina constitutiva (classe de DNA altamente repetitivo), normalmente localizada nas áreas pericentroméricas, região ao redor dos centrômeros. O bandamento C é útil para detectar a presença de cromossomos dicêntricos ou pseudodicêntricos, para estudar cromossomos marcadores e variantes polimórficas (Figura 18).

Figura 18: Metáfase corada através do bandamento C.



Fonte: <http://pathology.washington.edu/galleries/Cytogallery>

A marcação das regiões organizadoras de nucléolo, bandamento RONS ou NORs, identifica os cromossomos portadores dos genes codificadores de RNA ribossomal 45 S. Normalmente encontrados nas regiões de constrições secundárias dos cromossomos metafásicos (BORGES-OSÓRIO & ROBINSON, 2002), onde os cromossomos são corados em suas regiões satélites, ou seja, na região

organizadora do nucléolo (construção secundária). A prata (Ag) é um dos corantes mais utilizados.

O bandeamento T marca as regiões teloméricas dos cromossomos (o que dá origem a esta denominação). Telômero é a ponta ou a extremidade terminal de cada cromossomo, tem a função de manter a estabilidade e a integridade cromossômicas.

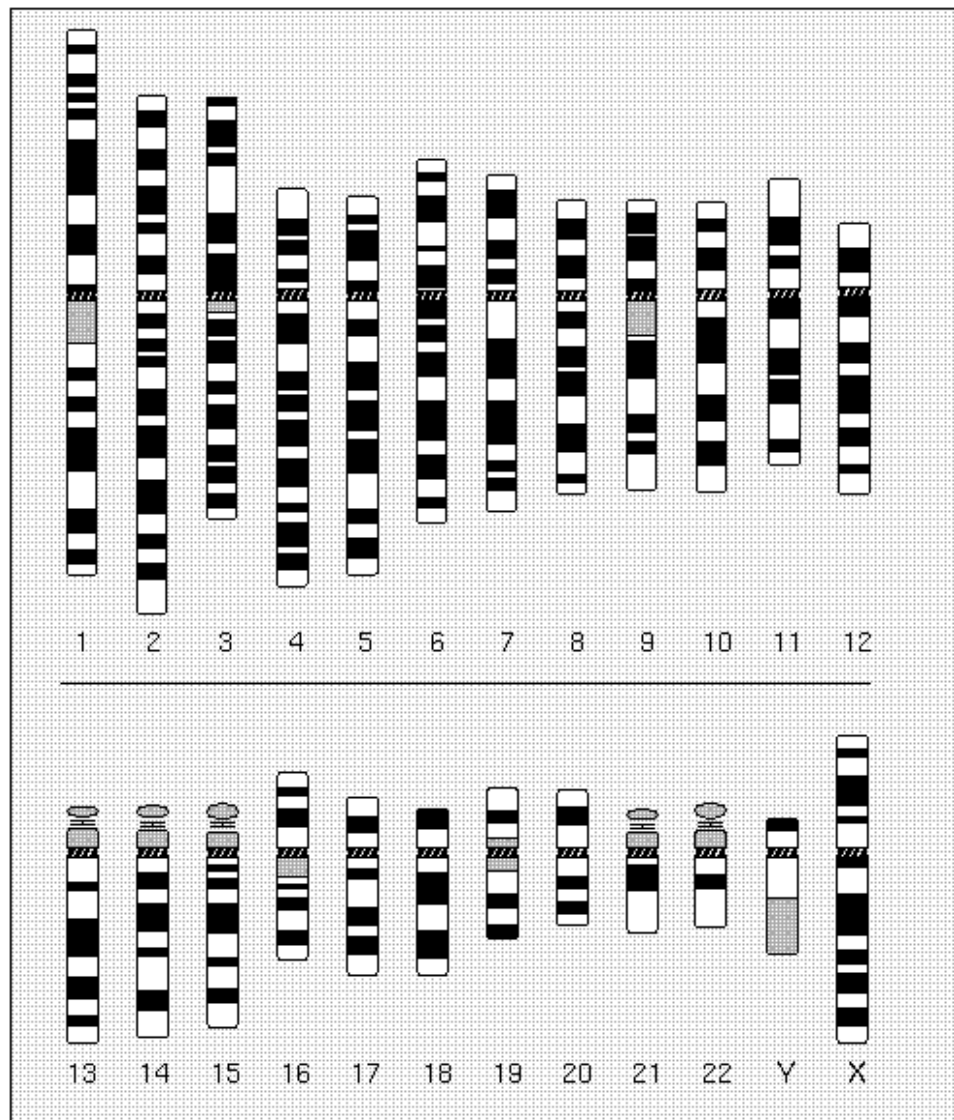
1.4.3 Cariótipo Humano

A representação do cariótipo pode ser feita na forma de idiograma ou de cariograma (Figura 19). O idiograma é a representação esquemática do cariótipo, utilizando valores médios da posição do centrômero e tamanho de cada cromossomo do conjunto haplóide. Esses valores são obtidos a partir de medições cromossômicas feitas em várias células de um indivíduo ou mesmo de vários indivíduos de uma espécie. O cariograma é construído a partir de uma fotografia ou do desenho detalhado de uma metáfase em que todos os cromossomos estão bem corados e individualizados. Esses cromossomos são analisados e os homólogos são emparelhados e numerados dentro de uma determinada ordem (GUERRA, 1988).

Os 46 cromossomos humanos formam 23 pares, sendo 22 de autossomos e um par sexual. Os pares de cromossomos autossomos são numerados de 1 a 22 em ordem decrescente de tamanho e os cromossomos sexuais recebem a notação X e Y. Os pares cromossômicos, incluindo os sexuais, são reunidos em sete grupos designados pelas letras de A até G (KASAHARA, 2003).

A análise consiste em procurar as metáfases ao microscópio, contá-las e comparar cada cromossomo com seu par na tentativa de detectar alterações estruturais ou numéricas. Atualmente, os laboratórios agilizam a cariotipagem com o uso de microscópio equipado com câmera captadora de imagem e um sistema computadorizado, que permite fazer o pareamento cromossômico através de software para cariotipagem.

Figura 19: Idiograma Humano



Fonte: <http://pathology.washington.edu/galleries/Cytogallery>

