

Como observar cromossomos:

Um Guia de Técnicas em
Citogenética Vegetal,
Animal e Humana



FUNPEC-Editora

Como observar cromossomos:

Um Guia de Técnicas em
Citogenética Vegetal,
Animal e Humana

Marcelo Guerra
Departamento de Botânica
Universidade Federal de Pernambuco

e

Maria José de Souza
Departamento de Genética
Universidade Federal de Pernambuco

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)

Guerra, Marcelo

Como observar cromossomos : um guia de técnicas
em citogenética vegetal, animal, e humana /
Marcelo Guerra, Maria José de Souzas. --
Ribeirão Preto, SP : Fundação de Pesquisas
Científicas de Ribeirão Preto, 2002.

Bibliografias.

1. Citogenética 2. Cromossomos I. Souza, Maria
José. II. Título.

ISBN: 85-87528-38-6

02-3218

CDD-572.8072

Índices para catálogo sistemático:

1. Citogenética : Técnicas de laboratório :
Ciências da vida 572.8072

**Todos os direitos desta edição reservados à
Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto.**

Editor Chefe: Prof. Dr. Francisco A. Moura Duarte

Editor Associado: Prof. Dr. David De Jong

Supervisora de Produção: Eneida Oliveira Banks

Engenheiro de Sistemas: Domingos Yamada

Computação Gráfica: José Meneghetti Júnior

Revisora Técnica: Margareth P. Monteiro de Barros

Coordenador de Produção Gráfica: Edmundo Cruz Canado

Supervisora de Editoração Gráfica: Fabiana Pereira da Silva

Capa: Fabiana Pereira da Silva

FUNPEC - Editora

Rua Hudson, 655 / Jardim Canadá
14024-000 Ribeirão Preto, SP
Tel./Fax: (16) 620-1251
e-mail: funpecrp@uol.com.br
www.funpecrp.com.br

2002, Impresso no Brasil



APRESENTAÇÃO

Este livro começou como um roteiro para aulas práticas ministradas independentemente por ambos os autores. Ao longo de muitos anos, o texto foi modificado, ajustando-se melhor às técnicas já bem estabelecidas e incorporando-se novas, servindo também de referência para a rotina dos estagiários e pós-graduandos dos nossos laboratórios. Finalmente, foi reorganizado como um guia prático de técnicas em citogenética. Desde o início até a sua forma final, os procedimentos técnicos foram sempre testados, criticados e aperfeiçoados por nossos alunos, aos quais somos imensamente gratos pelas inúmeras sugestões, principalmente àqueles que trabalharam intensamente conosco na fase final de redação deste texto, contribuindo, inclusive, com muitas das fotos apresentadas.

Na parte relativa à Citogenética Vegetal, o autor gostaria de destacar a colaboração fundamental de Ana Emilia Barros e Silva, que como amiga e técnica do laboratório, checou e discutiu todos os protocolos, preparo de soluções, etc, além de revisar o texto final várias vezes, e de Reginaldo de Carvalho, que gentilmente preparou todas as pranchas dessa área. Na Citogenética Animal, a autora é particularmente grata às colegas Tania T. Rieger, pela leitura e contribuições sugeridas, e Rita de Cássia de Moura, pela elaboração de alguns desenhos, bem como às técnicas Francisca Tavares Lira e Cirlene Maria da Silva pelo constante apoio nas diferentes fases deste trabalho. Gostaríamos ainda de agradecer à doutoranda Ana Christina Brasileiro pela revisão do português de todo o livro.

PREFÁCIO

A análise cromossômica sempre foi um dos campos mais excitantes da Citologia e da Genética, tanto quando relacionada a estudos taxonômicos e evolutivos, quanto a estudos estruturais, no melhoramento genético, na caracterização de germoplasmas ou na análise clínica. Apesar da revolução provocada pela Genética Molecular, a análise cromossômica continua sendo a única maneira de observar todo o genoma de um eucariota na forma de blocos individualizados de material genético, passíveis de serem mensurados, diferenciados em sub-unidades e manipulados de diversas maneiras. Em nenhuma outra instância, o material genético é tão claramente observado. Com a introdução das técnicas moleculares, os chamados “corpos corados” da Citologia, estão cada vez mais brilhantemente corados, em cores e pseudo-cores as mais variadas.

