

# IDENTIFICAÇÃO DE CROMOSSOMOS POR TÉCNICAS DE FORMAÇÃO DE BANDAS: OBSERVAÇÕES PRÁTICAS -

Lilia Maria de Azevedo Moreira

## RESUMO

Este trabalho apresenta uma revisão na metodologia de formação de bandas cromossômicas com diferentes colorações, evidenciando a sua aplicação no cariótipo humano. Além disso, é apresentado o desenvolvimento detalhado das técnicas de formação de bandas C, pelo Ba (OH)<sup>2</sup>; bandas R, com coloração pelo Pinacyanol ou Fucsina básica e a fluorescência centrômetrica dos cromossomos nº 1, 9, 15, 16 e Yq pela técnica do DAPI.

## 1 - INTRODUÇÃO

A última década proporcionou aos citogeneticistas importantes avanços no processo de conhecimento do cariótipo humano, com a possibilidade de identificação de cada cromossomo individualmente.

Até o início de 1970, pouco mais da metade do complemento haplóide humano poderia ser reconhecido com as técnicas existentes que consistiam nos crité

Trabalho realizado com o auxílio do DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst), Kennziffer 4315050038.

Universitas. Ciência. Salvador, (34): 21-30, out./dez. 1985

rios morfológicos e na autoradiografia. Um novo avanço foi proporcionado pelos trabalhos de Caspersson et alii, (1968, 1970) que corando os cromossomos com o fluorocromo quinacrina mustarda e a seguir, examinando-os com iluminação ultravioleta, verificaram um padrão consistente e único de bandas para cada par.

Os resultados desta aplicação foram excelentes e a técnica da formação de bandas pela quinacrina (Bandas Q) continua a ser aplicada, apesar do seu caráter efêmero se constituir em uma desvantagem desta metodologia. O desenvolvimento de novas técnicas que permitem a identificação do cromossomo ou de estruturas cromossômicas específicas, também com iluminação usual, se constitui em um novo avanço no campo da Citogenética. Na Tabela I estão relacionadas as diferentes técnicas de formação de bandas, in formas metodológicas e as referências bibliográficas iniciais.

Nos últimos anos, a utilização combinada da hibridização celular, formação de bandas e a análise de ligação gênica, tem fornecido novos dados para a localização específica de genes nos cromossomos humanos. Neste sentido, importante contribuição foi obtida com o desenvolvimento de técnicas apropriadas para análise de cromossomos profásicos ou prematuramente condensados (Únakul et alii, 1973) que apresentam uma resolução semelhante à observada nos cromossomos gigantes de *Drosophila*. Recentemente, Eljalde et alii (1984) relatam a utilização do mercaptoetanol na produção de bandas de alta resolução, com a técnica R G B (bandas R com BudR e Giemsa). Os autores descrevem a metodologia como sendo reprodutível, requerendo no entanto material nem sempre acessível a muitos serviços de Citogenética.

Neste relato são apresentadas considerações práticas referentes às técnicas de formação de bandas cromossômicas, testadas em grandes centros de Citogenética (Institut für Humangenetik und Anthropologie - Universität Düsseldorf e Universität Freiburg - República Federal da Alemanha), principalmente no que concerne à sua aplicação no estudo do cariótipo humano.

