

TÉCNICAS CITOGENÉTICAS

Flávia Scapin

Cromossomos são estruturas filamentosas presentes no interior do núcleo celular que consistem, cada qual, de uma molécula de DNA supercondensada, juntamente com proteínas histonas e não-histonas. Até 1956 não se sabia exatamente o número de cromossomos da espécie humana. O desenvolvimento de técnicas adequadas, juntamente com o auxílio do microscópio, possibilitou a identificação de cada um deles, bem como a visualização adequada do seu conjunto. É atribuída a Tjio e Levan (da Suécia) e Ford e Hamerton (da Inglaterra) a descoberta de que o genoma humano é constituído por 46 cromossomos (ou 23 pares), sendo 44 autossômicos e 2 sexuais. A partir de então, a citogenética tem-se desenvolvido enormemente, trazendo grande contribuição não só para o estudo das doenças humanas, como também para estudos das populações normais, sua origem e evolução.

Os cromossomos não se apresentam uniformes ao longo de todo o seu comprimento; cada cromossomo apresenta uma constrição primária denominada centrômero. O centrômero divide o cromossomo em dois braços: o braço curto, designado por **p** (do francês *petit*) e o braço longo, em analogia, por **q**.

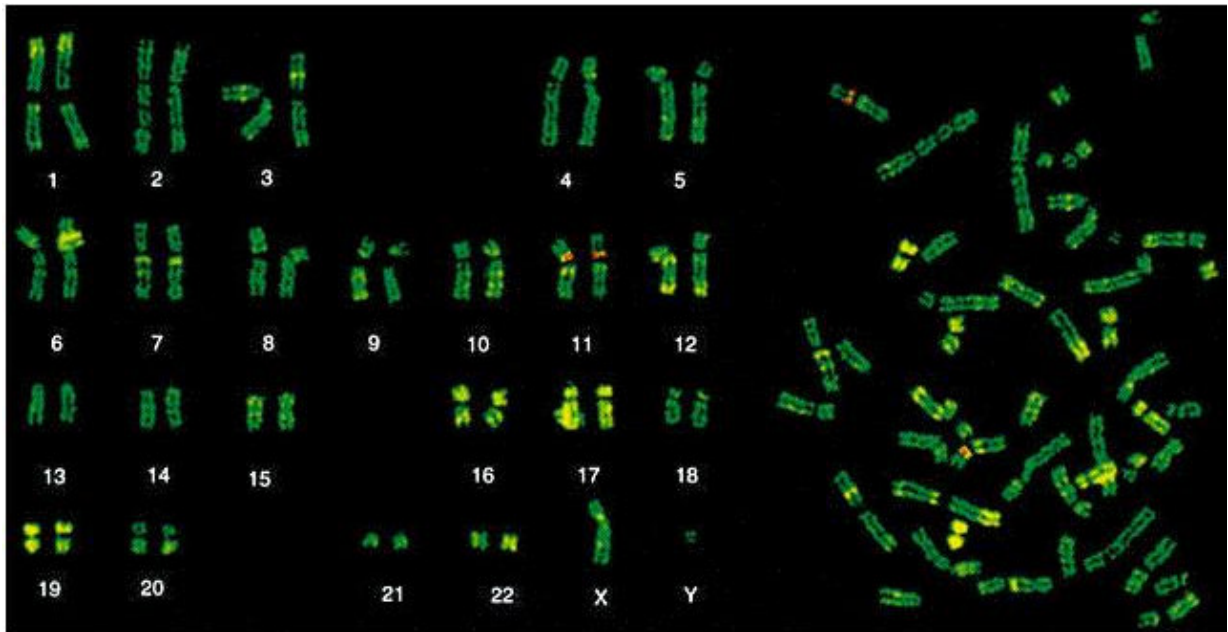
Morfologicamente os cromossomos são classificados de acordo com a posição do centrômero. Se este estiver localizado centralmente, o cromossomo é denominado metacêntrico; se próximo à extremidade, é acrocêntrico; se o estiver em uma posição intermediária, o cromossomo é submetacêntrico.

Mas os cromossomos não diferem somente pela posição dos centrômeros ou pelo seu tamanho, mas também por apresentarem um padrão característico de bandas. Por meio de técnicas de coloração especial, que coram seletivamente o DNA, cada par cromossômico é individualmente identificado; isto ocorre por apenas um breve período, durante a mitose, na metáfase, quando estão condensados ao máximo e quando os genes não podem ser transcritos.

Bandas Q

As primeiras bandas foram observadas quando lâminas contendo material cromossômico foram tratadas com quinacrina mostarda, uma substância fluorescente. Os cromossomos submetidos a esse tratamento apresentavam 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).

A análise deste material deve ser feita em microscópio de fluorescência, sendo que as regiões cromossômicas fluorescentes (brilhantes) são ricas em AT (adenina e timina). Esta técnica apresenta uma vantagem específica na identificação do cromossomo Y, que se cora intensamente com quinacrina, mesmo quando a célula está em interfase.



Além desta, novas técnicas de coloração foram desenvolvidas, melhorando sensivelmente a capacidade de identificação dos cromossomos. São as seguintes as principais técnicas disponíveis: bandas G, R, C, T, NOR, bandeamento de alta resolução e FISH (*fluorescence in situ hybridization*).