A obtenção de bons resultados, depende basicamente do perfeito domínio de diferentes técnicas de coloração. Com isso, a Citogenética alia a informação obtida sobre o material genético, estampada em uma simples foto, a uma estética própria da área, capaz de impressionar iniciantes e profissionais experientes. O fascínio da Citogenética é evidente até nos trabalhos rotineiros. Em aulas práticas, por exemplo, mesmo professores mais experientes não conseguem ser muito objetivos na análise de uma lâmina bem preparada de mitose em cebola. São sempre possuídos pelo desejo de olhar mais e mais, uma e outra célula. Uma metáfase bonita, bem espalhada e corada com hematoxilina, Giemsa ou DAPI é uma paisagem difícil de tirar da memória por horas ou mesmo dias.

Durante o processo evolutivo das espécies, os cariotípos se transformaram seguindo regras próprias, muitas das quais ainda desconhecidas, gerando uma imensa diversidade cromossômica em número, forma, tamanho, capacidade de pareamento meiótico, conteúdo de heterocromatina, etc. Os vários exemplos apresentados no texto, ilustram não apenas o efeito final de determinadas técnicas de coloração como também fornecem uma amostra da diversidade revelada com essas técnicas. As fotos foram quase sempre tiradas de trabalhos nossos já publicados, mostrando assim o que é possível produzir com essas técnicas.

O estudo da variabilidade cariotípica e do seu significado tem sido nosso tema de pesquisa há cerca de 30 anos. Este livro é o resultado dessa experiência em pesquisa, em aulas práticas e na orientação de alunos nos mais diversos ramos da citogenética. Os protocolos apresentados têm sido utilizados em aulas práticas de diferentes cursos de graduação e pós-graduação ministrados pelos autores na Universidade Federal de Pernambuco e em outras Universidades. A citogenética humana foi restrita, neste texto,

às técnicas básicas, tanto por não ser a área de pesquisa dos autores, quanto por ser uma área já tão especializada que possui guias particulares nos quais tem sido bastante exploradas.

O texto está dividido em duas partes praticamente independentes: a citogenética vegetal e a citogenética animal e humana. Cada uma dessas partes é de autoria exclusiva de apenas um dos autores e por isso tem estilo de apresentação próprio, apesar da intensa troca de idéias e sugestões. Os capítulos finais da parte de citogenética vegetal, sobre o preparo de soluções, revelação de filmes e sugestões gerais para o dia-a-dia do laboratório, se aplicam igualmente bem na citogenética animal e são recomendados a qualquer pesquisador iniciante. O texto foi escrito para servir de guia prático para aqueles interessados em desenvolver essas técnicas em seus laboratórios. Por essa razão, são descritas não apenas as etapas de cada técnica mas também os detalhes de como fazer cada uma delas e os cuidados que devem ser tomados. Para os iniciados na área, uma leitura atenta através das técnicas e recomendações provavelmente revelará algumas observações importantes.

O livro certamente é incompleto, uma vez que apresentamos apenas aquelas técnicas utilizadas rotineiramente em nossos laboratórios. Em caso contrário, faríamos um texto muito volumoso e sem muita experiência. O leitor interessado em outras técnicas deve consultar outras obras, algumas das quais recomendamos no capítulo final. Das técnicas atuais, a grande ausente é a de hibridização *in situ*, na qual a nossa experiência não é tão extensa que nos permita tratar à vontade as várias etapas envolvidas e por isso preferimos apenas recomendar livros recentes de autores com vasta experiência na área. Esperamos que as técnicas apresentadas possam ajudar estudantes e pesquisadores iniciantes a descobrir mais sobre esse fantástico mundo guardado dentro das células.