TABELA 1 - Técnicas propostas para identificações cromossômicas

TÉCNICA	ESTRUTURA BANDEADA	TRATAMENTO	REFERÊNCIA INICIAL
Q	Todo o cromossomo, bandas escuras enriquecidas em A/T, bandas claras em G/C.	Quinacrina mustarda e outros fluorocromos.	T. Caspersson; et al., 1968, 1970.
G	" " "	Coloração pelo Giemsa ou outros corantes, com ou sem prétratamento diferentes.	M.E. Dretts e M. Shaw, 1971.
A	Todo o cromossomo: bandas G atípicas.	Técnicas para bandas G, em lâminas velhas (preparadas há mais de 3 meses).	P.E. Crossen, 1974
R	Todo cromossomo, padrões inversos aos obtidos com as técnicas G e Q.	Desnaturação térmica controlada e posterior coloração.	B. Dutrillaux e J. Lejeune, 1971.
BUDR	Todo o cromossomo; marcação diferencial em cromátides. Segmentação do X, 4 e 5.	BUDR por 5 a 6 horas.	A.F. Zakharov et al 1971, 1972.
Colcemide	Todo cromossomo, semelhantes à BUDR.	Colcemide por 12 hs.	E. Stubblefield, 1964
C	Centrômero, algumas constrições secundárias, parte distal do braço longo do Y.	Hidrólise, tratamento com base forte; incubação com 2xSSC; produção sequencial a bandas G, com uso de enzimas proteolíticas; coloração com fluorocromos	F.E. Arrighi e T. C. Hsu, 1971.
Cd	Provavelmente cinetocóros	Incubação em salina a 85° C. Coloração com Giemsa	H.Eiberg, 1974
GI1	Preferencialmente centrômero e constrição secundária do Cr 9 humano. DNA satélite III	Giemsa pH 11.	M. Bobrow et al, 1972
N	Organizadores nucleolares	Incubação em TCA 5% seguido de incubação HCl 0,1N. Giemsa	S. Matsui e M. Sasak, 1973.
1 humano	Preferencialmente constrição 2a. do Cr 1 humano e menos evidentemente nos Cr 9, 16, 19 DNA satélite II	Desnaturação cromossômica em salina fervendo. Incubação em CsCl. 65° C por 10'. Coloração com Leischman.	V. Geraedts e P. Pearson, 1973.
T	Preferencialmente os telômeros	Desnaturação térmica controlada do cromossomo. Produção sequencial às bandas R.	B. Dutrillaux, 1973

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

Em cromossomos metafásicos, obtidos pela técnica usual de cultura de linfócitos (Moohread et alii, 1960), foram testados e adaptados os procedimentos para a obtenção das bandas C, R e pelo DAPI.

## I - Bandas - C (Scheres, 1978)

## Material

- Ba (OH)<sub>2</sub> 5%
- 2 x SSC pH 7.0
- Tampão fosfato 0,01M pH 6.8
- Giemsa a 3% diluído no tampão fosfato
- Preparações cromossômicas recentes.

## Procedimento

- a. Incubar as preparações na solução de Ba (OH)<sub>2</sub> a 60°C, em banho-maria, por 4 minutos.
- b. Lavar em água corrente.
- c. Incubar em 2xSSC a 60°C por 10 minutos.
- d. Lavar em água corrente.
- e. Corar na solução de Giemsa a 3% por 15 a 18 minutos.
- f. Lavar em água corrente.
- g. Secar e observar ao microscópio.

## II - Bandas R (Scheres, 1978)

## Material

- Ba (OH)<sub>2</sub> 5%
- Solução corante: 125 mg de cloreto de Pinacynol Chlorid (ou de Fucsina básica) dissolvidos em 15ml de tampão tetraborato NaOH pH 10.2 + 35 ml de Metanol p.a.
- Tampão tetraborato: 0,8g de tetraborato (di-natrium tetraborato 10 - hydrat - Na<sub>2</sub> B<sub>4</sub><sup>0</sup>7 - 10H<sub>2</sub>O, Merck Art. 6308)

Universitas. Ciência. Salvador, (34): 21-30, out./dez. 1985

dissolvido em 50 ml de NaOH 0,1N e 50 ml de água destilada. Acertar o pH 10.2 com a cerca de 10 gotas de HCl 1N

- Preparações cromossômicas recentes.

#### Procedimento

- a. Imergir as preparações em solução saturada de Bario a 60°C por 5 a 7 minutos.
- b. Passagens sucessivas em água destilada, HC 0,1N
- c. Secar ao ar.
- d. Corar por 1 a 3 segundos na solução de Pinacynol ou por 10-15 minutos na solução de Fucsina básica.
- e. Lavagem em água corrente.
- f. Secar e observar ao microscópio.

OBS.: Não havendo formação de bandas R, descorar a lâmina por passagens sucessivas em HCl 0,1N - Etanol absoluto, deixar secar. Repetir o procedimento, deixando por 3 a 4 minutos na solução de bário.

