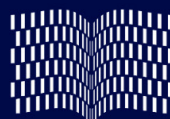




MANUAL PRÁTICO DO
CITOGENETICISTA
INICIANTE

Andressa Schneiders Santos
Luiza Emy Dorfman
Patrícia Trevisan
Paulo Ricardo Gazzola Zen



Editora da
UFCSPA

Manual prático do citogeneticista iniciante

Editora da UFCSPA

Manual prático do citogeneticista iniciante

Organizadores

Andressa Schneiders Santos
Luiza Emy Dorfman
Patrícia Trevisan
Paulo Ricardo Gazzola Zen

Ilustradora

Milena Mantelli Dall' Soto

Porto Alegre
Editora da UFCSPA
2024

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Reitora

Lucia Campos Pellanda

Vice-reitora

Jenifer Saffi

Pró-Reitoria de Extensão, Cultura e Assuntos Estudantis (PROEXT)

Mônica Maria Celestina de Oliveira

Coordenador do Laboratório de Citogenética

Prof. Paulo Ricardo Gazzola Zen

EDITORA DA UFCSPA

Diretora

Ana Rachel Salgado

Vice-diretor

Rodrigo de Oliveira Lemos

Conselho Editorial

Alberto Antônio Rasia Filho; Ana Luíza Pires de Freitas
Ana Rachel Salgado; Caroline Tozzi Reppold
Cláudia de Souza Libânio; Keli Cristine Reiter
Márcia Vignoli-Silva; Rodrigo de Oliveira Lemos

Revisão

Leonardo Vernier Finamor
Olívia Barros de Freitas

Diagramação e capa (arte original)

Caroline Lopes Duarte

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M294 Manual prático do citogeneticista iniciante [recurso eletrônico] / Andressa Schneiders Santos; Luiza Emy Dorfman; Patrícia Trevisan; Paulo Ricardo Gazzola Zen – Porto Alegre : Ed. da UFCSPA, 2024.
Recurso on-line (173 p. : il.).

Modo de acesso: <http://www.ufcspa.edu.br/index.php/editora/obras-publicadas>

ISBN 978-65-87950-89-1

1. Genética. 2. Citogenética. 3. Laboratório. I. Santos, Andressa Schneiders. II. Dorfman, Luiza Emy. III. Trevisan, Patrícia. IV. Zen, Paulo Ricardo Gazzola.

CDD 572.8

CDU 575

SUMÁRIO

Sobre os autores	05
Lista de figuras	9
Lista de quadros	12
Apresentação	13
1. Cultura de sangue periférico	15
<i>Andressa Schneiders Santos; Bianca Soares Carlotto; Bruna Lixinski Diniz</i>	
2. Confecção da lâmina	27
<i>Andressa Schneiders Santos; Bianca Soares Carlotto; Bruna Lixinski Diniz</i>	
3. Bandeamento G	33
<i>Andressa Schneiders Santos; Bianca Soares Carlotto; Bruna Lixinski Diniz</i>	
4. Análise cromossômica	39
<i>Andressa Schneiders Santos; Bruna Lixinski Diniz; Tatiana Diehl Zen</i>	
5. Cariótipo de alta resolução	63
<i>Andressa Schneiders Santos; Patrícia Trevisan; Paulo Ricardo Gazzola Zen</i>	
6. Quebras cromossômicas e trocas entre cromátides irmãs	67
<i>Andressa Schneiders Santos; Ravena Maya Cardoso; Juliane Nascimento; Patrícia Trevisan</i>	
7. Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	77
<i>Andressa Schneiders Santos; Luiza Emy Dorfman; Patrícia Trevisan; Paulo Ricardo Gazzola Zen</i>	

8. Extração de DNA	93
<i>Ravenna Maya Cardoso; Andressa Barreto Glaeser; Maiara Anschau Floriani</i>	
9. MLPA	99
<i>Andressa Barreto Glaeser; Maiara Anschau Floriani; Paulo Ricardo Gazzola Zen</i>	
10. Desenvolvimento de sonda FISH	109
<i>Andressa Schneiders Santos; Luiza Scherner; Luiza Emy Dorfman; Patrícia Trevisan; Paulo Ricardo Gazzola Zen</i>	
11. Gerenciamento de laboratório	127
<i>Desirée Deconte; Andreza Ávila de Moura; Luiza Emy Dorfman; Patrícia Trevisan; Paulo Ricardo Gazzola Zen</i>	
Lista de soluções	149
Glossário	157

SOBRE OS AUTORES

Andressa Barreto Glaeser. Biomédica graduada pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Mestra em Patologia: Genética pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia (PPG-Patologia) da UFCSPA.

Andressa Schneiders Santos. Biomédica graduada pela UFCSPA. Iniciação Científica do Laboratório de Citogenética da UFCSPA.

Andreza Ávila de Moura. Acadêmica de Biomedicina da UFCSPA. Voluntária de Iniciação Científica do Laboratório de Citogenética da UFCSPA.

Bianca Soares Carlotto. Biomédica graduada pela Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS) com habilitação em Genética e Patologia Clínica. Mestra em Patologia: Genética no PPG-Patologia da UFCSPA.

Bruna Lixinski Diniz. Biomédica graduada pelo Centro Universitário Metodista do Sul (IPA), com habilitação na área de Patologia Clínica (Análises Clínicas) e Análises Bromatológicas. Mestra em Patologia: Genética, pelo PPG-Patologia pela UFCSPA. Doutoranda em Patologia: Genética, pelo PPG-Patologia da UFCSPA.

Desirée Deconte. Biomédica graduada pela UFCSPA com habilitação em Patologia Clínica (Análises Clínicas), Genética e Toxicologia. Mestra em Patologia: Genética pelo PPG-Patologia pela UFCSPA. Doutoranda em Patologia: Genética pelo PPG-Patologia da UFCSPA.

Juliane Nascimento da Silva. Biomédica graduada pela UFCSPA, Licenciada em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Mestra em Patologia: Genética pelo PPG-Patologia pela UFCSPA. Doutoranda em Patologia: Genética pelo PPG-Patologia da UFCSPA. Técnica de Laboratório da UFCSPA.

Luiza Carolina da Rosa Scherner. Biomédica graduada pela UNISINOS, com habilitação na área de Biologia Molecular e Patologia Clínica.

Luiza Emy Dorfman. Bióloga pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS). Mestra em Genética e Biologia Molecular pela UFRGS. Doutora em Patologia: Genética, pelo PPG-Patologia da UFCSPA. Especialização em Biologia e Genética Forense pela PUC-RS. Professora na UNISINOS.

Maiara Anschau Floriani. Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC). Mestra em Patologia: Genética pelo PPG-Patologia da UFCSPA. Doutora em Patologia: Genética no PPG-Patologia da UFCSPA.

Milena Mantelli Dall' Soto. Biomédica graduada pela UFCSPA. Residente em Saúde Coletiva da UFRGS.

Patrícia Trevisan. Farmacêutica pela PUC-RS. Mestra e Doutora em Patologia: Genética pelo PPG-Patologia da UFCSPA. Bolsista pelo Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE-CAPES) na University of Colorado (EUA). Certificada pela American Society for Clinical Pathology (ASCP) para o título de "International Technologist in Cytogenetics". Atua como Health Care Principal Professional no Colorado Genetics Laboratory, University of Colorado.

Paulo Ricardo Gazzola Zen. Médico pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Residência médica em Pediatria no Hospital Ernesto Dornelles e em Genética Clínica pela Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA). Mestre pelo PPG em Genética e Biologia Molecular da UFRGS. Doutor em Patologia pelo PPG-Patologia da UFCSPA. Título de Especialista em Genética Médica pela Associação Médica Brasileira (AMB). Membro da Sociedade Brasileira de Genética Médica (SBGM). Professor Associado e orientador nos PPGs Patologia e Pediatria da UFCSPA.

Ravena Maya Cardoso da Silva. Acadêmica de Biomedicina da UFCSPA. Voluntária de Iniciação Científica do Laboratório de Citogenética da UFCSPA.

Tatiana Diehl Zen. Farmacêutica pela Universidade Luterana do Brasil (ULBRA). Mestre e Doutora em Patologia: Genética pelo PPG-Patologia da UFCSPA. Especialização em Homeopatia pela Faculdade de Ciências da Saúde de São Paulo, em Saúde Pública pela UFRGS e MBA Farmácia Estética pela Pós-Graduação do Centro Universitário Ingá (Uningá).

LISTA DE FIGURAS

1. Fluxograma geral das técnicas de citogenética
2. Esquema de pipetagem para o cultivo celular
3. Processo de saída do cultivo celular
4. Processo de confecção da lâmina
5. Processo de bandeamento G dos cromossomos
6. Exemplos de alterações de qualidade da técnica
7. Grupos cromossômicos
8. Processo de análise de cromossomos ao microscópio
9. *England Finder*
10. Cromossomo 1
11. Cromossomo 2
12. Cromossomo 3
13. Cromossomo 4
14. Cromossomo 5
15. Cromossomo 6
16. Cromossomo 7
17. Cromossomo 8
18. Cromossomo 9
19. Cromossomo 10
20. Cromossomo 11
21. Cromossomo 12
22. Cromossomo 13

23. Cromossomo 14
24. Cromossomo 15
25. Cromossomo 16
26. Cromossomo 17
27. Cromossomo 18
28. Cromossomo 19
29. Cromossomo 20
30. Cromossomo 21
31. Cromossomo 22
32. Cromossomo X
33. Cromossomo Y
34. Cariótipo de alta resolução
35. Metáfase após técnica de quebras cromossômicas
36. Metáfase após técnica de trocas de cromátides irmãs
37. Marcação do *spot*
38. Processo da técnica FISH
39. Interfase e metáfase visualizadas em microscópio de fluorescência após técnica FISH
40. Diretrizes para contagem de sinais de sonda de duas cores
41. Quadro de contagem
42. Processo de extração do DNA
43. Exemplo de análise de MLPA (P311-B1 CHD) pelo método de dosagem quociente (DQ) através do *software* Coffalyser
44. Processo da técnica de MLPA

45. Gel no transiluminador mostrando as bandas formadas pela sequência do clone de cada BAC e a escala do marcador de tamanho molecular
46. Gel no transiluminador mostrando o resultado da concentração do DNA após REPLI-g
47. Esquema geral do desenvolvimento de sonda *in house*
48. Lavagem correta das mãos

LISTA DE QUADROS

1. Alterações em metáfases após bandeamento G e indicação de correção de protocolo
2. Volume de cada reagente que compõem a mix de PCR
3. Esquema de pipetagem para a quantificação da concentração do DNA após amplificação por REPLI-g
4. Cálculos para determinação do volume de DNA e dH₂O para a reação de *Nick Translation*

APRESENTAÇÃO

Caro leitor,

É com imensa alegria que apresentamos o *Manual Prático do Citogeneticista Iniciante*, um material desenvolvido por alunos, pesquisadores, profissionais e professores da área de citogenética humana. Imaginamos que você seja um citogeneticista em início de carreira e que precise de auxílio para pôr em prática todas as habilidades e técnicas que a profissão exige. Tendo isso em vista, este manual possui um sistema objetivo de informações, organizado em capítulos que seguem a rotina laboratorial e as etapas do processo de aprendizagem de um aluno de citogenética.

Cada capítulo é composto por uma breve explicação da técnica, a descrição do protocolo, uma ou mais figuras representativas e uma lista de referências, onde você encontrará leituras complementares. Ao final do manual, você tem acesso à lista de soluções, onde estão descritas as “receitas” de todas as soluções utilizadas nas técnicas, e ao Glossário, onde há explicações diretas de palavras-chave importantes nas áreas de genética, citogenética e biologia molecular.

Este manual foi desenvolvido por alunos e pesquisadores do Laboratório de Citogenética e do Serviço de Genética Clínica da UFCSPA. O Laboratório de Citogenética foi criado em agosto de 1975 pela professora Heirie Miriam Marques Mendez. Nesse período inicial, eram realizadas técnicas de citogenética clássica. Em 2002, os professores Giorgio Adriano Paskulin e Paulo Zen iniciaram as atividades da citogenética molecular, através da técnica *Fluorescent In Situ Hybridization* (FISH). Na década se-

guinte, foram incorporadas as metodologias de desenvolvimento de sondas de DNA para FISH, durante o doutorado da professora Luiza Emy Dorfman, e de MLPA, durante o mestrado da Maiara Anschau Floriani. Esperamos que a leitura do *Manual Prático do Citogeneticista Iniciante* possa ajudar na formação e capacitação de futuros citogeneticistas, e que o livro seja utilizado por professores e profissionais da área da saúde como material de apoio em seus ambientes de trabalho, salas de aula e laboratórios de diagnóstico citogenético.

As técnicas descritas neste manual são aquelas adaptadas ao Laboratório de Citogenética da UFCSPA. Existem variações aos protocolos apresentados disponíveis na literatura, e cada laboratório deve adaptar os protocolos às suas necessidades e à sua realidade.

Por fim, agradecemos aos alunos e pesquisadores do Serviço de Genética Clínica da UFCSPA, que participaram ativamente da produção deste manual, como autores dos capítulos apresentados; à Profa. Dra. Marileila Varella-Garcia do Cytogenetics Core, Cancer Center, University of Colorado, que gentilmente cedeu protocolos relacionados ao desenvolvimento da sonda *in house* da FISH; e à ilustradora Milena Mantelli Dall' Soto, que desenvolveu todas as ilustrações presentes no manual.

1. CULTURA DE SANGUE PERIFÉRICO

Andressa Schneiders Santos

Bianca Soares Carlotto

Bruna Lixinski Diniz

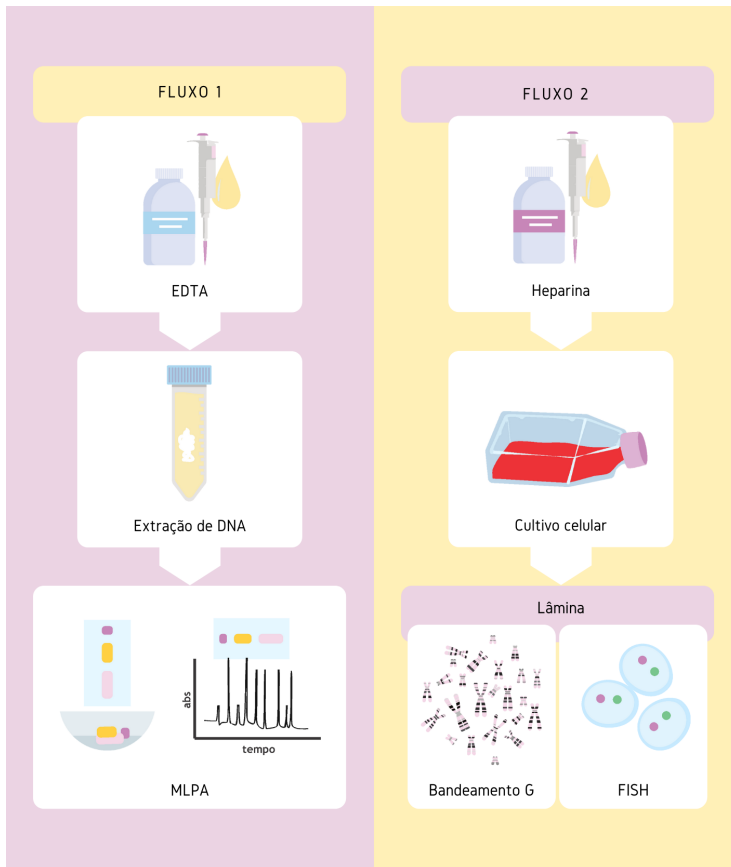
Antes de tratarmos da cultura de sangue periférico em si, é importante abordar alguns pontos sobre a adequação da amostra, uma vez que o primeiro passo da análise citogenética é obter a amostra adequada para a técnica requerida, com materiais, temperatura e tempo apropriados, de forma a evitar possíveis interferências que possam prejudicar a realização do procedimento. Assim, cada laboratório deve ter um protocolo padrão para o recebimento de amostras e informações (identificação e clínica) dos pacientes, e as amostras recebidas devem ser registradas no sistema interno do laboratório, através de registros manuais ou eletrônicos, atribuindo um número de identificação cada.

Além disso, é importante recordar que existem dois tipos gerais de culturas: as suspensas e as aderentes. As culturas suspensas são vistas em tecidos como sangue e medula óssea, em que as células crescem suspensas no meio de cultivo. Já as culturas aderentes são classificadas assim quando as células se fixam ao recipiente de cultivo, como é o caso dos fibroblastos de amostras de pele.

Ademais, ainda existe a classificação de culturas quanto ao sistema, que pode ser aberto ou fechado. As culturas abertas são capazes de trocar gases com o ar presente na estufa de incubação (5% de CO₂), eliminando os produtos gerados pelo

metabolismo celular, enquanto os sistemas fechados não trocam gases, de forma que há chances menores de haver contaminação de microrganismos na cultura.

Neste manual, iremos apresentar o cultivo celular de sangue periférico, uma das amostras mais utilizadas em citogenética. Essa técnica foi primeiramente descrita por Moorhead et al. (1960), que realizaram o cultivo de sangue com fitohemaglutinina e colchicina, o que foi seguido por choque hipotônico, fixador, e confecção das lâminas, com a coloração de Giemsa para a visualização dos cromossomos. O desenvolvimento desse protocolo foi resultado de várias pesquisas anteriores, que definiram a utilização do choque hipotônico para ajudar no espalhamento dos cromossomos (HUGHES et al., 1952; HUNGERFORD, 1958); da colchicina, como agente de parada da metáfase (TJIO; LEVAN, 1956); e da fitohemaglutinina, como estimulador do crescimento de linfócitos (NOWELL, 1960). Um fluxograma geral das técnicas de citogenética está demonstrado na Figura 1.

Figura 1. Fluxograma geral das técnicas de citogenética

Fonte: elaborado pelos autores.

1.1 Entrada em cultivo celular: semeadura

Para a realização do cultivo celular de sangue periférico, colete de 1,5 a 2 mL de sangue em um tubo de heparina sódica (tampa verde). Caso não seja possível a realização da cultura logo após a

coleta, recomendamos o armazenamento da amostra em refrigerador (1 a 8 °C) por no máximo 2 dias.

O processo de entrada em cultivo celular tem um tempo estimado de duração de 20 minutos por amostra, sendo importante que você organize seus horários para a realização da técnica. Para o primeiro passo, separe os reagentes necessários, que devem estar em temperatura ambiente ao entrar em contato com a amostra:

O processo de entrada em cultivo celular tem um tempo estimado de duração de 20 minutos por amostra, sendo importante que você organize seus horários para a realização da técnica. Para o primeiro passo, separe os reagentes necessários, que devem estar em temperatura ambiente ao entrar em contato com a amostra:

- meio de cultura RPMI 1640 (o frasco em uso pode ser mantido em geladeira, 4 a 8 °C, protegido da luz ou em estoque a ser armazenado em *freezer*, -25 a -1 °C);
- soro bovino fetal (SBF) (armazenado em *freezer*, -25 a -1 °C);
- fitohemaglutinina (PHA/“Fito”) (armazenado em *freezer*, -25 a -1 °C).

Após, organizar os equipamentos e materiais que serão utilizados, sendo eles:

- fluxo laminar;
- estufa de CO₂ a 37 °C ou estufa comum;
- caixa de ponteiras (1000 µL e 200 µL);
- pipeta P1000;
- pipeta P200;
- frascos de cultura estéreis (tubos Falcon ou garrafas de cultura);
- recipiente para descarte de material;

- *Parafilm M*[®];
- luva estéril.

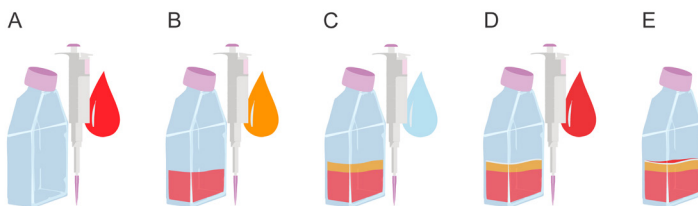
A seguir, higienize, com álcool 70%, o fluxo laminar e os materiais que não são esterilizados, posicionando-os de forma a facilitar o manuseio dentro do fluxo. Depois, deixe a luz ultravioleta (UV) agir entre 20 e 30 minutos sobre os materiais. Após o tempo determinado, ligue o motor do fluxo laminar para a filtragem do ar, e desligue a UV.

Antes de prosseguir, lembre-se do cuidado com o manuseio dos materiais e reagentes, uma vez que um dos principais motivos de falta de sucesso no cultivo celular é a contaminação. Dessa forma, quando, inadvertidamente, contaminar um reagente, ele deve ser descartado, ao contrário de materiais, que devem ser novamente esterilizados ou higienizados com álcool 70%, conforme o caso.

Com os materiais dentro do fluxo laminar, homogeneíze os reagentes e a amostra de sangue, além de identificar os frascos de cultura e de pipetar em cada frasco nesta ordem (Figura 2):

- 4 mL de RPMI;
- 1 mL de SBF;
- 50 µL de Fitohemaglutinina;
- 400 µL de sangue.

Figura 2. Esquema de pipetagem para o cultivo celular



Legenda: (A) Meio de cultivo, (B) SBF, (C) Fitohemaglutinina, (D) sangue, (E) cultura pronta

Fonte: elaborado pelos autores.

Após a pipetagem, homogeneíze o frasco e envolva a tampa com *Parafilm M*[®] (cultura fechada)¹. Os frascos devem ser colocados em uma estufa de CO₂, a 37 °C, e permanecer ali por, preferencialmente, 72 a 96 horas. Feita a técnica, organize os materiais que foram utilizados.

- Sele os reagentes com *Parafilm M*[®].
- Guarde os reagentes em ambiente adequado.
- Higienize o fluxo laminar e as pipetas com álcool 70%, e ligue a UV por mais 30 minutos.

Diariamente, os frascos podem ser delicadamente homogeneizados, para a obtenção de maior crescimento celular. Além disso, os linfócitos crescem melhor quando suspensos do que quando depositados no fundo do frasco de cultura.

1.2 Preparação do fluxo laminar, reagentes e equipamentos para retirada da cultura

No dia da retirada da cultura, após 72 horas de crescimento celular, volte ao fluxo laminar, para higienizá-lo com álcool 70%,

¹ Lembre-se de que existem frascos para cultura aberta que não devem ser selados.

e ligue a UV por 30 minutos. Materiais que irão ser utilizados no fluxo, como pipeta (P200) e ponteiras, também devem ser incluídos nesse processo. Durante esses 30 minutos, prepare os equipamentos e materiais necessários.

- *Banho-maria*

Configure para 37 °C.

- *Centrífuga*

Com rotor para tubos de 15 mL,
configure para 1500 RPM e 8 minutos.

- *Colchicina*

Retire a colchicina da geladeira, deixe-a em temperatura ambiente e protegida da luz.

- *Solução hipotônica (KCl 0,075 M, pH 6-6,8)*

Para cada amostra cultivada, utilize 5 mL de KCl para o tratamento com hipotônico. Assim, para 4 amostras, serão necessários 20 mL de KCl.

Retire o KCl do refrigerador e transfira o volume de solução a ser usado para uma proveta ou um recipiente de vidro.

Após, coloque a proveta ou recipiente de vidro em banho-maria a 37 °C.

- *Tubos Falcon de 15 mL*

Etiquete um tubo por frasco de cultura, com a identificação da amostra e a data.

- *Fixador (solução de Carnoy modificada 3:1)*

Prepare o fixador na concentração de 3 partes de metanol para 1 parte de ácido acético, lembrando-se de colocar sempre o metanol primeiro, para homogeneizar o fixador.

Para todo processo de lavagem celular, utiliza-se 24 mL de fixador por amostra. No entanto, no dia da retirada da cultura, sugere-se realizar apenas uma lavagem celular, guardando a amostra no segundo fixador. Assim, no primeiro dia da retirada da cultura usa-se aproximadamente 12 mL de fixador por amostra. Por exemplo, para duas amostras utilizaremos 24 mL, 18 mL de metanol e 6 mL de ácido acético.

Cubra a proveta com papel laminado, ou guarde-a em frasco com tampa, para não evaporar o fixador, que deve ser utilizado sempre gelado, e coloque-o no congelador após o seu preparo. Por fim, lembre-se de que você deverá preparar um novo fixador para cada processamento de amostra.

1.3 Preparação celular

Após os 30 minutos de esterilização, mas antes de seguir os próximos passos, ligue o fluxo e desligue a UV.

1.3.1 Interrupção da divisão celular com colchicina

- Antes de completar as 72 horas de cultivo celular, pegue as amostras na estufa e leve-as ao fluxo laminar para adicionar a colchicina.
- Pipete 50 μ L de colchicina.
- Homogeneíze delicadamente.

- Devolva as amostras para a estufa, deixando-as ali entre 20 e 40 minutos, dependendo da indicação do fabricante da colchicina utilizada, completando as 72 horas de cultivo.

Enquanto a colchicina está agindo, guarde os reagentes em ambiente adequado, retire os materiais do fluxo e higienize-os com álcool 70%, e ligue a UV por mais 30 minutos.

Passado o tempo de reação da colchicina (20-40 min), retire os frascos com as amostras da estufa e prossiga para o tratamento hipotônico das células.

1.3.2 Tratamento hipotônico

- Verta a amostra nos tubos Falcon já identificados.
- Centrifugue, por 8 min, a 1500 RPM.
- Despreze o sobrenadante (pipeta Pasteur acoplada ao sistema de vácuo ou pipeta Pasteur e descarte químico adequado).
- Homogeneíze delicadamente (tapping ou pipeta Pasteur).
- Coloque os tubos Falcon com a amostra em uma estante que possa ser colocada no banho-maria.
- Pipete 5 mL de KCl, a 37°C.
- Homogeneíze delicadamente (pipeta Pasteur ou vórtex).
- Coloque a estante com os tubos em banho-maria, a 37°C, por 15 minutos.
- Pipete 1 mL de fixador (pipeta Pasteur ou graduada ou automática).
- Homogeneíze (pipeta Pasteur ou vórtex).

É importante lembrar que, sempre que realizar a homogeneização, faça-a delicadamente, evitando a geração de bolhas de ar ao encher e esvaziar a pipeta repetidamente. Após, você deve

paralisar a ação do KCl nas células, adicionando 1 mL de fixador, e iniciar a etapa de lavagem e fixação das células.

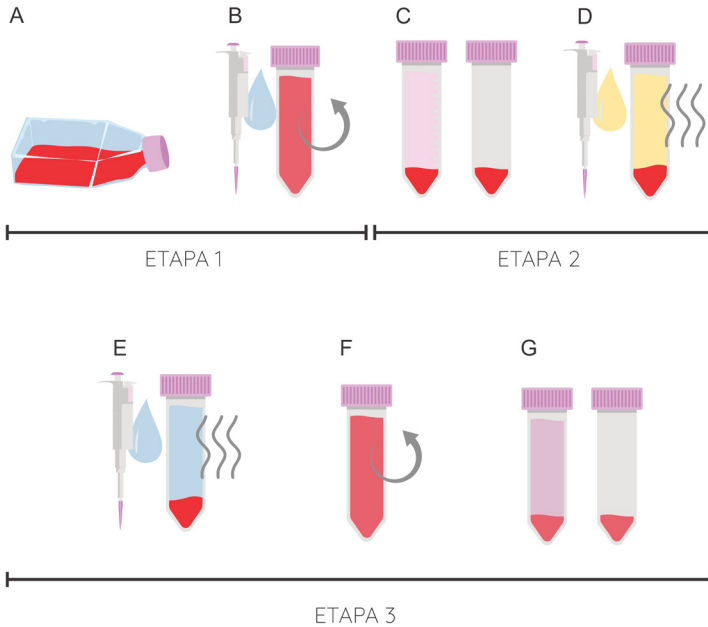
1.3.3 Lavagem e fixação das células

- Centrifugue (8 minutos, a 1500 RPM).
- Visualize a formação do *pellet* de células (precipitado).
- Despreze o sobrenadante (pipeta Pasteur acoplada ao sistema de vácuo ou pipeta Pasteur e descarte químico adequado).
- Homogeneíze o *pellet* delicadamente.
- Pipete o fixador até a marca de 5 mL do tubo Falcon.
- Homogeneíze novamente (pipeta Pasteur ou vórtex).
- Repita esses 5 passos até o sobrenadante ficar límpido, com aspecto de “água de coco” (normalmente, recomendamos fazer isso 4 vezes). Preferencialmente, não realize todas as lavagens no dia da retirada da cultura. Sugere-se realizar apenas uma lavagem no dia da retirada da cultura. A amostra com o fixador deverá ser guardada no refrigerador (5 a 8 °C). No dia seguinte, pode-se concluir todas as lavagens.