MARCELO GUERRA E MARIA JOSÉ DE SOUZA

ÍNDICE

Parte I - Citogenética Vegetal	15
1 Como coletar material para análise citogenética	17
1.1 Obtenção de tecido com atividade mitótica intensa	17
1.2 Pré-tratamento com antimitóticos	19
1.3 Fixação das células	20
1.4 Estocagem do material	20
2 Como analisar cromossomos mitóticos	23
2.1 A escolha da técnica e do corante adequados	23
2.2 Técnicas de esmagamento seguido de coloração	25
2.2.1 Coloração com Giemsa	25
2.2.2 Controle da coloração Giemsa	28
2.2.3 Coloração com hematoxilina a 1%	29
2.3 Técnicas de coloração seguida de esmagamento	31
2.3.1 Coloração com hematoxilina acética a 1%	31
2.3.2 Coloração com orceína acética a 2%	32
2.3.3 Preparação de lâminas permanentes com corantes acéticos	33
2.3.4 Coloração Feulgen	33
2.4 Representação do cariótipo na forma de cariograma ou idiograma	36
2.4.1 Construção de um cariograma	36
2.4.2 Construção de um idiograma	37
3 Como analisar cromossomos meióticos	39
3.1 Observações gerais para a preparação das lâminas	39
3.2 Técnicas de coloração seguida de esmagamento	41
3.2.1 Coloração com carmim acético a 2%	41
3.2.2 Coloração com hematoxilina acética a 1%	43
3.3 Técnicas de esmagamento seguido de coloração	44
3.3.1 Coloração com Giemsa	44
3.3.2 Coloração com hematoxilina acética a 1%	45
3.4 Análise de células do tapete e da mitose polínica	46
4 Como corar diferencialmente algumas regiões cromossômicas	49
4.1 Preparação de lâminas com digestão enzimática	49
4.2 Bandeamento C – Observação da heterocromatina constitutiva	50
4.3 Dupla-coloração com os fluorocromos CMA e DAPI	52
4.4 Tripla-coloração CMA/DA/DAPI	55
4.5 Coloração sequencial CMA-DAPI com contracorantes (CMA/DA-DAPI/AMD)	56
4.6 Coloração com Hoechst 33258, quinacrina ou iodeto de propídeo	56

4.7	Coloração com nitrato de prata: observação de nucléolos e RONs	57
4.8	Descoloração de lâminas coradas com prata	58
5	Como preparar as soluções mais utilizadas na citogenética vegetal	61
5.1	Fixador Carnoy 3:1 - 20 ml	61
5.2	Colchicina a 0,1% ou 0,5% - 50 ml	61
5.3	8-Hidroxiquinoleína (8HQ) 0,002M - 300 ml	61
5.4	HCl 1N e 5N - 300 ml	62
5.5	Carmim acético a 2% - 100 ml	62
5.6	Hematoxilina acética 1% - 100 ml	62
5.7	Orceína acética a 2% - 100 ml	62
5.8	Solução corante de Giemsa (solução estoque) - 66 ml	63
5.9	Giemsa a 2% (solução de uso) - 100 ml	63
5.10	Reativo de Schiff - 400 ml	63
5.11	Água sulfurada - 300 ml	64
5.12	Tampão fosfato pH 6,8 (tampão de Sorensen) - 2 litros de solução estoque	64
5.13	Tampão McIlvaine pH 7,0 - 2 litros de soluções estoque	65
5.14	Tampão McIlvaine pH 5,5 - 20 ml	65
5.15	Tampão citrato-fosfato pH 4,8 - 1 litro	65
5.16	20xSSC - 1 litro	65
5.17	2xSSC - 100 ml	66
5.18	Solução de celulase 2% - pectinase 20% - 20 ml	66
5.19	Solução saturada de hidróxido de bário - 120 ml	66
5.20	DAPI (4'- 6'diamidino - 2' - fenilindol) 2 µg/ml - 10 ml de solução estoque	66
5.21	CMA (Cromomicina A ₃) 0,5 mg/ml - 10 ml	67
5.22	AMD (Actinomicina D) 0,2 mg/ml - 5 ml	67
5.23	DA (Distamicina A) 0,1 mg/ml - 10ml	67
5.24	Hoechst 0,5 µg/ml - 2 ml de solução estoque	67
5.25	Quinacrina 0,5% - 10 ml	68
5.26	Iodeto de propídeo 1 µg/ml - 10 ml de solução estoque	68
5.27	Meio de montagem Glicerol:/McIlvaine 1:1 (para fluorocromos) - 50 ml	68
6	Como revelar os filmes fotográficos	69
6.1	Reveladores e fixadores mais comuns	69
6.1.1	Revelador Dektol - 1 litro de solução estoque	69
6.1.2	Revelador Microdol - 1 litro de solução estoque	70
6.1.3	Revelador HC-110 (para filme de ASA 400)	70
6.1.4	Fixador universal - 1 litro	70
6.2	Cuidados com os reveladores e fixadores	71
6.3	Revelação dos filmes mais comumente utilizados	71
6.3.1	Filme Copex Pan Agfa ou Imagelink Kodak (ASA 25)	71

