

PADRONIZAÇÃO DE CARIÓTIPO POR BANDEAMENTO G DE LINFÓCITOS HUMANOS

Giandra Azolini Fernandes de Souza¹, Bárbara Scorsim Arjona², Mariane Castardo Araujo³, Clarissa Torresan⁴, Ana Maria Silveira Machado de Moaraes⁵, Marcela Funaki dos Reis⁶

¹ Acadêmica do curso de Biomedicina e bolsista PIBIC/Unicesumar – Maringá-PR. giandra.azolini@hotmail.com

² Discente do programa de pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PEA), Universidade Estadual de Maringá; acadêmica colaboradora. barbarascorsim@gmail.com

³ Bióloga. Responsável técnica do laboratório de Biologia Molecular, Unicesumar, Maringá-PR. mariane.araujo@unicesumar.edu.br

⁴ Co-orientadora. Docente de Medicina da Unicesumar – Maringá-PR. clarissa.torresan@unicesumar.edu.br

⁵ Co-orientadora. Docente de Medicina da Unicesumar – Maringá-PR. ana.machado@unicesumar.edu.br

⁶ Orientadora. Docente de Medicina da Unicesumar – Maringá-PR. marcela.reis@unicesumar.edu.br

RESUMO

A Síndrome de Down (SD) é considerada uma das desordens mais comuns, além de ser uma das principais causas de deficiência intelectual. Essa desordem é causada por uma alteração cromossômica, a qual pode se dar de diferentes maneiras, como a trissomia livre do cromossomo 21, mosaicismos genéticos ou ainda translocação. Portanto, pode-se considerar que a análise do cariótipo de indivíduos com SD é fundamental para um aconselhamento genético adequado. O objetivo do presente trabalho foi, de maneira geral, padronizar técnicas para montagem de cariótipo e capacitar membros da Liga de Genética Médica de Maringá - LAGeM. O cultivo celular de linfócitos e preparação e análise dos cariótipos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular do Centro Universitário Cesumar – Unicesumar. Ao finalizar os testes, foi possível padronizar a técnica para o cultivo celular, possibilitando, dessa maneira, futuramente o fornecimento de laudos citogenéticos aos pacientes.

PALAVRAS-CHAVE: Aconselhamento Genético; Etiologia Genética; Exame Citogenético.

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome de Down (SD) é considerada uma das desordens mais comuns, onde se tem um enorme custo médico e social (ASIM et al., 2015). Atualmente é considerada uma das principais causas de deficiência intelectual em todo globo e está presente em todas as etnias, classes sociais e gênero.

Milhões de pacientes diagnosticados com essas desordens apresentam diversos problemas de saúde, como aprendizagem e memória, doenças de Alzheimer (DA), leucemia, câncer, doença de Hirschprung (HD) (WAHAB et al., 2006), alta incidência da doença celíaca (BRASIL, 2013) e diversas doenças malformações congênitas (BOY et al., 1995).

Do ponto de vista citogenético, a SD pode ser resultado de quatro rearranjos diferentes: 1) trissomia livre 21 (95%), 2) mosaicismos (2-4%), 3) translocação Robertsoniana (2-4%) e 4) outros rearranjos (<1%) (KAMINKER et al., 2008). Vale ressaltar que a idade materna é considerada de grande peso na incidência de trissomia (WAHAB et al., 2006). Portanto, o cariótipo é fundamental para orientar corretamente o aconselhamento genético da família, tendo em vista que somente esse diagnóstico determina a forma da mutação – casual ou herdada (BRASIL, 2013).