Agora, o material está pronto para a confecção das lâminas. Lembre-se de que, se a amostra ficar estocada por alguns dias, é conveniente trocar o fixador por um novo.

Com as lavagens finalizadas, a amostra também pode ser guardada no tubo Falcon, com 5 mL de fixador, em um *freezer* (-25 a -1 °C). Assim, a fixação da amostra está completa, e poderá ser utilizada por um período de alguns meses.

Lembre-se de que o processo de retirada de cultura e preparação celular tem um tempo de duração estimado em 2 horas. Dessa forma, organize seus horários para a realização da técnica.

Figura 3. Processo de saída do cultivo celular

Legenda: (A) cultivo celular,
(B) parada do ciclo celular com a colchicina e centrifugação,
(C) retirada do sobrenadante, (D) tratamento hipotônico em banho maria,
(E) adição de fixador, (F) centrifugação, (G) retirada do sobrenadante.
Fonte: elaborado pelos autores.

REFERÊNCIAS:

ARSHAM, Marilyn S.; BARCH, Margaret J.; LAWCE, Helen J. (Ed.). **The AGT cytogenetics laboratory manual**. John Wiley & Sons, 2017.

HUGHES, Arthur. **Some effects of abnormal tonicity on dividing cells in chick tissue cultures**. *Journal of Cell Science*, v. 3, n. 22, p. 207-219, 1952.

HUNGERFORD, David A. Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl. **Stain technology**, v. 40, n. 6, p. 333-338, 1965.

MOORHEAD, Paul Sidney et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Experimental cell research**, v. 20, n. 3, p. 613-616, 1960.

NOWELL, Peter C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. **Cancer research**, v. 20, n. 4, p. 462-466, 1960.

TJIO, Joe Hin; LEVAN, Albert. The chromosome number of man. In: **Problems of Birth Defects**. Springer, Dordrecht, 1956. p. 112-118.

2. CONFECÇÃO DA LÂMINA

Andressa Schneiders Santos

Bianca Soares Carlotto

Bruna Lixinski Diniz

Depois que as células em suspensão foram obtidas através da cultura, é possível confeccionar lâminas tanto para a realização do cariótipo como para a técnica FISH. Atualmente, o método mais utilizado para confecção das lâminas para análise citogenética chama-se espalhamento (*spread out*, em inglês). Esse método foi descoberto de modo acidental, quando, em 1958, Rothfels e Siminovich deixaram células de macacos cultivadas em uma lâmina secarem por evaporação, e viram que conseguiam obter uma visualização ótima dos cromossomos dessa forma. Dois anos depois, Moorhead *et al.* (1960), baseando-se nas descobertas de Rothfels e Siminovich, desenvolveram um protocolo que é seguido até hoje, com algumas adaptações.

O primeiro passo da confecção das lâminas está relacionado à retomada da lavagem da amostra em solução de Carnoy (fixativo), pois a amostra fixada deve permanecer no *freezer* por um período de *overnight* de 8 a 12 horas. Passado esse tempo, retire os tubos do *freezer* e prossiga com as duas lavagens que restam.

Antes de retomar esse processo, prepare os equipamentos, materiais e reagentes necessários.

- *Centrífuga*
Com rotor para tubos de 15 mL, configure para 1500 RPM e 8 minutos.
- *Lâminas (previamente limpas, armazenadas em álcool 70% na geladeira)*
Passe nas gaze umedecida com etanol 70%, água corrente e guarde-as em cuba com água destilada.
- *Fixador (solução de Carnoy modificada 3:1)*
Se a amostra ficou guardada no segundo fixador (recomendado), prepare fixativo para mais duas lavagens (ao redor de 8 mL de fixativo por amostra).
Lembre-se de que, para preparar as lâminas, as amostras devem estar diluídas em um fixador “novo”, limpas e sem resíduos de sangue.

Após a preparação, posicione, na bancada, a cuba com as lâminas, os tubos das amostras (armazenadas em *freezer*), a pinça, o lápis, o papel-toalha e o fixador gelado.

Feito isso, siga para a etapa de lavagem da amostra com fixativo.

- Centrifugue a amostra que foi guardada com fixador por 8 minutos, a 1500 RPM.
- Visualize a formação do *pellet* de células (precipitado).
- Despreze o sobrenadante (pipeta Pasteur acoplada ao sistema de vácuo ou pipeta Pasteur e descarte químico adequado).
- Pipete uma quantidade específica de fixador para cada amostra, dependendo do tamanho do *pellet*.
- Homogeneíze a amostra com pipeta Pasteur (isso evita bolhas).

- Repita as etapas acima.
- Na última lavagem, quando for colocar o material na lâmina, retire o sobrenadante e adicione no tubo Falcon uma quantidade específica de fixador (em geral, entre 0,5 e 1 mL) para cada amostra, dependendo do tamanho do *pellet*. Nesse caso, é importante diluir o *pellet* com o fixador até que se perceba uma aparência de “água de coco” ou até que aquele fique “levemente turvo”, de forma a se obter uma quantidade suficiente de células a serem analisadas.

Para a próxima etapa, que é a de pipetar a amostra na lâmina, é necessário um ambiente apropriado, pois isso ajuda na qualidade dos cromossomos/metáfases para a microscopia. Assim, os fatores a serem observados são a umidade (35%) e a temperatura ambiente (25 a 35 °C). Entretanto, muitos laboratórios não possuem capelas apropriadas ou aparelhos para o controle desses fatores ambientais, sendo possível a utilização de outros artifícios, como o uso de ar condicionado para secar o ambiente, e a verificação da previsão do tempo, para evitar a realização desse processo em dias chuvosos.

A fase de pipetar a amostra na lâmina deve ser dividida em pequenos passos.

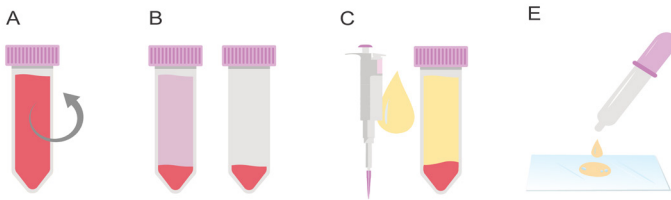
- Retire a lâmina da cuba com água, atentando para o lado correto da lâmina, segurando-a pela borda fosca com a pinça (ou com o polegar e o indicador, se você preferir), além de tomar cuidado para não deixar a lâmina secar, pois ela deve permanecer com uma fina película de água.
- Pingue 3 gotas da amostra em diferentes regiões da lâmina, utilizando uma pipeta Pasteur a uma distância de 30 cm.

- Mantenha a lâmina na horizontal até que apareçam “ondas” em sua borda.
- Seque a parte de trás da lâmina com papel-toalha.
- Escreva, com lápis, os dados de identificação na borda fosca do lado correto da lâmina.
- Deixe-a secar sobre papel-toalha, em uma posição levemente inclinada.

Quando a lâmina estiver completamente seca, será possível visualizar as metáfases e os núcleos interfásicos no microscópio óptico mesmo sem coloração, o que possibilita uma pré-análise da qualidade da amostra, por meio da verificação de metáfases suficientes e de possível contaminação. Além disso, pode-se verificar a presença de halos em volta das metáfases, um indicativo de excesso de citoplasma, o que pode interferir nas técnicas de coloração. Contudo, tenha cuidado nessa primeira visualização, pois a objetiva do microscópio não pode encostar na lâmina e não se pode utilizar o óleo de imersão.

A seguir, será possível encaminhar a lâmina para a fase de preparo, tanto por cariótipo quanto por FISH.

Figura 4. Processo de confecção da lâmina



Legenda: (A) centrifugação, (B) retirada do sobrenadante, (C) homogeneização com fixador, (D) pipetagem da suspensão de células na lâmina.

Fonte: elaborado pelos autores.

REFERÊNCIAS:

ARSHAM, Marilyn S.; BARCH, Margaret J.; LAWCE, Helen J. (Ed.). **The AGT cytogenetics laboratory manual**. John Wiley & Sons, 2017.

MOORHEAD, Paul Sidney et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Experimental cell research**, v. 20, n. 3, p. 613-616, 1960.

ROTHFELS, K. H.; SIMINOVITCH, L. An air-drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown in vitro. **Stain technology**, v. 33, n. 2, p. 73-77, 1958.

3. BANDEAMENTO G

Andressa Schneiders Santos

Bianca Soares Carlotto

Bruna Lixinski Diniz

Em 1968 e em 1970, Caspersson e seus colegas publicaram estudos que deram início às técnicas de coloração das bandas dos cromossomos. A primeira técnica desenvolvida, chamada de bandeamento Q, é baseada na afinidade da quinacrina (reagente fluorescente) com átomos de guanina (base nitrogenada do DNA). Assim, as regiões com maior concentração de guanina, conhecidas como eucromatina, acabam por ser coradas com maior intensidade de fluorescência. Posteriormente, tendo esse método como base, vários outros foram desenvolvidos para identificação e caracterização dos cromossomos. Alguns desses métodos mais difundidos e aplicados pelo mundo são: bandeamento C, utilizado para a visualização da heterocromatina dos centrômeros; bandeamento NOR, baseado na ação do nitrato de prata para a marcação das regiões satélites dos cromossomos; bandeamento G, o mais utilizado e que será descrito a seguir; e o bandeamento R, conhecido por ser o bandeamento G reverso, para a visualização da eucromatina.

O bandeamento G é chamado assim porque faz uso do corante Giemsa (*GTG banding: G-bands by Trypsin using Giemsa*), e permite corar, de tons mais escuros, as regiões heterocromáticas, que são ricas em adenina e timina, e, de tons mais claros, a região transcricionalmente mais ativa, que é a eucromatina, a qual é rica

em guanina e citosina (DUTRILLAUX; LEJEUNE, 1971; SUMNER et al., 1971).

Tendo-se isso em vista, nas fases de coloração e marcação dos cromossomos, é importante que os reagentes sejam novos e que estejam em boas condições para que a lâmina fique sem detritos e para que os cromossomos possam ser identificados facilmente. Portanto, após a sua confecção (capítulo 2), as lâminas deverão ser colocadas em estufa, a 60 °C, por *overnight* (8 a 12 horas), para que sejam envelhecidas.

Dessa forma, o primeiro passo para a realização dessa técnica é a organização das cubas de coloração que são utilizadas para limpar e corar as lâminas.

- Cuba 1: 51 mL da Solução de NaCl + 17 mL Tripsina 0,5% (mantenha a cuba no banho-maria, a 37 °C).
- Cuba 2: 80 mL de PBS 1X + 1 mL de SBF.
- Cuba 3: 80 mL de PBS 1X.
- Cuba 4: 30 mL de PBS 1X + 50 mL de água ultrapura + 2 mL de Giemsa.

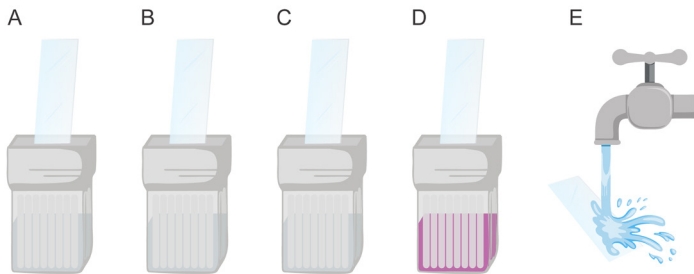
Antes de iniciar o procedimento de coloração, retire as lâminas da estufa, para esfriá-las. Feito isso, siga os próximos passos.

- Mergulhe a lâmina na Cuba 1 (tempo sugerido: 30 segundos).
- Lave a lâmina na Cuba 2 (agite a lâmina 12 vezes dentro do frasco).
- Lave a lâmina na Cuba 3 (agite a lâmina 12 vezes dentro do frasco).
- Mergulhe a lâmina na Cuba 4 (tempo sugerido: 3 minutos).
- Lave a lâmina com água corrente, deixando a água escorrer indiretamente na lâmina por uma torneira aberta.

- Deixe a lâmina secar uniformemente, colocando-a inclinada e apoiada sobre papel-toalha.

Tome cuidado para estabelecer um tempo de reação diferente para cada cuba, o qual pode ser definido à medida que as lâminas forem sendo coradas e analisadas em microscópio óptico. Uma alternativa é realizar um teste de tempo, tanto para a cuba de Tripsina quanto para a de Giemsa, com uma lâmina considerada adequada em uma pré-análise (sem coloração) em microscópio óptico. Nesse caso, dependendo das características que os cromossomos apresentarem, os tempos de reações podem ser modificados (Figura 6). A seguir, estão listadas, no Quadro 1, algumas alterações na qualidade das lâminas, relacionadas à duração da reação em cada reagente.

Figura 5. Processo de bandeamento G dos cromossomos



Legenda: (A) lavagem da lâmina com Tripsina e NaCl, (B) lavagem da lâmina com PBS e SBF, (C) lavagem da lâmina com PBS, (D) coloração da lâmina com Giemsa, (E) lavagem da lâmina com água.

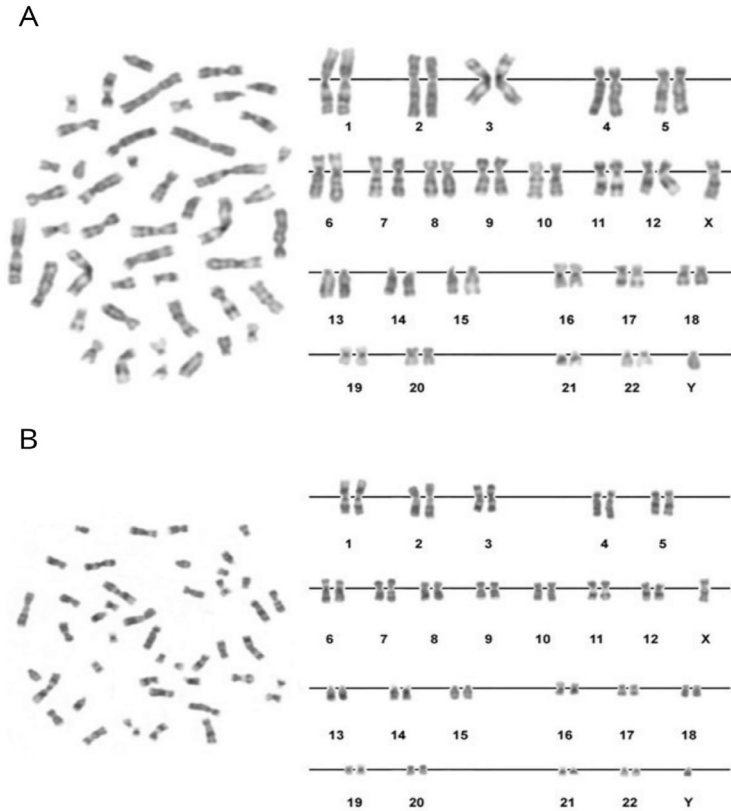
Fonte: elaborado pelos autores.

Quadro 1. Alterações em metáfases após bandeamento G e indicação de correção de protocolo

Alteração	Correção
Cromossomos sem diferenciação de banda	Aumentar o tempo em Tripsina (Cuba 1)
Cromátides abertas	Aumentar o tempo em Tripsina (Cuba 1)
Cromossomos com bordas espigadas	Diminuir o tempo em Tripsina (Cuba 1)

Fonte: elaborado pelos autores.

O tempo de duração desta técnica de coloração irá depender do número de lâminas. Assim, após todas estarem devidamente coradas, lave os frascos, descartando corretamente a solução de Giemsa em recipiente para resíduo químico identificado.

Figura 6. Exemplos de alterações de qualidade da técnica

Legenda: (A) cromátides abertas, (B) pouca diferenciação de bandas.
Fonte: acervo dos autores.

REFERÊNCIAS:

ARSHAM, Marilyn S.; BARCH, Margaret J.; LAWCE, Helen J. (Ed.). **The AGT cytogenetics laboratory manual**. John Wiley & Sons, 2017.

CASPERSSON, Torbjörn et al. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. **Experimental cell research**, v. 49, n. 1, p. 219-222, 1968.

CASPERSSON, T.; ZECH, Li; JOHANSSON, C. Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. **Experimental cell research**, v. 60, n. 3, p. 315-319, 1970.

DUTRILLAUX, B.; LEJEUNE, J. Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. **CR Acad. Sci.(Paris)**, v. 272, p. 2638-2640, 1971.

SUMNER, A. T.; EVANS, H. J.; BUCKLAND, R. A. New technique for distinguishing between human chromosomes. **Nature New Biology**, v. 232, n. 27, p. 31-32, 1971.

WANG, H. C.; FEDOROFF, S. Banding in human chromosomes treated with trypsin. **Nature New Biology**, v. 235, n. 54, p. 52-54, 1972.

4. ANÁLISE CROMOSSÔMICA

Andressa Schneiders Santos

Bruna Lixinski Diniz

Tatiana Diehl Zen

Muitos estudos e pesquisas, realizados ao longo de décadas, foram necessários para que se pudesse identificar e classificar os cromossomos, além de relacionar suas alterações a síndromes e doenças genéticas. A primeira visualização de cromossomos de que se tem registro foi feita em 1875, por Eduard e Strasburger, em células vegetais. Posteriormente, em 1879, Flemming realizou a visualização em células animais.

Já o termo “cromossomo” foi estabelecido por Waldeyer em 1888, referindo-se a corpos (do latim *soma*) com capacidade de adquirir cor (do latim *croma*) através do uso de corantes. Depois de visualizá-los e denominá-los, os estudos focaram em definir o número total de cromossomos e em caracterizá-los. Primeiramente, Painter, em 1923, estabeleceu que existiam 48 cromossomos em um núcleo de célula humana normal. Três décadas depois, Tjio e Levan, em 1956, descreveram o número correto de 46 cromossomos, o que foi possível devido ao avanço das técnicas de cultivo celular (Capítulo 1).

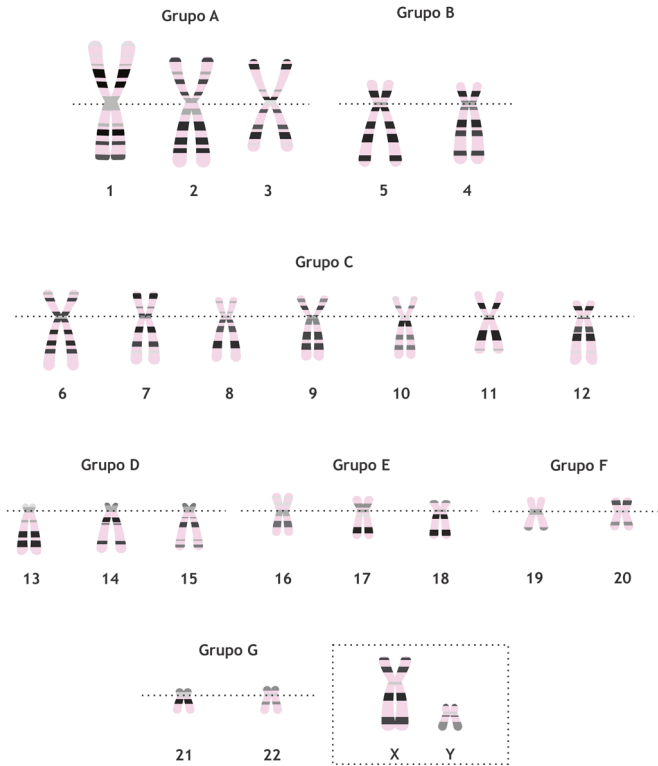
Naquela época, os cromossomos eram corados apenas com Giemsa, sem outros tratamentos ou reagentes, o que não permitia sua caracterização e diferenciação específica, de forma que eles eram agrupados por tamanho e formato. Após o desenvolvimento das metodologias de coloração e marcação (Capítulo 3), foi possível

a identificação das bandas cromossômicas, aumentando o poder de caracterização de cada um dos 22 pares de cromossomos autosossomos e dos 2 cromossomos sexuais.

De acordo com o manual de referência internacional *An International System for Human Cytogenomic Nomenclature* (ISCN 2020), os cromossomos são comumente divididos em 7 grupos, de A a G (Figura 7), de acordo com o seu tamanho e com a posição do centrômero.

- Grupo A (cromossomos 1, 2 e 3): os cromossomos 1 e 3 são metacêntricos grandes (centrômero posicionado no centro do cromossomo), enquanto o cromossomo 2 é submetacêntrico grande (centrômero deslocado para uma das extremidades).
- Grupo B (cromossomos 4 e 5): são submetacêntricos grandes.
- Grupo C (cromossomos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e X): são submetacêntricos médios.
- Grupo D (cromossomos 13, 14 e 15): são acrocêntricos médios (cromossomo portador de uma esfera terminal, denominada satélite, que é localizada na extremidade do braço curto).
- Grupo E (cromossomos 16, 17 e 18): o cromossomo 16 é metacêntrico médio, e os cromossomos 17 e 18 são submetacêntricos médios.
- Grupo F (cromossomos 19 e 20): são metacêntricos pequenos.
- Grupo G (cromossomos 21, 22 e Y): são acrocêntricos pequenos.

Figura 7. Grupos cromossômicos



Fonte: elaborado pelos autores.

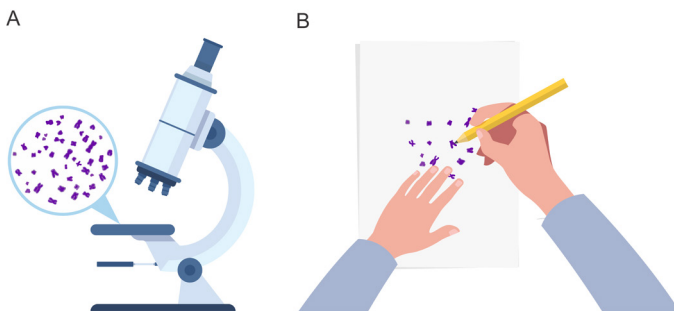
Usualmente, o treinamento para a análise dos cromossomos começa com a utilização de imagens de boa qualidade de metáfases normais. Então, o *trainee* poderá recortar os cromossomos, arranjá-los em pares e colá-los em um cartão, ou treinar utilizando um programa de computador. O exemplo de cariótipo no ISCN 2020 pode ser usado como referência para determinar a identidade de cada par, ou a pessoa em treinamento pode seguir um cariótipo previamente preparado e corrigido.

Em um cariótipo, os cromossomos são dispostos de modo que o braço curto (*p*, derivado de *petit*) fica orientado para cima da linha central, enquanto o braço longo (*q*, derivado de *queue*) fica orientado para baixo dessa linha. Se um cromossomo alterado for encontrado, ele deve ser colocado no lado direito do par. Já o cromossomo que contenha uma inversão pericêntrica deve ser alinhado de modo que os telômeros estejam em orientação correta. Por fim, após o *trainee* completar um cariótipo, esse deve ser revisado.

Quando o *trainee* estiver consistentemente acurado em analisar metáfases cromossômicas, então a análise ao microscópio deverá ser desenvolvida. Nesse momento, será útil ter papel e lápis junto ao equipamento, de forma que se possa elaborar um esquema com a localização dos cromossomos, conforme estas etapas (Figura 8).

- Desenhe os cromossomos, cuidando a posição do centrômero e dos braços *p* e *q*, o tamanho do cromossomo e a correta disposição dele dentro da metáfase.
- Conte o número de cromossomos presentes na metáfase.
- Identifique a qual grupo os cromossomos pertencem.
- Identifique cada cromossomo.

Figura 8. Processo de análise de cromossomos ao microscópio



Legenda: (A) visualização das metáfases, (B) análise de cromossomos, com apoio de desenho/esquema em papel.

Fonte: elaborado pelos autores.

As análises para o cariótipo são realizadas em microscópio óptico, com aumento de 100 vezes. Quando realizar a análise utilizando objetiva de imersão, atente para a quantidade de óleo de imersão, uma vez que, se for utilizada uma quantidade maior do que a devida, ele pode escorrer e penetrar no espaço entre a lâmina e a lamínula, inviabilizando a análise e “estragando” a lâmina. Tendo isso em vista, coloque uma gota e, se necessário, utilize mais gotas. A amostra que restar no tubo Falcon pode ser ressuspensa em 5 mL de fixador e armazenada no *freezer*.

A contagem das metáfases deve ser feita metodicamente ao longo da lâmina, seja varrendo para a direita e para a esquerda, ou para cima e para baixo, movendo um campo antes de retornar na outra direção. Lembre-se de que o número de células a serem contadas para cada tipo de estudo é específico para cada laboratório, de forma que o Colégio Americano de Genética Médica (American College of Medical Genetics) publicou diretrizes em seu *website* (www.acmg.net) para ajudar os laboratórios a criarem seus próprios protocolos.

Ademais, você deve anotar a localização de cada metáfase na lâmina, para que ela possa ser encontrada caso necessário. Para isso,

há uma marcação numérica de que muitos microscópios dispõem, conhecida como escala Vernier, situada ao longo de cada eixo, a qual pode dar uma indicação apurada da localização de cada metáfase, apesar de sua leitura usualmente não ser correspondente entre os equipamentos.

Para que a metáfase possa ser encontrada em outro microscópio, utilize um sistema diferente, com uma lâmina marcada, conhecida como *England finder*. Para esse trabalho, é necessário que você conheça de qual a maneira a lâmina deve ser colocada no microscópio (marca para direita ou esquerda), e qual lado da lâmina em análise contém a borda fosca. Após visualizar o campo desejado, a lâmina em análise deve ser substituída pela lâmina *England finder*, sem movimentar os estágios do microscópio. O ponto visualizado deve ser anotado (Figura 9).

Na ausência da *England finder*, você pode criar sua própria “lâmina ponto”: selecione uma lâmina de vidro sem uso, e então recorte uma folha de papel branca no formato da lâmina, e cole em um dos lados. Indique com um lápis as posições das suas metáfases, o que irá auxiliar na análise.



Fonte: elaborado pelos autores.

4.1 Cromossomo 1

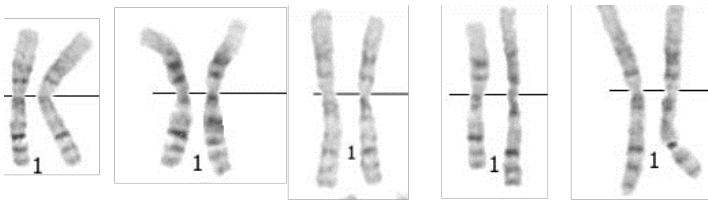
O cromossomo 1 é usualmente fácil de identificar: a região heterocromática escura fica logo abaixo do centrômero, e tem três

bandas escuras ao final do braço longo. Outra característica marcante é uma grande banda clara no braço curto, seguida de duas bandas escuras bem marcadas (Figura 10). Os cromossomos 9 e 16 também têm regiões heterocromáticas que podem variar em tamanho.

– *Características*

- Metacêntrico grande.
- Braço 1 p : claro no final distal.
- Braço 1 q : heterocromatina escura visível logo abaixo do centrômero, além de duas bandas distinguíveis escuras abaixo, separadas por uma banda clara de bom tamanho.

Figura 10. Cromossomo 1



Fonte: acervo dos autores.

4.2 Cromossomo 2

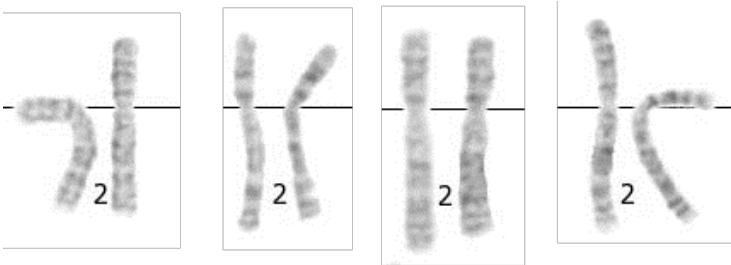
O cromossomo 2 possui muitas bandas próximas umas das outras, porém, dependendo da qualidade do bandeamento, essas podem não ficar tão aparentes. Aqui, exemplificamos cromossomos extraídos de diferentes células para mostrar como cromossomos longos distinguem-se na característica da banda (quanto mais alongado, melhor a visualização do bandeamento) (Figura 11).

– *Características*

- Submetacêntrico grande.

- Braço $2p$: uma banda escura logo acima do centrômero, e mais três acima desse, quase equidistantes uma da outra.
- Braço $2q$: duas proeminentes bandas escuras duplas centralmente, e duas distais, separadas por uma banda clara, que também pode ser dupla em alguns casos.