A nomenclatura utilizada para a descrição do cariótipo segue regras precisas estabelecidas pelo Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética (ISCN,1995). As regras básicas para a descrição estabelecem que o número de cromossomos deve ser primeiramente mencionado, seguido dos cromossomos sexuais, separados por vírgula. Desta forma um cariótipo normal para a espécie humana é designado 46,XX (sexo feminino) e 46,XY (sexo masculino).

As aberrações cromossômicas, quando presentes, são descritas após a designação do sexo, separadas por vírgula e utilizando os símbolos que denotam a anomalia. Aberrações numéricas por exemplo devem ser identificada colocando uma

vírgula a seguir dos cromossomos sexuais com sinal + ou – seguido do autossomo em causa, exemplo 47,XX,+21 (trissomia do cromossomo 21 ou Síndrome de Down); 45,XY,-7 (monossomia do cromossomo 7 ou Síndrome de Williams). Que quando a anomalia numérica ocorre nos cromossomos sexuais esta é identificada diretamente a partir da escrita desses cromossomos (exemplos: 45,X – Síndrome de Turner; 47,XXX – Síndrome de Klinefelter do sexo feminino; 47,XXY – Síndrome de Klinefelter do sexo masculino (BARCH; KNUTSEN; SPURBECK,1997; HEIM; MITELMAN, 1995).

Nas aberrações cromossômicas estruturais são utilizadas abreviações para descrever os cromossomos (Tabela 2). A letra designando a alteração deve ser minúscula seguida entre parênteses, dos dois cromossomos envolvidos separados por ponto e vírgula e novamente entre parênteses o braço e a banda respectivamente de cada cromossomo envolvido, ex: 46,XX,t(8;21)(q22;q22) observada em Leucemia Mielóide Aguda (REGATEIRO, 2003).

Tabela 2: Abreviações das a anomalias cromossômicas pelas normas do ISCN.

| Anomalia Cromossômica | Abreviatura |
|--------------------------------|--------------------|
| Deleção | del |
| Duplicação | dup |
| Cromossomo em anel | r |
| Isocromossomo | i |
| Cromossômico dicêntrico | dic |
| Inversão | inv |
| Translocação | t |

Recomenda-se que sejam analisadas no mínimo 20 metáfases, cujos cromossomos foram contados a partir da identificação e classificados de acordo com os critérios do ISCN – 2005 (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*). Um clone é definido como a observação da mesma alteração estrutural em pelo menos duas metáfases ou da mesma alteração numérica (monossomia ou trissomia) em pelo menos três células.

A definição de cariótipos normais e de aberrações cromossômicas de maior ocorrência tem permitido o esclarecimento do funcionamento da maquinaria genética, dos padrões de evolução cariotípica e revelado os danos cromossômicos relacionados com as doenças humanas, contribuindo como uma importante ferramenta no prognóstico e diagnóstico clínico (HENG *et al.*, 2006).