6.3.2	Filme T-Max ou Tri-X Pan Kodak (ASA 400)	71
6.3.3	Filme Panatomic X ou T-Max Kodak (ASA 100)	72
7	Como organizar melhor seu laboratório e apresentar seus resultados	73
7.1	Cuidados gerais com os protocolos	73
7.2	Preparação da bancada	74
7.3	Anotações gerais no laboratório	74
7.4	Reutilização de lâminas e lamínulas	75
7.5	Descarte de ácidos e substâncias tóxicas	75
7.6	Conservação de corantes e lâminas coradas	75
7.7	Observação de uma célula em diferentes microscópios	76
7.8	Cuidados com a fotografia	76
7.9	A escolha dos filmes	77
7.10	Organização da documentação fotográfica	77
7.11	Seleção de fotos para publicação	78
7.12	Montagem de fotos em uma prancha	78
Parte II - Citogenética animal e humana		81
8	Como observar cromossomos mitóticos em insetos	83
8.1	Manutenção de gafanhotos em cativeiro	83
8.2	Obtenção de embriões	85
8.3	Preparação de lâmina a partir de embrião total	86
8.4	Obtenção de cromossomos mitóticos a partir de células de parede de ovaríolos	87
8.5	Obtenção de cromossomos mitóticos a partir de células de cecos gástricos (suspenção celular)	87
9	Como observar cromossomos mitóticos humanos e de pequenos mamíferos	89
9.1	Cultivo de linfócitos humanos	89
9.1.1	Macrotécnica para cultivo de linfócitos	89
9.1.2	Microtécnica para cultivo de linfócitos	90
9.2	Cultivo de fibroblastos em pequenos mamíferos	91
9.2.1	Obtenção de biópsias	92
9.2.2	Implantação do cultivo	93
9.2.3	Tripsinização	94
9.2.4	Preparação do material para análise cromossômica	94
9.2.5	Congelamento de células	95
9.2.6	Descongelamento de células	96
9.3	Observação de cromossomos mitóticos em células de medula óssea e de baço de pequenos mamíferos	96
9.3.1	Utilizando células de medula óssea	96
9.3.2	Utilizando células de baço	97
9.4	Análise do cariotípico mitótico	98