Figura 11. Cromossomo 2



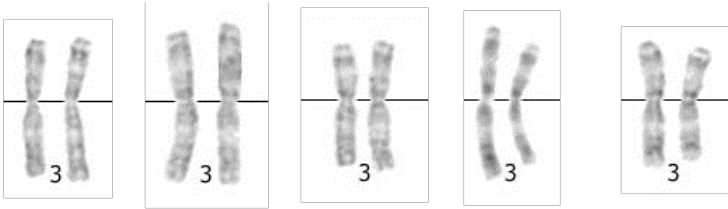
Fonte: acervo dos autores.

4.3 Cromossomo 3

O cromossomo 3 é metacêntrico, o que torna difícil reconhecer de quais são os braços curtos e de quais são os longos: no braço curto, uma pequena banda escura é mais perceptível na região terminal, enquanto, ao final do braço longo, se percebe uma banda escura, seguida de uma banda clara (Figura 12).

– *Características*

- Metacêntrico.
- Braço $3p$: banda escura proximal, banda escura logo após a banda clara terminal no final distal.
- Braço $3q$: quase idêntico ao padrão do braço curto exceto por a banda escura distal ser duas vezes mais larga que sua sócia no braço curto.

Figura 12. Cromossomo 3

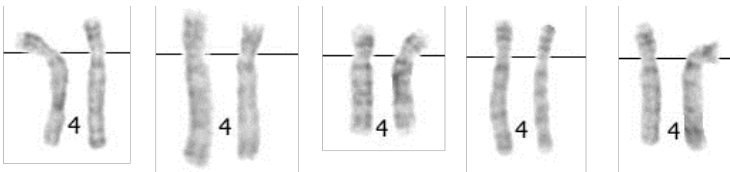
Fonte: acervo dos autores.

4.4 Cromossomos 4 e 5

Os cromossomos 4 e 5 parecem ser muito semelhantes na maior parte das vezes, mas o 4 possui bandas escuras bem marcadas ao longo do cromossomo (Figura 13), enquanto o 5 apresenta uma banda clara logo abaixo do centrômero (Figura 14).

– *Características do cromossomo 4*

- Submetacêntricos grandes.
- Braço 4p: duas bandas escuras bem marcadas.
- Braço 4q: banda escura característica logo abaixo do centrômero.

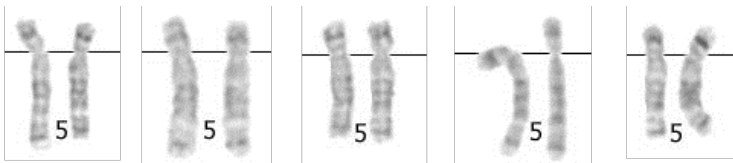
Figura 13. Cromossomo 4

Fonte: acervo dos autores.

– *Características do cromossomo 5*

- Braço 5p: uma banda escura bem marcada no meio do braço curto.
- Braço 5q: caracterizado por três bandas que se fundem em uma área escura no meio do braço, sendo elas uma banda clara, uma banda escura subterminal (que pode se separar em duas), e uma banda terminal clara.

Figura 14. Cromossomo 5



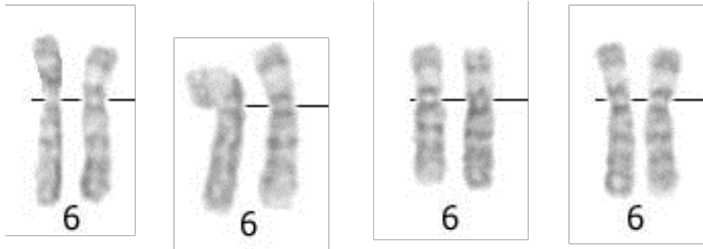
Fonte: acervo dos autores.

4.5 Cromossomo 6

O cromossomo 6 tem uma banda clara grande, no meio do braço curto, que o distingue dos outros submetacêntricos. Tenha cuidado, pois, às vezes, ele pode se parecer o cromossomo 3 (Figura 15).

– *Características*

- Submetacêntrico médio.
- Braço 6p: banda clara grande no meio.
- Braço 6q: banda bem marcada logo após o centrômero, lembrando um “colar”, e duas bandas escuras no centro, relativamente indistintas.

Figura 15. Cromossomo 6

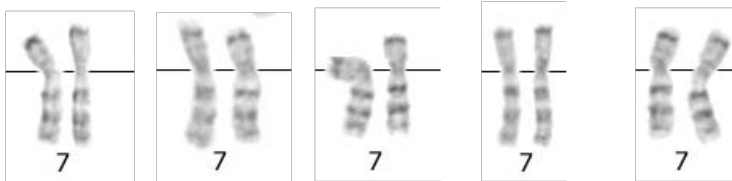
Fonte: acervo dos autores.

4.6 Cromossomo 7

O cromossomo 7 tem um braço curto maior e mais retangular, além de três bandas escuras bem marcadas no braço longo (Figura 16).

– *Características*

- Submetacêntrico médio;
- Braço 7p: banda escura bem marcada na região terminal do braço curto;
- Braço 7q: duas bandas escuras muito distintas, seguidas por uma terceira banda escura menos intensa e por uma banda clara na região terminal.

Figura 16. Cromossomo 7

Fonte: acervo dos autores.

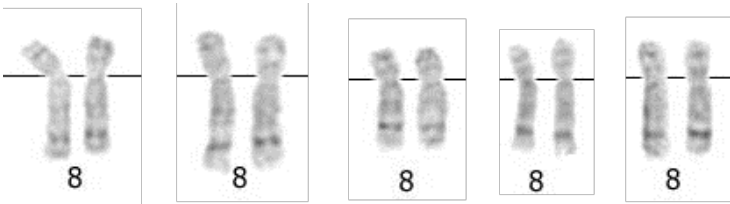
4.7 Cromossomo 8

O cromossomo 8 possui duas características distintivas: a existência, não tão aparente, de um par de pequenas bandas escuras em cada braço curto, que usualmente lhe dá uma aparência quadrada; e a presença de duas bandas escuras (de diferentes intensidades de escuro) maiores no braço longo, sendo a distal visivelmente mais escura (Figura 17).

– *Características*

- Submetacêntrico médio.
- Braço 8p: duas bandas escuras estreitadas, com uma banda clara de tamanho quase igual entre elas.
- Braço 8q: duas bandas escuras, sendo a primeira menos escura, localizada no centro do braço longo, e a segunda mais escura, bem marcada e mais distal.

Figura 17. Cromossomo 8



Fonte: acervo dos autores.

4.8 Cromossomo 9

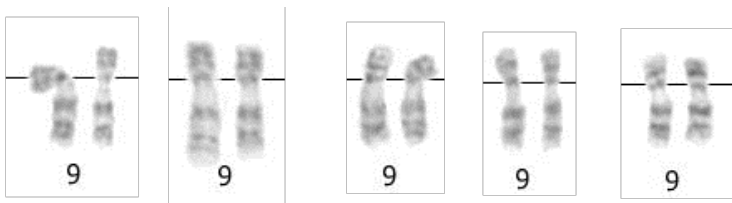
O cromossomo 9 tem uma banda clara logo abaixo do centrômero, possuindo variabilidade de tamanho. Em 5 a 10% da população existe uma inversão frequentemente herdada, onde essa

banda clara está localizada acima do centrômero. Tal inversão é conhecida por ser um polimorfismo, ou seja, não possui um significado clínico aparente nos portadores (Figura 18).

– *Características*

- Submetacêntrico médio.
- Braço 9p: possui duas bandas bem marcadas, sendo uma muito próxima ao centrômero (bom bandeamento em cromossomos longos pode evidenciar melhor as duas bandas distintas).
- Braço 9q: banda clara proximal variável e fina pode estar presente, a qual pode ser mais longa que a do braço curto, ou inexistente, sem ter qualquer efeito fenotípico descrito, sendo esse braço composto por uma banda escura, maior e distal a aquela banda clara e fina, e duas bandas escuras menores.

Figura 18. Cromossomo 9



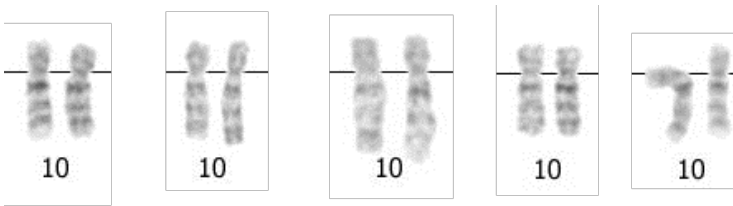
Fonte: acervo dos autores.

4.9 Cromossomo 10

O cromossomo 10 tem três bandas escuras no braço longo, sendo a proximal a mais escura, as quais podem lembrar aquelas do cromossomo 7, mas os braços curtos do 10 são menores (Figura 19).

- *Características*
- Submetacêntrico médio.
- Braço 10 p : possui uma banda quase central e, muitas vezes, pouco aparente.
- Braço 10 q : banda escura distintamente proeminente, próxima ao centrômero, seguida por duas bandas escuras equidistantes.

Figura 19. Cromossomo 10

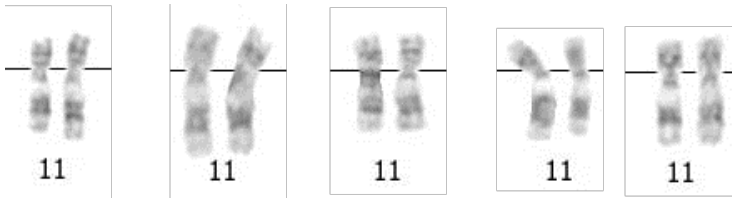


Fonte: acervo dos autores.

4.10 Cromossomos 11 e 12

Os cromossomos 11 e 12 são muito similares, sendo o 11 mais curto (Figura 20) e o 12 mais alongado (Figura 21). Além disso, o centrômero é menos metacêntrico, resultando em um braço curto menor e um braço longo maior.

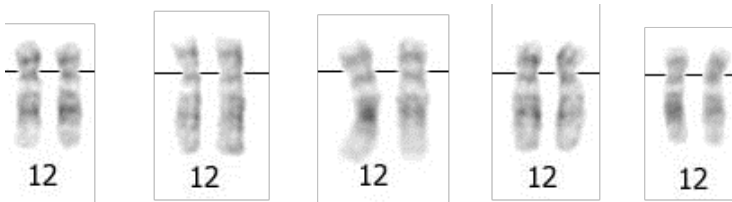
- *Características do cromossomo 11*
- Submetacêntricos médios.
- Braço 11 p : banda escura bem marcada, algumas vezes dupla.
- Braço 11 q : uma banda escura proximal, parecida com um “colarinho”, abaixo do centrômero, seguida por uma banda clara larga e por uma banda escura, dupla, larga e central.

Figura 20. Cromossomo 11

Fonte: acervo dos autores.

– *Características do cromossomo 12*

- Braço 12 p : banda central escura;
- Braço 12 q : banda escura proximal, seguida por uma banda clara, mais estreita que a do 11, havendo, logo abaixo, algumas bandas escuras muito próximas entre si (lembrando uma faixa), formando uma região clara mais larga que a do cromossomo 11.

Figura 21. Cromossomo 12

Fonte: acervo dos autores.

4.11 Cromossomos 13, 14 e 15

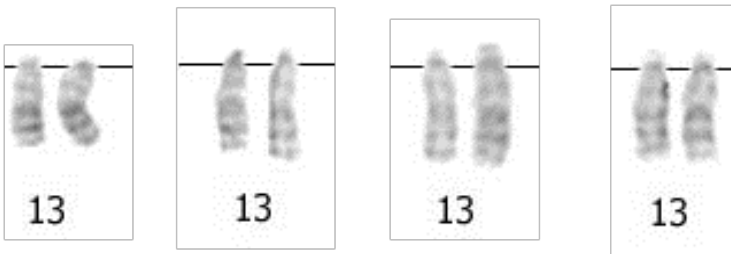
Os cromossomos 13, 14 e 15 têm braços curtos muito curtos, ou seja, o centrômero está mais próximo das extremidades. Basicamente, os três cromossomos vão se diferenciar pelas bandas

quase terminais dos braços longos. De uma forma mais didática, o cromossomo 13 possui três bandas escuras bem marcadas na posição terminal do braço longo (Figura 22), enquanto o cromossomo 14 possui duas bandas escuras bem marcadas, uma na região mais proximal e outra na região terminal do braço longo, a qual é seguida por uma banda clara (Figura 23). Por fim, o cromossomo 15 possui uma banda escura bem marcada, quase central no braço longo, seguida por uma grande banda clara (Figura 24).

– *Características do cromossomo 13*

- Acrocêntricos médios.
- Braço 13 p : braço curto pouco evidenciado.
- Braço 13 q : a metade proximal do braço é clara, sendo dividida em duas por uma banda estreita escura, enquanto a metade distal tem três bandas escuras proeminentes separadas.

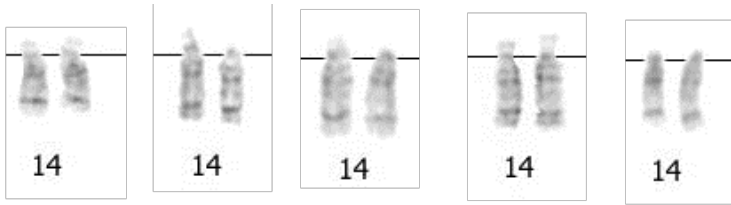
Figura 22. Cromossomo 13



Fonte: acervo dos autores.

– *Características do cromossomo 14*

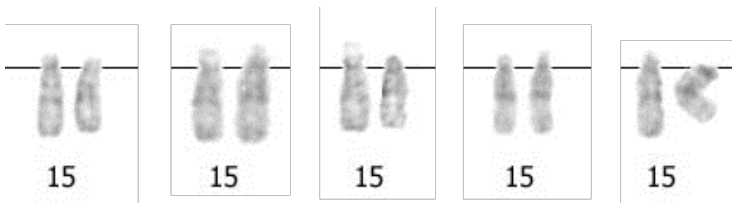
- Braço 14 p : braço curto pouco evidenciado.
- Braço 14 q : duas bandas distintas, uma proximal e a outra distal subterminal.

Figura 23. Cromossomo 14

Fonte: acervo dos autores.

– *Características do cromossomo 15*

- Braço 15 p : braço curto pouco evidenciado.
- Braço 15 q : uma banda escura bem marcada quase central, seguida por uma banda clara.

Figura 24. Cromossomo 15

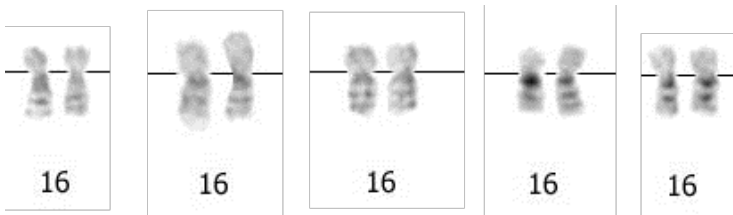
Fonte: acervo dos autores.

4.12 Cromossomo 16

O cromossomo 16 tem uma banda escura logo abaixo do centrômero. O tamanho dessa banda é herdado, e existe uma grande variação: em alguns cromossomos, é um minúsculo ponto, enquanto, em outros, ela pode ser grande, como o resto do braço q (Figura 25).

- *Características*
- Metacêntrico médio.
- Braço 16p: uma banda pouco escura central, com duas bandas claras flanqueadas e pouco evidenciadas.
- Braço 16q: banda escura junto ao centrômero, a qual cora muito sombriamente, e duas bandas escuras abaixo do bloco de heterocromatina, sendo que a banda escura distal parece terminal.

Figura 25. Cromossomo 16

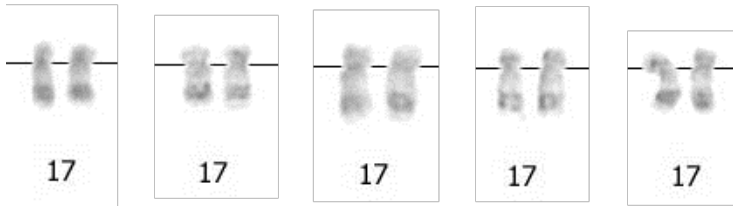


Fonte: acervo dos autores.

4.13 Cromossomo 17 e 18

Os cromossomos 17 e 18 são similares: o 17 tem uma banda proximal clara e uma banda distal escura (Figura 26), enquanto o 18 tem duas bandas escuras parecidas nos braços longos (Figura 27).

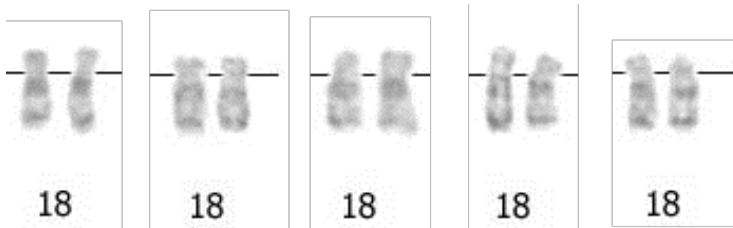
- *Características do cromossomo 17*
- Submetacêntricos pequenos.
- Braço 17p: banda escura central proeminente e pouco evidente.
- Braço 17q: banda clara, com duas bandas escuras subterminais seguidas por uma banda clara.

Figura 26. Cromossomo 17

Fonte: acervo dos autores.

– *Características do cromossomo 18*

- Braço 18p: banda com intensidade média.
- Braço 18q: duas bandas escuras características, uma proximal e uma distal.

Figura 27. Cromossomo 18

Fonte: acervo dos autores.

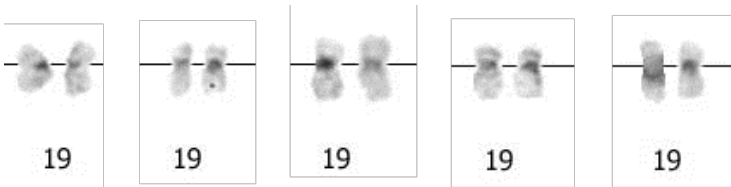
4.14 Cromossomo 19 e 20

Os cromossomos 19 e 20 são similares em tamanho e forma, mas o 19 tem braços mais claros e um centrômero grande e escuro, lembrando o formato de uma ampulheta (Figura 28), ao passo que o cromossomo 20 tem bandas escuras distintas, mas menores, em cada braço e um centrômero pequeno e escuro (Figura 29).

– *Características do cromossomo 19*

- Metacêntricos pequenos.
- Braço 19 p : banda escura pouco evidenciada.
- Braço 19 q : banda escura bem marcada, próxima ao centrômero.

Figura 28. Cromossomo 19

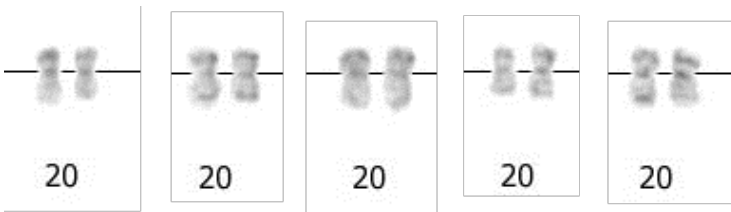


Fonte: acervo dos autores.

– *Características do cromossomo 20*

- Braço 20 p : banda terminal escura.
- Braço 20 q : uma banda escura próxima ao centrômero e uma banda escura terminal.

Figura 29. Cromossomo 20



Fonte: acervo dos autores.

4.15 Cromossomo 21 e 22

O cromossomo 21 tem uma banda escura maior e uma banda clara menor, sendo que a banda escura parece ser fusionada com o

centrômero (Figura 30). Já o cromossomo 22 tem um centrômero escuro menor e um braço *q* claro maior, com somente uma estreita banda escura evidente (Figura 31). Satélites com formas variadas podem, muitas vezes, ser vistos no final dos braços curtos dos 21 e 22, como nos 13, 14 e 15. Além disso, se os satélites forem proeminentes, eles podem fazer o 22 lembrar o 19.

– *Características do cromossomo 21*

- Acrocêntricos pequenos.
- Braço 21*p*: braço curto pouco evidente.
- Braço 21*q*: banda grande e escura bem marcada próximo ao centrômero.

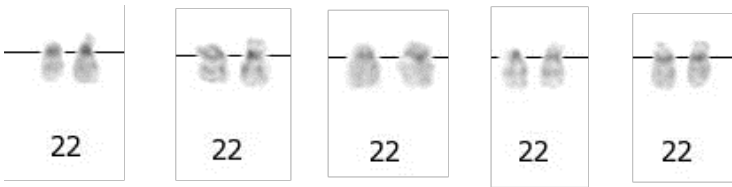
Figura 30. Cromossomo 21



Fonte: acervo dos autores.

– *Características do cromossomo 22*

- Braço 22*p*: braço curto pouco evidente.
- Braço 22*q*: região centromérica escura, com braço claro contendo uma banda central escura.

Figura 31. Cromossomo 22

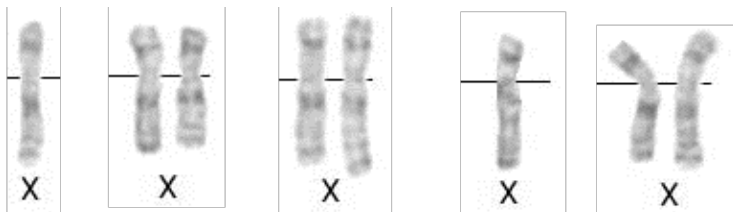
Fonte: acervo dos autores.

4.16 Cromossomo X

O cromossomo X pode, muitas vezes, parecer similar ao 7 ou ao 9, mas tem bandas escuras características no meio do braço curto, e uma banda mais escura no braço longo, próxima ao centrômero, além de não ter nenhuma banda clara bem distinta no final do braço longo (Figura 32).

– *Características*

- Submetacêntrico médio.
- Braço Xp : banda escura forte no centro.
- Braço Xq : a banda escura proximal está na mesma distância, a partir do centrômero, que a banda escura do braço curto (como se fosse espelhado), havendo, após essa banda escura, três bandas menos escuras, sendo que a primeira é muitas vezes indistinguível e a terceira é uma banda escura terminal estreita.

Figura 32. Cromossomo X

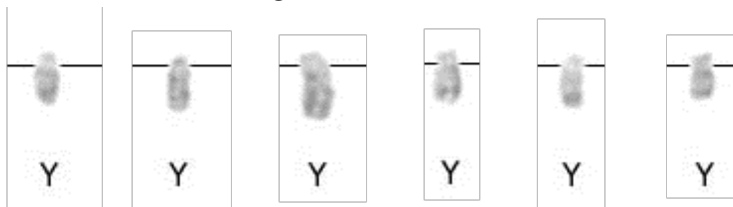
Fonte: acervo dos autores.

4.17 Cromossomo Y

O braço longo do cromossomo Y pode variar em tamanho de pessoa a pessoa, sem nenhum efeito fenotípico. Ele pode ser menor que o 21, ou grande, como um 18, como exemplificado nas figuras abaixo. Os braços longos são, muitas vezes, uniformemente escuros, e tendem a ser mais estreitos (Figura 33).

– *Características*

- Acrocêntrico pequeno.
- Braço Yp : braço curto pouco evidente.
- Braço Yq : uma banda escura próxima ao centrômero e uma banda escura na região terminal, sendo que o tamanho dessas bandas escuras depende da quantidade de heterocromatina.

Figura 33. Cromossomo Y

Fonte: acervo dos autores.

REFERÊNCIAS:

FLEMMING, Walther. Beitrage zur Kenntniss der Zelle und ihrer Lebenserscheinungen. **Archiv für mikroskopische Anatomie**, v. 16, n. 1, p. 302-436, 1879.

MCGOWAN-JORDAN, Jean (Ed.). ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016): recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenomic Nomenclature. Karger, 2020.

PAINTER, Theophilus Shickel. Studies in mammalian spermatogenesis. **Journal of Experimental Zoology**, v. 42, n. 37, p. 291-336, 1923.

TJIO, Joe Hin; LEVAN, Albert. The chromosome number of man. In: **Problems of Birth Defects**. Springer, Dordrecht, 1956. p. 112-118.

5. CARIÓTIPO DE ALTA RESOLUÇÃO

Andressa Schneiders Santos

Patrícia Trevisan

Paulo Ricardo Gazzola Zen

O cariótipo de alta resolução, ou sincronizado, foi desenvolvido para melhorar a detecção de alterações cromossômicas, como deleções, duplicações e pequenos rearranjos. A técnica permite a visualização dos cromossomos com maior resolução das bandas (850 bandas), aumentando a quantidade de informação adquirida no exame de cariótipo.

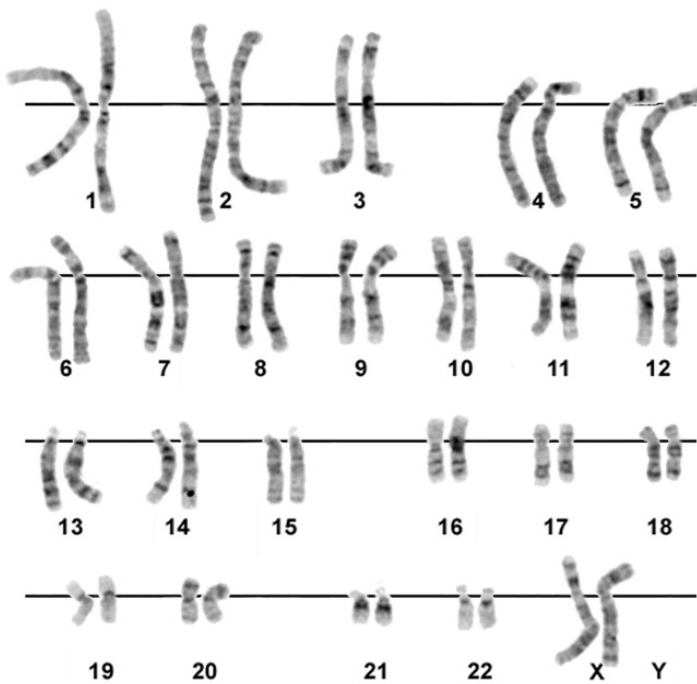
O processo que permite o alongamento dos cromossomos foi descrito primeiramente por Jorge Yunis, em 1979, e baseia-se na utilização de soluções que, ao serem incluídas no cultivo celular, irão proporcionar um número satisfatório de células em prófase, com o mínimo de sobreposição cromossômica. Assim, o início do cultivo do sangue periférico é realizado da mesma maneira, tanto para o cariótipo convencional (descrito no Capítulo 1) quanto para o sincronizado. Após 48 horas de cultivo, conforme instruído abaixo, inclua o metotrexato, que terá função de interromper o ciclo celular (bloqueio de fase S).

- Pipete 50 μL de metotrexato (10^{-5} M) em cada frasco de cultivo.
- Homogeneíze cada frasco.
- Coloque de volta na estufa.
- Descarte as ponteiras utilizadas.
- Armazene o metotrexato no refrigerador (1 a 8 °C).

O metotrexato deverá agir nas células durante 18 horas. Após esse tempo, realize a fase de sincronização das células, com a continuação do ciclo celular até o estágio de prófase.

- Verta o conteúdo de cada frasco de cultura para um tubo de centrífuga (Falcon).
- Centrifugue, por 8 min, a 2000 RPM.
- Aspire e despreze o sobrenadante (pipeta Pasteur acoplada ao sistema de vácuo), eliminando o metotrexato.
- Ressuspenda o material que ficou no tubo (pipeta Pasteur, vórtex ou por inversão do tubo).
- Pipete 4 mL de RPMI e 1 mL de SBF no tubo.
- Adicione 50 μ L de timidina (10 mg/mL).
- Homogeneíze (pipeta Pasteur ou vórtex).
- Coloque na estufa a 37 °C.

Passadas 3 horas, as amostras devem seguir para a etapa de tratamento hipotônico (descrita no capítulo 1.2).

Figura 34. Cariótipo de alta resolução

Fonte: acervo dos autores.

REFERÊNCIAS:

ARSHAM, Marilyn S.; BARCH, Margaret J.; LAWCE, Helen J. (Ed.). **The AGT cytogenetics laboratory manual**. John Wiley & Sons, 2017.

YUNIS, Jorge J. **High resolution of human chromosomes**. Science, p. 1268-1270, 1976.

6. QUEBRAS CROMOSSÔMICAS E TROCAS ENTRE CROMÁTIDES IRMÃS

Andressa Schneiders Santos

Ravena Maya Cardoso

Juliane Nascimento

Patrícia Trevisan

A integridade do genoma é essencial para a manutenção da vida. Entretanto, estamos expostos a eventos deletérios, sejam eles ambientais ou fisiológicos, que podem ocasionar danos ao DNA, como: agentes químicos, espécies reativas de oxigênio (ROS), encurtamentos do telômero e recombinações na meiose.