Para análise de cariótipos humanos pode ser utilizado um sistema automatizado. O sistema captura imagens de cromossomos metafásicos, diretamente do microscópio acoplado a uma câmera filmadora. Estas imagens são enviadas para uma unidade central de processamento, onde o software organiza os pares cromossômicos pelo tamanho. Durante este procedimento uma série de rotinas permite ao usuário não só a manipulação da imagem como um todo, mas também, dos cromossomos individualmente. O cariótipo, assim obtido, pode ainda ser comparado com um padrão de bandas existentes, permitindo os ajustes finais. O software agiliza a análise cariotípica, dispensando alguns procedimentos manuais como o registro fotográfico, o recorte e a montagem manual dos pares cromossômicos.

2.0 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Realizar análises citogenéticas comparando metodologias aplicadas em diferentes serviços.

2.2 Objetivo Específico

Comparar as metodologias aplicadas no bandeamento G para auxiliar na visualização do cariótipo e assessorar no diagnóstico, classificação, escolha da melhor opção terapêutica, acompanhamento e monitoramento do tratamento de certas doenças.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho, foi realizado um estudo comparativo qualitativo.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, em 20 de maio de 2014 sob o número do parecer 654.887.

3.1 Seleção

Foram estudados 20 indivíduos que voluntariamente concordaram em participar da pesquisa realizada no Departamento de Hematologia e Hemoterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu entre julho de 2014 a outubro de 2014. Para esses voluntários foi explicada a finalidade da pesquisa e em caso de concordância, foi solicitada a assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE), exigência da resolução nº196/96, do Conselho Nacional de Saúde.

3.2 Materiais

Para atingir o objetivo proposto no presente estudo, foram preparados os seguintes reagentes:

3.2.1 Meio de Cultura para Cariótipo

O meio de cultura para cariótipo foi preparado em Becker contendo 60 ml de Roswell Park Memorial Institute, RPMI – 1640 (MOORHEAD *et al.*, 1960), uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular onde as células ou as moléculas de DNA são mantidas em condições satisfatórias, suplementado com 30 ml de soro bovino fetal, 01 ml de penicilina e estreptomicina, como medida adicional de segurança e 1,5 ml de fitohemaglutinina (PHA), lectina de *Phaseolus vulgaris*, esta dotada das propriedades para ativar e induzir a proliferação de linfócitos humanos *in vitro* (NOWELL, 1960).

Foram feitas alíquotas, sob fluxo laminar, de 5 ml desse meio em tubo cônico de plástico estéril graduado, identificados com a data da fabricação, data de validade

e número lote que consta em planilha de preparação dos reagentes (Anexo 02). A estabilidade do meio de cultura para cariótipo é de 1 mês a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.2 Colchicina

A colchicina é um agente antimitótico, alcaloide que inibe a polimerização das proteínas do fuso mitótico, parando a divisão celular na metáfase, onde os cromossomos se encontram no maior grau de condensação, assim a célula não entra no próximo estágio de divisão, permanecendo no estágio da metáfase facilitando a observação do cromossomo (SNUSTAD; SIMMONS, 2008)

A Solução comercialmente utilizada foi KaryoMAX® COLCEMID® Solution, da marca Gibco® em Tampão Fosfato Salino (PBS) a $10\text{ }\mu\text{g/ml}$, estocada de 2 a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3 Solução Hipotônica De Cloreto De Potássio 0,075 M

A solução Hipotônica de Cloreto de Potássio 0,075M permite o intumescimento das células e separação das cromátides e foi obtida a partir da adição de 5,59 gramas de Cloreto de Potássio em quantidades suficientes para 1000 ml de água deionizada que foi purificada em um sistema Milli-Q, fornecido pela Millipore Corporation®.

Após a sua preparação o Ph é medido e ajustado com Hidróxido de Sódio (NaOH) ou Acido Clorídrico (HCl), o mesmo deve estar entre 5,5 e 6,0.

Foram feitas alíquotas de 50 ml em frasco âmbar, identificados, data de fabricação, data de validade, Ph e nº lote. A estabilidade da solução é de 3 meses a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A solução para uso diário fica estocada a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ em estufa e é estável por 1 mês.

3.2.4 Fixador

O fixador é utilizado para a preservação do cromossomo e foi utilizado 30 ml de Metanol, 10 ml de Ácido Acético Glacial sendo que o mesmo deverá ser preparado no momento do uso e conservado em geladeira. A fixação é uma etapa extremamente importante para a obtenção de bons resultados, especialmente em técnicas de bandamento cromossômico.