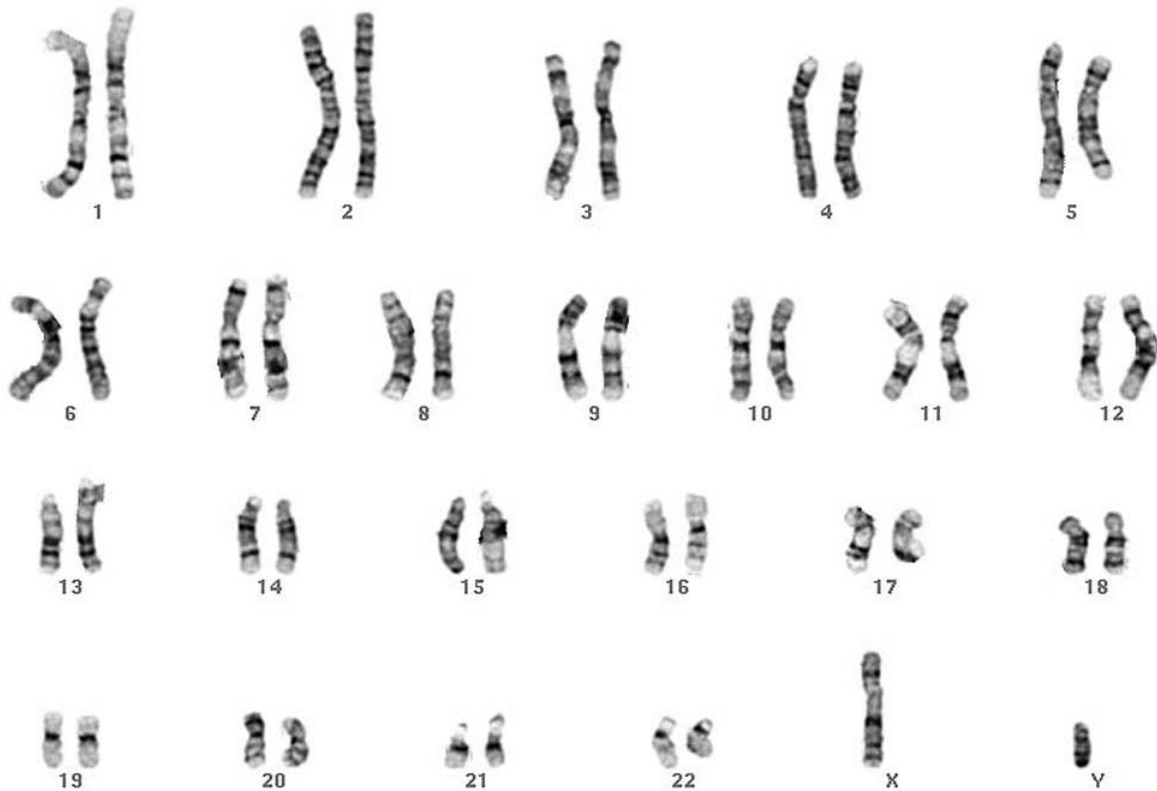
Bandas G

Esta técnica é a mais utilizada por ser simples e dispensar o uso de microscópio de fluorescência. Os cromossomos são submetidos à ação de uma enzima – a tripsina – que desnatura as proteínas cromossômicas, sendo corados posteriormente com Giemsa (de onde deriva o nome de bandas G).

Por esta técnica, são observadas aproximadamente 350 a 550 bandas por genoma haplóide; cada banda representa alguns genes ou até centenas deles (cerca de 5 a 10 x 10⁶ pares de bases).

Os cromossomos mostram um padrão de bandas claras e escuras, no qual as faixas escuras correspondem às bandas Q brilhantes e contêm DNA rico em bases AT e poucos genes ativos; as bandas G claras têm DNA rico em bases GC (guanina e citosina) e apresentam muitos genes ativos. Tal padrão é único para cada cromossomo humano e possibilita a definição inequívoca dos cromossomos normais. A maioria dos pontos de quebra e dos rearranjos cromossômicos parece ocorrer nas bandas claras.

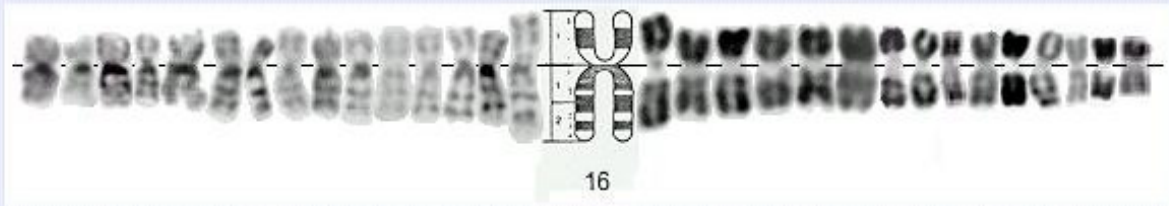
**Human male
G-bands**



Bandas R

Na obtenção destas bandas, os cromossomos são tratados com solução salina e calor para uma 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 (de onde deriva sua designação de bandas reversas). As bandas escuras são regiões ricas em GC, enquanto as claras contêm muito mais AT.