Entre as alterações que podem ocorrer estão as quebras cromossômicas e as trocas de cromátides irmãs. Essas alterações são consideradas espontâneas, ou seja, de ocorrência normal, quando ocorrem em baixa frequência em células que sofreram processo de cultivo. Entretanto, a análise desses danos é importante para o diagnóstico de síndromes (como síndrome de Bloom, anemia de Fanconi e ataxia telangiectasia) e para a avaliação de indivíduos expostos a agentes mutagênicos (benzeno, agrotóxicos e luz ultravioleta, por exemplo), casos em que pode haver maior frequência dessas alterações.

As técnicas de quebras cromossômicas e de trocas entre cromátides irmãs (TCI) baseiam-se no cultivo de células em meio contendo BrdU, o qual é um agente mutagênico análogo da timidina (ácido nucleico que compõe o DNA), de forma que ele possui a capacidade de se incorporar ao DNA durante a replicação. Sendo

a replicação do DNA um processo semiconservativo, ao final do cultivo, as duas cromátides irmãs diferirão na quantidade de BrdU incorporado, ou seja, o cromossomo possuirá uma cromátide normal (sem BrdU) e outra cromátide que contém BrdU.

Ainda, para a técnica de TCI, é utilizado um agente fluorescente, como o Hoechst, que se liga ao BrdU incorporado ao DNA, que é “revelado” a partir da exposição da luz UV. Dessa forma, tal processo permite a visualização das alterações em microscópio.

6.1 Quebras cromossômicas

O primeiro passo da técnica de quebras cromossômicas é o cultivo celular de sangue periférico, como descrito no Capítulo 1. Porém, existem algumas diferenças no processo, devendo ser preparados, inicialmente, 4 frascos de cultura para cada amostra, sendo identificados conforme a orientação a seguir.

- Frasco 1: cultura normal do paciente em avaliação (CASO 1).
- Frasco 2: cultura do paciente em avaliação com BrdU (CASO 1 + BrdU).
- Frasco 3: cultura normal do indivíduo controle (CONTROLE 1).
- Frasco 4: cultura do indivíduo controle com BrdU (CONTROLE 1 + BrdU).

Em seguida, podem ser separados os outros materiais e reagentes, que devem estar em temperatura ambiente ao entrar em contato com a amostra:

- meio de cultura RPMI 1640
(armazenado em freezer, -25 a -1 °C);

- soro Bovino Fetal (SBF)
(armazenado em freezer, -25 a -1 °C);
- fitohemaglutinina (PHA/“Fito”)
(armazenado em freezer, -25 a -1 °C);
- amostras de sangue periférico;
- fluxo laminar;
- estufa de CO₂ a 37 °C;
- caixa de ponteiras (1000 µL e 200 µL);
- pipeta P1000;
- pipeta P200;
- recipiente para descarte de material;
- *Parafilm M*[®];
- luva estéril.

As etapas de higienização do fluxo laminar e de pipetagem dos reagentes seguem conforme descrito no Capítulo 1. As amostras em cultivo devem permanecer 24h na estufa, a 37 °C, para então seguir para a parada do ciclo celular.

- Adicione 50 µL de BrdU nos frascos 2 e 4.
- Retorne os frascos para a estufa, a 37 °C, por mais 48 horas.
- Homogeneíze os frascos a cada 24 horas.

Após decorrido o tempo total de cultura (72h) na estufa, adicione 50µL de colchicina, e retorne os frascos de cultura para a estufa por mais 20 minutos. As próximas etapas devem ser seguidas como descrito no Capítulo 1 em “Tratamento hipotônico”.

Para a confecção das lâminas, siga o processo descrito no Capítulo 2, sendo utilizadas 4 lâminas para cada caso:

- 2 lâminas para a amostra de quebras sem BrdU;
- 2 lâminas para a amostra de quebras com BrdU;
- 2 lâminas para a controle de quebras sem BrdU;
- 2 lâminas para a controle de quebras com BrdU.

Após as lâminas secarem é realizada a etapa final de coloração. Para isso, prepare uma cuba com a solução de Giemsa 2% conforme segue:

- 30 mL de Tampão Sorensen;
- 50 mL de água destilada;
- 2 mL de Giemsa.

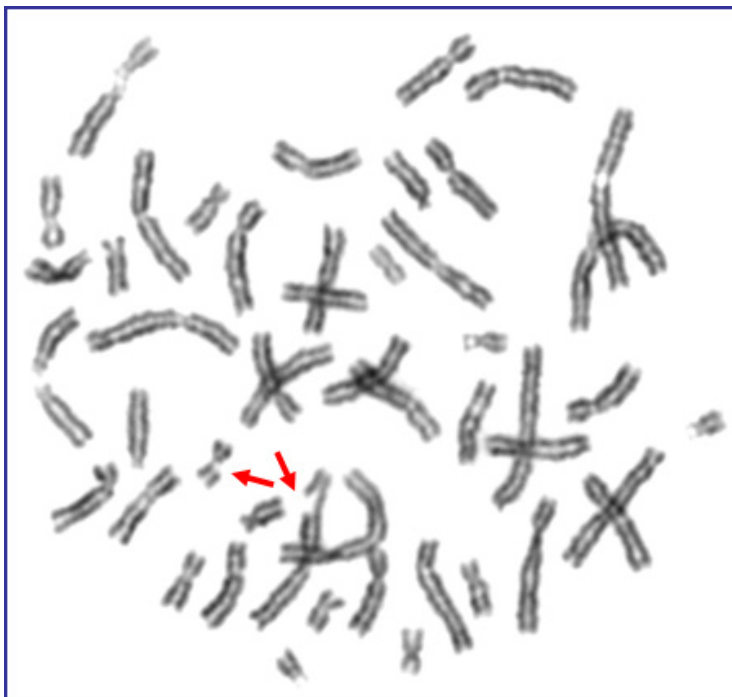
Mergulhe as lâminas na solução corante por 3 minutos. Ao término do tempo, escorra as lâminas, e deixe-as secar por 24 horas. Com isso, a técnica de quebras cromossômicas está finalizada, podendo ser realizada a análise dos cromossomos no microscópio óptico.

6.1.1 Análises de quebras cromossômicas

As análises de quebras cromossômicas são realizadas em microscópio óptico, com aumento de 100 vezes. As alterações encontradas nas quebras cromossômicas podem ser classificadas como estruturais (ex.: quebras cromossômicas ou cromatídicas, rearranjos cromossômicos, fragmentos, cromossomos dicêntricos ou em anel) ou numéricas (ex.: poliploidia) (Figura 35). Além da amostra em estudo, também devem ser analisados os controles (negativo e positivo) e a cultura sem tratamento, ou seja, sem contato com a substância utilizada (metotrexato).

A contagem das quebras é realizada a partir da análise de cada metáfase, avaliando o número e o tipo de alterações encontradas por metáfase. Para a determinação e classificação dessas alterações, deve ser utilizado o ISCN, sendo a determinação final do valor de quebras cromossômicas/metáfase estabelecida utilizando a média da soma de todas as alterações observadas em cada metáfase. Assim, uma amostra é considerada com resultados positivos de quebras cromossômicas quando há o aumento estatisticamente significativo das alterações relacionadas às doses da substância testada em comparação com o controle.

Figura 35. Metáfase após técnica de quebras cromossômicas (setas vermelhas indicam pontos de quebra)



Fonte: acervo dos autores.

6.2 Trocas entre cromátides irmãs

A técnica de trocas entre cromátides irmãs (TCI) é muito semelhante à técnica de quebras cromossômicas: o primeiro passo é o cultivo celular de sangue periférico, da mesma forma que para quebras cromossômicas, como foi descrito no item anterior, utilizando-se 4 frascos de cultura para cada amostra e adicionando BrdU após 24 horas de cultivo.

Cabe salientar que um pequeno número de pessoas apresenta um ciclo celular mais curto, o que pode interferir no resultado do estudo de TCI, uma vez que, com 72 horas, essas pessoas já podem ter apresentado um segundo ciclo de trocas, fazendo que as duas cromátides tenham incorporado o BrdU e sido marcadas com o Hoechst, o que impossibilita a contagem das trocas. Uma alternativa a isso seria acrescentar um frasco a mais (que será retirado em 68 horas) para o paciente.

A grande diferença entre as técnicas dá-se pela fase de tratamento das lâminas, que ocorre após a confecção dessas e que deve ser feita em ambiente escuro. Aqui, a “coloração” não utiliza Giemsa, sendo realizada por ligação do fluorocromo Hoechst 33258 ao BrdU e posterior revelação, conforme as instruções a seguir.

- Pingue 3 gotas de solução de Hoechst 33258 (150 µg/ml) sobre as lâminas.
- Cubra com lamínula e deixe por 10 a 15 min no escuro, em temperatura ambiente.
- Mergulhe a lâmina em um frasco com água destilada (dH₂O);
- Agite cuidadosamente a lâmina na água destilada, para a retirada da lamínula.
- Reserve a lamínula.

Depois, adicione 3 gotas de 2xSSC e 1 gota de solução de Hoechst 33258 às lâminas, e aplique as lamínulas utilizadas previamente. A seguir, exponha as lâminas à luz ultravioleta (UV) por 1h e 30min. Neste processo as lâminas são colocadas em um suporte de vidro coberto com papel laminado. Coloque, também, uma tira de papel-toalha molhado em uma parte desse suporte, de modo que as lâminas não encostem nele para evitar que elas sequem nesse período de exposição.

Após o tempo determinado, retire as lâminas da luz UV para finalizar a etapa de tratamento.

- Mergulhe as lâminas em um frasco com dH₂O.
- Incube as lâminas em uma cuba com 2xSSC, a 60 °C, por 1 hora e 30 minutos.
- Lave as lâminas em frasco com dH₂O.
- Seque as lâminas em temperatura ambiente *overnight*.
- Armazene as lâminas protegidas da luz.

6.2.1 Análises de trocas entre cromátides irmãs

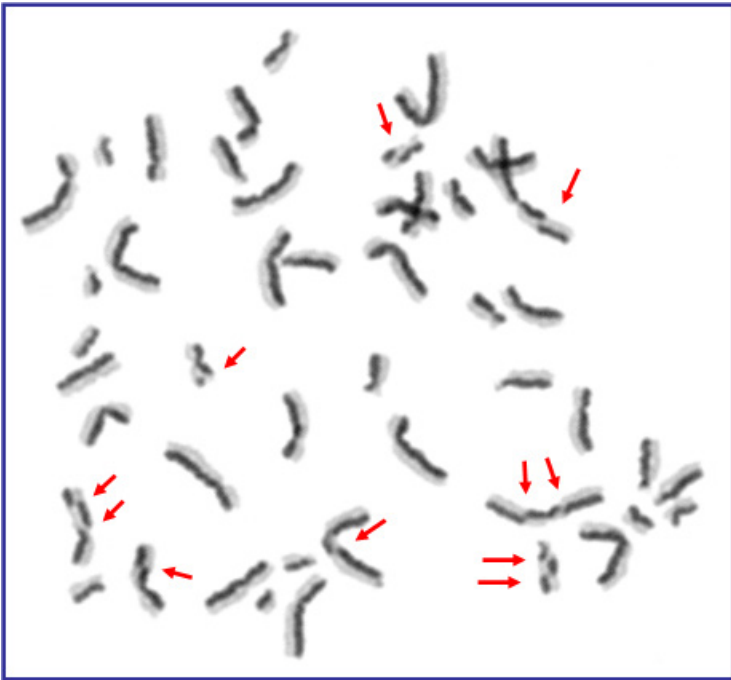
As análises de TCI são realizadas em microscópio de fluorescência, com aumento de 100 vezes, em ambiente protegido da luz. Nesse caso, considera-se que há uma troca quando a cromátide apresenta uma região fortemente corada, seguida por outra região fracamente corada, situação que se inverte na cromátide irmã (Figura 36). Devem ser analisados, além da amostra em estudo, a cultura sem tratamento e os controles negativo e positivo, ou seja, com e sem adição do metotrexato.

A contagem das trocas é feita analisando cada cromossomo da metáfase, de forma que o resultado da contagem, ou seja, a frequência de trocas, seja expresso através do número de trocas por célula/metáfase (TCIs/cel) em valor máximo e mínimo de

TCIs, recomendando-se a contagem de, no mínimo, 10 metáfases por amostra. A partir disso, o valor de TCI/metáfase de cada amostra poderá ser estabelecido utilizando-se a média da soma dos pontos de trocas em cada metáfase observada.

Nesse contexto, uma amostra é considerada com resultados positivos de TCI quando há o aumento estatisticamente significativo das trocas relacionadas às doses da substância testada em comparação com o controle, de tal forma que resultados positivos indicam que a substância testada induziu trocas entre as cromátides irmãs.

Figura 36. Metáfase após técnica de trocas entre cromátides irmãs.



Setas vermelhas indicam os pontos de trocas.
Observe a diferença de coloração entre as cromátides irmãs
Fonte: acervo dos autores.

REFERÊNCIAS:

ARSHAM, Marilyn S.; BARCH, Margaret J.; LAWCE, Helen J. (Ed.). **The AGT cytogenetics laboratory manual**. John Wiley & Sons, 2017.

VARELLA-GARCIA, M. Teste de trocas entre cromátides-irmãs. Em: RABELLO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.; MONTELEONE-NETO, R. **Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto: SBG, 1991. p.123- 139.

7. HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

Andressa Schneiders Santos

Luiza Emy Dorfman

Patxrcia Trevisan

Paulo Ricardo Gazzola Zen

Em 1986, Pinkel, Straume e Gray descreveram a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), marcando uma nova era para a área da citogenética combinada com a biologia molecular, pois criou-se a possibilidade de analisar a estrutura dos cromossomos com maior detalhamento, a partir de um método capaz de detectar regiões de 0,5 kb em cromossomos metafásicos.

A técnica FISH consiste em utilizar sondas de DNA (sequências de DNA) marcadas com corantes fluorescentes (fluorocromos). Essas sondas são complementares às suas respectivas sequências-alvo, de forma que ambas se unem, iniciando o processo conhecido como hibridização. Nessa técnica, são utilizadas lâminas previamente preparadas de amostras de cortes histológicos de tecidos sólidos e de preparações resultantes de cultivos celulares. A principal aplicação deste método é voltada para a detecção de alterações cromossômicas, como aneuploidias, ampliações, deleções e rearranjos.

Há etapas que são consideradas essenciais e básicas em FISH, de modo que é possível trabalhar com diversos tipos de células e tecidos, com o seu processo guiado pelas fases a seguir: (1) fixação das metáfases (DNA-alvo) ou dos núcleos interfásicos na superfície de uma lâmina; (2) pré-tratamento da lâmina para recebimento da

sonda; (3) aplicação da sonda de DNA marcada com fluorocromo, complementar à sequência de interesse; (4) desnaturação do DNA-alvo e da sonda; (5) hibridização das sequências-alvo e da sonda; (6) lavagem da lâmina pós-hibridização; (7) adição do contracorante DAPI e colocação da lamínula; (8) refrigeração do material; (9) análise em microscópio de fluorescência.

Destaca-se que as sondas de FISH são altamente específicas para sua sequência-alvo, sendo que essas precisam ser longas o suficiente para se ligarem de forma eficaz à região-alvo e produzirem um sinal com a intensidade necessária para a sua visualização. Atualmente existe no mercado mundial uma diversidade enorme de sondas FISH, mas elas consistem apenas de três principais tipos: sondas gene-específicas, sondas de sequências repetitivas e *sondas de chromosome-painting* (pintura cromossômica).

Também é possível o desenvolvimento de sondas *in house*, as quais são desenvolvidas a partir de clones de cromossomos artificiais bacterianos (BACs). As vantagens mais importantes da utilização de sondas *in house* são as suas sequências definidas e o seu tamanho, o que costuma gerar sinais intensos, brilhantes e fáceis de avaliar.

7.1 FISH em linfócitos de sangue periférico

Você irá precisar dos seguintes materiais:

- **Reagentes**
 - › etanol 70%, 85% e 100%;
 - › 2xSSC;
 - › 0,4xSSC;
 - › cola *rubber cement*;
 - › Tween 20;
 - › DAPI.

- **Equipamentos**

- › banho-maria;
- › vortex;
- › agitador;
- › minicentrífuga;
- › pinça (necessária para realizar trocas de uma cuba para outra);
- › estufa;
- › papel toalha e papel alumínio.

- **Vidrarias**

- › Cuba para coloração vertical ou becker (tamanho que dê para colocar quantidade suficiente para cobrir a área onde está a amostra na lâmina).

Ressalta-se que os reagentes e as etapas descritas a seguir podem ser adaptados conforme a necessidade do laboratório e da amostra, sempre visando à qualidade da análise microscópica. Cada laboratório deve adotar variações da técnica em seus protocolos de acordo com o tipo de material que será investigado, podendo variar tanto o tempo utilizado na análise quanto as soluções, porém sempre seguindo o princípio das etapas básicas já citadas. Destaca-se também que, durante todo o preparo das lâminas, se recomenda a utilização de luvas sem talco, pois a presença de qualquer resquício desse pode interferir na análise.

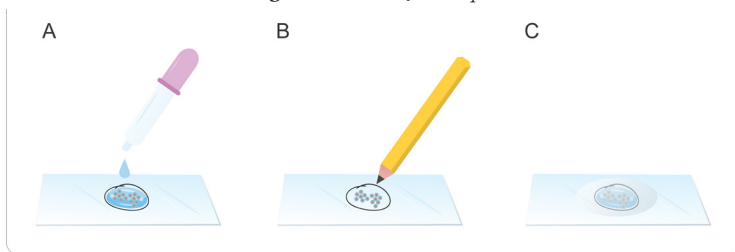
Tendo tudo isso em vista, a lâmina deve ser confeccionada através do espalhamento da suspensão de células em alta concentração, para se obter o maior número de núcleos e de metáfases em uma área menor da lâmina (Capítulo 2). Após, a lâmina deve passar por processos de lavagens, e ser incubada com a sonda, para que ocorra a hibridização com a amostra. Depois de pronta, a lâmina deve ser analisada em microscópio de fluorescência, podendo

os sinais emitidos serem analisados tanto em núcleos interfásicos quanto em metáfases. Por fim, recomenda-se que, no preparo da lâmina destinada às análises FISH, essa seja mais concentrada do que a lâmina destinada às análises de cariótipo convencional.

7.1.1 Pré-tratamento da lâmina

Para haver maior eficiência no uso da sonda e da análise, é recomendado delimitar o espaço na lâmina onde será pipetada a sonda. Essa delimitação, chamada de *spot*, é determinada a partir da visualização, em contraste de fase, no microscópio óptico, devendo ser feita na região que possuir a maior concentração de metáfases e interfases na lâmina. Tal marcação usualmente é realizada com uma caneta de ponta de diamante, específica para esse fim, pois marcações com outros tipos de caneta tendem a desaparecer nos processos de lavagem com álcool. Além disso, esse *spot* deve ser feito no lado oposto à aplicação da amostra, uma vez que pequenos fragmentos de vidro podem prejudicar a posterior análise. Por fim, essa marcação pode ser feita em círculo ou em linhas retas, visando a selecionar uma área de tamanho semelhante à da lamínula que será colocada ao final do processo (Figura 37).

Figura 37. Marcação do *spot*



Legenda: (A) pipetagem da amostra na lâmina, (B) marcação do spot com caneta diamante, (C) pipetagem da sonda no *spot*.

Fonte: elaborado pelos autores.

Realizada a marcação do *spot*, a lâmina necessita passar por lavagens, com a finalidade de limpar e desidratar o material para recebimento da sonda. Organize alguns itens antes de começar.

- Ligue o banho-maria a 75 °C.
- Coloque um frasco com tampa no banho-maria, de modo que esse boie.
- Coloque, em cubas separadas e em temperatura ambiente, 2xSSC, etanol 70%, etanol 85% e etanol 100%.

As etapas a seguir são simples, mas deve-se ter cuidado com a ordem de posicionamento das lâminas, para manter o padrão de tempo de cada lâmina em todas as cubas, retirando primeiro a lâmina que inicialmente foi posta na cuba. Como sugestão, nos primeiros testes, você pode utilizar 2 ou até 4 lâminas. Posicione as cubas previamente preparadas em uma bancada, juntamente com o banho-maria e com um agitador. As demais etapas devem seguir as orientações a seguir.

- Mergulhe a lâmina na cuba com 2xSSC por 2 minutos no agitador.
- Mergulhe a lâmina na cuba com etanol 70% por 2 minutos no agitador.
- Mergulhe a lâmina na cuba com etanol 85% por 2 minutos no agitador.
- Mergulhe a lâmina na cuba com etanol 100% por 2 minutos no agitador.
- Apoie as lâminas em alguma superfície, para que sequem na vertical (com a identificação para cima) em temperatura ambiente.

7.1.2 Hibridização

Após as lavagens, com as lâminas já secas, siga para a etapa de hibridização, na qual serão feitas a incubação da lâmina com a sonda e trocas de temperatura, para a desnaturação das fitas de DNA e para a ligação (hibridização) entre sonda e DNA da amostra.

A organização dos materiais utilizados deve ser feita em ambiente escuro, para a proteção da sonda, com o uso de luvas sem talco. Nos passos em que a sonda é manipulada, é necessário deixar o ambiente com o mínimo de luz possível, pois os fluorocromos são sensíveis à luz, de forma que a sua exposição pode danificar o reagente.

- Limpe lamínulas redondas (13x13mm) com etanol 70% e papel-toalha (ou papel macio, que não solte fiapos e fragmentos).
- Separe cola *rubber cement* e uma seringa.
- Retire a sonda do *freezer*, mantendo-a sempre protegida da luz.
- Faça uma alíquota da sonda em um microtubo, sendo necessário o preparo de acordo com as instruções do fabricante (verifique a forma de preparo antes de iniciar).
- Homogeneíze a sonda (vórtex).
- Precipite a sonda por *spin* (minicentrífuga).

Antes da pipetagem da sonda, coloque lâmina, lamínula e microtubo com a sonda na estufa, a 37 °C, por 10 minutos, pois os materiais devem estar na mesma temperatura. Passado o tempo, siga rapidamente para a etapa de pipetagem (mais uma vez, lembre-se de evitar a luz).

- Pipete 1 µL de sonda no *spot* marcado na lâmina (quantidade de sonda pode ser alterada conforme a qualidade da análise);

- Coloque, com o auxílio de uma pinça, a lamínula (13x13mm) sobre o *spot*;
- Cubra a borda da lamínula com cola *rubber cement*, utilizando a seringa;
- Deixe a cola secar (entre 30 minutos e 1 hora, ou até a cola ficar seca ao toque e transparente).

Com a cola seca, siga para a etapa das mudanças de temperatura, na qual a sonda irá hibridizar com a amostra:

- Coloque a lâmina em um frasco, e coloque esse frasco em banho-maria (ou em placa aquecida), a 75 °C, por 2 minutos;
- Retire a lâmina do frasco, e coloque-a na estufa, a 37 °C, por 16 a 40 horas, em câmara úmida (recipiente fechado com gaze ou papel-toalha úmido) ou em um sistema de hibridização/desnaturação de lâminas.

Vale citar que a definição do tempo de hibridização será feita dependendo da sonda utilizada e da qualidade registrada na análise microscópica, devendo-se aumentar o tempo de estufa se houver poucos sinais e vice-versa. Por fim, lembre-se de que é necessário seguir as recomendações e instruções do fabricante.

7.1.3 Pós-tratamento da lâmina

Passado o tempo de hibridização, as lâminas devem passar por um processo final de lavagens, para retirada do excesso de sonda. Antes do tempo esgotar, prepare os seguintes materiais.

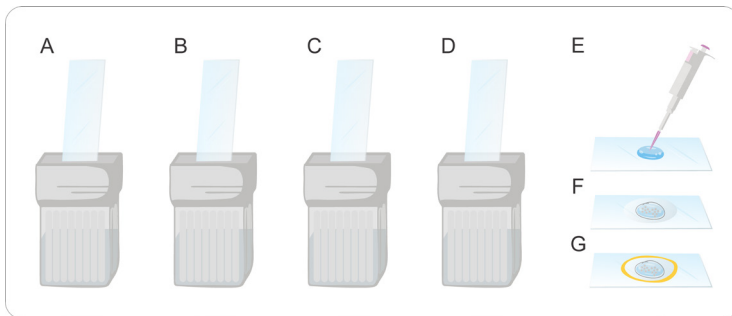
- Ligue o banho-maria a 72 °C.
- Coloque 0,4xSSC em uma cuba em banho-maria, a 72 °C.

- Coloque 50 mL de 2xSSC em uma cuba.
- Pipete 25 μ L de Tween 20[®] (IGEPAL ou NP40) na cuba com 2xSSC.
- Limpe as lâminulas (24x50mm) com etanol 70%.

As etapas a seguir também devem ser feitas em ambiente escuro, para a proteção da sonda, utilizando-se luvas sem talco:

- Retire as lâminas da estufa.
- Remova cuidadosamente a cola *rubber cement* e a lâminula (13x13 mm) com uma pinça.
- Mergulhe as lâminas no frasco com 0,4xSSC, a 72 °C, por 2 minutos e 30 segundos.
- Mergulhe as lâminas no frasco com 2xSSC/Tween 20[®], e coloque-as no agitador por 30 segundos.
- Seque as lâminas com papel-toalha.
- Pipete 3 μ L de DAPI no *spot* (utilizado como contra-corante).
- Coloque a lâminula (24x50 mm) sobre a lâmina.
- Remova as bolhas com a pinça, apertando delicadamente a lâminula e cuidando para não quebrá-la.
- Embrulhe a lâmina em papel-alumínio.
- Armazene a lâmina em geladeira *overnight* ou, no mínimo, por 1 hora, antes de iniciar a análise.

O sucesso do pós-tratamento deve ser controlado através da análise microscópica. Além disso, lembre-se de que os reagentes e as etapas descritas podem ser adaptados conforme as necessidades do laboratório e da amostra: por exemplo, se os sinais das sondas ficarem muito fracos, pode-se diminuir o tempo de lavagem, mas, se for verificado muito *background* (lâmina poluída, suja), também se pode aumentar o tempo de lavagem.

Figura 38. Processo da técnica FISH

Legenda: (A) lavagem da lâmina em SSC, (B) lavagem da lâmina em etanol 70%, (C) lavagem da lâmina em etanol 85%, (D) lavagem da lâmina em etanol 100%, (E) pipetagem da sonda, (F) aplicação de cola e lamínula, (G) secagem da cola, (H) hibridização (que será realizada em estufa).

Fonte: elaborado pelos autores.

7.2 FISH EM CORTES HISTOLÓGICOS DE TECIDOS SÓLIDOS PARAFINIZADOS

7.2.1 Pré-tratamento

A área a ser hibridizada (*spot*) precisa ser selecionada tendo como base a lâmina corada pela técnica de HE (Hematoxilina-Eosina), identificando o local de interesse. Nesse caso, uma região de 12 mm de diâmetro é marcada no dorso da lâmina com o uso de uma caneta diamante. A lâmina selecionada deve ser incubada na estufa à temperatura de 56 °C durante um período *overnight*, para, assim, aumentar a aderência do tecido à lâmina e amolecer a parafina. No dia seguinte, são realizadas as etapas de lavagem, sendo que a primeira dessas se refere à remoção da parafina do tecido.

- Incube as lâminas a 56 °C, por 2 a 4 horas, ou *overnight*, dependendo do tamanho do corte histológico na lâmina.
- Mergulhe as lâminas em xilol por 10 minutos (repetir 3 vezes).

- Seque a lâmina a temperatura ambiente.
- Agite as lâminas em etanol 100% por 5 minutos (repetir 2 vezes).
- Seque a lâmina a temperatura ambiente.
- Incube as lâminas em 2xSSC, a 75 °C.

A seguir, há a etapa de digestão do tecido, para a qual se utiliza uma solução de proteinase K 0,6 mg/mL (500 µL de proteinase K em 17 mL de 2xSSC), a 45 °C, ou de pepsina 0,025%, diluída em HCl 0,01M, a 37 °C, com um tempo de duração que pode variar de 35 a 65 minutos, dependendo do tecido, da coloração e do aspecto da amostra na lâmina HE. O prazo citado refere-se a amostras de glioblastoma, que são de difícil digestão, sendo interessante salientar que, para amostras de outros tecidos, deve-se adequar o tempo de digestão, iniciando com períodos menores do que o citado. Após, realize uma etapa final de lavagens.

- Mergulhe a lâmina em uma cuba com água ultrapura, a temperatura ambiente, por 1 minuto.
- Mergulhe a lâmina em uma cuba com 2xSSC (pH 7,0), a temperatura ambiente, no agitador, por 5 minutos.
- Mergulhe a lâmina na cuba com etanol 70% por 2 minutos.
- Mergulhe a lâmina na cuba com etanol 85% por 2 minutos.
- Mergulhe a lâmina na cuba com etanol 100% por 2 minutos.
- Seque a lâmina a temperatura ambiente.