Dessa forma, o diagnóstico dessa condição deve ser o mais precoce possível, para isso, duas abordagens diagnósticas complementares são possíveis, a clínica e a laboratorial, onde se tem observações fenotípicas e genotípicas, respectivamente. Tendo em vista isso, o objetivo do presente trabalho foi, além de testar e padronizar técnicas para montagem de cariótipo, capacitar futuros profissionais para a execução desta técnica para fins de ensino, pesquisa e extensão.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho consistiu de um estudo transversal de caráter clínico e experimental realizado em parceria com a Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) de Maringá, Liga Acadêmica de Genética Médica de Maringá-LAGeM, e o Laboratório de Biologia Molecular do Centro Universitário Cesumar – UniCesumar.

O estudo seguiu os encaminhamentos solicitados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unicesumar, seguindo a Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012 do Ministério da Saúde, onde foi deferido (CAAE: 2 01839118.3.0000.5539).

Dessa forma, para o cultivo de linfócitos foi adaptado a metodologia proposta pelo laboratório de Citogenética Humana da UNICAMP/SP (técnica modificada de Moorhead et al., 1960), no qual transfere-se 1 ml de sangue total coletado em tubo de heparina para 3.8 ml do RPMI 1640 suplementado (VITROCELL®), 200 µL de fitohemaglutinina (VITROCELL®) e 1 mL de soro fetal bovino (VITROCELL®) em frascos para cultivo celular de 60 mL.

Os linfócitos foram cultivados por 71 horas e 20 minutos em estufa à 37°C e, após esse período, adicionou-se 50 µL de colchicina 16 UG/mL (VITROCELL®) para bloquear o ciclo celular na fase de metáfase. Em seguida, o cultivo permaneceu em estufa a 37°C por mais 40 minutos, a fim de completar as 72 horas de incubação. Na sequência, as células foram transferidas para tubos Falcon, centrifugados a 1700 rpm por 5 minutos e expostas a 8.5 mL de solução hipotônica (KCl 0,075M) por 50 min a 37°C na estufa. Posteriormente, foi fixado com 5 mL de Carnoy (ácido acético e metanol, 3:1) por três vezes alternadas com centrifugações a 1700 r.p.m. durante 5 minutos para completa extração dos solventes.

Para a confecção das lâminas de cariótipo, o material foi deixado em overnight no freezer (-20°C) e, logo após esse intervalo, realizou-se uma nova etapa de centrifugação por mais 5 minutos a 1700 rpm. Posteriormente, o cultivo foi ressuscitado em 1 mL de Carnoy e, em seguida, com a lâmina levemente inclinada, depositou-se duas a três gotas da suspensão em uma distância superior a 30 centímetros. Por fim, foram coradas com corante Giemsa 5% por 15 minutos e visualizadas em microscopia óptica na objetiva de 40X e 100X com óleo de imersão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a montagem do cariótipo, foram realizados dois testes principais. O teste inicial (Figura 01) foi adaptado e realizado com base na metodologia proposta por Guerra e Souza (2002) e Pelloso et al. (2003), entretanto, os resultados obtidos não foram favoráveis para análise, visto que, quando havia presença de metáfase não se encontrava compreensível. Além disso, os cromossomos ficaram sobrepostos, o que favoreceu a complexidade em analisar a lâmina.

Entretanto, no teste final (Figura 02), o qual foi realizado a partir de alterações no protocolo do laboratório de Citogenética Humana da UNICAMP/SP (técnica modificada de Moorhead et al., 1960), o resultado se mostrou muito promissor, visto que foi observado metáfases em todas as lâminas realizadas. Ademais, os cromossomos não se apresentaram sobrepostos, como ocorreu no primeiro teste, deixando as lâminas, dessa maneira, viáveis para análises posteriores.

Sendo assim, para a obtenção desses resultados (Figura 02), foi realizado alguns testes, os quais foram experimentadas alterações nas quantidades iniciais e previstas pelo protocolo, visto que apresentava uma margem de uso consideravelmente alta.