9.4.1	Construindo um cariograma: o exemplo do cariograma humano	98
9.4.2	A montagem do cariograma	99
10	Como observar cromossomos meióticos e complexos sinaptonêmicos	101
10.1	Dissecção de gafanhotos	101
10.1.1	Preparação de lâminas por esmagamento de folículos testiculares de gafanhotos	102
10.1.2	Preparação de lâminas por suspensão de células testiculares de gafanhotos	103
10.2	A meiose em pequenos mamíferos (roedores, morcegos e marsupiais)	103
10.3	Análise da freqüência e distribuição de quiasmas em gafanhotos	104
10.4	Análise de complexo sinaptonêmico em insetos e pequenos mamíferos	105
10.4.1	Análise do complexo sinaptonêmico em pequenos mamíferos (técnica de dispersão ou <i>spreading</i>)	106
10.4.2	Análise de complexo sinaptonêmico de pequenos mamíferos (técnica de suspensão celular)	107
10.4.3	Análise de complexo sinaptonêmico em gafanhotos (técnica de dispersão ou <i>spreading</i>)	107
11	Como corar diferencialmente cromossomos mitóticos, meióticos, politênicos e a cromatina sexual	111
11.1	Bandeamento C (para vertebrados e invertebrados, especialmente insetos)	112
11.1.1	Bandeamento C (coloração com acridina orange)	112
11.2	Análise da heterocromatina constitutiva através da coloração com os fluorocromos CMA ₃ /DA/DAPI (tríplice coloração)	115
11.3	A coloração DA/DAPI em cromossomos humanos	116
11.4	Coloração seqüencial AgNO ₃ /CMA ₃	118
11.5	Observação de nucléolos, RONs, "cores" e cinetócoros de insetos	119
11.6	Análise das RONs em vertebrados	119
11.7	Bandeamento G e bandeamento R em humano e outros mamíferos	120
11.7.1	Bandeamento G para humano e outros mamíferos	120
11.7.2	Bandeamento R por incorporação de 5-bromodesoxiuridina (5-BrdU)	121
11.8	Análise de cromossomos politênicos de drosófila e da cromatina sexual humana	122
11.8.1	Coleta de drosófila na natureza	122
11.8.2	Preparação de lâminas para obtenção de cromossomos politênicos	122

11.8.3 Localizando a cromatina sexual humana	123
12 Como preparar as soluções e meios de cultura usados na citogenética animal	125
12.1 Solução de Ringer (solução fisiológica de insetos) - 1000 ml	125
12.2 Solução de Hanks (solução salina balanceada) - 500 ml	125
12.3 Solução desinfetante de merfene - 75 ml	125
12.4 Orceína acética a 2% -100 ml	125
12.5 Orceína lácto acética a 1% - 100 ml	125
12.6 Solução de fermento - 25 ml	126
12.7 Solução coloidal de gelatina - 50 ml	126
12.8 Meio de cultura para drosófila	126
12.9 Meio de cultura para linfócitos - 120 ml	127
12.10 Meio de cultura para fibroblastos - 120 ml	127
Referências Bibliográficas	129

PARTE I

CITOGENÉTICA VEGETAL

1 - Como coletar material para análise citogenética

Na análise cromossômica, tanto com técnicas de coloração simples quanto com as mais sofisticadas, uma coleta e preparação do material muito bem feitas são fundamentais para a obtenção de bons resultados. Os procedimentos descritos abaixo têm sido aplicados com êxito na análise citogenética de vegetais dos mais diversos grupos e constituem um resumo dos métodos mais comumente utilizados para observação de cromossomos em plantas. Antes de se aplicar qualquer das técnicas de coloração são necessários alguns cuidados especiais na obtenção de tecidos em atividade intensa de divisão, bem como no pré-tratamento, fixação e estocagem desse material.

1.1 - Obtenção de tecidos em atividade mitótica intensa

Em plantas, a maior quantidade de células em divisões mitóticas se encontra no **tecido meristemático**. Esse tecido pode ser encontrado em diferentes órgãos das plantas e se caracteriza por não apresentar células diferenciadas. Para análise cromossômica mitótica o melhor meristema é o de raízes, devido principalmente ao maior volume celular e ao crescimento muito rápido. Além disso, as pontas de raízes absorvem mais facilmente soluções onde são mergulhadas, o que é muito importante no uso de antimitóticos. A obtenção de raízes para a análise cromossômica pode ser feita a partir de diferentes fontes. As mais comuns são sementes, bulbos e caules. Abaixo descrevemos como proceder para obter raízes adequadas a partir de diferentes partes da planta.