III - Bandas pelo DAPI - fluorescência das regiões centroméricas dos cromossomos 1,9,15,16 e parte distal do Y (Schweizer et alii, 1978).

#### Material

- 4' , 6' - Diamino - 2 phenylindol 2H Cl  
p.A. (DAPI) C<sub>16</sub> H<sub>15</sub> N<sub>5</sub> - 2HCl; M = 350,3  
Solução mãe: 2 mg /100 ml de tampão;  
Solução a ser usada: 1 ml da solução mãe em 100 ml de tampão.  
Concentração final - 0,2 mg/100 ml.
- Distamycin A. HCl (C<sub>22</sub> H<sub>27</sub> N<sub>9</sub> O<sub>4</sub> HCl)  
M. 6517,9 - 1 mg/5 ml de tampão
- Tampão fosfato p H 7.3.
- Preparações cromossômicas recentes (de até 4 semanas). Preparações muito novas devem ser colocadas em estufa a 90° por 10 minutos ou deixadas por una noite em estufa a 60°C.

#### Procedimento

- a. Imergir a preparação em solução do antibiótico Distamycin A por 10 minutos.
- b. Lavar em tampão.
- c. Levar a preparação à solução do DAPI.
- d. Lavar em tampão p H 7.3.
- e. Montar em tampão, vedar com esmalte, observar em fluorescencia e fotografar rapidamente.

### 3 - RESULTADOS

As figuras 1, 2 e 3 são representativas das bandas cromossômicas formadas com as diferentes metodologias.

### 4 - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O desenvolvimento das técnicas de formação de bandas C e R, obtidas por comunicação pessoal de Scheres (1978), e a utilização rotineira do DAPI permitiram a esquematização dos procedimentos aqui apresentados.

As duas primeiras metodologias são de ampla aplicação no conhecimento do cariotipo humano, permitindo ainda a caracterização de novas síndromes cromossômicas, com a marcação de cromossomos dicêntricos (Bandas C) e detectando deleções terminais e outros rearranjos nas regiões cromossômicas marcadas (Bandas R). A formação de bandas pelo DAPI fornece importante avanço na investigação da origem de cromossomos marcadores. Schreck et alii (1977) realizando o estudo cromossômico de pacientes portadores de pequeno acrocêntrico extra, verificaram que em 75% dos casos, o cromossomo adicional ligava-se a anticorpos específicos para a 5 - methylcitidina, uma característica do braço curto do cromossomo 15. Assim, os autores propuseram que nos casos referidos, o marcador derivava-se do cromossomo 15. A 5 - methylcitidina, localizada no braço curto do cromossomo 15, é também detectável pela técnica de coloração DAPI que oferece em adição possibilidades de melhor compreensão da estrutura do cromossomo.

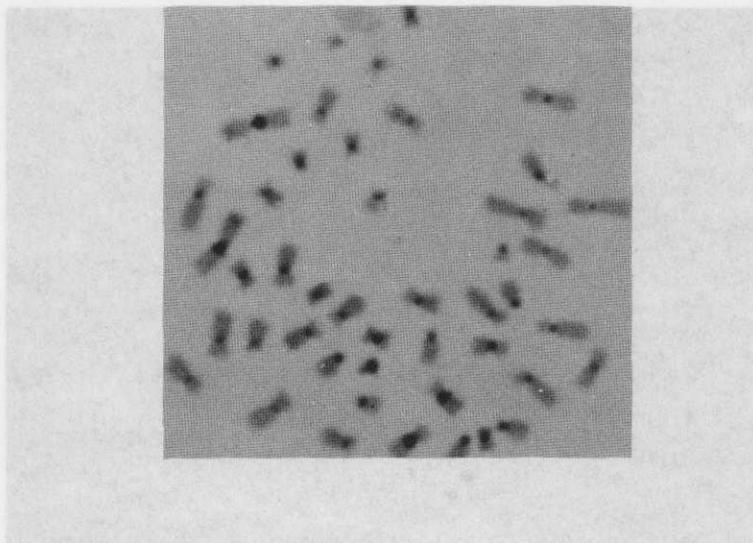


FIG.1. Cromossomos metafásicos humanos após o tratamento para a formação de bandas C pela técnica do hidróxido de bário.

