

ANÁLISE DO CARIÓTIPO HUMANO – MONTAGEM DE CARIOGRAMA

Cromossomos humanos para estudos de cariótipo podem ser obtidos através de vários procedimentos, porém, o mais rotineiramente empregado é o de cultivo de linfócitos de sangue periférico, cuja técnica é descrita de forma sumarizada nesta Prática. Com pequenas modificações, é também a técnica usada para a obtenção de preparações cromossômicas a partir do sangue de outras espécies de mamíferos e de vertebrados em geral.

Uma amostra de sangue é colhida assepticamente, com auxílio de uma seringa contendo o anticoagulante heparina. Algumas gotas do sangue total podem ser imediatamente inoculadas em meio de cultura ou pode-se esperar a sedimentação das hemácias, de modo que seja semeado o plasma contendo leucócitos. O meio de cultura contém os elementos necessários para a sobrevivência e multiplicação das células, antibióticos para impedir o crescimento de bactérias e fitohemaglutinina que o a agente mitogênico. Essa substância tem o papel de promover a diferenciação dos linfócitos que retornam à condição blástica e readquirem a capacidade de se dividir. As culturas são mantidas em estufa a 37°C durante 48 a 72 horas. A colchicina é, então, adicionada e após mais algum tempo de incubação, as células são submetidas a tratamento hipotônico com solução de cloreto de potássio 0,075M e a fixação com uma mistura de metanol e ácido acético, na proporção 3:1. A suspensão celular obtida é gotejada em lâminas de microscopia, que são posteriormente destinadas a diferentes técnicas de coloração e de marcação cromossômica.

As metáfases das preparações citológicas são analisadas e fotografadas ao microscópio. Posteriormente, as cópias fotográficas são destinadas à montagem de um cariógrama, como será efetuada nesta Prática. Para a construção do cariógrama humano ou de qualquer outro organismo, os cromossomos são recortados e dispostos de forma ordenada, de acordo com a sua morfologia e em ordem decrescente de tamanho, a menos que tenham sido diferenciados longitudinalmente, caso em que deve-se também levar em conta o padrão de bandas de cada elemento. Nos laboratórios de citogenética humana, as análises cromossômicas de rotina para fins de diagnóstico têm sido realizadas, em geral, com base em cromossomos que tenham sido diferenciados em bandas G ou alguma outra banda equivalente, que permitem a separação inequívoca de cada par de homólogos. Alguns laboratórios dispõem do recurso de se fazer a montagem do cariógrama humano no computador, com o uso de programas desenvolvidos para esta finalidade.

Os 46 cromossomos humanos formam 23 pares, sendo 22 pares de autossomos e um par sexual. A primeira classificação formal dos cromossomos humanos foi feita na Conferência de Dener em 1960 e subsequenteiramente aprimorada em diversas outras reuniões, como a Conferência de Londres (1963), a Conferência de Chicago (1966) e a Conferência de Paris (1971).

Posteriormente, devido ao desenvolvimento de inúmeras técnicas citogenéticas, houve a necessidade cada vez maior de se atualizar e unificar rapidamente a nomenclatura cromossômica, o que aconteceu em uma série de documentos conhecidos sob a sigla ISCN (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature), sendo o mais recente de 1995.

Os pares de 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 A até G.

Dentro de cada grupo, a identificação individual dos cromossomos nem sempre é possível quando se emprega determinadas técnicas. Isso pode ser feito com segurança apenas para alguns elementos do cariótipo, de modo que durante a montagem do kariograma com coloração convencional, a maioria dos pares cromossomos são tentativamente emparelhados. Para a distribuição nos diferentes grupos, deve-se obedecer os seguintes critérios:

GRUPO A – Compreende os seis maiores cromossomos. O par 1 é metacêntrico, o 2 é submetacêntrico e o 3 é também metacêntrico, porém de tamanho menor que o par 1.

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

GRUPO C - Compreende 15 cromossomos no homem e 16 na mulher, pois o cromossomo X é incluído nesse grupo. 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 o 7º. e 8º. par. Algumas vezes, um dos elementos do par 9 (raramente ambos) pode ser reconhecido, devido a uma constrição secundária proximal nos braços longos.

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

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

GRUPO F – Inclui os pares 19 e 20, os menores metacêntricos, não distinguíveis morfolologicamente entre si.

GRUPO G – Compreende 4 cromossomos na mulher e 5 no homem, pois o cromossomo Y está incluído neste grupo. 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.

A partir da década de 70, a citogenética humana, bem como a citogenética de animais e de plantas teve um notável desenvolvimento na medida em que as análises cariotípicas puderam ser aprofundadas, devido ao emprego de inúmeras técnicas de marcação cromossômica. A identificação dos pares de homólogos é possível graças às técnicas de bandas Q, R, e G. Além disso, existem técnicas que permitem identificar as regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RON), etc.

Nos últimos anos, vários tipos de refinamentos técnicos foram introduzidos no campo das investigações citogenéticas. Um deles consiste na obtenção de um grande número de células em fases precoces de divisão celular (prófase e pró-metáfase) através da sincronização de culturas de células por substâncias diversas como a timidina e a 5-bromodesoxiuridina (BrdU). As técnicas de produção de bandas G ou R aplicadas nesses cromossomos bastante alongados produzem um número muito maior de bandas, o que permite uma análise mais detalhada dos cromossomos (bandamentos de alta resolução). Outros procedimentos consistem em tratar células vivas com análogos de base, como o BrdU, que podem produzir nos cromossomos uma diferenciação em bandas de replicação, devido à sua incorporação na molécula de DNA, no momento da duplicação.

Técnicas especiais que empregam substâncias diversas, como enzimas de restrição, fluorocromos AT ou GC-específicos, anticorpos antinucleosídeos entre outras, têm sido também aplicados em estudos citogenéticos. Mais recentemente, tem sido muito utilizada a técnica de hibridação *in situ*, com sondas marcadas com agentes fluorescentes, identificada pela sigla FISH (hibridação *in situ* fluorescente). São empregadas sondas que permitem a localização de diversas regiões cromossômicas, como as de DNAr e os telômeros, ou mesmo genes específicos e até cromossomos inteiros. É a era da citogenética molecular.

Roteiro para montagem do cariógrama:

- a. Destacar a folha que traz a cópia fotográfica da metáfase.
- b. Contar o número de cromossomos, prestando atenção para a ocorrência de sobreposições, associações de acrocêntricos, constrições secundárias, satélites, etc., que podem confundir a contagem.

- c. Com a identificação preliminar do grupo ao qual pertence, recortar cada cromossomo, mantendo uma pequena margem ao seu redor.
- d. Arranjar os pares em cada um dos grupos de A a G. Levar em conta o tamanho relativo dos cromossomos e suas características morfológicas. Deixar para o final os cromossomos do grupo C por serem os mais numerosos e semelhantes entre si.
- e. Colar cada par cromossômico na prancha da folha anexa.

Referência Bibliográfica

KASAHARA, S. (2001). **Práticas de Citogenética**. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 69p.

1 2 3

4 5

6 7 8 9 10 11 12 X

13 14 15

16 17 18

19 20

21 22 Y