

**“CENTRO UNIVERSITÁRIO DAS FACULDADES METROPOLITANAS UNIDAS”
NÚCLEO DAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE BIOMEDICINA**

**INFLUÊNCIA DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS
REFRIGERADAS SOBRE A QUALIDADE DO EXAME CITOGENÉTICO**

**TCC do Curso de Biomedicina
Fernanda Fernandes**

**SÃO PAULO
2005**

**“CENTRO UNIVERSITÁRIO DAS FACULDADES METROPOLITANAS UNIDAS”
NÚCLEO DAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE BIOMEDICINA**

**INFLUÊNCIA DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS
REFRIGERADAS SOBRE A QUALIDADE DO EXAME CITOGENÉTICO**

**TCC apresentado ao Centro Universitário das
Faculdades Metropolitanas (UniFMU) como
requisito parcial para a obtenção do Título de
Bacharel em Biomedicina.
Fernanda Fernandes**

Orientadora Prof^a Ms. Luciana Zambelli Caputo

**SÃO PAULO
2005**

Fernandes, Fernanda

Influência do tempo de armazenamento de amostras refrigeradas sobre a qualidade do exame citogenético/

Fernanda Fernandes. - São Paulo, 2005.

X, 31p.

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) – Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas. Bacharelado – Curso de Biomedicina

Título em Inglês: The time influences in storage cooled samples assay quality in the cytogenetics.

1.Citogenética 2.Tempo de Refrigeração 3.Índice mitótico

Dedicatória

Ao meu querido esposo Leonardo por todo carinho, apoio e dedicação durante esses anos, e a minha mãe (In Memoriam) que ficaria muito feliz se estivesse conosco ao me ver concluir essa batalha.

Agradecimentos

A DEUS por me guiar no caminho certo e pela força nos momentos difíceis.

Ao meu marido por todo apoio durante essa jornada.

A minha mãe e melhor amiga que foi maravilhosa e sempre me apoiou, porém hoje se encontra em um plano superior (In Memoriam) e as minhas avós que são importantes na minha vida.

A minha orientadora e hoje amiga Luciana Caputo que foi fantástica durante esse período que estivemos juntas e agradeço muito por toda ajuda, compreensão, orientação e momentos alegres de muita risada.

Ao Laboratório Foccus Medicina Diagnóstica e ao Laboratório Chromos de Citogenética Humana por me fornecerem o estágio no qual muito aprendi em sua estrutura onde realizei o trabalho.

A todos meus amigos que durante esse período foram maravilhosos, me proporcionando muitos momentos alegres juntos, e principalmente a minha amiga Ana Cecília que me ajudou muito durante esses quatro anos juntas.

E a muitos professores que foram maravilhosos durante esses anos.

Sumário

Dedicatória	II
Agradecimentos	III
Lista de Ilustrações	VI
Lista de Tabelas	VII
Lista de Abreviaturas	VIII
Resumo	IX
Abstract	X
1 Introdução	1
1.1 Objetivo	3
2 Casuística e Métodos	4
2.1 Casuística	4
2.2 Método	4
2.2.1 Estratégia de ensaio	4
2.2.2 Obtenção do material para estudo do cariótipo	5
2.2.3 Teste de Viabilidade Celular	5
2.2.4 Preparação dos cromossomos	6
2.2.5 Incubação com Colchicina	6
2.2.6 Solução hipotônica	7
2.2.7 Fixação do material	7
2.2.8 Preparação da lâmina	8

2.2.9 Bandamento _____	8
2.2.10 Índice mitótico _____	9
2.2.11 Cariotipagem _____	9
2.3 Método Estatístico _____	10
3 Revisão da Literatura _____	11
3.1 Aspectos Gerais do Estudo Cromossômico _____	11
3.2 Aplicações da Citogenética segundo Wolstenholme e Burn (1992) _____	14
3.2.1 Materiais Biológicos utilizados na análise cromossômica _____	15
3.2.2 Anticoagulante, agente mitógeno e bloqueador de fuso mitótico utilizado em amostras para análise cromossômica _____	17
3.2.3 Técnicas de armazenamento de amostras para análise cromossômica _____	18
4 Resultados _____	19
5 Discussão _____	26
6 Conclusão _____	28
7 Referências _____	29

Lista de Ilustrações

Figura1 - 46, XY. Cariótipo masculino normal de SP, com bandamento G _____ 10

Figura 2 - Esquemática do ciclo celular de uma célula somática, onde G1,S,G2 representam as fases da intérfase e M representa a divisão celular mitose _____ 12

Figura 3 – Análise do índice mitótico da amostra 2 encontrado na cultura celular processada imediatamente após a coleta _____ 22

Figura 4 – Análise do índice mitótico da amostra 2 encontrada na cultura celular realizada após 3 dias de refrigeração _____ 22

Figura 5 – Análise do índice mitótico da amostra 2 encontrada na cultura celular realizada após 10 dias de refrigeração _____ 22

Figura 6 – Qualidade das metáfases obtidas na cultura da amostra 3 sem armazenamento e com armazenamento e da amostra 5 com armazenamento _____ 24

Gráfico1- Comparação dos resultados obtidos pelos testes de viabilidade celular, índice mitótico e morfologia cromossômica nos diferentes tempos de armazenamento sob refrigeração das amostras _____ 25

Lista de tabelas

Tabela 1 - Materiais biológicos utilizados na citogenética pré-natal _____	16
Tabela 2 - Materiais biológicos utilizados na citogenética pós-natal _____	16
Tabela 3 – Valores relativos do teste de viabilidade celular realizado no 1º, 3º e 10º dia de armazenamento de onze amostras de sangue periférico refrigeradas _____	19
Tabela 4 - Valores relativos do Índice mitótico realizado no 1º, 3º e 10º dia de armazenamento de onze amostras de sangue periférico refrigeradas _____	20
Tabela 5 – Valores médios relativos (%) de cada categoria morfológica cromossômica em relação aos dias de armazenamento das amostras de sangue periférico sob refrigeração _____	23
Tabela 6 - Comparação da morfologia cromossômica para estudo citogenético realizado no 1º, 3º e 10º dia de cultura _____	24

Lista de abreviaturas

ATM - Ausência total de metáfase

DP – Desvio Padrão

IM – Índice Mitótico

PHA – fito-hemaglutinina

SP – Sangue periférico

G – Giemsa

Resumo

O estudo citogenético é considerado estratégico para a análise do genoma humano, onde se observam alterações cromossômicas numéricas e ou estruturais compatíveis com diversas patologias. Para tal finalidade, a citogenética dispõe de técnicas para obtenção de preparações citológicas de boa qualidade. A influência do tempo de refrigeração em amostras biológicas, sob temperaturas extremas, é considerada o principal fator causal de morte celular e conseqüentemente das repetições realizadas na prática laboratorial da citogenética. A proposta desse estudo foi determinar o melhor tempo de armazenamento, sob refrigeração, de amostras de sangue periférico para o estudo citogenético. Para isso foram realizadas 3 culturas celulares para cada amostra: a primeira cultura foi realizada no mesmo dia da coleta, a partir de amostras mantidas em temperatura ambiente; as culturas seguintes foram processadas 3 e 10 dias após a coleta, sendo que as amostras foram armazenadas sob refrigeração entre 2º e 8º C. Para cada cultura, realizou-se teste de viabilidade celular, avaliação do índice mitótico e da morfologia cromossômica. Os resultados obtidos nesse trabalho demonstraram que a viabilidade cromossômica diminui com o aumento do tempo de armazenamento, o índice mitótico aumenta nas amostras com 3 dias de armazenamento para, em seguida, diminuir drasticamente nas amostras armazenadas por 10 dias, sendo que o mesmo ocorre com a morfologia cromossômica. Quando comparadas com as amostras cultivadas no dia da coleta, as amostras mantidas sob refrigeração por 3 dias apresentaram melhora na morfologia cromossômica e no índice mitótico em cerca de 27% e 64% das amostras respectivamente.