3.2.5 Corante Giemsa

A coloração de Giemsa é utilizada para análise cromossômica principalmente o bandamento (MALUF; RIEGEL, 2011).

3.2.5.1 Solução Estoque

A preparação da solução de Giemsa para estocagem foi realizada a partir de 1 grama de Giemsa em pó para 54 ml de glicerina. A mistura foi mantida a 60°C em Banho Maria de 1 hora e 30 minutos à 2 horas, homogeneizando sempre. Após esse período, aguardou-se que a solução atingisse a temperatura ambiente e foi adicionado 84 ml de Metanol Absoluto, sendo então armazenado em frasco âmbar a temperatura ambiente até a sua utilização.

3.2.5.2 Solução de Giemsa para Uso Diário

Foram acrescentados em 48 ml de Tampão Fosfato Ph 6,8 2 ml da solução estoque de Giemsa.

3.2.6 Tripsina

A tripsina permite uma digestão enzimática das proteínas cromossômicas (GUSTASHAW, 1991).

3.2.6.1 Solução Mãe

Foi diluída 1 grama de Trypsina (1:250)[®] em quantidades suficientes para 100 ml de água deionizada em balão volumétrico de 100 ml e deixada em repouso por 1 hora.

Foram feitas alíquotas de 5,0 ml em frascos de vidro, congelados e identificados com data de fabricação, data de validade e nº lote. A estabilidade da solução mãe é de 3 meses a – 20°C.

3.2.6.2 Solução de Tripsina para Uso Diário

Em 45 ml de tampão Fosfato Ph 6,8 a 37°C foi adicionada a solução mãe alíquotada de tripsina.

3.2.7 Tampão Fosfato

Os fosfatos têm como finalidade manter o pH constante, quando adicionados a diferentes meios.

3.2.7.1 Tampão Fosfato 0,06 M pH 6,8

Foram preparadas a solução A utilizando 4,2588 gramas de Fosfato de Sódio Dibásico dissolvidos em 500 ml de água destilada e solução B 4,8992 gramas de Fosfato de Potássio Monobásico dissolvidos em 600 ml de água destilada e deixadas até total dissolução em agitador magnético. Foram misturadas 409 ml da solução A e 510 ml da solução B, verificado o pH e armazenado em frasco âmbar com estabilidade de 2 meses a 4°C; o restante das soluções é reservado separadamente para ajustes de Ph, sendo a solução A para aumentar o pH e a solução B para diminuir o pH.

Para o uso são filtrados 100 ml da solução e mantidos a temperatura ambiente.

3.2.7.2 Tampão Fosfato Salino pH 7,2 – 7,3

A solução de Fosfato Salino (PBS) foi preparada a partir da adição de 2,21 gramas de Fosfato de Sódio Dibásico (Na_2HPO_4 – 7,78 mM), 0,64 gramas de Fosfato de Potássio Monobásico (KH_2PO_4 – 2,20 mM), 16,2 gramas de Cloreto de Sódio (NaCl – 140 mM), 0,405 gramas de Cloreto de Potássio (KCl – 2,73 mM) em quantidades suficientes para 2000 ml de água Milli-Q. e armazenada a 4°C por 3 meses.

3.2.7.3 Tampão Salino Citratado

Para o tampão salino citratado foram adicionados 17,53 gramas de cloreto de sódio e 8,82 gramas de citrato de sódio em quantidades suficientes para 1000 ml. O pH foi ajustado em 7,0 utilizando hidróxido de sódio 1N.

3.2.8 Preparo das Lâminas

As lâminas foram lavadas com detergente Extran Alcalino, Merck®, repassadas por duas vezes em água corrente, finalizando-se o processo em água

destilada, para então serem acondicionadas imersas em fixador e conservadas a 4°C.

3.3 Métodos

3.3.1 Coleta das Amostras

No Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas do Departamento de Hematologia e Hemoterapia foram realizadas as coletas de sangue venoso periférico para o estudo citogenético e bandamento cromossômico. Os procedimentos de coleta seguiram as recomendações adotadas pelas normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Jorde, et al., 2004). No antebraço foi realizada antissepsia com álcool a 70% e puncionada a veia em um ângulo de 45°, com o bisel voltado para cima. Foram coletados 5 ml de sangue venoso em seringa estéril descartável com 0,1 ml de heparina sódica.

As amostras foram encaminhadas ao laboratório e processadas para a cultura celular no máximo em 1 hora após a coleta.