7.2.2 Hibridização

As etapas de hibridização devem ser feitas em ambiente escuro, para a proteção da sonda, com o uso de luvas sem talco. Primeiramente, retire a sonda de DNA do *freezer* e mantenha-a em temperatura ambiente por cerca de 5 minutos. Após, agite-a

no vórtex e centrifugue-a rapidamente (3 segundos), para que a solução fique ao fundo do frasco. Com essas preparações feitas, siga para a etapa de pipetagem.

- Pipete 4 μ l da sonda no *spot* marcado na lâmina.
- Coloque a lamínula (13x13 mm) sobre o *spot* (tenha cuidado para evitar as bolhas).
- Cubra a borda da lamínula com cola *rubber cement*, utilizando a seringa.
- Deixe a cola secar (entre 30 minutos e 1 hora, ou até a cola ficar seca ao toque e transparente).

Após, realize a etapa de mudanças de temperatura, o que irá permitir a hibridização *in situ*.

- Coloque a lâmina no frasco, e, então, no forno seco, a 85 °C, por 15 minutos;
- Coloque a lâmina em câmara úmida, protegida da luz, na estufa, a 37 °C, por um período de 16 a 48 horas.

A definição do tempo de hibridização será feita dependendo da qualidade na análise microscópica, além de depender do tipo de sonda utilizada, pois as sondas *in house* geralmente costumam ter um tempo maior de hibridização. Desse modo, se houver poucos sinais, aumente o tempo de estufa; caso contrário, se houver uma quantidade de sinal extra interferindo na análise, deve-se diminuir o tempo de estufa.

7.2.3 Pós-tratamento

Após o período de hibridização, sempre em ambiente protegido da luz, realize o processo de lavagem da lâmina, para retirada do material sobressalente.

- Retire as lâminas da estufa.
- Remova a cola *rubber cement* e a lamínula (13x13 mm) com uma pinça, com cuidado para não danificar o material.
- Mergulhe as lâminas em uma cuba com 0,6xSSC/IGEPAL 0,3% (pH 7-7,5), a 74 °C, por 3 minutos, agitando manualmente 3 vezes durante o processo.
- Mergulhe as lâminas na cuba com 2xSSC, a temperatura ambiente, e coloque-a no agitador por 2 minutos.
- Mergulhe a lâmina na cuba com etanol 70%, por 2 minutos.
- Mergulhe a lâmina na cuba com etanol 85%, por 2 minutos.
- Mergulhe a lâmina na cuba com etanol 100%, por 2 minutos.
- Seque a lâmina a temperatura ambiente.
- Pipete 14 µL do contra-corante DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) na lâmina.
- Coloque a lamínula (24x50mm) sobre a lâmina.
- Remova as bolhas com a pinça, comprimindo levemente;
- Embrulhe a lâmina em papel-alumínio.
- Armazene a lâmina em refrigerador (1 a 8 °C), *overnight*, ou por, no mínimo, 1 hora, antes de iniciar a análise.

7.3 Análise dos sinais

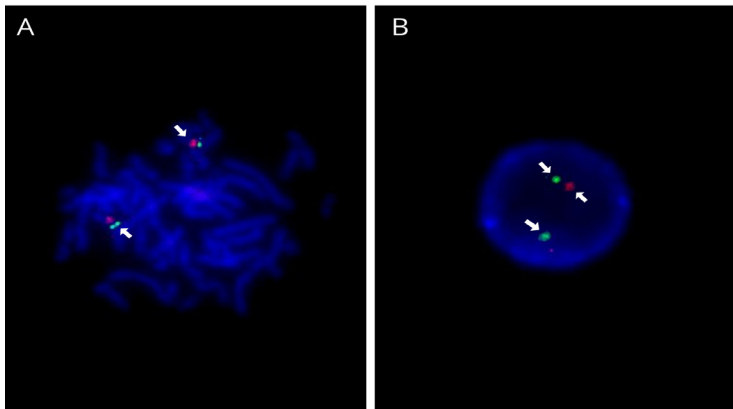
A fase de análise e contagem dos sinais no microscópio de fluorescência é o que irá permitir a avaliação da qualidade do sinal e do material da lâmina. É nesse momento em que se visualizam o nível de

hibridização, influenciado pelo tempo de estufa, e o corpo de fundo (*background*) da lâmina, influenciado pelas etapas de lavagem da lâmina.

Para iniciar, visualize a lâmina na objetiva de 10 vezes, o que possibilita ter uma dimensão de como ficou o material. Após, adicione uma gota de óleo de imersão (importante salientar que o produto deve ser de boa qualidade para o funcionamento correto) em cima da região a ser analisada e passe-a para a objetiva de 100 vezes, para que possam ser realizadas as contagens.

As células, tanto em interfase quanto em metáfase, apresentam-se marcadas em azul, devido à presença do contracolorante DAPI. O *background* deve aparecer escuro — ou preto — e limpo (sem fluorescência entre as células e sem manchas). Além disso, os sinais da sonda devem ser brilhantes, distintos e facilmente avaliados. Aqui, não devem ser contados os sinais em núcleos sobrepostos ou aglomerados ou em células com artefatos e rompidas.

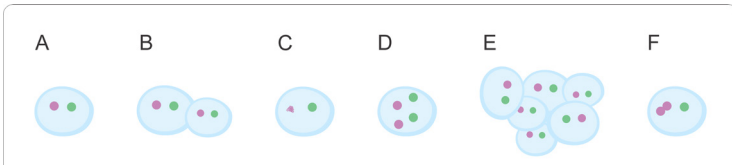
Figura 39. Metáfase (a) e interfase (b) visualizadas em microscópio de fluorescência após técnica FISH.



As setas indicam os sinais vermelhos e verdes correspondentes às sondas locus específico para a região do gene EGFR (vermelho) e região centromérica do cromossomo 7 (verde)

Fonte: acervo dos autores.

Figura 40. Diretrizes para contagem de sinais de sonda de duas cores



Legenda: (A) conte como um sinal verde e um rosa, (B) não conte (os núcleos estão sobrepostos e algumas áreas não podem ser visualizadas), (C) conte como um sinal verde e um sinal rosa (o sinal rosa está difuso), (D) conte como dois sinais rosa e dois sinais verde, (E) não conte (os núcleos estão muitos próximos para serem identificados), (F) conte como um sinal verde e um sinal rosa (o sinal rosa está fragmentado).
 Fonte: elaborado pelos autores, com base em *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual* (2017).

Dessa forma, as células são contadas metodicamente ao longo da lâmina, no *spot* determinado, seja varrendo para a direita e para a esquerda, ou para cima e para baixo, movendo um campo antes de retornar na outra direção, semelhante à leitura de lâminas com Bandeamento-G. Quanto ao número de células a serem contadas para cada tipo de estudo, esse é específico para cada laboratório, e o Colégio Americano de Genética Médica (American College of Medical Genetics) publicou diretrizes em seu *site* (<http://www.acmg.net>) para ajudar os laboratórios a criarem seus próprios protocolos. Por fim, células metafásicas devem ser usadas como verificação de resultados de interfase sempre que possível, pois podem contribuir para a interpretação.

Assim, para facilitar a contagem, faça um quadro onde são marcadas as metafases e interfases, escrevendo a identificação da lâmina no cabeçalho, a fase celular (interfase ou metafase) na coluna da esquerda, e os resultados esperados (normal, ou alterado, ou, por exemplo, o número de sinais encontrados) na primeira linha.

Figura 41. Quadro de contagem

Paciente	Data
Metáfases normais <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Metáfases anormais <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Interfases normais <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Interfases anormais <input type="checkbox"/>

Fonte: elaborado pelos autores.

REFERÊNCIAS:

ARSHAM, Marilyn S.; BARCH, Margaret J.; LAWCE, Helen J. (Ed.). **The AGT cytogenetics laboratory** manual. John Wiley & Sons, 2017.

LIEHR, Thomas. **Fluorescence in situ hybridization** (FISH). ed. 2, Springer Berlin Heidelberg, 2017.

PINKEL, Dr; STRAUME, T_; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 9, p. 2934-2938, 1986.

8. EXTRAÇÃO DE DNA

Ravena Maya Cardoso
Andressa Barreto Glaeser
Maiara Anschau Floriani

O DNA foi isolado, pela primeira vez, em 1869, pelo médico Friedrich Miescher. Atualmente, existem diferentes métodos de extração, que podem ser manuais, semiautomatizados ou automatizados, além de existirem, comercialmente, diversos *kits* baseados em sílica, sais e enzimas.

O isolamento do DNA envolve três etapas básicas, sendo a primeira a lise da membrana celular. Esta etapa compreende a limpeza da amostra, retirando possíveis interferentes e expondo o conteúdo de dentro da célula. Para que isso aconteça, soluções com detergentes, enzimas e outros agentes são utilizadas. Quando, por exemplo, a extração é realizada a partir de sangue periférico, deve-se utilizar o tampão de lise de hemácias (RBC, do inglês *Red Blood Cells*), uma vez que essas não possuem DNA e acabam interferindo nas etapas posteriores da extração e análise. Já na segunda etapa, é realizada a desnaturação dos complexos proteicos, a fim de separar o DNA das proteínas em que esse está enovelado, podendo ser utilizados, para isso, calor, enzimas e sais (como acetato de amônio). A terceira etapa, por sua vez, consiste na precipitação e purificação da amostra, possuindo por finalidade evidenciar a estrutura e separar o DNA dos demais componentes celulares. Pode-se utilizar álcoois que tornam o DNA hidrofóbico, fazendo com que ele se enovele em torno de si.

A técnica aqui descrita é baseada na metodologia *salting-out*, que utiliza sais em grande concentração para a extração de DNA de leucócitos. Para essa metodologia de extração, a amostra de sangue deve ser coletada em tubo com EDTA, sendo indicada a realização da extração logo após a coleta. Contudo, se isso não for possível, a amostra pode ser armazenada no refrigerador (1 a 8 °C) por até 7 dias.

Nesta técnica, são utilizados 2 tubos de centrifugação tipo Falcon, de 15 mL, e 1 microtubo, de 1,5 mL, para cada amostra, que devem ser identificados da mesma forma, com número de registro e data da extração. É necessário também separar, previamente, pipetas de 10, 5 e 1 mL, além de ponteyras. Por fim, os equipamentos requeridos são a centrífuga e o vórtex.

Antes de começar, organize os reagentes que serão utilizados, sendo que todos devem estar em temperatura ambiente no momento da extração:

- tampão de lise de *RBC* 1X (armazenado em refrigerador, 1 a 8 °C);
- tampão de lise de células 1X (armazenado em refrigerador, 1 a 8 °C);
- acetato de amônio 6M (armazenado em refrigerador, 1 a 8 °C);
- TE 10mM Tris:1mM EDTA (armazenado em refrigerador, 1 a 8 °C);
- isopropanol 100% (armazenado em refrigerador, 1 a 8 °C);
- etanol 70% (armazenado em refrigerador, 1 a 8 °C).

O volume de reagentes utilizado na técnica depende do volume de sangue coletado, indicando-se, usualmente, a coleta de 4 mL de sangue periférico. Porém, em recém-nascidos ou em indivi-

duos com alguma restrição, pode haver dificuldades na coleta, o que resulta em um volume menor de material, devendo-se ter cuidado ao calcular as quantidades de solução que serão pipetadas. Quanto às proporções, essas serão descritas nas próprias etapas. Além disso, lembre-se de sempre identificar todos os tubos utilizados.

Voltando à técnica de extração de DNA, essa será dividida em 3 etapas (Figura 40), sendo a primeira a lise celular.

- Transfira o sangue coletado (tubo EDTA) para tubo Falcon.
- Pipete 12 mL (o triplo do volume de sangue inicial) de tampão de lise de RBC 1X.
- Misture lentamente, por inversão do tubo, por 10 minutos;
- Centrifugue a 2000 RPM por 10 minutos.
- Retire o sobrenadante por inversão (descarte no lixo branco);
- Ressuspenda o precipitado no vórtex.
- Pipete 4 mL (o mesmo volume de sangue inicial) de tampão de lise de células 1X no precipitado ressuspensão.
- Misture levemente, por inversão do tubo, até o precipitado dissolver (nessa etapa, você irá sentir um peso dentro do tubo, mas não se preocupe: se o precipitado demorar a dissolver, pode-se incubá-lo a 37 °C, por 15 minutos, sob leve agitação).

Após o precipitado dissolver, siga para a etapa 2, de *salting-out*.

- Pipete 1320 µL (um terço do volume de sangue inicial) de acetato de amônio 6M.
- Homogeneíze no vórtex.
- Centrifugue a 2000 RPM por 10 minutos.

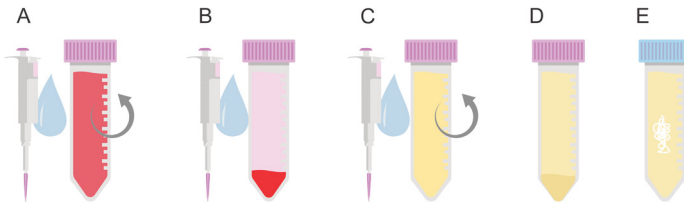
Enquanto se passam os 10 minutos de centrifugação, faça o preparo da fase 3.

- Pipete 500 μ L de TE no microtubo já identificado (local onde o DNA ficará armazenado).
- Pipete 4 mL (o mesmavolume de sangue inicial) de isopropanol 100% no segundo tubo Falcon já identificado.

Passados os 10 minutos da centrifugação, inicie a fase 3, de precipitação de DNA.

- Inverta o sobrenadante no tubo preparado com isopropanol 100%.
- Misture o tubo por inversão, até observar a formação do novelo de DNA.
- “Pesque” o DNA com uma ponteira ou gancho estéril.
- Lave o DNA com 3 gotas de etanol 70%.
- Transfira o DNA limpo para o microtubo com TE.
- Feche o microtubo com *Parafilm M*[®].

Ao finalizar a técnica, o microtubo contendo o DNA deve ser armazenado em *freezer* (-25 a -1 °C), podendo ser usado posteriormente para diversas técnicas moleculares. Além disso, guarde novamente os reagentes em seus lugares de origem, verificando se há quantidade suficiente para futuras extrações, uma vez que, se algum reagente estiver acabando, você deve produzir uma nova solução, como descrito na lista disponível neste manual.

Figura 42. Processo de extração do DNA

Legenda: (A) adição de tampão de lise de RBC e centrifugação,
(B) adição de tampão de lise de células e inversão,
(C) adição de acetato de amônio e centrifugação,
(D) inversão do sobrenadante em tubo com isopropanol,
(E) novelo de DNA.

Fonte: elaborado pelos autores.

REFERÊNCIAS:

LAHIRI, Debomoy K.; NURNBERGER JR, John I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic acids research**, v. 19, n. 19, p. 5444, 1991.

TAN, Siun Chee; YIAP, Beow Chin. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2009, 2009.

9. MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA)

Andressa Barreto Glaeser
Maiara Anschau Floriani
Paulo Ricardo Gazzola Zen

A técnica *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) é uma abordagem de citogenética molecular utilizada para avaliar o número de cópias relativas de cada sequência de DNA, sendo capaz de detectar perda (deleção) ou ganho (duplicação) de material em diversos genes, além de ser uma ferramenta de *screening* para síndromes genéticas e outras patologias, como o câncer. Ela é uma metodologia relativamente recente, desenvolvida em 2002 pela MRC-Holland, uma companhia de biotecnologia. A técnica baseia-se em um ensaio de reação em cadeia da *polimerase multiplex*, do inglês *Polimerase Chain Reaction* (PCR), com sondas específicas para regiões do DNA alvo, podendo ser dividida em cinco etapas: desnaturação/hibridização, ligação, amplificação, separação dos fragmentos por eletroforese capilar e análise dos resultados por *software* específico.

Apesar de ser uma técnica relativamente simples e rápida, com resultados prontos em até 24 horas, é importante que seja desenvolvida com muita atenção, devido à sua sensibilidade a contaminantes. Para resultados bons e fidedignos, a qualidade e a concentração da amostra de DNA a ser analisada é um fator de grande relevância, devendo a extração de DNA ter sido realizada corretamente, com uma etapa adicional de purificação das amostras, para se remover o

excesso de sal e de outros contaminantes obtidos durante o processo. Após a purificação, as amostras devem ser quantificadas, pois a quantidade de DNA utilizada também pode ser um interferente na reação. Dessa forma, para melhor compreensão de toda a metodologia, será dividida a explicação das etapas necessárias.

9.1 Fase pré-analítica

9.1.1 Purificação de DNA com etanol

A purificação de DNA é uma técnica realizada para eliminar o excesso de contaminantes. Existem diversas metodologias para esse processo, que pode ser feito com *kits* comerciais, isopropanol ou etanol, sendo a última descrita adiante. Antes de iniciar, organize reagentes, materiais e equipamentos a serem utilizados:

- acetato de sódio 3M, pH 5,2, ou acetato de amônio 6M (armazenado em refrigerador, 1 a 8 °C);
- etanol 100% (armazenado em refrigerador, 1 a 8 °C);
- etanol 70% (armazenado em refrigerador, 1 a 8 °C);
- gelo para incubação;
- TE 10mM Tris:1mM EDTA (armazenado em refrigerador, 1 a 8 °C);
- pipetas com capacidade para 10, 90 e 300 µL;
- microtubo de 1,5 mL;
- centrífuga refrigerada.

Para a purificação do DNA, siga as etapas a seguir.

- Pipete 90 μL de DNA, previamente extraído e armazenado em TE, em um microtubo.
- Pipete 10 μL de acetato de sódio ou de amônio (1/10 do volume de DNA) no microtubo.
- Pipete 300 μL de etanol 100%, gelado (3x do total DNA+TE), no microtubo.
- Incube no gelo por 30 minutos (ou *overnight*).
- Centrifugue por 30 minutos, a 14800 RPM, a 4 °C.
- Descarte o sobrenadante por inversão.
- Pipete 400 μL de etanol 70%, gelado.
- Homogeneíze no vórtex.
- Centrifugue por 10 minutos, a 14800 RPM, a 4 °C.
- Repita, mais duas vezes, os últimos 4 passos (descartar, pipetar, homogeneizar e centrifugar).
- Descarte o sobrenadante com pipeta.
- Seque o tubo com papel-filtro.
- Mantenha o tubo aberto, em um ambiente fechado, até a completa secagem por evaporação.
- Dilua o precipitado seco em 100 μL de TE 0,1.

9.1.2 Quantificação e diluição do DNA

A quantificação do DNA deve ser feita em equipamentos que permitam identificar a quantidade de DNA na amostra em $\text{ng}/\mu\text{L}$, como espectrofotômetros. Alguns exemplos de equipamentos comumente utilizados para esse fim são o BioSpec-nano[®] e NanoDrop[®].

A amostra ideal possui entre 50 e 60 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de DNA/ μL . Entretanto, a partir de 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ já é possível realizar a análise, sendo que indicamos que não ultrapasse os 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$, para uma boa qualidade dos resultados. Se necessário, a diluição pode ser feita utilizando um tampão previamente preparado, como o TE (TE

10mM Tris:1mM EDTA, armazenado em refrigerador, 1 a 8 °C). Nessa etapa, o TE deve ser adicionado de forma gradual ao DNA, até atingir a concentração ng/μl desejada.

9.3 Etapa analítica

Após essas etapas de preparo da amostra, pode-se iniciar a técnica de MLPA com segurança. Para as cinco etapas seguintes, serão necessários: pipetas, microtubos e/ou placas de PCR, termociclador, equipamento de eletroforese capilar, *kit* comercial de MLPA para a análise desejada e o *software* Coffalyser (disponibilizado pela MRC-Holland®). Há um *kit* desenvolvido pela MRC-Holland® que pode ser utilizado, contendo os seguintes reagentes:

- SALSAL MLPA *Buffer* (tampa amarela);
- SALSAL MLPA *Probe mix* (tampa preta);
- SALSAL Ligase-65 (tampa verde);
- ligase *Buffer* A (tampa transparente);
- ligase *Buffer* B (tampa branca);
- SALSAL PCR *Primer mix* (tampa marrom);
- SALSAL Polimerase (tampa laranja).

O *kit* deve ser conservado em temperaturas entre -25 °C e -15 °C. Além disso, é importante que você separe as amostras a serem testadas antes de iniciar o procedimento, assim como os controles que serão utilizados. Esses controles ou amostras de referência podem ser comerciais ou amostras de indivíduos saudáveis com resultados já conhecidos e validados.

9.3.1 Desnaturação do DNA e hibridização das sondas de MLPA

Para esta etapa, faça o seguinte, em microtubos ou em placa de PCR.

- Pipete 5 μL de DNA (50 $\text{ng}/\mu\text{L}$) em cada microtubo, usando TE para branco (controle negativo para descartar contaminação).
- Coloque no termociclador para desnaturação:
 - › 98 °C por 10 minutos;
 - › 25 °C por ∞ .

Quando o termociclador atingir a temperatura de 25 °C, inicie o preparo do *master mix* de hibridização em um microtubo. O cálculo da quantidade de reagentes para o *mix* depende do número de amostras a serem analisadas, o que inclui amostras teste, amostras de referência (controles) e controles negativos. Dessa forma, prepare, no mínimo, 10% a mais de solução, para possíveis erros na pipetagem.

- Prepare o *mix* de hibridização/anelamento:
 - › 1,5 μL SALSA MLPA *Buffer* (tampa amarela), por reação;
 - › 1,5 μL SALSA MLPA *Probe mix* (tampa preta), por reação.
- Adicione 3 μL da solução em cada tubo (dentro do termociclador).
- Homogeneíze, por pipetagem.
- Inicie o programa de hibridização no termociclador:
 - › 95 °C por 1 minuto;
 - › 60 °C por 18 horas.

9.3.2 Reação de ligação

Após 18 horas de hibridização, mantenha as amostras a 54 °C no termociclador (*Instant incubation*), enquanto prepara a etapa de ligação enzimática.

- Prepare o *mix* de ligação:
 - › 3 µL ligase *buffer* A (tampa transparente) por reação;
 - › 3 µL ligase *buffer* B (tampa branca) por reação;
 - › 25 µL de água ultrapura por reação;
 - › 1 µL SALSA ligase-65 (tampa verde) por reação.
- Com os microtubos dentro do termociclador (54 °C), pipete 32 µL do *mix* de ligação em cada um.
- Homogeneíze por pipetagem.
- Inicie o programa de ligação no termociclador:
 - › 54 °C por 15 minutos;
 - › 98 °C por 5 minutos;
 - › 20 °C por ∞.

Ao término da etapa de ligação, os microtubos podem ser armazenados a temperatura ambiente, por algumas horas, ou no *freezer*, por até uma semana. Para a obtenção de melhores resultados, o processamento deve ser imediato.

Quando as amostras atingirem 20 °C no termociclador, pode-se iniciar a etapa de amplificação. Se possível, a etapa de adição do *mix* de ligação pode ser realizada com o auxílio de uma pipeta multicanal, evitando alterações entre amostras.

9.3.3 Amplificação

- Prepare o *mix* de PCR:
 - › 2 μL SALSA PCR *Primer mix* (tampa marrom) por reação;
 - › 0,5 μL SALSA polimerase (tampa laranja) por reação;
 - › 7,5 μL água ultrapura por reação.
- Espere as amostras atingirem temperatura ambiente.
- Pipete 10 μL do *mix* de PCR em cada microtubo.
- Homogeneíze por pipetagem.
- Inicie o programa de PCR:
 - › 35 ciclos: 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto;
 - › 72 °C por 20 minutos;
 - › 15 °C por ∞ .

Os produtos da PCR devem ser armazenados envoltos em papel-alumínio, podendo ser mantidos por até 1 semana em refrigerador (1 a 8 °C).

9.3.4 Separação de fragmentos

A separação de fragmentos deve ser feita por eletroforese capilar, e é nesta etapa que os produtos de PCR são separados por tamanho. Após a reação de PCR, misture cada amostra com 0,7 μL do produto PCR, com 0,2 μL de LIZ GS 500 *size standard* – ou 0,3 μL de HOX GS 500 *size standard* (Thermo Fisher Scientific), e com 9 μL de formamida Hi-Di. Após, sele a placa de injeção, aquecendo a amostra por 3 minutos a 86 °C e, subsequentemente, resfriando-a por 2 minutos a 4 °C.

Então, submeta as amostras à eletroforese capilar, no sequenciador automático ABI 3130, com leitura de comprimento de onda de 488 nm a 650 nm, e faça a análise no *software* Coffalyser

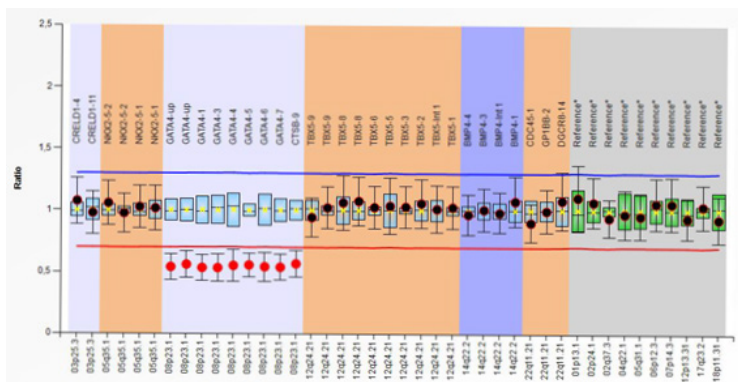
(MRC Holland). Aqui, as amostras deverão ser injetadas no equipamento de eletroforese capilar por profissional habilitado, a 1,6 kilovolt por 15 segundos, devendo a corrida ser de 15 kilovolt, por 3 minutos. Por fim, ressalta-se que outros sequenciadores automáticos podem ser utilizados, pois desempenham a mesma função, como ABI-Prism 3100, ABI 3500 e ABI 3730.

9.4 Fase pós-analítica

9.4.1 Análise dos dados

Os dados brutos gerados pela eletroforese capilar descrita anteriormente são importados pelo *software* Coffalyser (MRC-Holland), que deve ser configurado de acordo com o equipamento utilizado para a eletroforese capilar e com o lote do *kit* de MLPA utilizado. Além disso, essa análise é sempre comparativa com relação às amostras de referência.

Figura 43. Exemplo de análise de MLPA (P311-B1 CHD) pelo método de dosagem quociente (DQ) através do *software* Coffalyser.



Pontos vermelhos indicam deleção heterozigota ($0,40 < DQ < 0,65$)

Fonte: acervo dos autores.

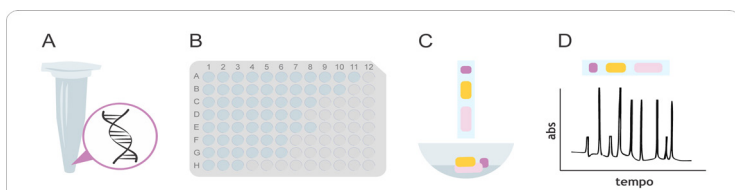
9.5 Cuidados operacionais

A cada ensaio de MLPA, é essencial que você adicione amostras de referência de indivíduos saudáveis (controles) para estimar a reprodutibilidade de cada sonda, sendo necessárias, no mínimo, 3 amostras de referência diferentes. Ademais, se a corrida possuir mais de 21 amostras, você deve adicionar 1 amostra de referência para cada 7 amostras adicionais. Quando possível, sugere-se a adição de um controle positivo, com uma amostra já conhecida, com deleção ou duplicação, a qual pode ser obtida comercialmente ou por amostras do biorrepositório do seu laboratório.

Além das amostras de referência, uma amostra de controle sem DNA (branco ou controle negativo) também é essencial, para verificar se houve contaminação durante o experimento. Para isso, você deve fazer um microtubo com todos os reagentes e seguir o procedimento normalmente, mas sem adicionar DNA, apenas TE. Outros cuidados importantes são:

- use o termociclador com tampa aquecida (99-105 °C);
- misture os reagentes no vórtex, com exceção das enzimas, que devem ser misturadas por leves toques no tubo;
- sempre prepare um volume maior de soluções *master mix* (5-10%).

Figura 44. Processo da técnica de MLPA



Legenda: (A) etapa de purificação, quantificação e diluição do DNA;

(B) etapa de desnaturação, hibridização, ligação e amplificação da sonda em microplaca; (C) eletroforese capilar;

(D) análise dos dados e geração dos gráficos pelo *software* Coffalyser.

Fonte: elaborado pelos autores.

REFERÊNCIAS:

MRC Holland. **MLPA® General Protocol:** Instructions For Use. Amsterdam: MRC Holland, 2022.

Floriani, M. A. et al. GATA4 Deletions Associated with Congenital Heart Diseases in South Brazil. **Journal of Pediatric Genetics**, v. 10, n. 2, p. 92-97, jun. 2021.