Chromosome 16



Chromosome 16 : G-banding, diagram and R-banding - Claude Léonard, Jean-Loup Huret

Bandas C

Após o tratamento com uma solução de hidróxido de bário, a coloração aqui também é feita com Giemsa. Com este método, são coradas regiões específicas: aquelas em que o cromossomo apresenta DNA altamente repetitivo, como nas regiões dos centrômeros e em outras regiões cromossômicas (ex: braço longo do Y), correspondendo à heterocromatina constitutiva, motivo de sua denominação.

**Human female
C-bands**



Bandas T

Marcam as regiões teloméricas dos cromossomos (o que dá origem a esta denominação). OBS: Telômero é a ponta ou a extremidade terminal de cada cromossomo. Tem a função de manter a estabilidade e a integridade cromossômicas.

Bandas NOR

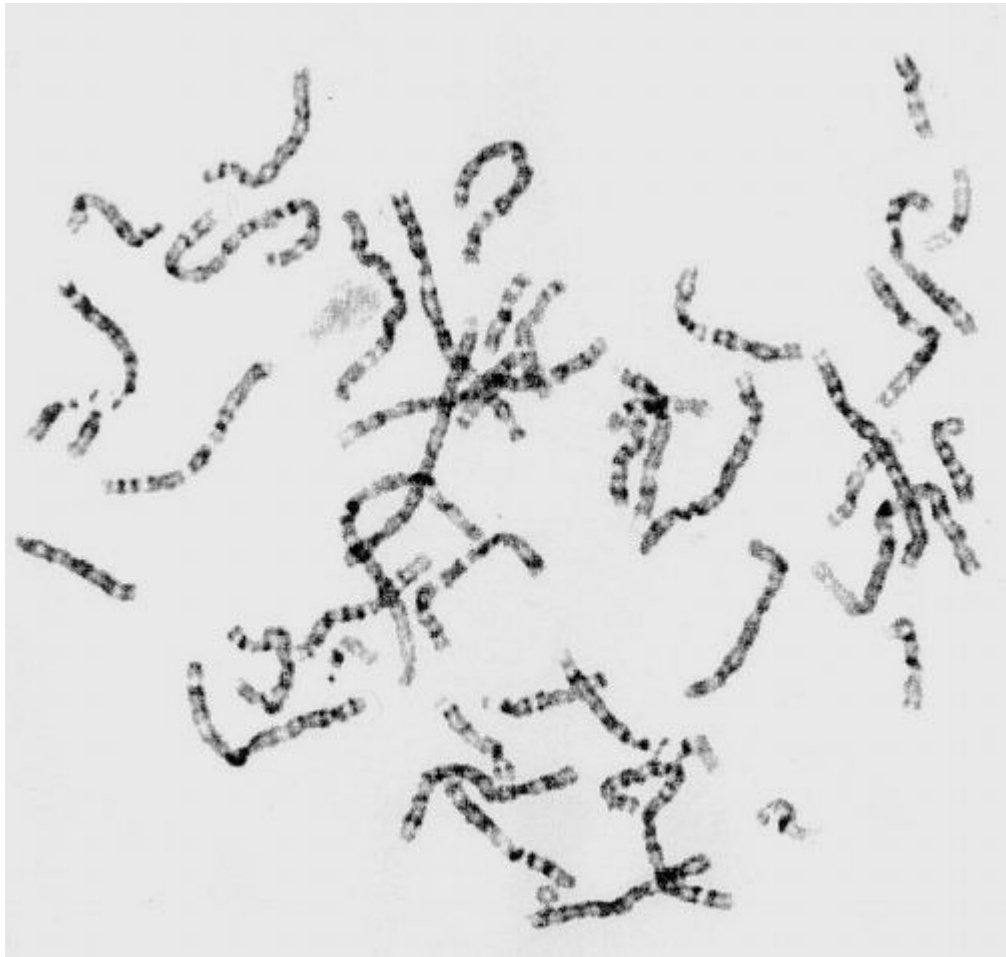
Coram especificamente as regiões organizadoras dos nucléolos, ou seja, as constricções secundárias dos cromossomos com satélites. OBS: Satélites são apêndices de forma pedunculada presentes nas extremidades dos braços curtos de cromossomos acrocêntricos, responsáveis pela formação dos nucléolos no período de intérfase celular, contendo múltiplas cópias repetidas dos genes para RNA ribossômico.

Chromosomes are treated with silver nitrate solution which binds to the Nucleolar Organizing Regions (NOR), i.e., the secondary constrictions (stalks) of acrocentric chromosomes.



Bandeamento de Alta Resolução

Atualmente têm sido desenvolvidas técnicas que permitem um exame mais detalhado dos cromossomos, em estágios mitóticos de prófase ou pró-metáfase, quando estão menos condensados, permitindo a visualização de mais de 800 bandas por genoma haplóide. Esta técnica pode ser utilizada para as bandas Q, G ou R e detecta alterações cromossômicas estruturais menores.