Dessa forma, em relação a colchicina, foi alterado o tempo de aplicação (de 1 hora para 40 minutos), uma vez que a concentração e a quantidade se mantiveram. Já no que se refere a fase de hipotonia, houve modificações na quantidade de KCl 0,075M (de 5mL

para 8.5mL), além de finalizar essa etapa com adição de fixador (3:1), o qual era um passo inexistente na metodologia de Guerra e Souza (2002) e Pelloso et al. (2003). Quanto a etapa de fixação, ocorreu uma redução na quantidade de fixador (de 10mL para 5mL), além de suspender o uso do vórtex em todas as etapas de homogeneização, devido esta metodologia estar promovendo lise celular. Por fim, na fase de montagem das lâminas, foi alterado a distância da aplicação do cultivo, o qual foi responsável por diminuir as sobreposições dos cromossomos e propiciar maior distanciamento melhorando a análise.

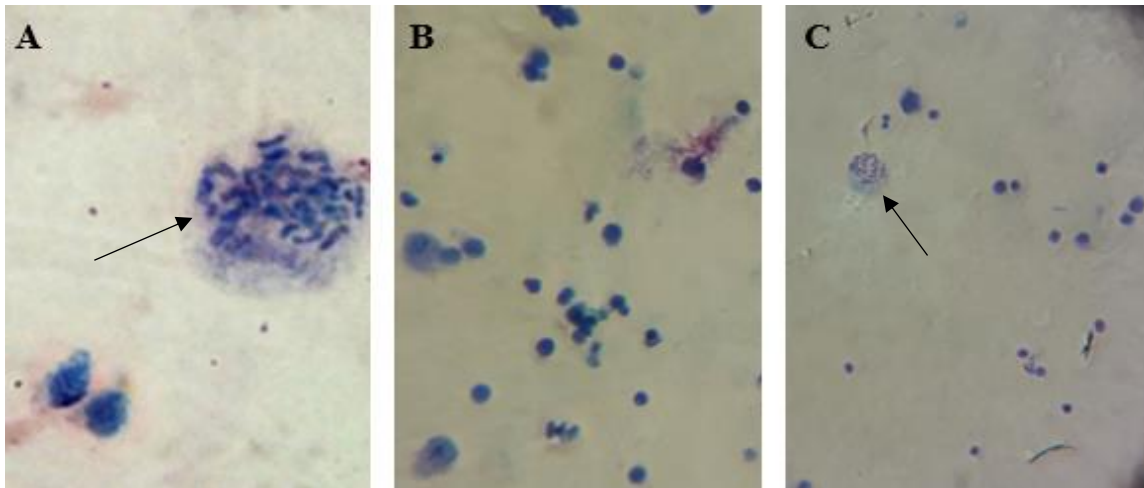


Figura 01: Teste Inicial

Resultados obtidos por meio da adaptação da metodologia de Guerra e Souza (2002) e Pelloso et al. (2003), sendo que nas capturas A e C obteve-se células em metáfase (ambas sinalizadas), enquanto na captura B não se teve presença de metáfase. A foto A foi capturada no microscópio óptico com aumento de 1000x, B e C foram capturadas no microscópio óptico no aumento de 400x.