3.3.2 Cultura Celular

A cultura celular foi realizada pelo método de cultura *in situ*, seguindo a metodologia de Moorhead *et al.* (1960), modificada.

Antes da semeadura do meio de cultura este foi previamente preparado como descrito anteriormente e após o descongelamento foram adicionados 18 gotas de sangue heparinizado, agitado por inversão e incubados em estufa à temperatura de 37°C, numa atmosfera de 5% de gás carbônico durante 72 horas. As culturas celulares foram realizadas em duplicatas.

Aproximadamente 50 minutos antes de completar 72 horas foram adicionados a cada tubo 0,5 ml de colchicina misturados por inversão e retornados à estufa.

3.3.3 Colheita

Completando o período de 72 horas de cultura, inicia-se a colheita das culturas. Os frascos foram retirados da estufa e agitados para o desprendimento das células aderidas ao fundo.

O material foi centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm, desprezando-se o sobrenadante. Ao precipitado adicionou-se 10 ml de solução hipotônica (KCL) à 0,075M, pré-aquecida à 37°C pela parede do tubo, ressuspensando-o suavemente com pipeta de Pasteur e incubados por 16 minutos em estufa a 37°C, numa atmosfera de 5% de gás carbônico. Ao término deste período as células foram fixadas com 1 ml de solução gelada recentemente preparada de fixador e o material foi submetido a nova centrifugação por 10 minutos a 1500 rpm e em seguida o sobrenadante desprezado.

O material foi novamente ressuspensado com 5 ml de fixador e centrifugado por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. Esse procedimento é repetido por mais 2 vezes ou até que o sobrenadante esteja limpo.

Após a última centrifugação foi desprezado o sobrenadante até se obter uma concentração inicial de 1,0 a 0,5 ml para o preparo das lâminas.

3.3.4 Lâminas

Imediatamente foi realizada uma lâmina guia corada com Giemsa para verificação da presença do índice mitótico, observando-se a qualidade e o número de metáfases ao microscópio.

As lâminas imersas em fixador foram retiradas da geladeira, o excesso de fixador escorrido em gaze e papel de filtro e o material ressuspensado de cada cultura foi pingado sobre 10 lâminas, totalizando 20 lâminas por amostra. As lâminas foram colocadas em estufa à 60°C, por no mínimo, 2 horas.

3.3.5 Bandamento G

O bandamento G foi realizado de acordo com duas técnicas:

- Bandamento G por digestão enzimática das proteínas, segundo Scheres (1.972), com modificações: as lâminas após seu preparo e secagem foram envelhecidas durante o período mínimo de 24 horas em estufa bacteriológica à 37°C. Posteriormente foram mergulhadas em solução para uso de tripsina aquecida a 37°C, durante 3 à 7 segundos. Em seguida, para a interrupção da ação da tripsina, foram mergulhadas em solução tampão fosfato pH 6,8 à 37°C, sendo logo em seguida lavadas com água destilada. Posteriormente o material foi corado com o corante Giemsa (Figura 20).
- Bandamento G com solução tampão citratado em alta temperatura, segundo Seabright (1.971), com modificações: as lâminas após seu preparo foram envelhecidas durante o período mínimo de 2 dias em estufa bacteriológica à 37°C ou 1 hora em placa aquecida a 88°C. Após esse período foram mergulhadas durante 90 segundos em solução tampão citratado aquecido à 72°C e posteriormente lavadas em água destilada. Em seguida o material foi corado com o corante Giemsa (Figura 21).

3.3.6 Análise de Preparações Citológicas

A coloração dos cromossomos com bandas G foram efetuadas segundo os métodos *standard*, Giemsa e analisadas ao microscópio óptico utilizando as objetivas de 10X e 100X (este último com o auxílio de óleo de imersão), para localização e análise respectivamente das metáfases.

A captura e análise das imagens foram efetuadas com uma câmera fotográfica acoplada ao microscópio Olympus BX 40® e um sistema de análise completo para cariótipo possibilitando um relatório em PDF contendo a imagem original, o cariótipo, o histórico do paciente e o laudo.