FISH

O progresso mais importante em citogenética nos últimos anos foi o desenvolvimento da tecnologia da hibridização *in situ* por fluorescência – FISH (do inglês *fluorescence in situ hybridization*). A hibridização *in situ* tornou possível detectar seqüências específicas de ácidos nucleicos em morfológicamente preservados cromossomos, células e tecidos. Essa tecnologia é baseada na formação *duplex*, sob condições bem definidas, de um fragmento de ácido nucleico de fita simples modificado (sonda ou *probe*) e sua seqüência complementar (seqüência alvo) em um espécime biológico fixado.

Trata-se de uma técnica de DNA recombinante que não necessita de isótopos radioativos, o que a torna realizável em qualquer laboratório padrão de citogenética.

FISH toma o lugar das bandas para identificar alterações além da resolução visual (como nas microdeleções) ou quando um rearranjo cromossômico envolve uma região camuflada na leitura pela banda (rearranjo crítico) ou de difícil interpretação (como rearranjo dentro do cromossomo).

Essa técnica é usada para estudar os cromossomos de células em metáfase, mas seu principal uso é nas células em interfase, quando anormalidades numéricas e algumas estruturais podem ser detectadas. Essa propriedade é de grande valor em estudos sobre câncer, já que um grande número de células pode ser verificado quanto a anormalidades clonais específicas que podem estar presentes somente em poucas células. A citogenética em interfase também possui enorme potencial para diagnóstico pré-natal, sendo também um instrumento valioso para o mapeamento gênico .

A técnica FISH envolve a preparação de sondas específicas de DNA, marcadas pela incorporação de nucleotídeos quimicamente modificados que são diretamente fluorescentes (método direto) ou podem ser detectados pela ligação a uma molécula fluorescente (método indireto), visualizados sob luz ultra-violeta. Tais sondas de cadeias simples de DNA são hibridizadas com os cromossomos metafásicos como nas técnicas habituais de citogenética, mas também diretamente com os cromossomos de células interfásicas. Após a hibridização *in situ*, as lâminas formadas podem ser visualizadas em microscópio de fluorescência, e as alterações cromossômicas, se presentes, identificadas. (ver etapas do processo adiante)

Atualmente há sondas viáveis para todos os cromossomos, DNAs satélites e muitos locos específicos envolvidos em doenças, que podem ser obtidas em Kits pelos laboratórios de citogenética.

Existem vários tipos de sondas para uso na técnica:

A) Sondas centroméricas

Consistem de seqüências de DNA repetitivo situadas no centrômero e na região pericentromérica de um cromossomo específico. Adequadas para um diagnóstico rápido das síndromes aneuplóides mais comuns (trissomias 13, 18 e 21) e como estudo de células interfásicas obtidas de vilosidades coriônicas, no diagnóstico pré-natal.

B) Sondas de seqüência única específicas para o cromossomo

Essas sondas são específicas para um determinado loco único, sendo úteis para identificar deleções e duplicações submicroscópicas, que constituem as síndromes de microdeleções.

C) Sondas para cromossomo inteiro (“pintura cromossômica”)

Consistem de um coquetel de sondas obtidas de diferentes regiões de um dado cromossomo. Quando esse coquetel é utilizado em uma única hibridização, todo o cromossomo fica fluorescente (“pintado”). Muito útil para caracterizar rearranjos complexos com algumas pequenas translocações e para identificar a origem de material cromossômico adicional, como os cromossomos em anel.

Uma parte do material cromossômico não identificado é usada como uma pintura para hibridizar com os cromossomos metafásicos normais. A origem do segmento cromossômico não identificado é, então, revelada quando se identifica o(s) cromossomo(s) com o qual(is) esse segmento hibridiza. Tal sonda é denominada pintura reversa.

D) Cariotipagem por espectro multicolorido

Utiliza um conjunto de sondas de pintura cromossômica de todos os cromossomos humanos, a fim de preparar um cariótipo humano multicolorido, em que cada par de cromossomos homólogos pode ser identificado na base de sua coloração única. Cada sonda é preparada de tal modo que apresenta uma cor diferente quando ligada a um marcador fluorescente e analisada por computador. Tal procedimento pode ser extremamente útil para a detecção de pequenos rearranjos cromossômicos, tanto constitucionais (como em pacientes que mostram anormalidades do desenvolvimento) quanto adquiridas (como no câncer).

Nesse procedimento, para aumentar a capacidade de identificar as cores dos alvos, um método de ligação combinatório foi desenvolvido. A multiplicidade é dada por $2^n - 1$, em que n é o número de cores. A tabela 1 e a figura 1 ilustra esse método.

	Hapteno ou	Cor	Fluor escen	te
Probe nº	fluorocromo	AMCA	Fluoresceína	Rodamina
1	Biotina	+	-	-
2	Digoxigenina	-	-	+
3	Fluoresceína	-	+	-
4	Biotina/Digoxigenina	+	-	+
5	Biotina/Fluoresceína	+	+	-
6	Fluoresceína/Digoxigenina	-	+	+
7	Biotina/Fluoresceína/Digoxigenina	+	+	+

Fig. 1 Princípio do FISH combinatorial de sete cores



Fig. 1 FISH 7 cores para cromossomos humanos (masculino) em metáfase de linfócitos com sete sondas satélites para cromossomos 1 (rodamina, fluoresceína e cumarina marcadas; branco), 6 (rodamina marcada; vermelho), 7 (fluoresceína marcada; verde), 15 (rodamina e cumarina marcadas; roxo), 17 (fluoresceína e cumarina marcadas; azul claro), 18 (rodamina e fluoresceína marcadas; amarelo) e X (cumarina marcada; azul escuro). As sondas foram detectadas com rodamina e fluoresceína no modo direto e biotina (via avidina-AMCA) no modo indireto.