Abstract

The cytogenetic study has been considered strategic to the analysis of human genome, which are observed numeric and or structural chromosomes alterations compatible with several diseases. For this purpose, the practical cytogenetic of tecnicas to obtain better quality in cytologic preparations. The influences of refrigeration's time in biological samples under extreme temperatures; has been considered the main cause of celular death and consequently of repetitions realized in cytogenetic laboratorial practice. This study intention is determinate the best storagemet time, under refrigeration, of peripheral blood samples for the cytogenetic study. Therefor, were realized three celular cultures for each sample: the first culture was realized in the same day of the puncture, from samples maintained at ambient temperature; the subsequent cultures were proceded 3 and 10 days after the puncture, being the samples stored under refrigeration between 2º and 8º C. From each culture was realized the celular viability test, evaluation of mitotic índex and chromosome morphology. The results obtained in this study demonstrate that the chromosome celular viability decrease with the increase of the storagemet time, the mitotic índex increase in samples with three days of storagemet for, in sequence, drastically decrease in the samples stored by 10 days, with the same results over the chromosome morphology. When compared with the samples cultured in the puncture's day, the samples maintained under refrigeration for three days demonstrate a improvement in chromosome morphology and in the mitotic índex in nearly 27% and 64% of the samples respectively.

1 Introdução

A Citogenética é uma área da biologia que se dedica ao estudo do número, morfologia, estrutura, propriedade e dinâmica dos cromossomos durante a divisão celular somática (mitose) e das células germinativas (meiose). Para tais finalidades, dispõe de uma série de procedimentos que visam a obtenção de preparações cromossômicas de boa qualidade, que permitam inferências da influência dos cromossomos sobre o fenótipo e dos fatores que provocam as alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais (LEE, et al., 1998)

O exame de citogenética é considerado um dos mais elucidativos no estudo do genoma humano, sendo indicado em diversas situações, como por exemplo, na investigação pré-natal e na investigação pós-natal. Na fase pré-natal são observadas perdas fetais por anormalidades cromossômicas, acarretando erros no desenvolvimento fetal, enquanto que, no período pós-natal, alterações cromossômicas observadas são menos óbvias ou não detectadas em fase anterior, como a Síndrome do X-Frágil, trissomias em mosaico, pequenas deleções (WOLSTENHOLME, 1992)

No Brasil, tanto os laboratórios de citogenética quanto os profissionais qualificados para o desenvolvimento dessa área são escassos. A localização desses laboratórios está restrita aos grandes centros, o que acarreta na necessidade de gerenciar a logística de transporte e armazenamento das amostras para percorrerem longas distâncias até serem processadas sem afetar a qualidade do exame. Além disso, devido ao fluxograma dos laboratórios nem sempre as amostras são processadas no mesmo dia da coleta, o que pode vir a comprometer significativamente a qualidade do material, a execução do exame e o resultado final.

O tempo de viabilidade da amostra para a realização do exame é discutível e é uma das principais variáveis que afetam a qualidade do exame. Dentre os fatores que influenciam essa viabilidade podemos destacar: a ação da temperatura ambiente, o tipo de anticoagulante usado na coleta, a forma de armazenamento da amostra, alterações sazonais, entre outras. Várias pesquisas foram realizadas com o

objetivo de melhorar o conhecimento sobre a influência das diversas condições citadas no tratamento das amostras (LAWCE e BROWN, 1997).

Na rotina do Laboratório de Citogenética Foccus-Chromos em São Paulo observou-se que algumas amostras, processadas no dia da sua coleta, apresentavam índice mitótico (IM) menor do que as armazenadas em geladeira. Esse fato despertou o interesse em verificar, de forma controlada, qual seria o melhor tempo de armazenamento de amostras refrigeradas para estudos citogenéticos futuros. Para isso, realizamos este trabalho experimental em diversos tempos de armazenamento de amostras de sangue periférico, realizando a cultura celular dos linfócitos em três períodos distintos: 1^o, 3^o e 10^o dias.

Alguns testes, como viabilidade celular, índice mitótico e a avaliação da morfologia cromossômica, podem ser utilizados na avaliação da influência da temperatura e do tempo de armazenamento da amostra na obtenção do cariótipo.

1.1 Objetivo:

Estabelecer o melhor tempo de refrigeração de amostras de sangue periférico para estudo cariotípico, avaliando os testes : a viabilidade celular, o índice mitótico e a morfologia cromossômica.

2 Casuística e Métodos

2.1 Casuística

Foram analisadas onze amostras de sangue periférico, com volume de 10mL cada, colhidas e transportadas em tudo de heparina sódica (Vacuette), encaminhadas no mesmo dia da coleta ao Laboratório de Citogenética Foccus-Chromos em um período de dois meses no ano de 2005.

2.2 Métodos

2.2.1 Estratégia de ensaio:

Foram realizadas três culturas celulares para cada amostra. A primeira cultura foi realizada no mesmo dia da coleta, a partir de amostras mantidas em temperatura ambiente. As culturas seguintes foram processadas 3 e 10 dias após a coleta e, sendo que as amostras foram armazenadas sob refrigeração entre 2º e 8º C. Para cada cultura, realizou-se teste de viabilidade celular, avaliação do índice mitótico e da morfologia cromossômica.

2.2.2 Obtenção do material para estudo do cariótipo

As amostras de sangue periférico (10mL) foram obtidas por punção venosa em tubo de heparina sódica (Vacuette). O material foi submetido à sedimentação mecânica por centrifugação 330 rpm (Eppendorf-5403), por 15 minutos separando assim o anel leucocitário. Procedimentos realizados em fluxo laminar vertical (MiniFlow I, Filtracom, Brasil).

2.2.3 Teste de Viabilidade Celular – Azul de Trypan

(modificado de Regidor, 1991).

Em um tubo cônico de 15mL, devidamente identificado com o número da amostra, adicionou-se 480µL do líquido de Turk [97mL de água destilada, 3mL de ácido acético (Quimex, F. Maia LTDA) e 50µL de corante Wright (Sigma chemical CO.)] e 20µL do sangue total, seguindo com a centrifugação a de 2000 rpm por 5 minutos.

Após a centrifugação, o material foi homogeneizado e 20µL dessa suspensão foi incubada com 180µL de Azul de Trypan (Sigma chemical CO.), por 5 minutos em temperatura ambiente. Após esse tempo, 15µL dessa solução foi adicionada em câmara de Neubauer, para contagem de leucócitos em aumento de 400x no microscópio de luz.

Foram computados 200 leucócitos para cada cultura. Os leucócitos corados em azul foram considerados inviáveis (células mortas) e os resultados foram expressos em porcentagem, conforme fórmula abaixo:

$$VC (\%) = \frac{\text{leucócitos inviáveis} \times 100}{200}$$

2.2.4 Preparação dos cromossomos

Foram realizadas três culturas de cada amostra sendo: a primeira cultura realizada com a amostra recém coletada, a segunda cultura com a amostra mantida sob refrigeração por 3 dias e, a terceira com a amostra armazenada por 10 dias, também sob refrigeração de 2 a 8°C.

Em cada um desses frascos de cultura, foi colocado meio composto de RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, USA) quantidade suficiente para 5 mL, 20% de soro fetal bovino (Gibco-BRL, NY, USA), 1% de L-glutamina (Gibco -BRL, NY, USA), 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina, preparada com 5.000U/mL de penicilina G sódica e 5.000µg/mL de sulfato de estreptomicina em 0.85% de solução salina, Gibco-BRL, NY, USA) e 200 µL de fito-hemaglutinina (PHA) (Difco, Detroit Michigan, USA). Foi retirada com o auxílio de uma pipeta pasteur estéril a camada de células intermediárias entre o sobrenadante e o precipitado do tubo recém centrifugado. Transferiu-se uma quantia de aproximadamente 0,5 mL, dessa camada. Essas culturas foram delicadamente homogeneizadas e incubadas em estufa (Elite II, Revco, Kendro, EUA) a 37°C, pCO₂ de 4.9% e umidade de 85%, por 72h.