Figura 20 – Bandeamento pela tripsina



Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 21 – Bandeamento pelo Tampão Citratado



Fonte: Elaborada pelo autor

4.0 RESULTADOS

Em todas as amostras foram obtidas metáfases com índice mitótico satisfatório e adequados para análise. O bandeamento cromossômico pela técnica utilizando a solução de tripsina foi realizado à 37°C, sendo que para o seu preparo são necessário 3 etapas e a estabilidade do reagente é apenas de 1 dia, foram necessárias várias tentativas de tempo de exposição da lâmina à solução e o mesmo ocorreu entre a 3ª e 5ª lâmina, sendo utilizada de 01 a 10 lâminas para se alcançar um protocolo ideal na verificação do bandeamento cromossômico sendo que em uma amostra não foi possível a obtenção do bandeamento por ter se esgotado todas as lâminas. Através da técnica com solução tampão salino citratado a temperatura ideal é de 72°C, a solução é preparada em uma única etapa e sua estabilidade é de 3 meses e o bandeamento ocorreu em número menor de tentativas devido ao tempo fixo de exposição da lâmina para se conseguir o bandeamento cromossômico que ocorreu entre a 1ª e a 3ª lâmina (Tabela 3,4, 5 e 6).

Os custos referentes aos reagentes utilizados em ambas as técnicas demonstrou uma diferença significativa (Tabela 7).

Tabela 3: Sequência de lâminas para o bandeamento cromossômico

| Sequencia de laminas | Quantidade de amostras/tripsina | Quantidade de amostras/tampão citratado |
|----------------------|---------------------------------|---|
| 1ª | 01 | 06 |
| 2ª | 01 | 07 |
| 3ª | 03 | 04 |
| 4ª | 05 | 02 |
| 5ª | 07 | 01 |
| 6ª | 01 | 00 |
| 10ª | 01 | 00 |
| 11ª | Insucesso | 00 |
| | 20 | 20 |

Tabela 4: Bandeamento Cromossômico pela Tripsina

| L* | L1 | L2 | L3 | L4 | L5 | L6 | L7 | L8 | L9 | L10 |
|-------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| AM** | | | | | | | | | | |
| AM1 | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| AM2 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| AM3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| AM4 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| AM5 | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| AM6 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| AM7 | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| AM8 | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| AM9 | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| AM10 | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| AM11 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| AM12 | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| AM13 | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| AM14 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| AM15 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| AM16 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| AM17 | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| AM18 | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| AM19 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| AM20 | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + |

Notas:

* Quantidade de lâminas submetidas ao bandeamento G pela tripsina.

** Número de amostras

+ Ocorrência do Bandeamento G pela tripsina

- Ausência do Bandeamento G pela Tripsina

Tabela 5: Bandeamento Cromossômico pelo Tampão Citratado

| L | L1 | L2 | L3 | L4 | L5 | L6 | L7 | L8 | L9 | L10 |
|-------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| AM | | | | | | | | | | |
| AM1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| AM2 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| AM3 | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| AM4 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| AM5 | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| AM6 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| AM7 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| AM8 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| AM9 | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| AM10 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| AM11 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| AM12 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| AM13 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| AM14 | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| AM15 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| AM16 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| AM17 | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| AM18 | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| AM19 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| AM20 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Notas:

* Quantidade de lâminas submetidas ao bandeamento G pela tripsina.

** Número de amostras

+ Ocorrência do Bandeamento G pelo Tampão Citratado

- Ausência do Bandeamento G pelo Tampão Citratado

Tabela 6: Comparação das técnicas para o bandeamento cromossômico

| | Solução Tripsina | Tampão Citratado |
|-------------------------------------|--|--|
| Temperatura | 37°C | 72°C |
| Preparo da solução | 03 etapas | 01 etapa |
| Estabilidade | 01 dia | 3 meses |
| Tempo de Exposição da lâmina | Variável 3 – 7 segundos | Fixo 90 segundos |
| Bandeamento | Entre a 3 ^a e 5 ^a sequência de lâminas | Entre a 1 ^a e a 3 ^a sequência de lâminas |

Tabela 7: Custo das soluções utilizadas para o bandeamento cromossômico

| Solução | Preço/litro |
|-------------------------|--------------------|
| Tripsina | |
| Tripsina/l | R\$ 178,10 |
| Tampão fosfato/l | R\$ 34,63 |
| Total R\$ 212,73 | |
| Tampão Citratado | |
| Citrato de sódio/l | R\$ 0,20 |
| Cloreto de sódio/l | R\$ 0,20 |
| Total R\$ 0,40 | |

5.0 DISCUSSÃO

A Citogenética convencional com bandeamento G pela ação da tripsina é considerada padrão-ouro, segundo Regateiro, 2007 permitindo a avaliação de uma linhagem celular que tem como objetivo tornar visível as bandas de cada cromossomo, permitindo assim identificá-los e avaliar possíveis aberrações e por fazer parte do processo de classificação, fornecer informações que contribua para definição do prognóstico. É considerado um teste diferencial a ser obrigatoriamente utilizado para o diagnóstico de certas doenças, principalmente as doenças hematológicas.