10. DESENVOLVIMENTO DE SONDA DE FISH

Andressa Schneiders Santos

Luiza Scherner

Luiza Emy Dorfman

Patrícia Trevisan

Paulo Ricardo Gazzola Zen

Apesar de existir uma enorme variedade de sondas disponíveis no mercado, o alto custo de sondas comerciais ainda dificulta o seu uso como *screening* oncológico, por exemplo. Nesse sentido, o desenvolvimento *in house* de sondas para FISH, além de representar desenvolvimento científico e tecnológico, permite que os custos sejam reduzidos. As etapas desse desenvolvimento serão descritas a seguir.

As sondas são desenvolvidas a partir de alguns *BACs* (*bacterial artificial chromosomes*) contendo a região-alvo e de outros *BACs* contendo uma região-controle. A escolha desses *BACs* deve ser realizada levando-se em consideração o tipo de sonda a ser desenvolvida, o tamanho da sequência que dará origem à sonda, o endereço genômico e a identidade da sequência com outras regiões que não a de interesse. Essa busca inicial pode ser feita por plataformas como *Genome Browser* (<https://genome.ucsc.edu/>), *BLAST* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) e *BACPAC Resources* (<https://bacpacresources.org/>).

10.1 Cultivo dos *BACs* e validação da PCR

As bactérias contendo os *BACs* são cultivadas em meio sólido (LB Ágar *ultrapure* 35mg/L, da Affymetrix), o qual deve ser preparado conforme orientação do fabricante. A presença da sequência de interesse pode ser confirmada através de PCR, com *primers* específicos para a sequência-alvo contida em cada *BAC*. Nesse caso, se a presença da sequência alvo for confirmada, as bactérias devem ser recolocadas em cultivo para incremento em sua proliferação em meio líquido. Siga as seguintes etapas para a preparação dos meios de cultivo.

- Pese 20 g de meio de cultivo LB Broth em um frasco para autoclave.
- Adicione 1000 mL de água ultrapura.
- Pese 35g de meio de cultivo LB Ágar em um frasco para autoclave.
- Adicione 1000 mL de água ultrapura.
- Autoclave os frascos de LB Broth e de LB Ágar.
- Deixe esfriar a temperatura ambiente.

Enquanto os meios esfriam, é importante que você prepare o fluxo laminar e os materiais a serem utilizados para o cultivo, seguindo o protocolo de higienização e esterilização.

- Verta 3 mL do meio de cultivo LB Broth em tubos Falcon de 15 mL.
- Armazene-os em geladeira.
- Verta o meio de cultivo LB Ágar em placas de Petri, até cobrir a superfície.
- Deixe solidificar em temperatura ambiente, dentro do fluxo laminar.

Para fazer o teste de contaminação dos meios de cultivo, coloque um tubo de centrifuga de 15 mL com o meio LB Broth e com uma placa de Petri com LB Ágar na estufa, a 37 °C, por *overnight*. Neste caso, se houver turvação no tubo e crescimento de colônias na placa, é porque há contaminação dos meios, o que inviabiliza o uso para experimentos.

Porém, se o teste de contaminação for negativo, os *BACs* podem ser inoculados, primeiramente, no meio LB Ágar. Dentro do fluxo laminar, já higienizado e esterilizado, faça o procedimento a seguir:

- Aplique 100 µL do antibiótico cloranfenicol no meio LB Ágar, já solidificado na placa de Petri.
- Espalhe o antibiótico, utilizando material descartável e estéril.
- Deixe secar a temperatura ambiente, dentro do fluxo laminar;
- Identifique cada uma das placas de Petri a serem usadas, colocando o número de identificação do BAC, a data e as iniciais do responsável.
- Inocule o *BAC* com alça estéril de 10 µL, através da técnica de esgotamento.
- Coloque na estufa a 37 °C, por *overnight*.

Após o tempo de crescimento bacteriano, realize a replicação das colônias no meio líquido (com o fluxo laminar já preparado para o procedimento).

- Retire as placas de Petri da estufa.
- Selecione **três** colônias isoladas, de tamanho médio, para cada clone (região-alvo e controle).
- Identifique as colônias selecionadas nas placas de Petri.

- Colete cada uma das colônias com uma alça estéril de 1 μL .
- Inocule cada uma das coletas em um tubo com meio LB Broth.
- Agite bem a alça no meio líquido, para homogeneizar o material.
- Identifique cada tubo com o número de identificação do *BAC*, o número da colônia que foi inoculada, a data e as iniciais do responsável.
- Incube no *shaker* a 37 °C, por *overnight*.

Já para a verificação da presença da sequência de DNA da região-alvo e do controle nos *BACs*, realize a reação de PCR com os *primers* específicos. Para isso, primeiramente, prepare o *mix* de acordo com o Quadro 2.

Quadro 2. Volume de cada reagente que compõem a *mix* de PCR por *BAC*

Reagentes	Volume (μL)
H ₂ O	13,25
Tampão 10x	2,50
MgCl ₂	0,75
DNTP	5,00
<i>Primer Forward</i>	1,00
<i>Primer Reverse</i>	1,00
<i>TaqPolimerase</i>	0,50

Fonte: elaborado pelos autores (2023).

A enzima *TaqPolimerase* só pode ser retirada do *freezer* (-20 °C) no momento do uso. Ademais, após o preparo do *mix*, adicione a esse 1 μL do meio líquido de cultivo de cada uma das colônias,

posteriormente à incubação no *shaker* e à homogeneização manual dos tubos.

Então, coloque os microtubos que contêm o *mix* e o material de cada colônia, além do microtubo controle (“branco”), que não contém material do *BAC* no *mix*, no termociclador, utilizando o programa adequado para a sequência a ser verificada. Aqui, a presença da amplificação do DNA de interesse pode ser visualizada através da eletroforese, com a preparação do gel de agarose 1x.

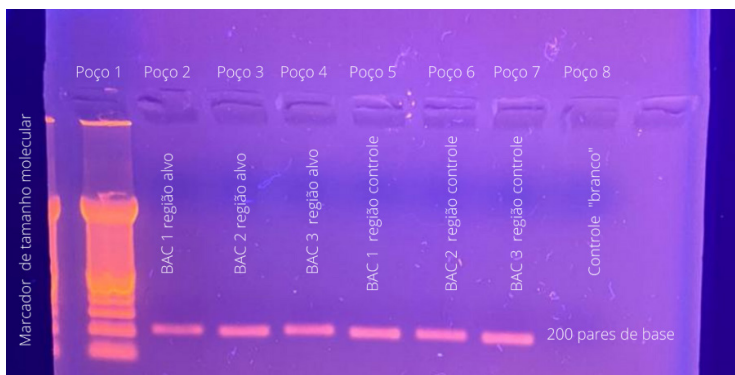
- Pese 1 g de agarose.
- Dissolva essa agarose em 100 mL de TBE 1X, em um Erlenmeyer.
- Aqueça a solução no microondas por 3 minutos.
- Resfrie o frasco em água corrente.
- Adicione 10 μL de brometo de etídio (10 mg/mL).
- Homogeneíze com cuidado.
- Coloque a solução na bandeja.
- Insira o pente.
- Aguarde a solidificação.

Em seguida ao preparo do gel, pipete, nos poços formados pelo pente, o marcador de tamanho molecular (no primeiro poço) e uma mistura de concentração de 3 μL de azul de bromofenol para 3 μL do *mix* da reação e de 4 μL de água destilada. Após, o gel deve ser colocado em uma cuba de eletroforese, a 85 V e 400 mA, por 50 minutos. Ao final, as bandas poderão ser visualizadas no transiluminador, confirmando, assim, a presença da região de interesse no DNA dos *BACs*.

Com base no tamanho do produto e na qualidade da banda presente no gel de agarose, deve ser feita a escolha da melhor colônia de cada clone, que será utilizada para o incremento na proliferação dos *BACs* (Figura 43). Feito isso, coloque as colônias escolhidas em

meio líquido LB Broth, e incube-as no *shaker*, a 37 °C, por *overnight*. Após o cultivo, congele 1 mL do meio em 2 *cryovials*, 500 µL de meio de cultivo líquido e 500 µL de glicerol estéril 50%, no *freezer*, a -80 °C. A quantidade restante de meio pode ser armazenada a 4 °C, selando-se adequadamente com *Parafilm M*[®], com viabilidade de 1 semana.

Figura 45. Gel no transiluminador mostrando as bandas formadas pela seqüência do clone de cada *BAC* e a escala do marcador de tamanho molecular



Fonte: acervo dos autores.

10.2 Extração de DNA bacteriano

A extração de DNA bacteriano dos *BACs* é realizada usando-se o *kit* QIAamp DNA Mini *Kit* (QIAGEN[®]), que possibilita a purificação do DNA por membrana de sílica. Ademais, o material a ser utilizado para a extração é o da suspensão de células bacterianas do meio de cultivo, que foi armazenado em refrigerador (4 °C) após o processo de seleção da colônia.

O protocolo de extração, conforme orientação do fabricante (QIAGEN®), é dividido em duas etapas, sendo a primeira a de lise de células.

- Pipete 1 mL da suspensão celular do meio líquido em um microtubo.
- Centrifugue a 9000 RPM, por 1 minuto.
- Remova o sobrenadante.
- Ressuspenda o *pellet* celular com 300 µL PBS 1x.
- Adicione 30 µL de QIAGEN Proteinase K.
- Adicione 300 µL de *Buffer AL*.
- Homogeneíze em vórtex por 15 segundos.
- Incube em banho-maria ou em banho seco, a 56 °C, por 1 hora.
- Adicione 300 µL de etanol 100%, gelado.
- Homogeneíze manualmente.

Após, inicie a purificação do DNA bacteriano.

- Transfira a mistura com o etanol gelado para o QIAamp *spin column*.
- Centrifugue a 8000 RPM, por 1 minuto.
- Transfira a *spin column* para um novo tubo coletor (*collecting tube*).
- Adicione 500 µL de *buffer AW1*.
- Centrifugue a 8000 RPM, por 1 minuto.
- Transfira a *spin column* para um novo tubo coletor (*collecting tube*).
- Adicione 500 µL de *buffer AW2*.
- Centrifugue a 8000 RPM, por 1 minuto.
- Transfira a *spin column* para um microtubo de 2 mL.
- Centrifugue a 13000 RPM, por 1 minuto.
- Transfira a *spin column* para um novo microtubo de 2 mL.
- Adicione 150 µL de *buffer AE*.

- Incube a temperatura ambiente, por 5 minutos.
- Centrifugue a 8000 RPM, por 1 minuto.
- Repita os 3 pontos anteriores por mais 2 vezes.
- Descarte o *spin column* e mantenha o microtubo.

Nesse microtubo, que contém um total de 450 μL de *buffer* AE adicionado, é que teremos o DNA de interesse. Assim, continue o processo no microtubo, conforme a indicação a seguir.

- Adicione 45 μL de acetato de sódio 3M.
- Adicione 1,25 mL de etanol 100%, gelado.
- Homogeneíze manualmente.
- Incube a $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 1 hora, ou a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, por *overnight*.
- Centrifugue a 11000 RPM, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 30 minutos.
- Remova o sobrenadante.
- Adicione 200 μL de etanol 100% (gelado), sem homogeneizar.
- Centrifugue a 11000 RPM, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 10 minutos.
- Remova o sobrenadante.
- Centrifugue a 11000 RPM, por 2 minutos.
- Remova o sobrenadante.
- Deixe o precipitado secar a temperatura ambiente.
- Dissolva o precipitado seco em 10-30 μL de *buffer* AE, em banho-maria, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O microtubo final, contendo uma amostra de DNA de cada clone dissolvida em *buffer* AE, deve ser identificado e armazenado em *freezer* ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). A concentração de DNA pode ser estimada por eletroforese de gel de agarose (como descrito no item 10.1), utilizando um padrão de peso molecular (*high mass ladder*), ou por espectrofotômetro, como NanoDrop® (ThermoFisher).

10.3 REPLI-g

O *kit* REPLI-g (QIAGEN®), utilizado nesta etapa e que dá nome a ela, permite a amplificação uniforme de todo o DNA genômico de pequenas amostras, possibilitando uma maior variedade e um maior número de análises a serem realizadas. O *kit* contém a enzima DNA polimerase, tampões e reagentes para amplificação do genoma, usando a amplificação de deslocamento múltiplo (MDA). Nesse momento, como você deve possuir uma pequena amostra de DNA de cada clone (armazenadas no *freezer*), é importante que o DNA dessas amostras seja amplificado, para que se tenha a concentração adequada para a produção da sonda.

Dessa forma, antes da pipetagem dos reagentes na amostra, prepare-os.

- Prepare a solução “DLB *buffer* estoque”: adicione 500 μL de água ultrapura ao tubo, então homogeneíze e centrifugue brevemente.
- Prepare as soluções *buffer D1* e *buffer N1*, conforme o número total de reações (volumes descritos para 4 reações):
 - › *buffer D1*: 2,25 μL de DLB *buffer* reconstituído e 8 μL de água ultrapura;
 - › *buffer N1*: 3 μL de stop solution e 17 μL de água ultrapura.
- Identifique um microtubo de 50 μL para cada clone.
- Pipete 100 ng ($\leq 2,5 \mu\text{L}$) do DNA-molde de cada clone em seu respectivo microtubo.

A primeira etapa da reação é composta pela lise do material da amostra e pela desnaturação do DNA, a partir da adição de tampão de desnaturação (*Buffer D1*). Após, interrompa a desnaturação, a partir da adição de tampão de neutralização.

- Adicione 2,5 μL de *buffer D1* à amostra (DNA-molde).
- Homogeneíze em vórtex.
- Centrifugue brevemente.
- Incube as amostras a temperatura ambiente (15 a 25 °C), por 3 minutos.
- Adicione 5 μL de *buffer N1* à amostra;

Na segunda etapa da reação, adicione uma mistura principal (*master mix*), contendo tampão e DNA polimerase.

- Prepare o master mix conforme o número total de reações (volumes descritos por amostra), mantendo os microtubos em recipiente com gelo:
 - › 29 μL de REPLI-g *midi reaction buffer*;
 - › 10 μL de água ultrapura;
 - › 1 μL de REPLI-g *midi DNA polymerase*;
 - › homogeneíze manualmente;
 - › armazene no *freezer* (-20 °C) até o momento do uso.
- Adicione 40 μL do *master mix* aos 10 μL de DNA desnaturado de cada clone.
- Homogeneíze com a pipeta.

Com a mistura pronta, inicie a última etapa, a de reação de amplificação isotérmica.

- Coloque os microtubos de cada clone no termociclador.
- Selecione o programa REPLI-g (30 °C, por 8-16 horas, e 65 °C, por 3 min).

Após a amplificação do material, deve ser feito um gel de agarose 1% (como descrito no item 10.1), para que a concentração

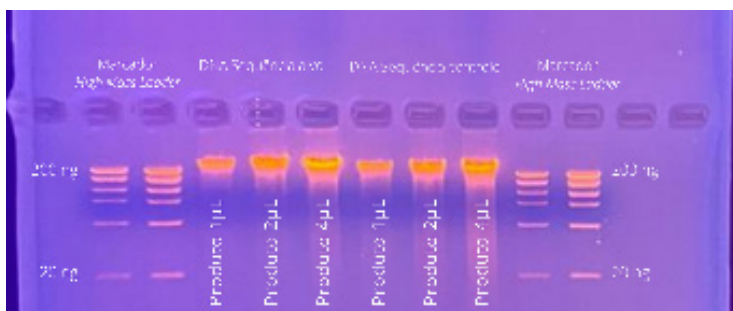
de DNA seja quantificada. Inicialmente, dilua 1 μL do produto da amplificação pelo REPLI-g, na concentração de 1:10 em água ultrapura (1 μL do produto + 9 μL de água ultrapura). Em seguida, faça o *mix*, que será utilizado na eletroforese em gel, utilizando microtubos individuais e seguindo as quantidades (em μL) indicadas no quadro para os produtos já diluídos e para o marcador (*high mass ladder*).

Quadro 3. Esquema de pipetagem para a quantificação da concentração do DNA após amplificação por REPLI-g

	Marcador		Produto diluído (sequência alvo)			Produto diluído (sequência controle)			Marcador	
	-	-	1	2	4	1	2	4	-	-
Produto diluído	-	-	1	2	4	1	2	4	-	-
Marcador	2	4	-	-	-	-	-	-	2	4
H ₂ O	3	1	4	3	1	4	3	1	3	1
Dye 2X	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Fonte: elaborado pelos autores.

Figura 46. Gel no transluminador mostrando o resultado da concentração do DNA após REPLI-g



Fonte: acervo dos autores.

Os microtubos com o produto do REPLI-g restante de cada clone, ou seja, o que não foi diluído, devem ser identificados com número do clone, concentração de DNA observada no gel de aga-

rose, data e iniciais do responsável pelo procedimento. Ademais, os microtubos devem ser armazenados em *freezer* (-20 °C) até que seja iniciada a fase de marcação.

10.4 *Nick Translation*

O método de marcação direta do DNA, o *Nick Translation*, é baseado na atividade da enzima DNA Polimerase I, que é usada para substituir alguns nucleotídeos de uma sequência de DNA por seus análogos marcados com fluorocromos, criando uma sequência de DNA marcada que pode ser usada como sonda na técnica FISH. Essa técnica permite que a sequência de DNA de interesse, que foi extraída, purificada e amplificada de cada clone, seja transformada em sonda a partir da marcação dos nucleotídeos dessa sequência. Assim, a partir de agora, lembre-se de trabalhar em ambiente escuro, com baixa iluminação, pois a presença de luz pode deteriorar os fluorocromos e interferir no sinal da sonda na microscopia.

O passo inicial para a marcação do DNA é a preparação dos materiais e dos reagentes.

- Coloque, em *freezer*, um microtubo identificado para cada um dos DNAs a serem marcados.
- Separe os seguintes reagentes, deixando-os em temperatura ambiente:
 - › água destilada (dH₂O);
 - › DNA específico de cada *BAC* previamente extraído, amplificado por REPLI-g, quantificado no gel e armazenado em *freezer* (-20 °C);
 - › 10x *Nick Translation buffer*;

- › 0,2mM *spectrum green* ou de *spectrum red* dUTP (tenha cuidado para separar corretamente e para marcar com a cor desejada a sequência de DNA selecionada);
- › 0,1mM dTTP;
- › dNTP *mix*;
- › *nick translation enzyme* (essa enzima deve ser mantida em um recipiente com gelo, por todo o período de uso).

Após o preparo dos materiais, calcule a quantidade de DNA a ser pipetada para se obter 1µg de DNA na reação. Além disso, calcule a quantidade de dH₂O, sendo que o volume de dH₂O e de DNA deve totalizar 22,5 µL por microtubo. Para isso, é necessário utilizar o valor de concentração de DNA previamente quantificado pela eletroforese em gel.

Quadro 4. Cálculos para determinação do volume de DNA e dH₂O para a reação de *Nick Translation*

	Concentração de DNA	Concentração sem diluição (x10)	Conversão para µg (/1.000)	Volume de DNA	Volume de dH ₂ O
Clone sequência alvo	100 ng/µL	1.000 ng/µL	1 µg/µL	1 µL	21,5 µL
Clone sequência controle	200 ng/µL	2.000 ng/µL	2 µg/µL	0,5 µL	22 µL

Fonte: elaborado pelos autores.

Após isso, adicione os seguintes reagentes e faça o procedimento a seguir em cada microtubo identificado, na ordem em que estão listados:

- volume calculado de dH₂O;
- volume calculado de DNA;
- 5 µL de 10x *Nick translation buffer*;

- 2,5 μL de 0,2mM *spectrum green* ou de *spectrum red* dUTP;
- 5 μL de 0,1mM dTTP;
- 10 μL de dNTP *mix*;
- centrifugue brevemente em microcentrífuga;
- homogeneíze por vórtex;
- 5 μL de *Nick Translation Enzyme*.

Após a pipetagem desses reagentes, os microtubos devem ser colocados em um termociclador, que deve estar programado da seguinte forma:

- incubar a 15 °C de 3 a 16 horas;
- incubar a 70 °C por 10 minutos;
- incubar a 4 °C.

Quando o termociclador atingir a incubação a 4 °C, os microtubos devem ser recolhidos e armazenados em *freezer* (-20 °C) ou devem ser imediatamente utilizados no protocolo de precipitação do DNA.

10.5 Precipitação do DNA

A última etapa para a produção da sonda é chamada de precipitação, que é responsável por purificar e concentrar a sonda, removendo componentes que possam interferir na técnica de FISH (*primer*, proteínas, etc.). Nesta etapa o DNA marcado de cada sequência (alvo e controle) é precipitado com etanol e acetato de sódio, na presença de DNA de esperma de salmão e da Cot-1 DNA, utilizados para reduzir a hibridização não específica da sonda.

Em um microtubo de 1,5 mL, individual para cada sequência (alvo e controle), faça o seguinte.

- Adicione 50 μL de DNA marcado.

- Adicione 10 μL de *human Cot-1 DNA*.
- Adicione 5 μL de DNA de esperma de salmão (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).
- Adicione 7 μL de acetato de sódio 3M (pH 5,2).
- Adicione 180 μL de etanol 100%, gelado.
- Homogeneíze por centrifugação breve.
- Incube a $-85\text{ }^\circ\text{C}$, por 1 hora, ou a $-20\text{ }^\circ\text{C}$, por *overnight*.
- Centrifugue a 11000 RPM, a $4\text{ }^\circ\text{C}$, por 30 minutos.
- Remova o sobrenadante.
- Adicione 200 μL de etanol 70%, gelado.
- Homogeneíze por pipetagem.
- Centrifugue a 11000 RPM, a $4\text{ }^\circ\text{C}$, por 10 minutos.
- Remova o sobrenadante.
- Adicione 180 μL de etanol 100%, gelado.
- Homogeneíze por centrifugação breve.
- Remova o sobrenadante.
- Deixe secar o *pellet* a temperatura ambiente, com o micro-tubo aberto.

Após, realize a ressuspensão do DNA na solução de hibridização:

- Pipete 10 μL de DenHyb para uma concentração final de 100ng/ μL ;
- Misture completamente em vórtex;
- Incube a $37\text{ }^\circ\text{C}$, em banho-maria, por 15 minutos;
- Mantenha em gelo até o uso, ou armazene em *freezer* ($-20\text{ }^\circ\text{C}$).

Nesse ponto, a sonda está pronta, podendo ser utilizada para 5 testes. Apesar disso, ela deve ser testada em amostras normais, para sua validação e para controle de qualidade do processo, antes de ser utilizada em amostras alteradas de pacientes.

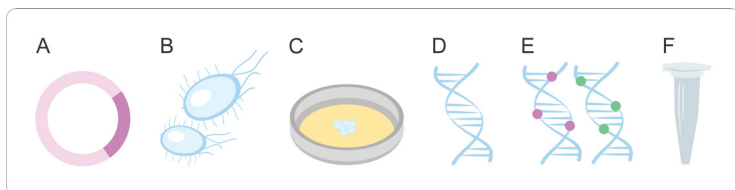
10.6 Mix de hibridização

Para a pipetagem da sonda nas lâminas, faça um *mix* de hibridização, que consistirá da mistura das duas sondas (alvo e controle), que foram desenvolvidas separadamente. Dessa forma, em um único microtubo de 1,5 mL:

- pipete 1,5 μL da sonda alvo;
- pipete 1,5 μL da sonda controle;
- pipete 1 μL de DenHyb.

Ao final, haverá 4 μL (75ng/ μL) de sonda pronta para ser pipetada no *spot*. Lembre-se de que os valores de pipetagem do *mix* podem ser multiplicados dependendo da quantidade de amostras a serem hibridizadas.

Figura 47. Esquema geral do desenvolvimento de sonda *in house*



Legenda: (A) BACs como sequência das regiões alvo e controle, (B) bactérias contendo os BACs, (C) cultivo dos BACs, (D) extração e amplificação do DNA, (E) marcação do DNA com fluorocromos, (F) mix de hibridização.

Fonte: elaborado pelos autores.

10.7 Avaliação da sensibilidade, especificidade e eficiência da sonda

A sonda e o protocolo da técnica FISH devem ser validados no laboratório antes de serem utilizados no diagnóstico clínico. Essa validação garante que a sonda produza resultados repetíveis e que detecte o alvo sem hibridizar com elementos interferentes na lâmina, além de determinar quais parâmetros serão definidos como normais e anormais, para evitar diagnósticos incorretos. Sugere-se que o processo de avaliação de sensibilidade, especificidade e eficácia seja realizado em 20 amostras normais.

10.7.1 Avaliação da sensibilidade da sonda

Para avaliar a sensibilidade da sonda desenvolvida (detecção do sinal esperado), devem ser contadas 200 interfases em cada amostra controle normal, sendo o cálculo da sensibilidade feito de acordo com a fórmula:

$$\text{sensibilidade} = \frac{\text{número de núcleos interfásicos com padrão de sinal esperado}}{\text{número total de núcleos interfásicos}} \times 100$$

10.7.2 Avaliação da especificidade da sonda

Para avaliar a especificidade da sonda desenvolvida (detecção do sinal esperado na região cromossômica correta), devem ser contadas 100 metáfases (5 para cada amostra controle normal), sendo o cálculo da especificidade feito de acordo com a fórmula:

$$\text{especificidade} = \frac{\text{número de sinais no locus cromossômico esperado}}{\text{número total de sinais}^*} \times 100$$

Além disso, devem ser registradas 5 fotos de microscopia de fluorescência, utilizando o filtro DAPI invertido (simula bandeamento G).

10.7.3 Avaliação da eficiência da sonda

Para avaliar a eficiência da sonda desenvolvida, deve ser analisado o percentual de hibridização correta das interfases contadas, sendo o cálculo da eficiência feito de acordo com a fórmula:

$$\text{eficiência} = \frac{\text{número de núcleos interfásicos com hibridização correta}}{\text{número de interfases contadas}} \times 100$$

REFERÊNCIAS:

ARSHAM, Marilyn S.; BARCH, Margaret J.; LAWCE, Helen J. (Ed.). **The AGT cytogenetics laboratory manual**. John Wiley & Sons, 2017.

BACPAC GENOMICS. BACPAC Resources Center. Contém informações sobre livraria de DNA genômico. disponível em < <https://bacpacresources.org/>>. Acesso: 19 dez 2023..

DORFMAN, L. E. **Implementação da produção de sondas de DNA para hibridização in situ fluorescente**. 2018. 101 f. Tese (Doutorado em Patologia) — Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, 2018.

LIEHR, Thomas. **Fluorescence in situ hybridization (FISH)**. ed. 2, Springer Berlin Heidelberg, 2017.

Protocolos do Cytogenetics Core, Cancer Center, University of Colorado - Aurora.

QIAGEN. **QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook**. 2016: Hilden, Alemanha.

QIAGEN. **REPLI-g® Mini/Midi Handbook**. 2011: Hilden, Alemanha.9

RIGBY, Peter WJ et al. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. **Journal of molecular biology**, v. 113, n. 1, p. 237-251, 1977.

11. GERENCIAMENTO DE LABORATÓRIO

Desirée Deconte
Andreza Ávila de Moura
Luiza Emy Dorfman
Patrícia Trevisan
Paulo Ricardo Gazzola Zen

As técnicas de citogenética são responsáveis por mover linhas de pesquisa diagnósticas dentro de um laboratório, promovendo laudos e resultados para diversas condições clínicas e garantindo um fluxo contínuo de experimentos. Entretanto, para garantir a eficiência e a qualidade dos resultados obtidos, é primordial que o laboratório zele pela organização geral do ambiente de trabalho. Alguns aspectos fundamentais do gerenciamento de laboratório são: estabelecer um fluxo lógico de trabalho, delimitar áreas para experimentos específicos, organizar reagentes e equipamentos em lugares adequados, armazenar corretamente as amostras biológicas, bem como descartar de forma apropriada cada tipo de resíduo, a fim de zelar pela qualidade dos resultados alcançados e pela praticidade na distribuição de tarefas.

11.1 Boas práticas de laboratório

As Boas Práticas de Laboratório (BPLs) têm como objetivos diminuir os riscos provenientes do ambiente laboratorial, bem como proteger os pesquisadores envolvidos e evitar a contaminação de amostras e reagentes. Medidas de biossegurança, como a utili-

zação de equipamentos de proteção e a higienização e organização da área de trabalho, são pontos-chave a serem considerados na hora de garantir a segurança do laboratório.