Etapas do FISH

Preparação dos Cromossomos

O índice mitótico e o grau de condensação cromossômica são influenciados pela adição de colcemide, um inibidor mitótico que “segura” a célula em metáfase. Longa exposição a essa substância resulta em maior número de divisões em metáfase às custas do alongamento dos cromossomos (que são preferíveis para o mapeamento gênico). As boas preparações são as que contêm ao menos três divisões em metáfase por campo em um aumento total de 100x. Isso pode ser obtido por repetidas fixações e lavagens, se necessárias, e diluição apropriada da suspensão.

Produção de Lâminas

Resultados ótimos são normalmente obtidos de lâminas com três dias do procedimento realizado, embora as de três semanas também possam ser usadas. As lâminas (*slides*) ou as suspensões devem ser estocadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Algum sucesso pode ser alcançado com lâminas estocadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. As lâminas têm sua “idade” determinada antes da hibridização por

desidratação com etanol (séries de 70%, 80%, 90% e 100%), que pode ser precedida por pequena incubação em 2XSSC ou solução de tampão-fosfato (*phosphate-buffered solution* - PBS) com o objetivo de limpar os slides e estabilizar o pH e deixar os cromossomos menos suscetíveis à desnaturação.

Preparação das Sondas

São geralmente preparadas por translação nick com um análogo de nucleotídeo trifosfato biotilado ou ligado à digoxigenina, embora o PCR também pode ser usado efetivamente. Tendo sido determinada a concentração apropriada de DNase, o procedimento de translação nick dá à sonda o tamanho desejado, que deve ser de 150 a 300 nucleotídeos.

Uma grande variedade de sondas de ácidos nucléicos pode ser usada no FISH, de pequenos oligonucleotídeos sintéticos (20 pb) a grandes fragmentos genômicos clonados em cromossomo artificial de levedura (YACs, *yeast artificial chromosomes*). Essas sondas podem ou não ter seqüências repetidas (como as repetições Alu e Kpn), sendo consideradas como de alta ou baixa complexidade, respectivamente. Então, uma pré-hibridização deve ser feita para bloquear as repetições, deixando livres as seqüências específicas para hibridizar ao seu cromossomo alvo. Na pré-hibridização, em solução, o DNA competidor não-ligado (DNA humano total ou fração) é permitido hibridizar com a sonda de DNA para as seqüências repetidas se tornarem dupla fita, enquanto as seqüências “únicas” na sonda permanecem em fita simples para poderem se ligar às suas seqüências-alvo complementares no passo seguinte da hibridização *in situ*.

Algumas sondas são ligadas diretamente com fluorocromo, e outras com molécula sinalizadora (biotina, digoxigenina...) que então se conjuga com outra molécula ligada ao fluorocromo (ex: avidina ou anticorpo). As ligadas diretamente simplificam o procedimento, mas a sensibilidade pode ser comprometida. As ligadas ao anticorpo permitem maior amplificação, mas pode haver ‘*background*’ – ligação não-específica ao citoplasma e restos celulares.

Após, as sondas são colocadas em microtubos e estocadas de -15 a -25 °C e devem ser descongeladas e pré-aquecidas em 37 a 42 °C antes da hibridização.

Desnaturação de Cromossomos

O DNA é desnaturado em 65 a 85 °C em solução de formamida a 70% em 2XSSC. O processo termina colocando-se as lâminas em etanol resfriado. As lâminas podem, então, ser desidratadas através de séries de etanol.

Hibridização

A sonda pré-aquecida é colocada sobre a lâmina para cobrir as áreas onde a suspensão celular foi dividida, e uma lamínula é colocada sobre ela. A sonda está agora em contato com o material cromossômico desnaturado, e é assim deixado geralmente por uma noite, em uma caixa úmida, a 37 ou 42 °C no escuro.

Lavagem Pós-Hibridização

Esse passo remove toda a sonda em excesso e perdida. É importante não lavar toda sonda do cromossomo alvo e remover toda sonda perdida para os outros cromossomos, citoplasma e restos celulares.

A primeira lavagem deve ser em formamida ou mistura formamida/SSC, seguida por lavagem em concentração apropriada de SSC para se obter a adstringência requerida. Geralmente, sondas de seqüência única requerem menor adstringência que as sondas com seqüências repetidas ou de pinturas de cromossomos inteiros.

A lavagem final é em detergente misturado com SSC ou solução tampão de fosfato, possivelmente com um agente bloqueador como albumina sérica bovina. A mistura de detergente pode ser usada como uma solução fixadora.

Deteção de Sondas

O procedimento de deteção consiste na aplicação de soluções de deteção requeridas à lâmina, coberta com uma lamínula e selada com solução de entellan. As soluções de deteção são misturas apropriadas de reagentes de ligação sinalizadores conjugados a fluorocromo em solução bloqueadora. Para procedimentos duplos ou multicoloridos, alguns sistemas permitem que reagentes de deteção sejam misturados para aplicação simultânea, mas sempre há a possibilidade que os anticorpos tenham reação cruzada.