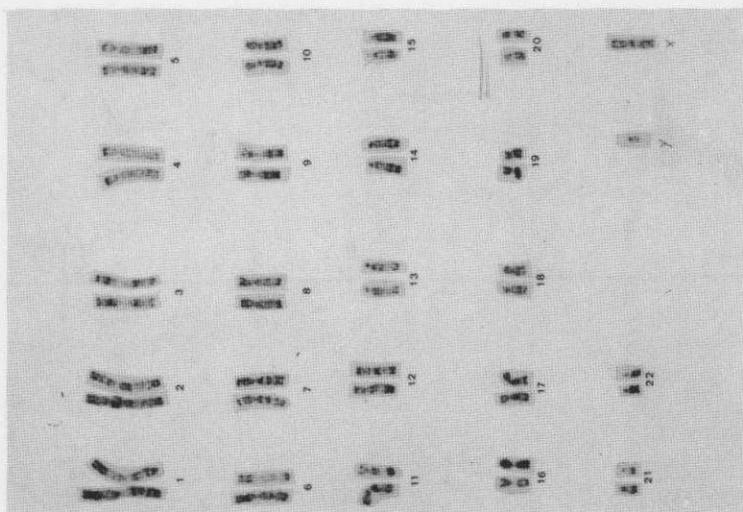


FIG.2. Cariotipo humano normal identificado por formação de bandas R com coloração pelo Pinacyanol.

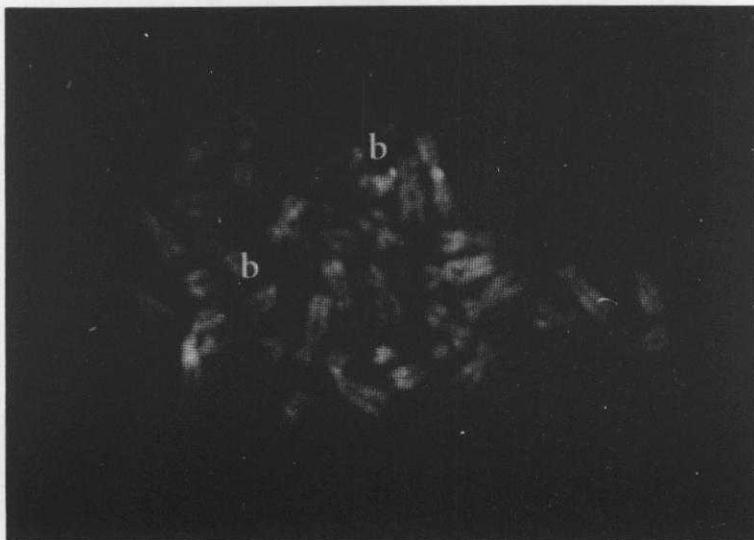


FIG.3. Metafase parcial tratada com Distamycin A/DAPI. A letra b indica o par cromossômico nº 15.