11.1.1 Resoluções da Diretoria Colegiada (RDCs)

A fim de promover a gestão e a organização, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou as Resoluções da Diretoria Colegiada (RDCs), que prezam pelas boas práticas em ambientes laboratoriais. Dentre essas regulamentações, destaca-se a RDC 302/2005, a qual determina normas a respeito de pontos básicos para o oferecimento dos serviços laboratoriais. Os principais tópicos abordados por essa RDC incluem a organização das etapas analíticas, o descarte de resíduos e o controle de qualidade. O objetivo dessa legislação é prezar pela qualidade do serviço prestado e garantir uma maior confiabilidade dos resultados obtidos, de forma que o descumprimento dessas normas pode acarretar multas significativas e outras punições para o laboratório e seus funcionários (BRASIL, 2005).

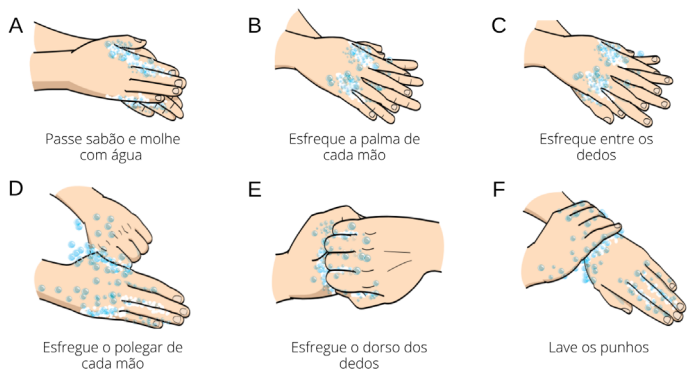
11.1.2 Higienização do ambiente e lavagem de mãos

Recomenda-se que o ambiente de trabalho a ser utilizado (bancada ou outra superfície de manipulação — cabine de fluxo laminar, por exemplo) passe por desinfecção com álcool 70%, tanto antes de qualquer experimento e ao final do uso. Além disso, deve-se manter a organização da bancada, a fim de otimizar o processo de pipetagem e de evitar a necessidade de passar mãos ou braços sobre qualquer vidraria, amostra ou reagente.

O procedimento de lavagem de mãos deve ser realizado antes e depois da manipulação de materiais dentro do ambiente laboratorial. Para a correta higienização, deve-se utilizar água e

sabão, e seguir o passo-a-passo de acordo com a imagem a seguir (Figura 48). Lembre-se de que o uso de luvas não substitui a lavagem apropriada das mãos.

Figura 48. Lavagem correta das mãos



Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Ministério da Saúde)

Fonte: Manual de Referência Técnica para a Higiene das Mãos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde (2009).

11.1.3 Equipamentos de proteção individual (EPIs) e coletiva (EPCs)

A rotina laboratorial inclui o contato constante do profissional com materiais contaminantes, sejam eles de cunho biológico, físico ou químico. Existem ferramentas de uso individual e coletivo para proteger quem manipula amostras e/ou reagentes. O uso de equipamentos de proteção também funciona na via contrária, evitando a contaminação da amostra pelo manipulador.

O uso desses equipamentos é regido pela Norma Regulamentadora 06 (NR6), a qual dispõe de regras e diretrizes a respeito do uso e da disponibilidade de EPIs e EPCs em ambientes laboratoriais (BRASIL, 2018). Dentre os principais equipamentos de

proteção individual, consta o uso de: jaleco, luvas, máscara, touca, óculos de proteção e protetor facial. Os equipamentos de proteção coletiva caracterizam-se por objetos e instrumentos localizados dentro e fora do laboratório que visam ao auxílio à equipe na hora de minimizar riscos, como oss equipamentos: chuveiro de emergência, lava-olhos, autoclave, cabine de segurança biológica (capelas de fluxo laminar) e extintor de incêndio.

11.2 Riscos laboratoriais

O laboratório de citogenética, assim como todo ambiente de pesquisa, conta com a probabilidade da ocorrência de danos, ferimentos ou eventuais doenças. Esse conjunto de possibilidades adversas, que podem ameaçar a saúde, a integridade física, o meio ambiente ou a propriedade, são denominados riscos, e podem ser divididos em cinco categorias, apresentadas a seguir.

11.2.1 Riscos biológicos

Os riscos considerados biológicos são compostos por vírus, bactérias, fungos, parasitas e qualquer microorganismo vivo nocivo à saúde humana. Normalmente, a infecção ocorre pelo contato direto com amostras biológicas ou animais contaminados. Os agentes de riscos biológicos podem ser classificados em quatro diferentes classes, que levam em consideração a patogenicidade, os modos de transmissão, a disponibilidade de medidas profiláticas eficazes, e a disponibilidade de tratamento eficaz. Os agentes biológicos de classe I são considerados aqueles com menor probabilidade de provocar enfermidades humanas, enquanto os agentes biológicos de classe

IV são compostos por microorganismos considerados como grande ameaça à saúde humana.

11.2.2 Riscos físicos

Os chamados riscos físicos são toda a forma de energia (ruído, por exemplo) ou condições físicas inadequadas a que os trabalhadores podem estar expostos. Entre os principais exemplos, incluem-se: pressões anormais, ruídos, temperaturas extremas de frio ou de calor, radiações ionizantes (raio-x) e não-ionizantes (luz ultravioleta, micro-ondas), vibrações e umidade.

11.2.3 Riscos químicos

Os riscos químicos são compostos por toda substância ou agente químico que possa penetrar no organismo por inalação, ingestão ou via dérmica. A exposição a esses compostos pode acontecer na forma líquida, gasosa, ou por meio de partículas presentes nos ambientes ou processos de trabalho. Alguns exemplos incluem: ácido clorídrico, etanol, ácido acético, brometo de etídio e outras soluções oxidantes, corrosivas ou inflamáveis.

11.2.4 Riscos de acidentes

Os riscos acidentais, ou de acidentes, são fatores ou situações de perigo que possa ameaçar a integridade física e moral do trabalhador. Os riscos mais comuns dessa categoria incluem queimaduras, cortes e perfurações. Exemplos incluem: uso de máquinas e equipamentos sem proteção, instrumentos perfurocortantes, manipulação de vidrarias, e armazenamento inadequado de reagentes e substâncias químicas.

11.2.5 Riscos ergonômicos

A categoria de riscos ergonômicos é marcada por lesões que possam interferir nas características psicológicas e/ou fisiológicas do profissional, prejudicando, assim, a execução de suas atividades. Normalmente, esses riscos são atribuídos a postura inadequada, movimentos repetitivos e levantamento e transporte manual de pesos excessivos. Ademais, relações interpessoais problemáticas e turnos longos de trabalho também fazem parte dessa categoria.

11.3 Descontaminação e descarte

É possível afirmar que a base de um bom gerenciamento das atividades rotineiras e experimentais inicia-se sempre com o processo de descontaminação do ambiente laboratorial e das superfícies a serem utilizadas, terminando com o descarte apropriado dos materiais e das substâncias manuseadas.

11.3.1 Descontaminação

A descontaminação é caracterizada como o processo de eliminar, total ou parcialmente, microrganismos, partículas ou materiais orgânicos de determinado ambiente ou superfície. Os objetivos desse processo são viabilizar o uso de superfícies de bancadas, possibilitar a reutilização de materiais e descartar apropriadamente substâncias, vidrarias ou ferramentas utilizadas. A descontaminação é composta por três etapas:

- **Limpeza:** é o primeiro passo no processo de descontaminação. Nessa etapa, são removidas as partículas e a matéria orgânica, através da lavagem de objetos e superfícies com água e sabão.

- **Desinfecção:** é o segundo passo e consiste na eliminação de todo e qualquer microrganismo, exceto os esporos. Aqui, é aconselhado evitar o uso de vassoura, uma vez que ela causa a suspensão de partículas que podem vir a se depositar novamente em superfícies já desinfectadas. Portanto, é recomendado o uso de rodos e panos umedecidos. Ademais, substâncias utilizadas na desinfecção incluem o álcool 70% e o hipoclorito de sódio (NaClO) 5%.
- **Esterilização:** é o terceiro procedimento, e visa à eliminação de qualquer forma de vida. Essa anulação pode ser feita através de métodos químicos ou físicos, como calor úmido (autoclave) ou seco (estufas ou forno de Pasteur), ou através do uso de agentes químicos, como o óxido de etileno, para materiais que não suportam altas temperaturas. Salienta-se que as condições de temperatura padrão de esterilização são de 160 °C a 170 °C, e que esses procedimentos devem ser realizados com extremo cuidado.

11.3.2 Descarte

O descarte é o processo de destino dado a qualquer ferramenta, material, substância e reagente após seu uso, bem como o encaminhamento final de amostras biológicas. Os principais tipos de procedimentos de descarte são estipulados de acordo com o tipo de material: biológico, perfurocortante ou químico.

- *Descarte de material biológico.* É considerado material biológico qualquer composto biológico, como células ou microrganismos. Esses resíduos devem ser tratados com hipoclorito de sódio a 5%, por 24h e, em seguida, descartados. Seu armazenamento deve ser feito em sacos plásticos brancos, de capacidade máxima de até 100 litros, indicados com a

etiqueta padrão preconizada pela normativa NBR 9190. Além disso, antes do descarte, deve-se autoclavar o material contaminado a 121 °C para descontaminação.

- *Descarte de material perfurocortante.* Materiais perfurocortantes são todos aqueles com risco iminente de cortes ou perfurações, como agulhas, ampolas abertas, lâminas de bisturi, vidraria quebrada e lâminas/lamínulas. Esse grupo compõe a principal fonte de riscos de acidentes, e de contaminação por agentes infecciosos. Portanto, devem ser armazenados em embalagens próprias, resistentes a autoclavação, rígidas e etiquetadas conforme a NBR 9190, nas seguintes condições: materiais perfurocortantes, como agulhas e seringas contaminadas, em caixas descartáveis, e vidrarias quebradas, em caixas de papelão. Por fim, os recipientes para descarte devem estar localizados próximos da área de utilização dos materiais.
- *Descarte de material químico.* As substâncias químicas devem ser descartadas com muito cuidado, uma vez que não se pode misturar resíduos de diferentes composições. Os resíduos químicos variam, possuindo diferentes padronizações de descarte de acordo com sua natureza, conforme a NBR 9190:
 - › reagentes líquidos devem ser acumulados em garrafas ou galões, lembrando-se de que não se deve encher completamente o recipiente, preenchendo, no máximo, 80% do seu volume;
 - › reagentes sólidos devem ser descartados em sacos plásticos brancos ou em caixas fechadas.

Por fim, os resíduos químicos devem ser tratados antes de descartados por empresas especializadas e, no armazenamento, a compatibilidade entre os produtos químicos deve ser sempre considerada.

11.4 Espaço físico e equipamentos

Os laboratórios de citogenética são extremamente dinâmicos, uma vez que diversos procedimentos são executados diariamente, além de possuírem uma divisão de tarefas eficiente na rotina dos pesquisadores. Por isso, a delimitação de alguns espaços específicos e seguros é necessária, a fim de otimizar a manipulação de equipamentos e amostras, a realização de técnicas e experimentos, e o armazenamento adequado de substâncias e reagentes. Ainda, é extremamente relevante a presença de um setor administrativo à parte, para a organização de laudos, prontuários e resultados de exames, sendo esse um diferencial na gestão geral do laboratório. Ademais, os espaços destinados aos laboratórios de citogenética devem, em geral, ter tamanhos apropriados, para garantir a melhor qualidade do trabalho e a segurança dos funcionários.

11.4.1 Setor de manipulação de amostras em bancada

O setor de manipulação de amostras em bancada tem como objetivo delimitar áreas para os experimentos que envolvem pipetagem e manipulação de vidrarias, como a preparação de amostras para PCR, as extrações de DNA e o preparo de reagentes. Normalmente, estes ambientes são amplos, sendo caracterizados por bancadas extensas e bancos altos, com equipamentos como balanças analíticas, centrífugas, vórtex e medidores de pH dispostos ao longo dessas bancadas, para uso comum dos pesquisadores. É importante lembrar, ainda, que, justamente por eles estarem na área mais acessada

do laboratório, esses equipamentos e instrumentos devem ter uma rotina de limpeza, manutenção e calibragem apropriada. Ainda, prateleiras e armários para o armazenamento de vidrarias, caixa de pipetas, ponteiras e demais itens de uso frequente, devem estar localizados próximos à área de manipulação.

11.4.2 Sala de cultivo

O espaço destinado para o cultivo celular deve ser organizado de maneira que a manipulação de todas as amostras e culturas de células sejam feitas sob condições estéreis, sem contato entre o técnico e a amostra. Para isso, recomenda-se o uso de fluxo laminar. A manutenção do fluxo laminar deve ser realizada periodicamente, sendo registrada em um documento acessível a todos que trabalham no laboratório. No dia de manutenção, deve-se ter atenção à validade e ao funcionamento do filtro de ar e da lâmpada UV. A sala de cultivo deve conter, também, uma estufa com fornecimento de CO₂ específica para as amostras de exames citogenéticos, excluindo contato com outros tipos de cultivos, como bacteriológicos.

11.4.3 Setor operacional

O setor operacional é aquele que dispõe de equipamentos mais robustos, que necessitam de menor fluxo de pessoas para otimizar o seu andamento. Os equipamentos que normalmente podem compor essa área são os termocicladores, as estufas de CO₂, as capelas de fluxo laminar, o laser *scanner*, as fontes de energia e o transiluminador. Neste setor, são realizados experimentos que envolvem PCR, eletroforese em gel e *array*, de maneira que os manuais de operação devem estar disponíveis na bancada, ao lado do respectivo equipamento. Além disso, equipamentos, reagentes e amostras de-

pendentes de temperatura específica devem ser controlados adequadamente, devendo as estufas, por exemplo, ser equipadas com alarmes que indiquem desvios de temperatura e de condições de CO₂. Por fim, para os laboratórios que produzem suas próprias sondas, as normas de laboratórios de biologia molecular relativas à prevenção de contaminação por DNA devem ser seguidas.

11.4.4 Sala escura

No laboratório de citogenética, uma área especial, protegida da luz, deve ser reservada para a realização de técnicas como FISH e Análise Cromossômica por Microarranjo. A finalidade dessa sala é ser um espaço enxuto e fechado para realizar as análises de lâminas que são fotossensíveis. Equipamentos específicos, como o microscópio de fluorescência com filtros apropriados e um monitor para a visualização de imagens, devem ser incluídos no ambiente. Ademais, esses microscópios devem ter resolução para uma análise citogenética adequada, e esses equipamentos devem ser mantidos sob uma rotina de limpeza e calibração apropriada.

11.4.5 Setor administrativo

A organização para um bom funcionamento constante dentro de um laboratório reside nesse setor. A administração rege a gestão de laboratório, uma vez que é lá em que todos os dados, informações, prontuários e resultados são armazenados. Além do armazenamento dos documentos físicos, também é extremamente sugerida a gestão apropriada desses dados de forma digital. A organização dos documentos de forma padronizada (alfabética ou por data, por exemplo) é altamente recomendada. Este setor deve ser composto, primariamente, de alguns computadores, cadeiras,

armários e gavetas. A administração é a responsável por manter as informações em dia, possibilitando fácil acesso a elas na hora de buscar dados recentes ou mais antigos. Por fim, o setor pode ser alocado próximo à área de circulação dos funcionários, uma vez que a digitalização de dados e informações deve acontecer esporadicamente durante a rotina laboratorial.

11.4.6 Sala de atendimento ao paciente

Este último setor é opcional, uma vez que nem todo laboratório de citogenética oferece serviços de atendimento clínico ou de coleta de material ao paciente. Entretanto, caso seja realizado, o ambiente destinado ao atendimento presencial deve ser separado do ambiente laboratorial, uma vez que o fluxo de pessoas implica um potencial contaminante, sendo imprescindível uma divisão física entre as atividades clínicas e as de laboratório. Normalmente, o espaço para atendimento envolve, pelo menos, maca, cadeira, mesa e computador, para acesso ao prontuário *online*. Além disso, tal sala também pode ser utilizado para o armazenamento de documentos administrativos.

11.5 Identificação de amostras

Para a organização e garantia da fidedignidade dos resultados obtidos, é necessário que todas as amostras encaminhadas ao laboratório sejam registradas (de forma digital ou escrita) e codificadas através de números e/ou letras. Dessa forma, cada paciente terá um código próprio, o que irá proporcionar um melhor controle de identificação de amostras ao longo de todas as etapas da análise citogenética.

11.5.1 Recepção de amostras

As amostras que forem encaminhadas ao laboratório devem seguir uma ordem de recepção apropriada, para garantir a organização e o controle de todos os exames solicitados para cada paciente. A recepção inclui a verificação das amostras, o registro imediato em fichas cadastrais próprias do laboratório e a identificação dos tubos, de acordo com o código fornecido para o paciente. A seguir, a amostra é armazenada em geladeira ou *freezer* (de acordo com o tipo de amostra e o período de estocagem antes da realização do procedimento laboratorial), ou encaminhada para manipulação (extração do DNA ou cultivo celular, por exemplo).

11.5.2 Ficha de cadastro

Todas as amostras devem ser registradas em uma ficha de cadastro própria do laboratório, a qual deve conter informações como:

- nome do paciente;
- código de registro do laboratório;
- data de nascimento e idade do paciente;
- sexo do paciente;
- data e hora da colheita;
- tipo de amostra (sangue periférico, líquido amniótico, etc.);
- exame solicitado;
- profissional que solicitou o exame;
- características clínicas do paciente (quando pertinente);
- profissional que realizou o exame.

11.5.3 Rejeição de amostras

Idealmente, todas as amostras encaminhadas ao laboratório devem ser aceitas para posterior análise. Entretanto, algumas condições são necessárias para que as amostras sejam consideradas aptas para a realização dos procedimentos dentro do ambiente laboratorial.

Algumas situações que podem inviabilizar o recebimento/processamento da amostra incluem: formação de coágulos, volume coletado insuficiente, tubo utilizado para a colheita inapropriado para o exame solicitado, transporte e armazenamento irregular da amostra e ausência ou incompletude de dados clínicos.

Quando houver a rejeição de amostras, a solicitação para uma nova colheita deve ser realizada. Em casos em que a colheita for inviável ou causar risco/desconforto ao paciente, a equipe do laboratório, juntamente com a equipe hospitalar, deve discutir as possíveis soluções a serem apresentadas.

11.6 Armazenamento

O armazenamento de amostras e insumos é essencial para garantir a qualidade a longo prazo dos reagentes, bem como para garantir a estabilidade do material biológico coletado. Ainda, é necessário registrar, também, os resultados obtidos por cada exame realizado, uma vez que o laudo é o documento mais relevante para o diagnóstico laboratorial e para o posterior diagnóstico clínico.

11.6.1 Amostras

Amostras de DNA extraído devem ser armazenadas em Eppendorf ou tubo Falcon, vedados e acondicionados em refrigeradores. A amostra de DNA a ser usada em um curto espaço de tempo

pode ser armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para armazenamento em longo prazo, utilizar refrigeradores com capacidade para $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*ultrafreezer*).

Lâminas usadas para testes diagnósticos em citogenética têm uma vida útil limitada, devido às técnicas de coloração para bandejamento e sondas com fluorocromos. Tendo isso em vista, esse tipo de amostra pode ser armazenada em caixa porta lâminas, com proteção de umidade e luz, por um período de três anos. Especificamente, lâminas usadas na análise com marcação fluorescente, como em FISH, devem ser armazenadas até o momento da emissão do laudo. Além disso, a captura de imagens deve ser realizada e arquivada juntamente ao laudo.

Outros tipos de amostras, como restos de cultivos celulares e suspensão de células, são armazenadas conforme o protocolo de cada laboratório. Recomenda-se que as amostras sejam mantidas em local adequado até o momento da emissão do laudo. Ademais, amostras sem identificação podem ser reutilizadas para controle de qualidade e desenvolvimento de testes, conforme permitido pelo Comitê de Ética institucional.

O armazenamento de material biológico humano para pesquisa pode ser organizado de duas maneiras. A primeira é o biobanco, definido como o conjunto de amostras e informações associadas, coletadas e armazenadas para fins de pesquisa, sob responsabilidade e gerenciamento da instituição (exemplo: universidades e centros de pesquisa). O segundo é o biorrepositório, que é composto por um conjunto de amostras, que ficam armazenadas ao longo da execução de um projeto de pesquisa específico, sob gerenciamento do pesquisador (BRASIL, 2011).

11.6.2 Reagentes

Os reagentes devem ser armazenados de acordo com as especificações do fabricante referentes a temperatura e exposição à luz. Recomenda-se a utilização de armários e prateleiras para a estocagem de insumos, preferencialmente com portas, para evitar a exposição constante à luz ambiente e a potenciais contaminantes. Ademais, vidrarias devem ser armazenadas em locais fechados e, uma vez autoclavadas, devem ser mantidas vedadas. Por fim, é aconselhável que a localização de cada reagente e material seja registrada em planilha, para facilitar a localização desses e evitar a manipulação desnecessária de armários e prateleiras.

11.6.3 Registro de exames

Ao se realizarem os exames no laboratório, deve ser preenchido o formulário de acompanhamento do exame, o qual deve estar de acordo com a documentação padronizada (ver Capítulo 11, item 11.8) e conter a identificação do profissional responsável pela condução do procedimento, com iniciais e data. Por exemplo: a técnica Maria Silva realizou o cultivo celular do paciente 011 no dia 09/05/2021. Assim, no formulário desse paciente, estará registrado “Cultivo celular: 011, MS, 09/05/2021”.

Além disso, o resultado de cada exame deve ser registrado apropriadamente em laudos padronizados pelo laboratório. É aconselhável que o registro seja feito nas formas escrita e, principalmente, digital, para evitar a perda de informações. Esse registro dos exames deve estar, também, especificado na ficha do respectivo paciente.

11.7 TRANSPORTE

A circulação de amostras, reagentes e materiais dentro do laboratório deve ser feita com cautela, para que não haja acidentes, perda de material ou, ainda, contaminação proveniente de fatores externos. Assim, todo o transporte realizado dentro do laboratório deve ser feito com calma, usando luvas e evitando transportar um número excedente de materiais, conforme segue:

- amostras e reagentes devem estar devidamente vedados;
- tubos, Eppendorfs e quaisquer materiais similares devem ser alocados em algum suporte antes de se realizar a transferência de local;
- lâminas e lamínulas devem ser colocadas em superfícies planas antes de serem manipuladas e transportadas;
- reagentes fotossensíveis devem ser transportados em recipientes fechados.

11.8 Documentação de procedimentos

Todo laboratório de citogenética possui um arsenal de procedimentos a serem desempenhados, desde algo mais simples, como a limpeza de determinada vidraria, até análises mais complexas, como a realização de um exame específico. Portanto é imprescindível que o laboratório realize registros próprios, que documentem o passo-a-passo de todas as metodologias utilizadas na rotina de trabalho. A ideia dessa documentação é possibilitar que qualquer profissional tenha condições de executar todo e qualquer procedimento dentro do ambiente de trabalho. Os documentos mais conhecidos na área laboratorial são os Procedimentos Operacionais Padrão (POPs), os

quais servem como guias práticos para o desempenho de qualquer técnica realizada dentro de um laboratório.

11.8.1 Informações para confecção dos POPs

- Passo-a-passo detalhado do procedimento.
- Descrição detalhada do preparo de reagentes ou de soluções utilizadas no procedimento (quando aplicável).
- Descrição detalhada do uso de equipamentos ou instrumentos de laboratórios utilizados no procedimento (quando aplicável).
- Instruções de segurança a serem seguidas durante o procedimento.
- Instruções para o caso de eventual contaminação ou dano ao profissional.
- Identificação do responsável pela redação e padronização do procedimento (iniciais e data).

Após a redação de todos os POPs de procedimentos realizados dentro do laboratório, é recomendado criar pastas para armazenamento de toda a documentação, uma vez que a criação de um local específico para esse tipo de informação facilita a rotina de trabalho e cria um hábito saudável de organização entre os profissionais.

11.9 Laudos

Laudos de análises anteriores realizadas no laboratório devem ser acessíveis ao corpo clínico. Os registros precisam ser rastreáveis tanto pelo nome do paciente quanto por um segundo identificador único (por exemplo número de acesso ao laboratório). Além disso, os registros devem ser mantidos de forma a garantir privacidade, segurança, integridade e acesso, conforme exigido por lei e padrões profissionais, devendo ser liberados so-

mente com a devida autorização. Dessa forma, os laudos dos resultados obtidos através de análises de citogenética devem incluir as seguintes informações gerais:

- nome do paciente/participante;
- código de registro do laboratório;
- data de nascimento do paciente/participante;
- data de coleta e/ou recebimento da amostra;
- tipo de amostra;
- diagnóstico clínico/suspeita;
- nome(s) do(s) médico(s) solicitante;
- data de liberação do laudo;
- assinatura do responsável técnico.

Para laudos de análise cromossômica, como o cariótipo, os seguintes itens são requeridos:

- número de células analisadas;
- declaração de contagem de células a mais, para resolução de mosaicismo;
- tempos e condições de cultura de células e de técnica de bandeamento utilizada;
- nível de resolução dos cromossomos (exemplo: 450 bandas, 850 bandas);
- nomenclatura correta dos cromossomos, segundo o ISCN;
- resultados de controles, quando utilizados;
- interpretação dos resultados, com correlação com informações clínicas;
- recomendações para estudos genéticos laboratoriais adicionais, quando apropriado.

Além disso, especificamente para os laudos de análise citogenética pela técnica de FISH, os seguintes itens são requeridos:

- resultado normal/negativo ou alterado/positivo;
- identificação da sonda utilizada (nome do gene ou *locus* e nome do fabricante);
- número de células analisadas;
- nomenclatura correta, segundo o ISCN;
- imagens de duas células;
- declaração de limitações do teste;
- interpretação dos resultados e suas correlações com informações clínicas.

Por fim, nos casos de análises a partir da técnica de MLPA, diferentes itens são requeridos:

- resultado com dados de alteração encontrada ou normal/negativo;
- nomenclatura correta, segundo o ISCN;
- descrição da técnica realizada;
- nome do *kit* utilizado e nome do fabricante;
- gene(s) testado(s);
- nome e versão do *software* utilizado para análise;
- interpretação dos resultados e suas correlações com informações clínicas.

REFERÊNCIAS:

AMERICAN COLLEGE OF MEDICAL GENETICS AND GENOMICS. **Technical Standards for Clinical Genetics Laboratories**. American College of Medical Genetics and Genomics, 2021. Disponível em: https://www.acmg.net/ACMG/Medical-Genetics-Practice-Resources/Genetics_Lab_Standards/ACMG/Medical-Genetics-Practice-Resources/Genetics_Lab_Standards.aspx?hkey=0e-473683-3910-420c-9efb-958707c59589. Acesso: 19 dez 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 302, de 13 de Outubro de 2005, dispõe sobre Regulamento Técnico para funcionamento de Laboratórios Clínicos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 out. 2005..

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. **Resolução nº 441**, de 12 de Maio de 2011. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 mai. 2011.

BRASIL. Ministério do Trabalho. **Norma Regulamentadora nº 06** - Equipamento de Proteção Individual - EPI. Aprovada pela Portaria MTb nº 3.214/1978, alterada pela Portaria nº 877, de 24 de Outubro de 2018. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 out. 2018.

ROGATTO; S. R. **Citogenética Sem Risco**: Biossegurança e Garantia de Qualidade. Ribeirão Preto: FUNPEC-RP, 2000.