2.2.5 Incubação com Colchicina

Após o tempo proposto de incubação, os frascos foram retirados da incubadora e transferido o material para tubos cônicos de 15 mL para centrífuga (Cornig, Cambridge, USA), e adicionado 100µL de colchicina na concentração final de $4 \times 10^{-5} M$ (Sigma, Saint Louis, USA). Os frascos foram fechados novamente e homogeneizados suavemente. Depois foram incubados a 37°C em banho-maria (Fanem-modelo 100, São Paulo, Brasil) por aproximadamente uma hora. Depois centrifugados (Eppendorf-5403) a 2000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi

desprezado com auxílio de pipeta Pasteur descartável (1,9 mL, Sigma, Saint Louis, USA) e o precipitado ressuspenso.

2.2.6 Solução hipotônica

Ao material ressuspenso, geralmente 1 a 2 mL, acrescentou-se uma quantidade de solução hipotônica (0,075M de cloreto de potássio, Merck, Rio de Janeiro, Brasil) até completar 10 mL. Os frascos foram incubados a 37⁰C em o banho-maria por 20 minutos, e centrifugados, sendo o sobrenadante desprezado. Esta etapa tem como finalidade o rompimento ou apenas a fragilização da membrana citoplasmática.

2.2.7 Fixação do material

As amostras foram lavadas três a cinco vezes com solução fixadora (solução de Carnoy), que consiste em três partes de metanol (QEEL, Brasil) para uma parte de ácido acético glacial (Merck, São Paulo, Brasil). A primeira lavagem foi realizada com solução gelada (entre 2⁰ a 8⁰C) visando-se boa separação do material nuclear. Após essas lavagens, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso em um volume final de 1 a 2 mL e estocado a -20⁰C.

2.2.8 Preparação da lâmina

A partir do material fixado, antes de ser congelado, uma gota foi pingada sobre uma lâmina limpa (Perfecta, São Paulo, Brasil). Rapidamente esta lâmina foi exposta a uma chama de bico de Bunsen (Fireboy, Tecnicra); sendo o sucesso desta etapa dependente da experiência de quem a processa. Se as células não estão suficientemente dispersas, os cromossomos não vão se separar adequadamente. Se a diluição for muito grande, um tempo maior vai ser gasto na procura de metáfases de boa qualidade, sem muitas sobreposições. As gotas foram lançadas de uma pipeta pasteur (Fisher, Alabana, USA) a uma distância relativamente curta em relação à lâmina (aproximadamente 15 cm), pois, para esses casos, onde foi efetuada à estimulação através de agentes mitógenos, os cromossomos se dispersam com muita facilidade.

2.2.9 Bandamento

Essa etapa foi realizada para a análise dos cromossomos da cultura, onde foram cariotipadas as metáfases. Após o gotejamento do material nas lâminas, essas foram embrulhadas em papel Flor Post (Ripel, São Paulo, Brasil) e permaneceram assim por três a 10 dias. Esta espera é sempre necessária para o envelhecimento da lâmina, o que ajuda o bandamento dos cromossomos e a melhor visualização das bandas. Algumas vezes as lâminas foram colocadas por 30 minutos a 100°C em placa aquecida (agitador magnético com aquecimento, Cole Parmer, Chicago, USA) com o objetivo de acelerar o envelhecimento.

2.2.10 Índice mitótico

(Modificado de Vargas-Munar, 2003)

Para avaliar o efeito proliferativo das culturas, utilizou-se o índice mitótico realizado na 1^o, 2^o e 3^o cultura de cada amostra.

Para cada cultura, foram preparadas quatro lâminas, das quais duas foram submetidas ao bandamento G e as demais coradas convencionalmente, com Wright a 20% diluído em tampão fosfato 0,06M e pH=6,8.

Em microscopia de luz, em aumento de 100x, foram computadas todas as figuras de mitose e núcleos interfásicos até completar 200 núcleos, determinando o índice mitótico em porcentagem, segundo a fórmula:

$$\text{IM (\%)} = \frac{\text{metáfases} + \text{núcleos estimulados} \times 100}{200}$$

2.2.11 Cariotipagem

Para cada cultura também foram montados de 3 a 5 cariótipos com bandamento G, de acordo com as normas do Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenética Humana (ISCN) de 1995. A cada cromossomo é dado um número correspondente ao tamanho decrescente dos mesmos (exceção aos cromossomos 21 e 22) e identificados pela sua morfologia, dado pelas bandas correspondentes a cada um, conforme a Figura 1.

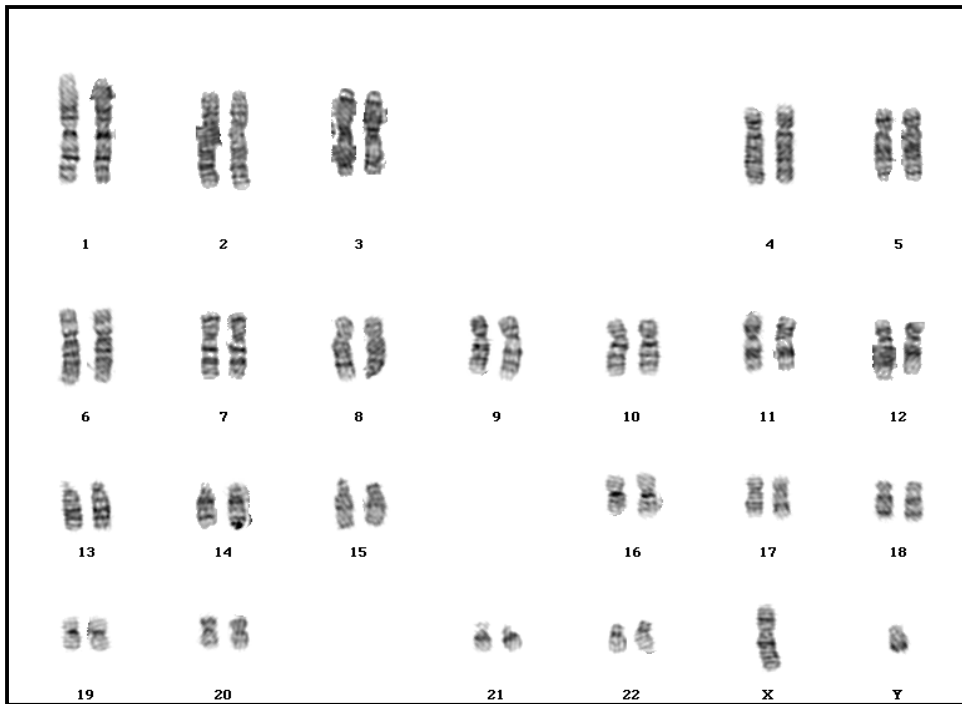


Figura1 - 46, XY. Cariótipo masculino normal de SP, com bandamento G.
Fonte - Foccus-Chromos Laboratório de Citogenética, 2005

Com base nos cariótipos fez-se uma avaliação da morfologia cromossômica para cada tempo de refrigeração das amostras (1^o, 3^o e 10^o dias) segundo os seguintes critérios:

Quando a morfologia cromossômica possibilitou a análise de alterações numéricas e estruturais, classificou-se como Boa.

Quando a morfologia cromossômica possibilitou apenas a realização da análise de alterações numéricas, classificou-se como Regular.

Quando não houve possibilidade de se analisar alterações numéricas e estruturais, classificou-se com crítica sugerindo nova coleta.

2.3 Método Estatístico:

Foi aplicada análise estatística descritiva para relatar os resultados.