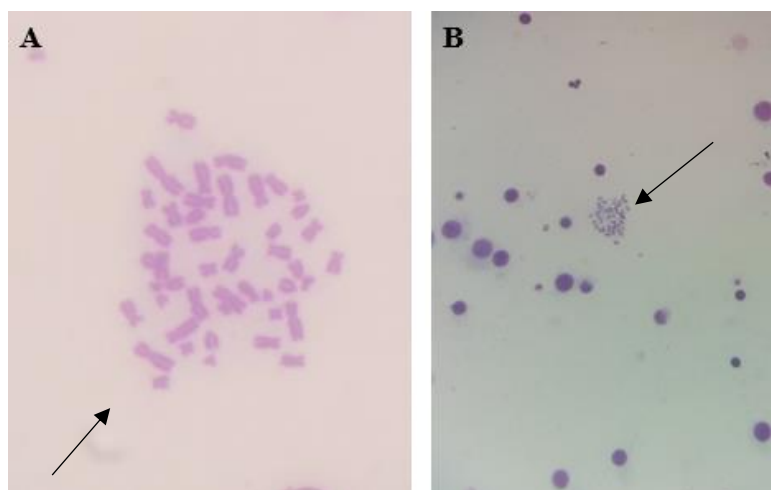


Figura 02: Teste final

Resultados obtidos com a realização do protocolo adaptado. Ambas capturas apresentaram presença de metáfases (sinalizadas nas fotos). A foto A e B foram capturadas em microscopia óptica com aumento de 1000x e 400x, respectivamente.

Contudo, outras modificações foram realizadas, dentre elas, o tipo de amostra utilizada, sendo que no teste inicial (Figura 01), o sangue periférico foi centrifugado para a obtenção do plasma, no entanto no teste final (Figura 02) foi aplicado sangue total.

Além disso, na etapa de hipotonia, após a adição do KCl, o cultivo permaneceu na estufa a 37°C por 50 minutos, de acordo com a metodologia da UNICAMP/SP, diferentemente da metodologia proposta por Guerra e Souza (2002) e Pelloso et al. (2003), o qual o cultivo manteve-se em Banho Maria a 37°C por apenas 10 minutos. Dessa maneira, pode-se presenciar uma evolução significativa do tamanho celular, o que, consequentemente, otimizou a visualização e análise dos cromossomos.

Os resultados encontrados no estudo estão de acordo com Mártonfiová (2013) que ao trabalhar com diferentes concentrações dos reagentes necessários para a preparação do cariótipo observou que estes atuam diretamente na qualidade da análise citogenética. Nesse sentido, a padronização do cariótipo, levando em consideração preparo do cultivo e lâminas, permitiu a realização da análise citogenética de maneira adequada.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que ao realizar as padronizações do protocolo para obtenção do cariótipo, resultou em uma capacitação dos membros presentes no laboratório e da Liga Acadêmica de Genética Médica (LAGeM- Maringá) acerca desta atividade, além de ser suficiente para realizar diagnósticos laboratoriais para a Síndrome de Down, os quais poderão vir a ser realizados posteriormente.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a bolsa concedida pelo PIBIC/Unicesumar, ao apoio e auxílio dos integrantes do laboratório de biologia molecular e a todos, de que alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ASIM, A.; KUMAR, A.; MUTHUSWAMY, S.; JAIN, S.; AGARWAL, S., 2015. Down Syndrome: an insight of the disease. **Journal of Biomedical Science**, 22(1), 41. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4464633/#CR5>> Acesso em: 11/05/2018.
- BOY, R.; NETO, J.G.B.; VARGAS, F.R.; FONTANA, C.; JOSÉ C. C. ALMEIDA, J.C.C.; LLERENA JR., J., 1995. Síndrome de Down - análise clínica, citogenética e epidemiológica de 165 casos. **Jornal da pediatria**. Disponível em <<http://www.jped.com.br/conteudo/95-71-02-88/port.pdf>> Acesso em 26/07/2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Disponível em <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2013/res0466_12_12_2012.html> Acesso em: 17/10/2017.
- MÁRTONFIOVÁ, L. A method of standardization of chromosome length measurement. **Caryologia**, v. 66, n.4, p. 304-312. 2013.
- WAHAB, A. A.; BENER, A.; TEEBI, A. S., 2006. *The incidence patterns of Down syndrome in Qatar*. **Clinical Genetics**, 69(4), 360–362.doi:10.1111/j.1399-0004.2006.00593.x
- KAMINKER, P.; ARMANDO, R., 2008. Síndrome de Down. Primeira parte: enfoque clínico-genético. **Arch Argent Pediatr**; 106(3):249-259. Disponível em <https://www.sap.org.ar/docs/archivos/2008/arch08_3/v106n3a11.pdf> Acesso em 26/07/2019.