Guerra e Souza, 2002 descrevem, na metodologia empregada, infundáveis detalhes, como numerosas lavagens, frações de tempo e temperatura muito precisas, produtos de marca e estoques específicos, etc, parecendo assim extremamente meticolosos. Essas variantes técnicas muito minuciosas raramente foram definidas com base em experimentos adequadamente controlados e repetidos, e só muito raramente têm alguma importância para a repetição da técnica por outro pesquisador.

A análise do bandamento G, embora mais demorada e dependente da obtenção de metáfases em boas condições, tem uma importância fundamental na detecção de alterações cromossômicas, segundo Cortez, 2003.

Assim, fatores como custo-benefício, material disponível, agilidade no diagnóstico e a necessidade de busca do tratamento mais eficaz são essenciais na escolha do melhor método a ser aplicado.

São inúmeras as vantagens da padronização do protocolo de bandamento G: confiabilidade, agilidade, maior segurança na relação laboratório, médico e cliente, aumento da qualidade técnica e, principalmente, aumento da qualidade no atendimento aos clientes. Em geral também a redução de custos se inclui devido o fato de não serem necessários repetições da técnica e gastos com reagentes. Entre outros benefícios a dedicação para entender melhor a tecnologia possa contribuir muito para a evolução e até para o crescimento do laboratório.

Quando se trata de testes genéticos, é fundamental que o médico possa contar com o laboratório na própria unidade de atendimento criando um elo, a padronização da técnica de bandeamento G pela solução de tampão salino citratado

demonstrou agilidade no diagnóstico completo e conclusivo da afecção hematológica que acomete determinados pacientes.

A presença de um serviço de genética em hospitais melhora a qualidade de vida dos pacientes e permite que eles recebam informação sobre o risco da doença, de recorrência, acessando assim maior confiabilidade na equipe médica e laboratorial além de evitar desperdícios decorrentes da realização inadequada de exames e demora nos resultados. Tais benefícios justificam a implantação desta técnica para que este tipo de serviço funcione.

6.0 CONCLUSÃO

O bandeamento cromossômico foi observado em todas as amostras submetidas ao tampão citratado, já nas amostras com a solução de tripsina o mesmo não foi possível.

Após diversas comparações e testes entre as técnicas analisadas foi possível estabelecer um protocolo para citogenética convencional pela técnica de bandeamento G, utilizando tampão citratado apresentando maior benefício.

Assim, a análise comparativa entre as técnicas mencionadas foi uma alternativa de protocolo simples, produtivo, ágil e de menor custo. Tais benefícios justificam a implantação da técnica de bandeamento cromossômico pelo tampão citratado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBERTINI,R.J. et al. **IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans**. Mutation Research, v. 463, n. 2, p. 111-172, 2000.
2. **An International System for Human Cytogenetic Nomenclature**. ISCN: Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature, Memphis, Tennessee, USA, 1995.
3. ANDRADES-MIRANDA, J.; MATTEVI, M. S. **Técnicas de bandeamentos e coloração cromossômica**. Em: MALUF, S. W.; RIEGEL, M. Citogenética humana – Artmed.Porto Alegre, 2011.p:63-69.
4. BAMSHAD, J.M.et al. **Genética Médica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltda., 2004.
5. BARCH, M.J.; KNUTSEN, T.; SPURBECK, J.L. **The AGT cytogenetics laboratory manual**. 3 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997.
6. BEIGUELMAN, B. **Citogenética Humana**. [s.n.]. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.
7. BORGES-OSÓRIO, M. & ROBINSON, W. **Genética humana**. PortoAlegre: [s.n.], Artmed., 2002. 459p.
8. GARDNER, R.J.M.; SUTHERLAND, G. **Pregnancy loss and infertility. In: Chromosome abnormalities an genetic counseling**. [s.n.]. Oxford University: Press Oxford, 1996.
9. GRIFFITHS, A.J. et al. **Introdução à genética**. 9. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2009.
10. GUERRA, M.S. **Introdução à Citogenética Geral**. [s.n.]. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.
11. HARDY P. A.; ZACHARIAS H. **Reappraisal of the Hansemann-Boveri hypothesis on the origin of tumors**. Cell biology international. v. 12. p. 983 - 992, 2005. Disponível em:<
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/j.cellbi.2005.10.001/abstract>>.
Acesso em: 25 nov. 2014.
12. HEIM, S.; MITELMAN, F. **Cancer Cytogenetics: Chromosomal and molecular aberrations of tumor cells**. 2.ed. Wiley-Liss, Inc. 1995.