3 Revisão da Literatura:

3.1 Aspectos Gerais do Estudo Cromossômico

Segundo levantamento histórico, o estudo cromossômico iniciou-se em 1857, quando Virchow observou, pela primeira vez, a divisão celular. O interesse pela citogenética de mamíferos aumentou quando a técnica foi aprimorada e novas descobertas foram sendo realizadas. Alguns eventos foram cruciais nesse processo, como, por exemplo, a descoberta do dimorfismo sexual em 1949 por Barr e Bertram; a utilização da colchicina, que tornou os cromossomos mais facilmente distinguíveis; o uso da solução hipotônica em 1952 por Hsu, melhorando a visualização e diminuindo a sobreposição dos cromossomos; e a detecção da primeira alteração cromossômica numérica por Tijo e Levan em 1956, posteriormente associada à Síndrome de Down, aliada ao desenvolvimento da técnica de cultura de sangue em curto prazo com agente mitótico por Moorhead et al, 1960, quando foram descritas as síndromes de Turner, síndrome de Klinefelter e síndrome de Patau (CASPERSSON et al., 1971).

A citogenética é o estudo metafásico dos cromossomos representado pelo cariótipo. A visualização dos cromossomos e suas características estruturais foram observadas após o desenvolvimento das técnicas de coloração e bandamento, quando foi possível distinguir as bandas cromossômicas, facilitando a identificação de translocações cromossômicas, inversões e deleções (CASPERSSON et al., 1971).

Os cromossomos são os veículos da informação genética, pois contém todo o DNA de uma célula, com exceção de uma pequena porção presente na mitocôndria. São visíveis durante as fases da divisão celular, quando a célula encontra-se em

mitose, mais especificamente, nas fases de prometáfase e metáfase e podem ser visualizados ao microscópio de luz.

O ciclo celular é um conjunto de processos altamente ordenados que compreende o período entre duas divisões celulares. No organismo de mamíferos, esses processos são regulados de tal maneira que as células, em condições normais, nunca iniciariam uma etapa do ciclo sem que a etapa anterior tenha sido completamente finalizada (LEWIN, 1997).

Os primeiros estudos do ciclo celular foram realizados sob microscopia de luz em tecidos somáticos. Na época era bem conhecido o fato que, durante a divisão celular, os cromossomos condensados se alinhavam no equador da célula e as cromátides irmãs migravam para pólos opostos da célula. Entretanto, sabia-se muito pouco sobre o intervalo entre duas mitoses sucessivas, também chamada intérfase, exceto que nessa fase as células cresciam em volume (NASMYTH, 1996).

Posteriormente quando se reconheceu que a molécula de DNA e as duplicações cromossômicas em nível molecular, a intérfase foi dividida didaticamente em três intervalos: G₁, que corresponde ao intervalo entre a mitose e duplicação do DNA; S, que é o período de síntese do DNA; e G₂, entre a fase S e a mitose seguinte (NASMYTH, 1996) conforme demonstrado na figura 2. Um outro intervalo foi ainda definido (G₀) porque alguns tipos celulares permaneciam por um longo período em um estado quiescente sem que ocorresse a duplicação de seu DNA (PARDEE, 1989).

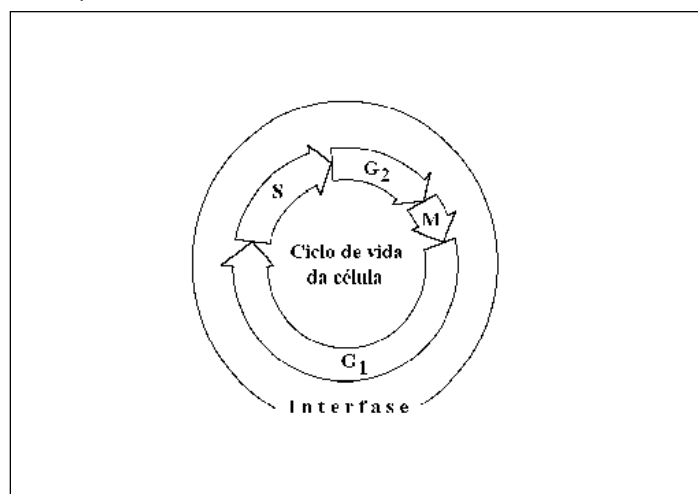


Figura 2 - Esquemática do ciclo celular de uma célula somática, onde G₁, S, G₂ representam as fases da intérfase e M representa a divisão celular mitose.

Fonte : Beiguelman, B. Citogenética Humana. Ed.Guanabara Koogan , 1986

No ciclo celular, a prometáfase, fase que antecede a metáfase e precede a prófase, está associada ao rompimento da membrana nuclear e ao desaparecimento dos nucléolos. Os cromossomos continuam sua condensação e começa a haver organização do fuso mitótico a partir dos centrossomos, constituídos por um par de centríolos e uma matriz proteinácea ao redor dos centríolos. O centrossomo se duplica uma vez a cada ciclo celular, na transição de G2/M (prófase), os centrossomos duplicados se separam e migram para os pólos opostos do núcleo e coordenam a reorganização dos microtúbulos da célula, com a dissolução dos aparatos microtubulares citoplasmáticos, e a organização dos microtúbulos do fuso mitótico (ALBERTS et al., 2002)

Na metáfase os cromossomos alcançam sua condensação máxima, tornando bem visíveis as suas duas cromátides-irmãs. O fuso mitótico controla o movimento ordenado dos cromossomos durante a mitose. Os microtúbulos que saem do pólo do fuso são capturados pelos cinetócoros, que se formam ao nível dos centrômeros dos cromossomos de cada cromátide. Algumas proteínas motoras, da família das cinesinas, como a CENP-E presente no cinetócoro, e outras presentes nas fibras do fuso, empurram os cinetócoro par um plano, a placa metafásica, onde os cromossomos ficam dispostos, de forma independente, no máximo de sua condensação (ALBERTS et al., 2002).

O lote cromossômico básico de uma espécie, caracterizado pelo número, forma e tamanho dos cromossomos, é conhecido como cariótipo. Para os indivíduos de uma mesma espécie, o número e a morfologia dos cromossomos é constante, sendo que as diferenças observadas quanto ao padrão da espécie são geralmente devido a aberrações cromossômicas. Desta maneira podemos avaliar a determinação sexual, das alterações cromossômicas, determinar sua origem e natureza, estabelecer relações evolutivas e taxonômicas entre espécies de um mesmo grupo e entre grupos diferentes. O estudo cariotípico se faz quando a célula esta em metáfase, nesta fase os cromossomos são mais visíveis, pois estão no seu grau máximo de condensação (ALBERTS et al., 2002).

3.2 Aplicações da Citogenética Segundo Wolstenholme e Burn (1992).

O exame citogenético é a técnica mais eficiente para a avaliação do genoma de um indivíduo. É indicado nos casos de investigações pré ou pós-natal, pesquisa de baixa fertilidade, aborto habitual e processos tumorais.

A citogenética pré-natal permite a detecção de alterações durante o período gestacional. Verifica se as alterações encontradas permitem o desenvolvimento fetal normal, sendo poucas as alterações detectadas neste estágio, como a trissomia do 13, 18, 21, monossomia do X entre outras. No período pós-natal ou fase adulta as alterações cromossômicas são as mesmas encontradas no período pré-natal, sendo poucas as não identificadas. Entretanto, muitos adultos encontram-se em instituições, psiquiátricas, por alterações mentais que são reflexos de alterações cromossômicas não diagnosticadas, por exemplo, a Síndrome do X-Frágil.

Outros adultos realizam a investigação cromossômica não em virtude de suspeita clínica mais sim, mas sim por existirem casos de rearranjo estrutural não equilibrados na família.

Problemas de fertilidade e abortamentos são divididos em dois grupos. O primeiro grupo é representado por indivíduos que apresentam suspeita inicial de alteração em cromossomos sexuais não investigada e ou manifestada durante a puberdade. E o segundo grupo representa indivíduos com uma série de problemas ligados à infertilidade, baixa-fertilidade e abortamentos, além de malformações congênitas na prole.