Fluorocromos usados: fluoresceína tiocianato FITC (verde), rodamina e Texas red (vermelhos), Cy3 (laranja), Cy3.5 (escarlate), etc.

Sistemas de moléculas sinalizadoras: biotina/avidina, digoxigenina/anticorpo anti-digoxigenina, etc. Para sua deteção devem ser conjugados com F-CRBM apropriado.

Amplificação de Sinal

Pode ser combinada com o procedimento de deteção ou realizada em estágio mais tardio se o sinal não está forte o suficiente após exame no microscópio. Pode consistir em um passo (o anticorpo é dirigido contra o F-CRBM e é conjugado com mais fluorocromo; ex: biotina - avidina/fluorocromo – anti-avidina/fluorocromo) ou dois passos (o anticorpo contra o F-CRBM é conjugado com outras moléculas sinalizadoras às quais se conjuga mais F-CRBM; ex: biotina - avidina/fluorocromo - anti-avidina biotinilada - avidina/fluorocromo).

Em algumas ocasiões, para procedimentos duplos e multicoloridos, os reagentes de amplificação podem ser misturados para aplicação simultânea.

Contagem Colorida (Counterstaining)

Fase de colorir o resto do material cromossômico. As pinturas mais usadas são DAPI (azul) e *propidium iodide* (vermelho) e devem ser diferentes da cor do fluorocromo com o qual vai ser usada.

As lâminas cobertas com a lamínula são colocadas diretamente na solução tinta/*anti-fade* e seladas com solução entellan. Agora, já podem ser visualizados no microscópio de fluorescência. Se o sinal é muito fraco, o procedimento de amplificação pode ser realizado; se o sinal é muito forte, as lavagens devem ser repetidas.

Microscópio

Um microscópio epifluorescente é requerido com uma lâmpada de alta pressão de mercúrio (100 W) que deve estar ajustada corretamente. As objetivas mínimas requeridas são de 10 e 20X (para *scanning*) e 100X com imersão em óleo.

Os filtros são desenhados para fluorocromos específicos e devem ser escolhidos de acordo com os sinais a serem detectados. A visualização simultânea de diferentes cores pode ser obtida com filtros multi-bandas.

As imagens podem ser colecionadas com alta resolução em filmes coloridos de alta velocidade ou em memória do computador via câmeras estáticas CCD (*charge coupled device*) ou via scanner a laser.

Hibridização Genômica Comparativa (CGH)

Trata-se de um método citogenético molecular com o potencial de detectar desarranjos cromossômicos previamente inacessíveis, já que somente o DNA é requerido para o procedimento. É possível estudar pequenas quantidades de DNA preparados de poucas células com as técnicas da reação em cadeia da polimerase (PCR). Pode ser considerado um avanço na estratégia denominada "pintura reversa" usada em genética do câncer, na detecção de genes supressores tumorais e proto-oncogenes.

Esse procedimento baseia-se na marcação com cores diferentes para o DNA teste ou tumoral (verde) e para o DNA normal usado como controle (vermelho). As duas amostras são misturadas e hibridizadas com cromossomos metafásicos normais. Se a amostra-teste contém mais DNA de uma região cromossômica particular do que a amostra-controle, essa região é identificada por um aumento na fluorescência do verde em relação ao vermelho, caracterizando uma amplificação gênica. Similarmente, uma deleção na amostra testada é identificada como uma redução na fluorescência do verde em relação ao vermelho.

Os pobres resultados da hibridização devem-se principalmente à presença de restos celulares nos slides e às sondas de DNA contaminadas com grande quantidade de proteínas ou de tamanho inapropriado.

TÉCNICAS DE CULTURA TECIDUAL

SANGUE:

Vários são os tecidos usados para a preparação de cromossomos. Podem ser usados linfócitos (linfoblastos), sangue e medula óssea, entre outros. Sangue é o tecido mais freqüentemente usado para diagnóstico citogenético de uma variedade de casos clínicos. Sangue periférico é facilmente obtido de pacientes de todas as idades, incluindo neonatos, e é o tecido de escolha para o diagnóstico de cariótipos constitucionais.

A cultura do sangue é realizada pela introdução de linfócitos na forma de linfócitos ricos em plasma ou fração isolada de linfócitos (cultura de linfócitos ou macrocultura), ou como sangue total (cultura de sangue total ou microcultura), colocados dentro do meio de cultura.

Cultura de Linfócitos ou Macrocultura

Protocolo 1: Separação do Linfócito

Procedimento:

1. Obter 5 a 10 ml de sangue em um tubo (contendo heparina) e misturar suavemente para evitar a coagulação. Se o sangue for recebido numa seringa, deve ser transferido para um tubo e misturado.
2. Permanecer em temperatura ambiente por 30 a 60 minutos. Os corpúsculos das células vermelhas sedimentam mais rápido do que os linfócitos e se depositam em direção à metade mais baixa do tubo, deixando uma solução turva de linfócitos ricos em plasma no topo.
3. Coletar a porção do topo que possui plasma rico com linfócitos (livre de corpúsculos) e fazer uma suspensão uniforme.
4. Pegar um volume pequeno de linfócitos ricos em plasma para determinar a densidade celular, se necessário, e proceder de acordo com o protocolo seguinte.