13. HENG, H. H. et al. **Stochastic cancer progression driven by non-clonal Chromosome aberrations**. *Journal of Cellular Physiology*, v.208, n. 2, p. 461 – 472, 2006.
14. JACOBS, P.A.; STRONG, J.A. **A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism**. *Nature*, v.183, p. 302 – 303, 1959. Disponível em: < <http://www.nature.com/scitable/content/A-Case-of-Human-Intersexuality-Having-a-16930>>. Acesso em: 20 nov. 2014.
15. KASAHARA, S. **Práticas de Citogenética**. Rio claro: [s.n.], 2003. 96p.
16. KEAGLE, M. B.; GERSEN, S. L. **The principle of clinical cytogenetics**. 2 ed. Totowa: NJ; 2005, p.63-79.
17. LACADENA, J R. **Citogenética**. 1. ed. Madrid: Complutense S.A., 1996. 931p.
18. LEWIS, R. **Genética humana conceitos e aplicações**. Rio de Janeiro: [s.n.], Guanabara Koogan, 2004. 487p.
19. MALUF, S.W.; RIEGEL, M. **Citogenética humana**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
20. MOORHEAD, P.S. et al. **Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood**. *Expi Cell Re.* v. 20.p.613 – 616, 1960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13772379>>. Acesso em: 24 nov. 2014.
21. MOTTA, P.A. **Genética humana aplicada a psicologia e toda a área biomédica**. Rio de Janeiro: [s.n.], Guanabara Koogan, 2000. 170p.
22. NOWELL, P.C et al. **Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood**. *Expi Cell Res.* V.20. P.613 – 616, 1960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13772379>>. Acesso em: 24 nov. 2014.
23. NOWELL, P.C. **Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes**. *Cancer Res.* V.20 p. 462 – 466, 1960. Disponível em: < <http://cancerres.aacrjournals.org/content/20/4/462.full.pdf>>. Acesso em: 25 nov. 2014.
24. NUSSBAUM, M. et al. **Genetics in Medicine**. 6.ed. Philadelphia: Saunders, 2004.
25. REGATEIRO, FJ, Chapters XII(2), XIV(2) XXII, In: **Manual de genética médica**. Coimbra, Imprensa da Universidade, 2003.

26. SCHINZEL, A. **Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man.** 2.ed. NY: Walter de Gruyter; 2001.
27. SEABRIGHT, M. **The use of proteolytic enzymes for the mapping of structural rearrangements of man.** *Chromosoma*. V. 36. p. 204 – 210, 1971.
28. SHIPPEY, C.A.; LAWLOR, E.; SECKER-WALKER, L.M. **Isochromosome 9q in acute lymphoblastic leukemia: a new non-random finding.** *Leukemia* : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K. 1989 ; 3 (3) : 195 – 199.
29. SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, J.M. **Fundamentos da Genética.** [s.n.]. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
30. THARAPPEL, A. **Human chromosome nomenclature: an overview and definition of terms.** In: GERSEN,S.; KEAGLE,M. *The principles of clinical cytogenetics*. New Jersey: Human Press, 1999. p.23 – 49.
31. THERMAN, E. et al. **Apparently isodicentric but functionally monocentric X chromosome in man.** *Am J Hum Genet*, v. 26, p. 83-92, 1974.
32. THOMPSON, M. et al. **Genética Médica.** 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1993.
33. TIJO, J.H.; LEVAN, A. **The chromosome number of man.** In: *Hereditas*. V.42 p. 1 – 6, 1956.
34. VAN DYKE, D.L., et al. **The frequency and mutation rate of balanced autosomal rearrangements in man estimated from prenatal genetic studies for advanced maternal age.** *Am. J. Hum. Genet.* v.35. p. 301 – 308, 1983. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6837576>>. Acesso em: 24 nov. 2014.
35. WARBURTON, D. **De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: Clinical significance and distribution of break points chromosomes.** *Am. J. Hum. Genet.*v. 49. p.995 –1013, 1991. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1928105>>. Acesso em: 24 nov. 2014.
36. YUNIS, J.J. et al. **The characterization of high-resolution G-banded chromosomes of man VIII.** v.67. p.293 – 307, 1976.
37. ZAHA, A.; FERREIRA, H.B.; PASSAGLIA, L.M.P. **Biologia Molecular Básica.** 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.