A maioria dos casos não está relacionada com alterações cromossômicas, mas, na ausência de outro fator causal mais óbvio, estudos citogenéticos do casal podem demonstrar um rearranjo estrutural balanceado. Tais rearranjos normalmente não causam alterações fenotípicas no indivíduo, porém interferem diretamente no processo de meiose e na produção de gametas, causando infertilidade, ou produzindo gametas com rearranjos cromossômicos não balanceados que irão resultar em perdas fetais ou nascimentos de malformados.

A citogenética tumoral tornou-se uma ferramenta importante no diagnóstico e na determinação do tratamento e prognóstico nas doenças onco-hematológicas. Entretanto, a realização da análise citogenética em tumores sólidos ainda encontra muitos obstáculos e é pouco empregada nos laboratórios de rotina.

3.2.1 Materiais Biológicos utilizados na análise cromossômica

Segundo Wolstenholme e Burn (1992), os materiais biológicos utilizados são diferente para cada indicação, por exemplo, nos casos de estudos pré-natais, dependem da idade gestacional, podendo ser tecido fetal, vilo corial, sangue de cordão umbilical, líquido amniótico, sangue cardíaco e placenta. Nos casos pós-natais podem ser utilizados sangue periférico, biópsia de tecido e na análise tumoral aspirado medular, material de biópsia, punção de gânglios e sangue periférico para a realização do cariótipo.

As tabelas 1 e 2 mostram os materiais biológicos freqüentemente utilizados na análise cromossômica na prática laboratorial.

Tabela 1 – Materiais biológicos utilizados na citogenética pré-natal.

Fonte - The AGT Cytogenetics laboratory manual 3 ed. Philadelphia: Lippnkott-Raven

Material Biológico	Aplicação Clínica
Tecido fetal e vilo corial	Realizados em casos de abortos espontâneos.
Sangue de cordão Líquido amniótico Biópsia de placenta	Utilizados em casos de detecção de anomalias fetais durante o ultra-som do segundo ou terceiro trimestre.
Sangue cardíaco Placenta	Realizados em casos de morte intra-uterina e natimortos.

Publishers, 1997, p. 83-84.

Tabela 2 - Materiais biológicos utilizados na citogenética pós-natal.

Material Biológico	Aplicação clínica
Sangue periférico	Utilizado em casos de suspeitas de alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais.
Biópsia de tecido, esses tecidos podem ser pele, testículos e ovários.	Realizado em caso de suspeita de mosaicismo não encontrado em sangue periférico.
Aspirado medular Sangue periférico	Realizado para doenças onco-hematológicas Sangue periférico é somente utilizado caso exista mais de 30% de blastos no sangue.
Punção de Gânglio	Realizado no caso de linfomas não infiltrados.
Biópsia de tecidos	Realizada para cultura de fibroblastos.

Fonte - The AGT Cytogenetics laboratory manual 3 ed. Philadelphia: Lippnkott-Raven Publishers, 1997, p. 83-84.

3.2.2 Anticoagulante, agente mitógeno e bloqueador de fuso mitótico utilizado em amostras para análise cromossômica

Segundo Lawce e Brown (1997) o anticoagulante mais adequado para a cultura celular de linfócitos no preparo do cariótipo é a heparina sódica, pois ela atua como aceleradora da inibição do fator Xa pelo antagonismo com antitrombina III.

Outros anticoagulantes, como Ácido Etileno Diamino Tetracético (EDTA), e o citrato de sódio, interferem prejudicando no processo normal de cultura celular, pois atuam quelando os íons de cálcio, ou seja, se ligando a eles, bloqueando a cascata de coagulação (FELLIPE-JÚNIOR, 2005).

Para Trump e Berezsky, 1996 o cálcio, é um íon chave na mitogênese, desempenhando um papel essencial na permeabilidade da membrana citoplasmática ao sódio e alterando o seu potencial elétrico.

A fito-hemaglutinina utilizada na cultura celular é capaz de provocar nos linfócitos uma reação blastóide, isto é, faz com que parte deles se desdiferencie, adquirindo o aspecto de linfoblastos. Antes dessa estimulação, cerca de 80% da cromatina do núcleo dos linfócitos apresenta-se heteropicnótica. Após 48 horas da ação da fito-hemaglutinina verifica-se que a heteropicnose da maior parte da cromatina desaparece e linfócitos adquirem aspecto de linfoblastos (YUNIS, 1965).

Segundo Yunis, 1965 a colchicina adicionada após setenta duas horas do início da cultura, causa o bloqueio da mitose interferindo na tubulina, que é responsável pela polimerização das fibras do fuso mitótico.

3.2.3 Técnicas de armazenamento de amostras para análise cromossômica

Em 1986, Beiguelman, através de variações das técnicas para obtenção de metáfases, a partir da cultura de leucócitos do sangue periférico preconizada inicialmente por Moorhead et al., (1960), relatou que o tempo decorrido entre a coleta de sangue e a transferência para um tubo ou frasco contendo meio de cultura completo pode ser de várias horas e, às vezes, de alguns dias, sendo o tubo mantido à temperatura ambiente.

Thompson et al., 1993 afirmaram que para as análises clínicas razoavelmente rápidas, o sangue periférico é o mais adequado para cultura celular, tendo apenas o inconveniente dos leucócitos terem uma vida curta de 3 a 4 dias.

Lawce e Brown (1997) concordam que a cultura pode ser feita alguns dias após a coleta, porém estabelecem um período máximo de até quatro dias. Os pesquisadores aconselham nunca congelar as amostras e nem mantê-las em temperatura menor que 4°C, isto permite que outras culturas sejam feitas se houverem falhas na primeira.

Estes mesmos pesquisadores estipularam uma maneira na qual se pode evitar colher as culturas aos finais de semana. Amostras obtidas na segunda, terça ou sexta-feira podem ser colocadas em cultura por 72 horas, as amostras obtidas na quarta-feira podem ser armazenadas por um dia e colocadas em cultura por 96 horas, armazenadas por dois dias e colocadas em cultura por 72 horas ou colocadas imediatamente e deixadas por 48 horas, e por último as amostras obtidas na quinta-feira devem ser colocadas em cultura por 96 horas lembrando que, o tempo de cultura começa a ser contado após a adição da fito-hemaglutinina e o armazenamento em estufa.

4 Resultados

A média de células viáveis nas amostras processadas no mesmo dia da coleta (1º dia), foi de 97,4% com desvio padrão de $\pm 3,2$. Após três dias de refrigeração a média da viabilidade celular foi de 87,8% com desvio padrão de $\pm 7,7$ e depois de 10 dias de conservação sob refrigeração das mesmas amostras a média da viabilidade celular foi de 72,1% com desvio padrão de $\pm 15,9$. Todas as amostras refrigeradas por três dias, apresentaram viabilidade celular inferior àquela encontrada no 1º dia. Essa queda também se fez presente nas amostras conservadas sob refrigeração por 10 dias conforme tabela 3.

Tabela 3 – Valores relativos do teste de viabilidade celular realizado no 1º, 3º e 10º dia de armazenamento de onze amostras de sangue periférico refrigeradas.

Amostras	Viabilidade celular 1º dia (%)	Viabilidade celular 3º dia (%)	Viabilidade celular 10º dia (%)
1	100,0	90,3	63,2
2	89,5	75,0	36,0
3	100,0	87,0	71,4
4	100,0	93,4	59,0
5	96,0	93,2	87,0
6	98,3	96,4	88,7
7	98,4	90,3	69,4
8	100,0	94,0	88,5
9	94,0	76,0	70,2
10	97,0	78,6	73,4
11	98,5	92,2	86,1
Média	97,4	87,8	72,1
DP *	$\pm 3,2$	$\pm 7,7$	$\pm 15,9$

* DP – Desvio padrão

A média do índice mitótico nas amostras processadas em cultura celular no mesmo dia da coleta (1º dia) foi de 1,9% com desvio padrão de $\pm 0,009$ (figura 3). Após três dias de armazenamento sob refrigeração, a média do índice mitótico foi de 2,9% com desvio padrão de $\pm 0,02$ (figura 4) e depois de 10 dias de armazenamento sob refrigeração o índice mitótico médio foi de 0,6% com desvio padrão de $\pm 0,007$ (figura 5). Todas as amostras refrigeradas por três dias, apresentaram índice mitótico maior ou mantiveram aquele encontrado no 1º dia, com exceção das amostras 4 e 5. Esse aumento não se fez presente nas amostras armazenadas sob refrigeração por 10 dias conforme tabela 4.