Em conseqüência dos novos avanços adquiridos, a Citogenética tem mudado gradativamente a sua área de atuação que de um aspecto geral de citologia, passou a um campo específico - a citogenética molecular, tendência esta cada vez mais direcionada.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRIGHI, F.E., HSU, T.C. Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenet.* 10 : 81 - 86, 1971.
- BOBROW, M., MADAN, K., PEARSON, P.L. - Staining of some specific regions of human chromosomes, particularly the second constriction of nº 9. *Nature New Biol* 238 : 122-124 - 1972.
- CASPERSSON, T., FARBER, S., FOLEY, G.E., Kundynowsky, J. MODEST, E.J., SIMONSON, E., WAGH, V., ZECH, L - Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exptl Cell Res.* 49: 219 - 222, 1968.
- CASPERSSON, T., L., JOHANSON, C., MODEST., E.J. - Identification of human chromosomes by DNA binding fluorescent agents. *Chromosoma (Berl)* 30: 215-227, 1970.
- CROSSEN, P.E., Unusual chromosomes bands revealed by aging. *Humangenetik* 21: 197 - 202, 1974.
- DRETS, ME., SHAW, M.W. - Specific banding patterns of human chromosomes. *Proc. Nat. Sci. USA* 68: 2073 - 2077, 1971.
- DUTRILLAUX, B. - Nouvelle systeme de marquage chromosomique: les bands T. *Chromosoma (Berl)* 41: 395 - 402, 1973.
- DUTRILLAUX, B., LEJEUNE, J. - Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humaine C.R. Acad. Sci. Paris 272: 2638 - 2640, 1971.
- EIBERG, H. - New selective Giemsa technique for human chromosomes Cd staining, *Nature* 248: 55-56, 1974.
- ELEJALDE, B.R., PLEYTE, K., ELEJALDE, M.M. - The use of Mercaptoethanol to obtain high - resolution RBG - banded chromosomes and a more successful chromosome analysis in humans. *Rev. Bras. Genet.* 4 :717 - 725, 1984.
- GERAEDTS, V., PEARSON, P. - Specific staining of the nº 1 chromosome in spermatozoa *Humangenetik* 20 : 171 - 173, 1973.
- MATSUI, S.I., SASAKI, N. Differential staining of nucleolus organizers in mammalian chromosomes, *Nature* 246 : 148 - 150, 1973.
- MOOREHEAD, P.S., NORWELL, P.C., Mellman, W. J., BARRIPS, D.M., HUNGERFORD, D.A. - Chromosomes preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exptl. Cell Res.* 20: 613-616, 1960.
- Universitas. Ciência. Salvador, (34): 21-30, out./dez. 1985

- SHERES, J.M.J.C. - Comunicação no "Tagung der Sektion Cytogenetik der Gesellschaft für Anthropologie und Humangenetik der Deutschland", Lubeck - Travemund, 8 - 11-Mai, 1978.
- SCHRECK, R.R., BREG, W. R., ERLANGER, B.F., MILLER, O.J. - Preferential derivation of abnormal human G - group - like chromosomes from chromosome 15. *Hum. Genet.* 36: 1 - 12, 1977.
- SCHWEIZER, D., AMBROS, P., ANDRLE, M. - Modification of DAPI banding on human chromosomes by pre-staining with a DNA - binding oligopeptide antibiotic, Distamycin A. *Exp. Cell Res.* 111: 327 - 332, 1978.
- STUBBLEFIELD, E. - DNA Synthesis and chromosomal morphology of chinese hamster cells cultured in media containing N - deacetyl -N- methylcolchicine (colcemid). In: *Symp. Intern. Soc. Cell Biol.* (R.J.C. Harris, ed) Vol. 3, *Cytogenetics of cell in culture*, pp. 22-248- Acad. Press. Inc. New York, 1964.
- UNAKUL, W., JOHNSON, R.T., RAO, P.N., HSU, T.C. Giemsa banding in prematurely condensed chromosomes obtained by cell fusion. *Nature New Biol.* 242:106 -107-, 1973.
- ZAKHAROV, A.F., EGOLINA, N.A. Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. I. Budr revealed differentiation chinese hamster chromosomes. *Chromosome (Berl)*. 38 : 341 - 365, 1972.
- ZAKHAROV, A.F., SELEZNEV, J.V. BENJUSCH, V.A., BARANOV AYA, L.T., DEMINTSEVA, V. I. - Abstracts IV - International Congress of Human Genetics in Paris; 1971, p. 193 (J. de Grouchy, F.J.G. Ebling, I. Henderson and J. Fraçois, eds) ICS233, Excerpta Médica, Amsterdam, 1971.

## SUMMARY

The present paper presents a review in chromosome banding methodology by different stains and shows this application on human karyotype. In addition are presented detailed description on the development of C - banding technique by Ba (OH)<sub>2</sub>; R - banding by Pinacyanil or basic Fucsin and the centromeric fluorescence of the chromosomes nr. 1,9,15,16 and Y q by DAPI banding.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Prof. Lucy Magalhães Freitas, Prof. Asistente do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Biologia UFBA pela leitura crítica deste trabalho.