Protocolo 2: Isolamento do Linfócito

Soluções:

1. RPMI 1640-HEPES sem soro. É um meio de cultura.
2. Ficoll-paque ou Histopaque, densidade 1077. Ficoll-paque e Histopaque são soluções que contem polissacarose e diatrizoato sódico ajustado para a densidade específica.

Procedimento:

1. Preparar tubos de Histopaque, assepticamente, pela colocação de 3 ml de Histopaque em cada tubo de centrifugação (capacidade de 15 ml). Para um volume de 10 ml de sangue não diluído, preparar 2 tubos de centrifugação. Deixar o Histopaque alcançar a temperatura ambiente.
2. Suavemente adicionar 3 ml de sangue total em cada tubo de centrifugação para cobrir o Histopaque.
3. Centrifugar os tubos a 2000 rpm por 30 minutos. As células vermelhas do sangue e os granulócitos formam sedimento no fundo do tubo abaixo do Histopaque, e os linfócitos,

juntamente com as células mononucleares, permanecem na interface do plasma com Histopaque.

4. Descartar a camada superior de plasma sem perturbar a camada celular e coletar as células nucleadas usando uma pipeta de Pasteur.

5. Lavar as células pela sua suspensão em 10 ml de RPMI 1640 sem soro em um tubo de centrifugação. Centrifugar a 1000 rpm por 10 minutos para coletar as células como uma bola.

6. Descartar o sobrenadante e lavar as células novamente, repetindo o passo 5 seguido pela centrifugação.

7. Suspender as células em um meio apropriado conforme exigido.

Protocolo 3: Técnica de Cultura

Soluções:

1. Meio de crescimento:

RPMI 1640:	100 ml
Soro bovino fetal:	25 ml
Penicilina e estreptomicina: (10.000 U/ml e 10 mg/ml respectivamente)	1,3 ml
L-glutamina (200 mM ou 29,2 mg/ml):	1,3 ml

RPMI 1640 pode ser substituído por outros meios, por exemplo, MEM com aminoácidos não-essenciais, TC 199, McCoy 5A, ou RPMI 1630. Um bom índice mitótico e a preparação dos cromossomos são obtidos com qualquer um desses meios. Eles devem ser estocados em 2 a 5°C e usados dentro de 2 a 3 semanas.

2. Fitohemaglutinina (PHA)

Fitohemaglutinina liofilizada, como suprimento, deve ser dissolvida em uma quantidade apropriada de água destilada esterilizada. Pode ser estocada na forma liofilizada em 2 a 5°C por muitos meses. A solução é estocada congelada, e pode ser usada por poucas semanas, se a esterilidade é mantida.

Procedimento:

1. Preparar os tubos de cultura (15 ml) ou frascos (T25), colocando 10 ml de meio de crescimento e 0,2 ml de PHA em cada. Para as espécies da rotina clínica, é sugerido que culturas triplas sejam iniciadas para cada amostra. As culturas em frascos podem ser tratadas como culturas abertas, enquanto aquelas em tubos de centrifugação esterilizadas são tratadas como culturas fechadas. Para culturas fechadas, o meio é ajustado para um pH levemente alcalino, entre 7,4 e 7,6.

2. Preparar a cultura de linfócitos pela adição de 3 a 5 gotas, usando uma pipeta, ou 0,3 a 0,5 ml de linfócitos ricos em plasma em cada cultura. Alternativamente, um pode estimar a densidade celular e adicionar uma quantidade adequada a fim de adquirir uma densidade final de aproximadamente 1×10^6 células nucleadas/ml no meio de cultura.

3. Misturar suavemente os conteúdos de cada tubo de cultura. Incubar as culturas por 3 dias a 37°C em uma posição inclinada. Frascos T25 são incubados em um incubador com CO₂, frouxamente encobertos. Os tubos de cultura são incubados em um incubador ou em um quarto aquecido, numa posição inclinada e firmemente fechados. A posição inclinada cria uma

superfície maior entre a fase líquida e a fase gasosa, e, além disso, permite que as células se estabeleçam em uma área mais larga do tubo de cultura, o qual fornece condições ideais de cultura para as células crescerem e proliferarem.

4. Colher a cultura no terceiro dia (68 a 76 horas a partir do tempo de início), seguindo o protocolo 5 (colheita de linfócitos não-estimulados em 24 ou 48 horas).

Cultura de Sangue Total ou Microcultura

Protocolo 4: Cultura de Sangue Total ou Técnica de Microcultura

Soluções:

1. Meio de crescimento:

RPMI 1640:	100 ml
Soro bovino fetal:	25 ml
Penicilina e estreptomicina: (10.000 U/ml e 10 mg/ml respectivamente)	1,3 ml
L-glutamina (200 mM ou 29,2 mg/ml):	1,3 ml

2. Fitohemaglutinina (PHA)

Fitohemaglutinina liofilizada, como suprimento, deve ser dissolvida em uma quantidade apropriada de água destilada esterilizada.