Tabela 4 - Valores relativos do Índice mitótico realizado no 1º, 3º e 10º dia de armazenamento de onze amostras de sangue periférico refrigeradas.

Amostras	Índice mitótico 1º dia (%)	Índice mitótico 3º dia (%)	Índice mitótico 10º dia (%)
1	3,0	3,0	0,5
2	3,0	6,0	1,5
3	2,5	6,5	2,0
4	2,0	1,5	0,5
5	3,0	1,0	0,0
6	1,5	3,0	0,0
7	1,0	2,0	0,5
8	0,5	2,5	1,0
9	1,0	1,0	0,0
10	2,0	3,0	0,0
11	1,5	2,5	1,0
Média	1,9	2,9	0,6
DP *	$\pm 0,009$	$\pm 0,02$	$\pm 0,007$

* DP - Desvio padrão

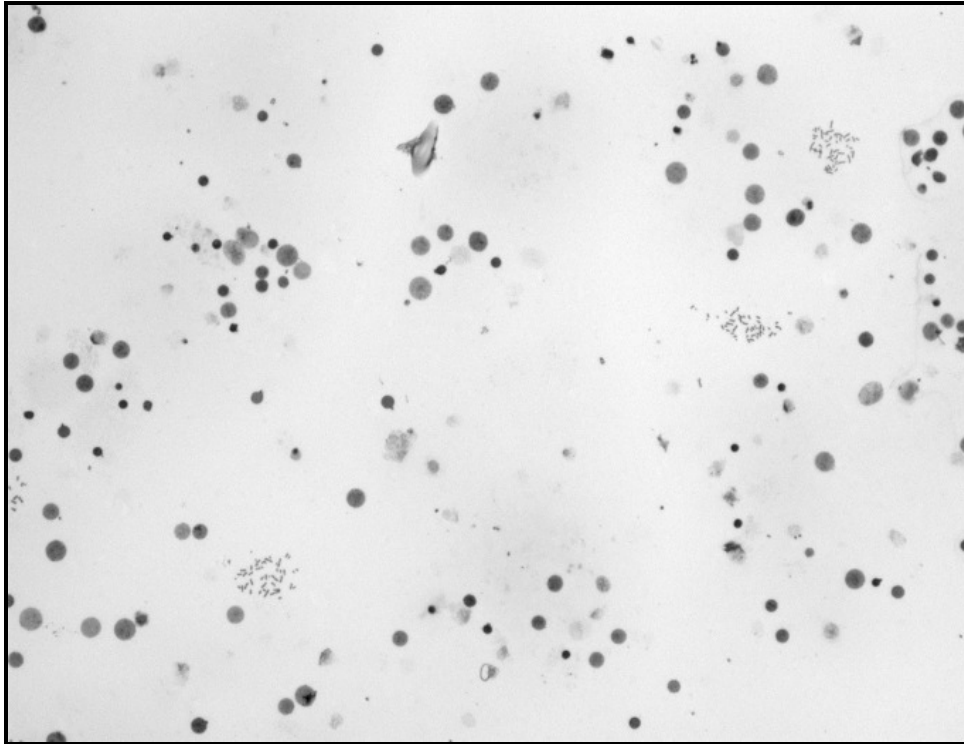


Figura 3 – Análise do índice mitótico da amostra 2 encontrado na cultura celular processada imediatamente após a coleta. Aumento de 100X.
Fonte: Foccus-Chromos Laboratório de Citogenética, 2005

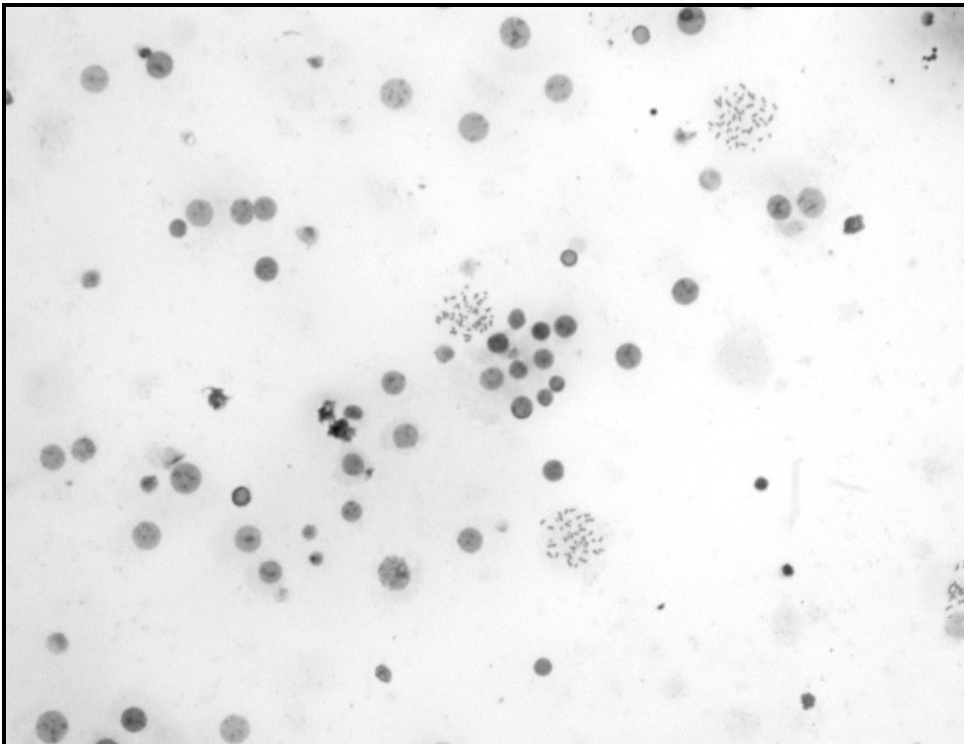


Figura 4 – Análise do índice mitótico da amostra 2 encontrada na cultura celular realizada após 3 dias de refrigeração. Aumento de 100X.
Fonte: Foccus-Chromos Laboratório de Citogenética, 2005

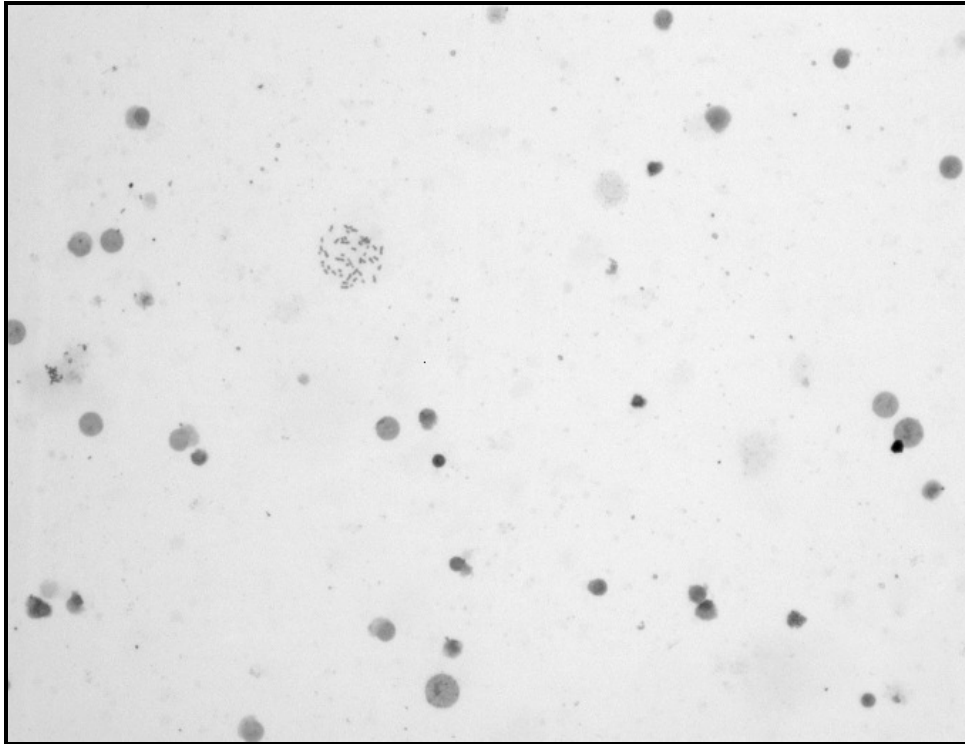


Figura 5 – Análise do índice mitótico da amostra 2 encontrada na cultura celular realizada após 10 dias de refrigeração. Aumento de 100X.
Fonte: Foccus-Chromos Laboratório de Citogenética, 2005