LISTA DE SOLUÇÕES

1. Acetato de Amônio 6M

- Acetato de amônio $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$: 46g
- Água destilada: 100 mL
- Armazenamento: geladeira (2 a 8 °C)

2. Acetato de Sódio 3M

- Acetato de sódio $3\text{H}_2\text{O}$: 40.81g
- Água destilada: 100 mL
- Ajustar pH em 5,2 com Ácido Acético Glacial
- Armazenamento: geladeira (2 a 8 °C)

3. Álcool (Etanol) 70%

- Etanol absoluto: 700 mL
- Água destilada: 300 mL

4. Álcool (Etanol) 85%

- Etanol absoluto: 850 mL
- Água destilada: 150 mL

5. EDTA 0,5 M

- Ácido etilenodiamino tetra-acético dihidratado
 $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 186,1g
- Água destilada: 800 mL
- Hidróxido de Sódio NaOH para pH 8,0: 20g
- Água destilada até completar 1.000 mL
- Armazenamento: geladeira (2 a 8 °C)

6. Fixador (concentração 3:1)

Concentração 3:1

- Metanol: 18 mL
- Ácido acético: 6 mL
- Armazenamento: frasco âmbar em temperatura ambiente

7. Ácido clorídrico (HCl)

Concentração 1 M

- HCl: 8,3 mL
- Água destilada até completar 100 mL
- Armazenamento: temperatura ambiente

Concentração 0,2M

- HCl: 16,36 mL
- Água destilada: 1.000 mL
- Armazenamento: temperatura ambiente

8. Cloreto de potássio (KCl) 0,075 M

- KCl: 5,9 g
- Água destilada: 1.000 mL
- Ajustar pH entre 6,0 e 6,8
- Armazenamento: geladeira (2 a 8 °C)

9. Metotrexato (10^{-5} M)

- Metotrexato: 0,5 mL
- Solução de Hank's: 4,5 mL
- Armazenamento: frasco protegido da luz, geladeira (2 a 8 °C)

10. PBS (Tampão fosfato-salino)

Concentração 10X

- Cloreto de sódio NaCl: 80 g
- Cloreto de potássio: 2 g
- Fosfato dissódico Na₂HPO₄: 14,4 g
- Fosfato monopotássico KH₂PO₄: 24 g
- Água ultrapura para 1.000 mL
- Armazenamento: temperatura ambiente

Concentração 1X

- PBS 10X: 100 mL
- Água ultrapura: 900 mL
- Armazenamento: frasco âmbar em geladeira (2 a 8 °C)

11. SSC (Tampão de citrato de sódio salino, *saline-sodium citrate buffer*)

Concentração 20X

- SSC 20X: 132g
- Água destilada: 400 mL
- Ajustar pH em 7,0
- Água destilada para completar 500 mL
- Armazenamento: temperatura ambiente

Concentração 2X

- Solução de SSC 20X: 100 mL
- Água destilada: 900 mL
- Ajustar pH entre 7 e 7,2
- Armazenamento: geladeira (2 a 8 °C)

Concentração 0,6X

- Solução de SSC 20X: 30 mL
- Água destilada: 970 mL
- Armazenamento: geladeira (2 a 8 °C)

Concentração 0,4X

- Solução de SSC 20X: 20mL
- Água destilada: 980 mL
- Armazenamento: geladeira (2 a 8 °C)

12. SSC 0,6X/IGEPAL 0,3%

- Solução de SSC 0,6X: 50 mL
- IGEPAL: 150 µL
- Observação: preparo somente na hora do uso.

13. Solução de Hank's

- Cloreto de potássio KCl: 0,4 g
- Fosfato monopotássico KH_2PO_4 : 0,006 g
- Cloreto de sódio NaCl: 8,00 g
- Bicarbonato de sódio NaHCO_3 : 0,35 g
- Fosfato dissódico dihidratado $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,06 g
- D-glucose: 1,00 g
- Vermelho de fenol: 0,01 g
- Água destilada: 1.000 mL
- Ajustar pH entre 6,8 e 7,8 com KCl
- Armazenamento: frasco âmbar em geladeira (2 a 8 °C)

14. Solução de Hoechst 33258

- Hoechst 33258: 1,5 mg
- Água destilada: 10 mL

15. Solução de NaCl (Bandeamento G)

- Cloreto de sódio NaCl: 8,5 g
- Água ultrapura: 1.000 mL
- Ajustar pH em 7,0

16. Solução de Pepsina 0,025%

- HCl 1M: 0,8 mL
- Pepsina: 20 μ L
- Água destilada para completar 80 mL
- Observação: preparo na hora do uso.

17. Tampão de Lise RBC (Red Blood Cell)

Concentração 10X

- Cloreto de amônio NH_4Cl 1,5 M: 40,12 g
- Na_2EDTA 20 mM: 7,44g
- Bicarbonato de sódio NaHCO_3 para ajustar pH em 6,5: 3,1 g
- Água destilada: 500 mL
- Armazenamento: geladeira (2 a 8 °C)

Concentração 1X

- Solução de Tampão de Lise RBC 10X: 10 mL
- Água destilada: 90 mL
- Ajustar pH em 6,5 com NaHCO_3
- Armazenamento: geladeira (2 a 8 °C)

18. Tampão Lise de Células

Concentração 10X

- Tris base: 1,21 g
- Na_2EDTA : 7,44 g
- Dodecil sulfato de sódio SDS: 10g
- Hidróxido de sódio NaOH 10 M para pH 7,45: 40 g
- Água destilada: 100 mL
- Armazenamento: geladeira (2 a 8 °C)

Concentração 1X

- Solução de Tampão de Lise de Células 10X: 10 mL
- Água destilada: 90 mL
- Ajustar pH em 7,45
- Armazenamento: geladeira (2 a 8 °C)

19. Tampão Tris-EDTA (TE)

(10mM TRIS: 1 mM EDTA)

- TRIS 1 M: 1,0 mL
- EDTA 0,5 M: 0,2 mL
- Água ultrapura para 100 mL
- Armazenamento: geladeira (2 a 8 °C)

20. Tampão Sorensen

- Solução A: Fosfato de sódio monobásico monohidratado $\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2,76 g/L)
- Solução B: Fosfato dissódico Na_2HPO_4 (2,84 g/L)
- Tampão: 230 mL da solução A e 770 mL da solução B
- Ajustar pH em 7,15

21. Timidina (10 mg/mL)

- Timidina: 100 mg
- PBS 1X: 10 mL
- Armazenamento: frasco âmbar, *freezer* (-20 °C)

22. Tripsina para banda

- Tripsina 2,5% (10x): 0,5 mL
- Solução de Hank's: 49,5 mL
- Alternativamente, usar 1 mL de tripsina e 49 mL de solução de Hank's, dependendo da atividade da tripsina e da banda obtida

23. TRIS 1M

- Trisaminometano $C_4H_{11}NO_3$: 121,1 g
- Água destilada: 800 mL
- Ácido clorídrico HCl para pH 8,0: 42 mL
- Água destilada para completar 1.000 mL
- Armazenamento: geladeira (2 a 8 °C)

GLOSSÁRIO

A

Água destilada. Resultado de um processo químico chamado destilação, o qual consiste na evaporação, seguida pela condensação da água. A água destilada não é totalmente pura, ou seja, livre de sais minerais. A aplicação desse produto costuma ser laboratorial, como reagente ou solvente.

Água ultrapura. Tipo de água com mais alto teor de pureza, livre de coloides iônicos ou dissolvidos e de contaminantes orgânicos, apropriada para as técnicas analíticas mais sensíveis. É ideal para métodos de análise que exigem mínima interferência e máxima precisão e exatidão, sendo requerida para aplicações mais exigentes.

Aneuploidia. Alterações no material genético em que ocorre ganho ou perda de cromossomos, resultando em um número cromossômico diferente do normal da espécie. Um exemplo comum é a síndrome de Down ($47,XX+21$ ou $47,XY+21$), quando o indivíduo possui três cromossomos 21 (trissomia do 21).

Azul de bromofenol. Corante utilizado para monitorar a migração de moléculas em experimentos com fragmentos de DNA, como na eletroforese em gel de agarose. Ele atua como um indicador de pH, ao mudar a sua cor de amarelo, em pH 3,0, para violeta, em pH 4,6. A reação responsável pela mudança de cor é totalmente reversível.

B

BAC. Cromossomos artificiais bacterianos (*BACs*, do inglês *Bacterial artificial chromosome*) são formados por fragmentos de DNA a partir de sequências já definidas, com aproximadamente 100 a 300 mil pares de bases, o que garante seu funcionamento de forma a simular um cromossomo natural. Sua manipulação facilitada é útil para mapear e sequenciar genomas. Assim, o BAC é usado para clonar sequências de DNA em células bacterianas (por exemplo, *Escherichia coli*).

Bandas cromossômicas. Cada cromossomo apresenta um padrão característico de bandas, determinadas por segmentos diferenciados em determinadas regiões do cromossomo. Por meio de técnicas de coloração, que coram seletivamente o DNA, cada cromossomo é individualmente identificado pelos seus segmentos com constituição ou organização molecular diferente, o que possibilita compreender melhor as alterações cromossômicas que se estabelecem em cada indivíduo.

C

Centrômero. É a região mais condensada do cromossomo, normalmente localizada no meio dessa estrutura, também pode ser chamado de constrição primária. O centrômero corresponde a uma região de DNA inativa, ou seja, os genes não têm atividade e não são expressos (não são transcritos, traduzidos, etc.). O centrômero é uma região do cromossomo, a qual interage com o fuso acromático em diferentes estágios da divisão celular (na meiose ou na mitose).

Colchicina. Substância que age inibindo a polimerização das proteínas do fuso cromático, parando a divisão mitótica na fase de metáfase. Pode ser encontrado com nomes comerciais KaryoMAX e Colcemid.

Cot-1 DNA. DNA de origem placentária com tamanho de 50 a 300 pares de base. Ele é usado para bloquear sequências de DNA repetitivas da sonda, evitando a hibridização inespecífica entre as sondas de DNA e a amostra. Comumente utilizado nas técnicas de FISH e de *microarray*.

Cromatina. Corresponde ao DNA “empacotado” associado a proteínas. Especificamente é formada pelo DNA, proteínas histônicas e não-histônicas e pequena quantidade de RNA. Varia de estágio de condensação conforme o metabolismo celular. heterocromatina, correspondente a condensada sem atividade transcricional, e eucromatina, correspondente a não condensada e que pode passar pelo processo de transcrição.

Cromossomo. Estruturas formadas por sequências do DNA total de um organismo e proteínas histonas, localizados no núcleo celular. Os cromossomos são visíveis apenas durante a divisão celular, quando ocorre a compactação da cromatina e a sua organização em formas cromossômicas. O número de cromossomos é variável entre as espécies; a humana apresenta um total de 46.

Cultura celular. Compreende um conjunto de técnicas que envolve a distribuição e isolamento de células em um ambiente artificial (*in vitro*). O termo cultura significa manter vivo e crescer em um meio apropriado que simule as condições naturais. Dessa forma, um gru-

po particular de células pode ser cultivado, aumentando sua quantidade, para estudar suas características.

Cloranfenicol. Antibiótico usado para inibir o crescimento de bactérias sensíveis a este componente, uma forma de controle de contaminação por bactérias nos meios de cultivo.

D

DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol). Corante fluorescente que emite a cor azul brilhante, sendo um marcador, que se liga seletivamente ao DNA de fita dupla e forma complexos DNA-DAPI fortemente fluorescentes com alta especificidade. É comumente usado como um contracorante nuclear em microscopia de fluorescência.

Deleção cromossômica. Alteração cromossômica estrutural em que parte do cromossomo é perdida e, conseqüentemente, há perda de material genético. Pode ocorrer na porção terminal dos braços cromossômicos ou ainda em porções internas (deleções intersticiais).

Desnaturação do DNA. Processo no qual as fitas de DNA (dupla hélice) podem ser separadas. As ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas são rompidas por altas temperaturas (96 °C), formando fitas simples de DNA.

DNA de espermatozoides de salmão. Agente bloqueador de seqüências de DNA repetitivas, muito eficaz para evitar hibridizações não específicas entre o DNA da amostra e a sonda. É utilizado como uma solução de pré-hibridização e hibridização, juntamente com a Cot-1 DNA, em ensaios de FISH.

DNA polimerase. Enzima responsável pela duplicação da molécula de DNA, catalisando a adição de unidades de desoxirribonucleotídeos conforme a sequência da fita molde de DNA. Tal processo inicia-se na extremidade 3' de um primeiro nucleotídeo, pela formação de uma ligação fosfodiéster entre o grupo OH dessa extremidade 3' e o grupo 5'-fosfato do próximo nucleotídeo a ser incorporado. O sentido da síntese de DNA é da extremidade 5' para a extremidade 3'.

dNTP. São os desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), geralmente usados na reação de PCR, onde exercem a função de unidades nucleotídicas que serão adicionadas as novas fitas de DNA formadas.

Duplicação cromossômica. Alteração cromossômica estrutural em que há uma duplicação do material genético. Essa alteração ocorre, após o pareamento incorreto dos cromossomos homólogos na meiose, depois de uma inversão e translocação, seguido por um *crossing over* desigual.

E

Eletroforese. Termo geral que descreve a migração e separação de partículas eletricamente carregadas sob a influência de um campo elétrico. A eletroforese é realizada em uma matriz que apresenta alguma resistência à migração das moléculas, cujos fragmentos menores movem-se com mais facilidade que os grandes. Como resultado tem-se a migração diferencial dos fragmentos, a qual é inversamente proporcional ao tamanho da molécula.

Espectrofotômetro. Instrumento de análise capaz de medir e comparar a quantidade de luz (radiação eletromagnética) absorvida,

transmitida ou refletida por uma determinada amostra, seja ela solução, sólido transparente ou sólido opaco. Demonstra de maneira quantitativa o quanto uma solução está mais concentrada que outra por meio de sua interação com a luz.

Eucromatina. Consiste em DNA ativo que pode ser transcrito e traduzido. Ela se descondensa e apresenta coloração fraca ao bandejamento G durante a interfase.

Extração do DNA. É uma etapa fundamental para a realização de técnicas de biologia molecular, pois a sua eficiência é dependente, em primeiro lugar, de um DNA-molde de boa qualidade. O protocolo de extração do DNA normalmente contém três etapas. lise das células (rompimento das células para a liberação de todo o seu conteúdo), desproteíntização (separação dos ácidos nucleicos de proteínas, lipídios e restos celulares) e concentração do DNA.

F

Fase S. Fase mais importante e longa da interfase, etapa do ciclo celular, também chamada de fase de síntese. Nela ocorre a duplicação/replicação do DNA (duplicação dos cromossomos) e histonas.

Fitohemaglutinina. Proteína que faz parte do grupo da lectina, encontrada em leguminosas como o feijão (*Phaseolus vulgaris*). Exerce função de reconhecimento de carboidratos e de desencadear a proliferação celular de linfócitos (atividade mitogênica).

Fixador. Aumenta a estabilidade e resistência mecânica dos tecidos, sendo muito importante para a conservação das células. O fixador

utilizado inicialmente era constituído de metanol, ácido acético e clorofórmio, conhecido como o fixador de Carnoy. A partir dos anos 1960, o termo clorofórmio foi descartado, sendo denominado fixador de Carnoy modificado.

Fluorocromo. Moléculas que absorvem luz em comprimento de onda baixo e elevada energia e emitem luz em comprimento de onda maior, de menor energia, fenômeno conhecido como fluorescência. A quantidade de energia emitida e seu comprimento de onda dependem tanto do próprio fluorocromo como do ambiente químico no qual está (como o pH, por exemplo).

Formamida. Solvente ionizante de elevada pureza, possui efeitos termodinâmicos que permitem a desnaturação e a renaturação de ácidos nucléicos em experimentos de hibridização com temperaturas mais baixas do que as geralmente utilizadas. Como um derivado do formol, a formamida é tóxica e um potencial teratogênico, e a sua utilização exige a implementação de medidas de segurança específicas.

G

Gel de Agarose. Matriz na qual é aplicada a amostra e que permite realizar a separação de moléculas carregadas em um campo elétrico, separando uma das outras conforme o tamanho, a forma ou carga durante a eletroforese. A agarose é um polissacarídeo neutro que permite a formação de um gel altamente resistente mesmo em baixas concentrações, o qual possui aspecto de rede, permitindo a passagem das moléculas e fornecendo as condições ideais para a realização da eletroforese.

Gene. Segmento de uma molécula de DNA responsável pelas características herdadas geneticamente. Cada gene é composto por uma sequência específica de nucleotídeos que pode levar à produção de uma proteína que desempenha uma função específica no corpo. Gene é a sequência de DNA que codifica um produto funcional.

Giemsa. Corante usado no bandeamento de Giemsa, comumente chamado de bandeamento G, para corar cromossomos e possibilitar a confecção do cariótipo (mapa de cromossomos). A coloração obtida utilizando Giemsa auxilia na análise e na identificação de anomalias cromossômicas, como translocações e rearranjos. Além disso, é um corante destinado principalmente à coloração de células sanguíneas em esfregaços de sangue periférico, de medula ou de outra natureza.

H

Heterocromatina. Parte da cromatina condensada. São regiões de material genético não codificantes, isto é, que não participam de transcrições; logo, são inativas. A heterocromatina apresenta o material genético mais compactado e aparece com maior frequência no núcleo denso (parte mais escura da cromatina).

Hibridização. É o método que utiliza a tendência natural que uma fita simples de DNA tem de se parear com sua fita complementar para formar a dupla hélice. Assim, determinado fragmento de DNA pode ser localizado em uma mistura heterogênea, desde que se disponha de uma sequência complementar ao fragmento, chamada de sonda.

Hipotonia celular. Reação celular que ocorre após contato com solução hipotônica, menor concentração e pressão osmótica. A

hipotonia celular permite que as células mitóticas inchem dentro da membrana celular e pode levar a sua lise. Este tratamento ajuda a espalhar os cromossomos, melhorando sua visualização no microscópio.

Homogeneizar. Misturar ou fazer que uma solução (ou uma mistura) tenha um mesmo aspecto e concentração em todo seu interior.

I

IGEPAL (Tween 20, NP40). Detergente, não iônico e não desnaturante, adequado para solubilização, isolamento e purificação de complexos de proteínas da membrana. Normalmente utilizado como um tampão de lise celular.

Interfase. Período entre duas divisões celulares, ou seja, é o período em que a célula não está se dividindo. É nesse período que o DNA cromossômico está ativo e a célula está em produção constante de proteínas, além de estar se preparando para a próxima divisão celular. É a maior fase do ciclo celular.

Inversão pericêntrica. Quando o cromossomo sofre duas quebras, o segmento compreendido entre elas gira 180° e se reintegra no mesmo cromossomo. A inversão pericêntrica envolve a região centromérica, enquanto a quebra ocorre no braço curto e no longo, podendo alterar a proporção do tamanho dos braços do cromossomo.

Isopropanol. Álcool utilizado durante a precipitação de ácidos nucleicos, garantindo o máximo de pureza do material durante o processo de extração de DNA.

L

Luz ultravioleta. Quando o cromossomo sofre duas quebras, o segmento compreendido entre elas gira 180° e se reintegra no mesmo cromossomo. A inversão pericêntrica envolve a região centromérica enquanto a quebra ocorre no braço curto e no longo, podendo alterar a proporção do tamanho dos braços do cromossomo.

M

Meio de cultura (cultivo). Insumos preparados em laboratório que fornecem os nutrientes para o crescimento e desenvolvimento de células fora do seu habitat natural. Para o preparo do meio de cultura, devem ser observados o pH, a pressão osmótica, o grau de umidade, a temperatura e as exigências nutritivas.

Meio LB ágar. Meio de cultivo sólido altamente referenciado para o crescimento e manutenção das bactérias, sendo usado para o cultivo de *E. coli* e outras. Ele é rico em nutrientes, contendo peptídeos, aminoácidos, vitaminas hidrossolúveis e carboidratos. A adição de ágar garante o estado sólido a esse meio de cultivo.

Meio LB Broth. Meio de cultivo líquido, conhecido como LB (Luria-Bertani). É o mais utilizado para o crescimento e manutenção de bactérias, pois é rico em nutrientes, contendo peptídeos, aminoácidos, vitaminas hidrossolúveis e carboidratos.

Metáfase. Fase da mitose na qual acontece o alinhamento dos cromossomos na região/placa equatorial. Nela há o apogeu da condensação cromossômica.

Metotrexato. Substância que interrompe a via purínica, inibindo a dihidrofolato redutase, que catalisa a redução de ácido fólico a ácido tetrahidrofólico, coenzima responsável pela síntese de aminoácidos, purinas e timidina. Utilizado como agente bloqueador da fase S durante o ciclo celular, sua ação consiste na inibição da síntese do DNA e do RNA.

MgCl₂ (cloreto de magnésio). Possui função de ativação da DNA polimerase, sendo obrigatório para o funcionamento da enzima (é um cofator), pois é um doador muito estável de íons Mg²⁺. Como todo íon, pode afetar as temperaturas de desnaturação das fitas de DNA e de anelamento de *primers*.

N

Nucleotídeos. São os “blocos construtores” dos ácidos nucleicos, o DNA e o RNA. É formado por ácido fosfórico, um açúcar, uma pentose (ribose no RNA e desoxirribose no DNA) e uma base nitrogenada (citosina, adenina, guanina, timina ou uracila).

O

Óleo de imersão. Líquido oleoso, transparente e incolor. A partir da objetiva de 100x na microscopia, é recomendado utilizar o óleo de imersão na lâmina, para que o índice de refração seja igual para a lâmina de vidro e para o óleo. Isso faz os raios luminosos não se dispersarem ao atravessarem o conjunto lâmina-óleo, permitindo a entrada de um grande cone de luz na objetiva, possibilitando, assim, uma melhor resolução.

P

PCR. Reação em cadeia da polimerase. É uma técnica que consiste na amplificação enzimática de uma sequência específica de DNA, a partir de uma quantidade mínima de amostra. Uma fita simples de DNA é usada como molde para a síntese de novas cadeias complementares sob a ação da DNA polimerase, capaz de adicionar os nucleotídeos presentes na reação, segundo a fita-molde. Essa técnica é a base da biologia molecular moderna, sendo amplamente utilizada em laboratórios de diversas áreas.

Precipitado. Formação de um sólido durante a reação química. O precipitado é uma substância que se separa de uma solução, formando uma fase sólida que ocorre pela centrifugação ou pela supersaturação de uma substância em particular.

Primer. Oligonucleotídeos iniciadores em reações de amplificação do DNA, como a PCR. Consistem em pequenas sequências (cerca de 20-25 pares de base que reconhecem a região de interesse no DNA). Eles delimitam o tamanho dos fragmentos amplificados, anelando-se à fita-molde simples e servindo de apoio para que os nucleotídeos subsequentes sejam adicionados.

Primer forward. Anela-se à cadeia de DNA-molde no início (iniciador 5') do fragmento de DNA a amplificar, no sentido da fita senso (5' - 3').

Primer reverse. Anela-se à cadeia de DNA-molde no fim (iniciador 3') do fragmento de DNA a amplificar, no sentido reverso complementar da fita senso.

Prófase. Primeira fase da mitose, na qual ocorre a desorganização do envoltório nuclear, dos nucléolos e a cromatina começa a se condensar, ou seja, é a fase de caracterização individual dos cromossomos.

Proteinase K. Reagente para lise em extração de DNA e RNA. É amplamente utilizada para digestão de proteínas em preparações de ácidos nucleicos, degradando as proteínas mesmo na presença de detergentes. Também pode ser utilizada para a preparação de lâminas de tumores sólidos para FISH.

Purificação do DNA. Etapa da extração de DNA que possui a finalidade de obter melhores resultados nas amplificações, pois consiste na separação do DNA a partir dos restos celulares e das proteínas, principalmente das DNases, que degradam as moléculas de DNA. É uma etapa de limpeza.

R

Rearranjo cromossômico. Mudanças na estrutura dos cromossomos decorrentes de quebra e posterior junção cromossômica. O cromossomo quebrado é reorganizado de uma forma diferente do original, podendo o indivíduo ter uma região cromossômica a mais ou a menos. Os rearranjos podem ocorrer de forma espontânea (erros durante a replicação, falta de um segmento de cromatina ou erros durante o *crossing-over*) ou induzida (causada por agentes externos).

Replicação do DNA. A replicação das fitas de DNA é um processo semiconservativo. Cada fita pode servir de molde para uma fita complementar de DNA, de forma que cada dupla hélice formada contém uma das fitas da dupla hélice original. Esse processo ocorre durante a fase S da interfase, ou seja, antes do início da divisão celular.

S

Satélite. Também chamada de zona SAT, é a responsável pela reorganização do nucléolo ao final da divisão celular, durante a telófase. O nucléolo, formado por RNAr e proteínas, desaparece durante a divisão. É a região terminal dos cromossomos acrocêntricos em humanos, sendo separada do cromossomo por uma constrição secundária.

Sobrenadante. Conteúdo líquido de uma solução, que permanece por cima da fase sedimentada no fundo do tubo de centrifuga.

Solução de Hanks. Mistura de sais e outros componentes essenciais para a manutenção celular, atuando como solução nutritiva que estimula o crescimento da célula.

Solução de pepsina. Atua na digestão de proteínas (solução de limpeza), fazendo parte do pré-tratamento em cortes histológicos de tecidos sólidos parafinizados e de células em suspensão para FISH.

Sonda. Fragmentos de DNA fita simples, de tamanho pequeno (18 a 60 nucleotídeos ou mais), marcados com uma substância radioativa, fluoróforo ou outra que seja complementar àquela que se deseja identificar. Garante a especificidade da técnica de hibridização, e tem como objetivo encontrar (hibridizar com) um trecho de um DNA/RNA para o qual ela seja complementar.

Soro bovino fetal. Suplemento para meios de cultura celular. Contém uma grande quantidade de componentes como ácidos graxos, fatores de crescimento, aminoácidos e vitaminas. Seus

componentes têm a finalidade de promover o crescimento das células e de protegê-las contra danos oxidativos e apoptose.

SSC. Produto de limpeza (solução salina) para lavagem pós-hibridização. É uma etapa importante que remove a sonda em excesso, com restos celulares e citoplasma. Pode também atuar como uma solução tampão.

T

Tampão. Solução aquosa capaz de resistir a mudanças de pH quando ácidos ou bases são adicionados na mistura, de forma que seu pH permaneça praticamente inalterado. É uma solução formada por um ácido ou por uma base fraca inorgânica e por um sal inorgânico que apresente o mesmo ânion do ácido ou o mesmo cátion da base.

Tampão de lise RBC. Solução concentrada para lise de hemácias em suspensões de tecidos hematopoiéticos (sangue periférico).

Tampão de lise de células. Solução tampão utilizada com o objetivo de romper as células. Utilizado no isolamento de DNA, rompendo a célula e as membranas nucleares e permitindo que o DNA seja liberado e exposto.

Tampão PBS. Utilizado para a produção de lâminas, possui os objetivos de limpar as lâminas e estabilizar o pH, deixando os cromossomos menos suscetíveis à desnaturação.

Tampão TE. Constituído pela mistura de solução de Tris-HCl e EDTA. Auxilia no armazenamento (conservação) do DNA dissolvido, pois o EDTA previne a degradação do DNA contra ações enzimáticas.

TaqPolimerase. Enzima DNA polimerase termoestável, ou seja, resistente a variações de temperaturas, a qual é utilizada na reação de amplificação de fragmentos de DNA na técnica de PCR, sendo responsável pela síntese desses fragmentos. É isolada da bactéria *Thermus aquaticus*, e tem função de catalisar a adição dos nucleotídeos à nova fita de DNA (5'-3').

Tampão TBE. Solução tampão que contém uma mistura de base T (Tris), ácido bórico e EDTA. Frequentemente usado em procedimentos envolvendo ácidos nucleicos (DNA/RNA), sendo o mais comum a eletroforese. Em geral, o tampão TBE oferece maior resolução para os fragmentos menores do que 1500pb. TBE é mais indicado para voltagens altas (>150V) devido à sua alta capacidade de tamponamento e à sua menor condutividade, quando comparado ao Tampão TE.

tDenHyb-2. Solução de hibridização altamente eficaz para FISH em células suspensas e tecidos embebidos em parafina. São compatíveis com uma ampla variedade de sondas de DNA, tanto as desenvolvidas *in house* quanto as sondas comerciais.

Técnica de esgotamento. Procedimento de rotina para o isolamento de bactérias em culturas puras. A técnica de esgotamento do inóculo permite obter colônias isoladas a partir de uma suspensão bacteriana semeada em uma placa de Petri contendo o meio nutriente sólido adequado.

Técnica HE. Principal técnica de coloração de tecidos em histologia, por meio da qual se podem diferenciar partes basófilas (pela hematoxilina, corando os ácidos nucleicos, DNA/RNA) e acidófilas, ou eosinófilas (pela eosina, corando o citoplasma).

Termociclador. Equipamento utilizado para técnicas baseadas na manipulação ou identificação de DNA, como a PCR. Este equipamento executa uma etapa chamada amplificação de DNA, através do aumento e da diminuição da temperatura. Tal reação, executada de forma precisa e controlada, produz cópias exatas de segmentos específicos do DNA em estudo.

Timidina. Também conhecida como desoxitimidina, é um nucleosídeo (nucleotídeo sem o grupamento fosfato) que é incorporado ao DNA após múltiplas reações enzimáticas, as quais irão transformá-la em trifosfato de timidina (dTTP). Em biologia celular, é usada para sincronizar as células durante o ciclo celular na fase inicial G1.

Transiluminador. Equipamento que emite luz UV e é utilizado para a visualização de bandas em géis de eletroforese corados com marcadores fluorescentes, como brometo de etídio e corante safer.

Tripsina. Enzima que hidrolisa o componente protéico da cromatina, permitindo assim que o corante Giemsa reaja com o DNA exposto. É utilizada na técnica de coloração cromossômicas por bandas G.

Tween 20 (IGEPAL ou NP40). Detergente utilizado para remover o excesso de sondas de DNA. É utilizado para a lavagem pós-hibridização na metodologia FISH.