Procedimento:

1. Preparar os tubos de cultura como descrito no protocolo 2 (passo 1).
2. Obter uma pequena quantidade de sangue periférico em uma seringa heparinizada ou tubo (contendo heparina) e colocar 5 a 10 gotas em cada tubo de cultura.
3. Incubar os tubos de cultura numa posição inclinada a 37°C.
4. Colher a cultura no terceiro dia.
5. Os métodos de colheita e preparação de lâminas são iguais aos da macrocultura, descritos no protocolo 5.

Protocolo 5: Colheita e Preparação de Lâminas

Soluções:

1. Solução de colcemide (colchicina) (solução ou liofilizada)

10µg/ml

Diluída com a quantidade sugerida de água destilada

Pode ser estocada de 2 a 5°C por muitos meses

2. Solução hipotônica

Cloreto de Potássio

5,6g

Água destilada

1L

Estocado em quantidades pequenas. Pode ser estocado por poucos meses se esterilizado.

3. Fixador

Metanol-absoluto (3 partes)

75 ml

Ácido acético (1 parte)

25 ml

Preparar fixador fresco antes de cada uso.

Procedimento:

1. Adicionar 0,02 ml de colcemide para cada tubo de cultura contendo 10 ml de meio, sacudindo suavemente o tubo para misturar. Então incubar as culturas por 45 a 60 minutos a 37°C.
2. Seguindo o tratamento com colcemide, transferir o conteúdo de cada frasco T25 para um tubo de centrifuga. Centrifugar os tubos a 800 rpm por 8 minutos. Se houver qualquer agregação celular que não pode ser dissociada, eles devem ser removidos antes da centrifugação.
3. Descartar o sobrenadante por pipetagem, deixando tanto meio quanto for possível.
4. Suspender as células em 5 ml de solução hipotônica (0,075 M KCl) e incubar 10 a 15 minutos em água a 37°C. A solução hipotônica pode ser pré-aquecida a 37°C antes do uso ou solução estocada em temperatura ambiente pode ser usada diretamente para suspender as células. Ambos os caminhos são essenciais para estabelecer um protocolo padrão e segui-lo.
5. Adicionar 5 gotas do fixador para cada tubo e misturar muito suavemente pela inversão dos tubos 1 ou 2 vezes. Centrifugar a 800 rpm por 8 minutos.
6. Descartar o sobrenadante. Agitar completamente as bolas formadas através de tapas no tubo. Ressuspender as bolas em 5 ml de fixador (evitar pipetagem). Deixar em temperatura ambiente por cerca de 10 minutos.
7. Centrifugar novamente os tubos, descartar o sobrenadante, e suspender as células no fixador. Repetir esse passo 3 vezes.
8. Depois da centrifugação final, suspender as células em um volume pequeno de fixador (aproximadamente 0,5 a 1 ml) para dar uma suspensão levemente opaca.
9. Pingar 3 a 4 gotas uniformemente em uma lâmina úmida e deixar secar. Depois que a lâmina estiver completamente seca, examinar com aumento de 10x ou 16x para verificar a densidade celular e a distribuição dos cromossomos metafásicos. Se a densidade celular estiver muito alta, adicionar algumas gotas a mais de fixador para a suspensão celular. Se a densidade celular estiver baixa, centrifugar a suspensão e ressuspender as bolas em uma quantidade menor de fixador.

MEDULA ÓSSEA:

Com o estabelecimento de uma relação entre malignidade e alterações cromossômicas, estudos citogenéticos tem sido importantes em um grande número de distúrbios hematológicos. Esses estudos tem ajudado em áreas como diagnóstico, prognóstico e terapia.

Preparação Cromossômica Direta

Protocolo 6: Colheita Direta

Soluções:

1. Meio sem soro:
RPMI 1640

100 ml

Penicilina e estreptomicina	1,0 ml
L-glutamina	1,0 ml

2. Meio de crescimento :

RPMI 1640	100 ml
Soro bovino fetal	25 ml
Penicilina e estreptomicina	1,3 ml
L-glutamina	1,3 ml

Procedimento:

1. Obter 1 a 2 ml de medula óssea em uma seringa heparinizada.
2. Adicionar 5 a 10 gotas de medula a 10 ml do meio pré-aquecido sem soro em um tubo de centrifugação 15-ml e suspender as células.
3. Centrifugar a suspensão por 8 minutos a 800 rpm e ressuspender em um meio não suplementado. Repetir a centrifugação e finalmente suspender em 10 ml de meio de crescimento. Lavar as células melhora a qualidade da preparação cromossômica pela extração de glicoproteínas da superfície celular que podem estar presentes na membrana celular.
4. Expor as células a colcemide, colher as culturas e preparar as lâminas seguindo o protocolo 5.

Referências

1. VERMA RS, BABU A. Human Chromosomes – Principles and Techniques. New York. McGraw-Hill, Inc, 2^a edição, 1995.
2. BORGES-OSÓRIO MR, ROBINSON WM. Genética Humana. Porto Alegre. Editora Artmed, 2^a edição, 2002.
3. ROONEY DE, CZEPULKOWSKI BH. Human Chromosome Preparation- Essential Diagnoses. Reino Unido. Editora Wiley, 1997.