Como demonstrado na tabela 5; 63,6% das metáfases das amostras recém cultivadas (1^o dia) apresentaram morfologia cromossômica considerada Boa. Enquanto essa frequência foi de 72,7% as metáfases das amostras mantidas sob refrigeração por 3 dias, já no décimo dia de refrigeração observou-se queda na frequência da morfologia cromossômica Boa para 9,10%.

Tabela 5 – Valores médios relativos (%) de cada categoria morfológica cromossômica em relação aos dias de armazenamento das amostras de sangue periférico sob refrigeração.

Morfologia Cromossômica	Dias de armazenamento		
	1º	3º	10º
Boa	63,6%	72,7%	9,1%
Regular	27,3%	18,2%	54,5%
Crítica	9,1%	9,1%	0%
ATM *	0%	0%	36,4%

* ATM – Ausência total de metáfase

Cerca 27% das amostras apresentaram uma morfologia cromossômica classificada como: Regular (amostra 6), Crítica (amostra 8) e Regular (amostra 10) no dia da coleta, quando comparadas com a morfologia obtida na cultura celular após três dias de armazenamento sob refrigeração, quando tiveram seu aspecto melhorado. No 10º dia, quatro amostras (amostras 5, 6, 9 e 10) não apresentaram crescimento celular, conseqüentemente ausência total de metáfase (ATM). A amostra 11 manteve morfologia cromossômica Boa em todos períodos de conservação. As demais amostras (1, 2, 3, 4 e 7) apresentaram queda na qualidade da morfologia cromossômica de Boa para Regular conforme acréscimo no tempo de armazenamento sob refrigeração conforme tabela 6.

Tabela 6 - Comparação da morfologia cromossômica para estudo citogenético realizado no 1º, 3º e 10º dia de cultura.

* ATM – Ausência total de metáfase.

Amostras	Morfologia cromossômica 1º dia	Morfologia cromossômica 3º dia	Morfologia cromossômica 10º dia
1	Boa	Boa	Regular
2	Boa	Boa	Regular
3	Boa	Regular	Regular
4	Boa	Boa	Regular
5	Boa	Crítica	ATM *
6	Regular	Boa	ATM *
7	Boa	Boa	Regular
8	Crítica	Boa	Regular
9	Regular	Regular	ATM *
10	Regular	Boa	ATM *
11	Boa	Boa	Boa

A figura 6, demonstra a qualidade da morfologia cromossômica obtida nos casos 3 e 5, na cultura realizada com a amostra 3 em Tº ambiente (A) e com a mesma amostra refrigerada por 3 dias (B), e a morfologia cromossômica obtida após 10 dias de armazenamento da amostra 5 (C).

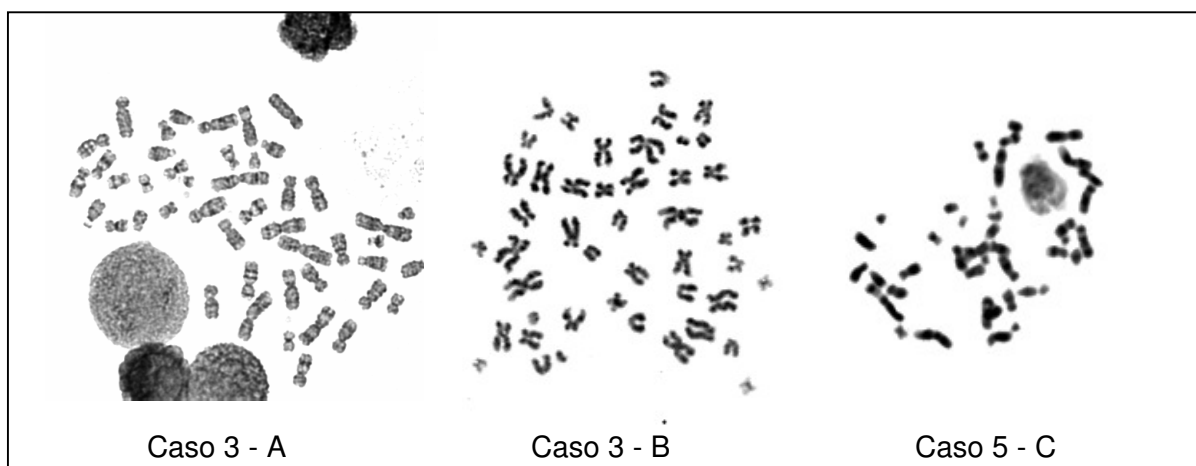


Figura 6 – Qualidade das metáfases obtidas na cultura da amostra 3 sem armazenamento (Caso 3 - A) e com armazenamento (Caso 3 – B) e da amostra 5 com armazenamento (Caso 5 – C).

Fonte: Foccus-Chromos Laboratório de Citogenética, 2005

O gráfico 1 relaciona todos os resultados obtidos pelos testes de viabilidade celular, índice mitótico e morfologia cromossômica realizados.

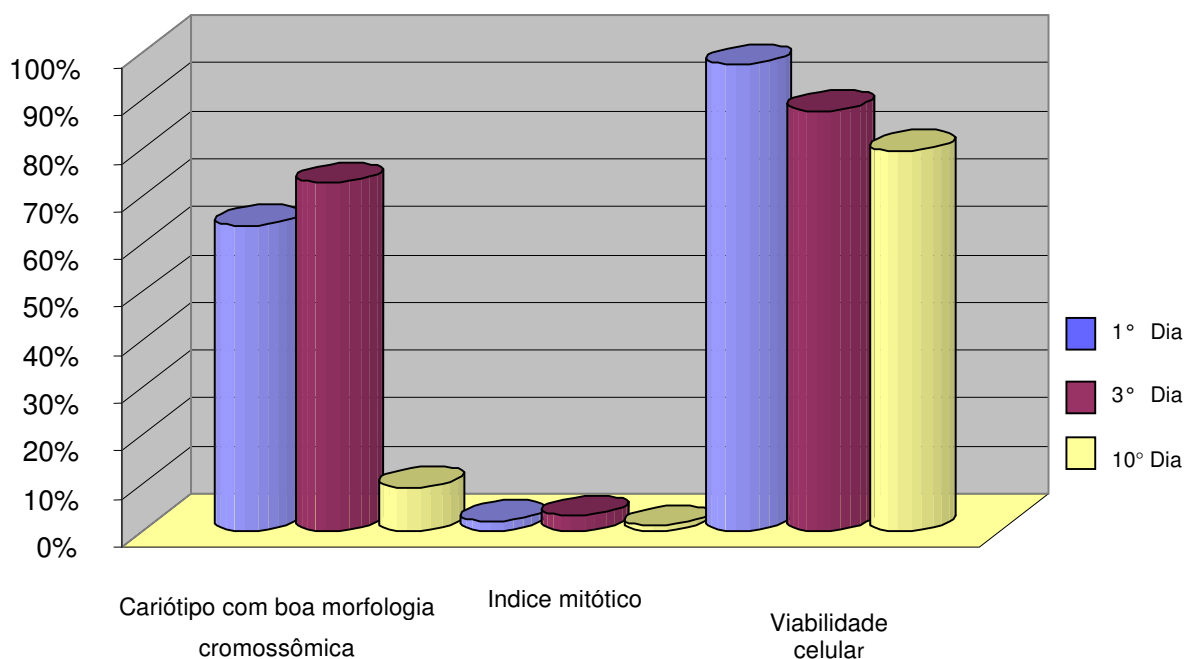


Gráfico1- Comparação dos resultados obtidos pelos testes de viabilidade celular, índice mitótico e morfologia cromossômica nos diferentes tempos de armazenamento sob refrigeração das amostras.

5 Discussão

A literatura que versa a seguinte proposta se encontra escassa.

Porém há relatos na literatura que demonstram que o número de leucócitos é influenciado pela ação da temperatura. Em experimento realizado em 1954, Russof e colaboradores, demonstraram que o número total dos leucócitos em amostras de sangue era maior durante o verão, contudo, Vrzgulová (1961) discordou dessa conclusão, pois observou que havia aumento do número de leucócitos durante o outono e inverno, sendo maior o valor de linfócitos no inverno e outono.

Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que amostras refrigeradas por três e 10 dias apresentaram viabilidade celular inferior àquela encontrada no 1º dia, corroborando com os dados da literatura vigente (ALBERTS et al., 2002)

Apesar de existir queda na viabilidade celular no 3º dia, o índice mitótico e a morfologia cromossômica, que são aspectos altamente relevantes para a análise citogenética, permaneceram inalterados e, às vezes, até foram melhorados.

Por isso o armazenamento das amostras sob refrigeração por 3 dias mostrou-se o mais adequado dentre os tempos utilizados concordando com Thompson et al., 1993.

Segundo Beiguelman (1986), amostras de sangue periférico se mantêm viáveis durante varias horas em Tº ambiente, o que já foi comprovado pelas culturas realizadas no dia da coleta e mantidas em Tº ambiente. Estas amostras apresentaram os melhores valores de viabilidade celular quando em comparação com os métodos de armazenamento avaliados.

É importante salientar que esses trabalhos foram realizados por pesquisadores estrangeiros, portanto a variável Tº ambiente deve ser considerada com cautela. O laboratório onde foi realizado este experimento é climatizado e sua temperatura média é de 21º C.

Com dez dias de armazenamento a amostra não se encontra mais viável para realização da cultura, onde provavelmente já ocorreu a degradação da amostra.

Como Lawce e Brown (1997) sugerem, avaliações desse tipo, ajudam a estabelecer um fluxograma de amostras, materiais, equipamentos e funcionário, de modo a otimizar os procedimentos realizados em um laboratório de rotina citogenética, priorizando a qualidade dos resultados e minimizando os erros e desperdícios.

A fim de estabelecer um tempo máximo de armazenamento de amostras de sangue periférico sob refrigeração, sugere-se acrescentar, em pesquisas futuras, tempos de armazenamento intermediários entre 3 e 10 dias. Ao mesmo tempo, aconselha-se que sejam feitas avaliações paralelas com amostras a T^o ambiente, sob as condições climáticas dos laboratórios de nosso país.

6 Conclusão

Os resultados encontrados neste estudo mostraram que as amostras de sangue periférico podem ser armazenadas sob refrigeração de 2^o a 8^oC por três dias sem comprometer a qualidade do estudo citogenético.

O tempo de refrigeração do sangue periférico de três dias mostrou ser o mais adequado no estudo cariotípico, apesar da casuística investigada ter sido pequena.

O período de refrigeração da amostra por 10 dias, não se mostrou eficiente, não sendo este recomendável.

7 Referências

ALBERTS, B., JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; **Molecular Biology of the cell**. 4 ed. Rockefeller University Press: Hardcover. 2002., p191-195 / 583-614.

BARR, M.L.; BERTRAM, E.G. **A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behavior of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis**. Nature, 1949, p. 676-677.

BEIGUELMAN, B. **Citogenética Humana**. Ed. Guanabara Koogan, 1986, p. 59-60.

CASPERSSON, T.; CASTLEMAN, K.R.; LOMAKKA, G.; MODEST, E.J.; MOLLER, A.; NATHAN, R.; WALL, R.J.; ZECH, L. **Automatic karyotyping of quinacrine mustard stained human chromosomes**. Exp Cell Res. 1971, v. 67(1) p. 233-235.

FELIPPE - JUNIOR, J.F.; **O controle do câncer com um método muito simples e não dispendioso: provocar a hiperpolarização celular com dieta pobre em sódio e rica em potássio. Evidências clínicas e experimentais**. Jan 2004. Disponível em: <http://www.medicinacomplementar.com.br/temajan04.asp>. Acesso em: 20 ago. 2005.

ISCN (1995) - An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. MITELMAN, F. 114 p., S. Karger Basel.

LAWCE, H.J.; BROWN, M.G. Cytogenetics – an overview. In: BARCH, M. .J.; KNUTSEN, T.; SPURBECK, J.L. **The AGT Cytogenetics laboratory manual**. 3 ed. Philadelphia: LIPPINKOTT-RAVEN PUBLISHERS, 1997, p. 83-84.

LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N. **Wintrobe Hematologia Clínica**. São Paulo: Ed. Manoele Ltda, 1998, v.1, p. 31-35.

LEWIN, B. **Genes VI**. Oxford University Press, Inc., New York, 1997, p.1260.

MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, D.A. **Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood**. Exp Cell Res 20, 1960, p.613-616.

MUSTACCHI, Z.; PERES, S. **Genética baseada em evidências- síndromes e heranças**. São Paulo: CID Editora, 2000, p.520-523.

NASMYTH, K. **Viewpoint: Putting the cell cycle in order**. Science, 1996, v. 274, p. 1643-1645.

REGIDOR,C. Controles Biológicos. In: GARCIA,J.; BORNSTEIN,R.;LAMANA, M.; MALDONDO, J.; OTEYZA, J.P.; REGIDOR, C.; SOLER, M.A. **Obtencion y Manipulacion de Precusores Hematopoyeticos – Manual de Técnicas**. Ballesteros, Ibarguen, 1991.p. 125-127.

PARDEE, A.B. **G1events and regulation of cell proliferation**. Science, 1989, v. 246, p. 603-608.

THERMAN, E.; SUSMAN, M. **Human chromosomes – structure, behavior, and effects**. 3 ed. New York: Springer-Verlag, 1993, p. 60-70 / 254-256.

THOMPSON, M.W.; MCINNES, R.R.; WILLARD, H.F. **Thompson & Thompson- Genética Médica**. 5 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1993, p. 1-21.

TRUMP, B.F.; BEREZESKY, I.K. **The mechanisms of calcium-mediated cell injury and cell death**. New Horiz; v. 4(1), 1996, p. 139-150.

TIJO, J.H.; LEVAN, A. **The chromosome number in man**. Hereditas 42, 1956, p. 1-6

VARGAS-MUNAR, D.S.F. **Relação entre fragilidade cromossômica e troca de cromátides irmãs com a variabilidade cariotípica de cervídeos brasileiros**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu , 2003

WOLSTENHOLME, J. An introduction to human chromosomes and their analysis. In: ROONEY, D.E.; CZEPULKOWSKI, B. H. **Human Cytogenetics- Constitutional Analysis: a practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 1992. v. 1, p. 1-20.

WOLSTENHOLME, J. BURN, J. The application of cytogenetic investigation to clinical practice. In: ROONEY, D. E.; CZEPULKOWSKI, B. H. **Human Cytogenetics- Constitutional Analysis: a practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 1992. v. 1, p. 119-126.

YUNIS, J.J.; **Human Chromosome Methodology**. Academic Press New York and London, 1965, p. 42-46