a) Sementes. Coloque sementes limpas para germinar em placas de Petri com papel de filtro umedecido. A raiz deve ser coletada preferencialmente quando o seu tamanho for aproximadamente igual ao do eixo maior da semente. Quando as raízes forem muito grossas, é preferível esperar que cresçam um pouco mais e se tornem mais finas. Observe que *o papel de filtro deve ser mantido apenas úmido*. A maioria das espécies germina rapidamente e dispensa maiores cuidados. Entretanto, em alguns casos, é preferível esterilizar externamente a semente para evitar o desenvolvimento de fungos e bactérias que afetem a sua viabilidade ou diminuam o seu índice mitótico. Nesses casos, antes de colocar as sementes na placa de Petri, elas devem ser esterilizadas em etanol 70% ou em hipoclorito de sódio (água sanitária) a 4%, em um recipiente sob agitação intensa por 15 a 20 segundos, e lavadas rapidamente em água destilada ou esterilizada. Sementes com tegumentos muito duros podem precisar de algum tratamento que facilite a absorção da água pelo embrião. Para isso, pode-se lixar as sementes em um ponto da superfície ou mergulhá-las cuidadosamente em ácido sulfúrico concentrado para escarificar o tegumento. O tempo de escarificação depende do material, podendo ser testado, inicialmente,

tempos bem curtos (2 a 5 minutos) até tempos mais longos (30 minutos ou mais). Geralmente é possível observar o efeito corrosivo do tratamento sobre o tegumento a olho nu ou na lupa.

b) Bulbos. No caso de plantas com bulbos, como a cebola, ou com estruturas similares, *deixe apenas a base do bulbo em contato com a água* dentro de um frasco. As capas mais externas e as raízes envelhecidas ou secas do bulbo devem ser retiradas para evitar apodrecimento da água. Se necessário, mude a água freqüentemente. No caso de cebola, as raízes para coleta devem ter 1 a 2 centímetros de comprimento.

c) Caule. Muitas plantas enraízam facilmente quando colocadas na água e produzem um excelente meristema. É o caso da maioria das monocotiledôneas, como as aráceas (comigo-ninguém-pode, imbé, etc), comelináceas e gramíneas, e de muitas dicotiledôneas, como os maracujás e as espirradeiras. Nesse caso, deve-se mergulhar na água a parte inferior do ramo ou caule, para que emita raízes adventícias. Sempre que possível, deve-se retirar as folhas submersas para evitar que apodreçam e aferrem a qualidade da água. Em plantas como a mandioca ou as aráceas em geral, pode-se obter melhores resultados “enterrando-se” o caule em um jarro com cubos de xaxim, de coco ou bolinhas de cerâmica, garantindo assim um excelente nível de umidade e aeração - duas condições fundamentais para um bom desenvolvimento das raízes.

d) Plantas cultivadas em jarro. No caso de plantas cultivadas em jarro, pode-se inverter o jarro por inteiro apoiando a terra em volta da planta na palma da mão e, com pancadas cuidadosas no fundo do vaso, deslocar para fora todo o seu conteúdo sem desmanchar o bloco de terra. As raízes jovens, que geralmente se situam no fundo do vaso ou junto às paredes, podem ser facilmente coletadas sem danificar o restante do raizame. No caso de plantas pequenas, o ideal é deixá-las crescendo em jarros pequenos enterrados no chão ou em um jarro bem maior. Assim, os vasos pequenos não ressecam facilmente e as plantas são manipuladas sem dificuldades.

e) Plantas inteiras coletadas diretamente no campo. Especialmente em época chuvosa, muitas plantas fornecem excelentes raízes quando extraídas cuidadosamente do solo. Se não há raízes jovens, pode-se coletar a planta, retirar todas ou a maioria das raízes e deixar crescer novas em um vaso com água. No caso de gramíneas, ciperáceas e outras plantas que formam pequenas touceiras, deve-se retirar todas as raízes e mergulhar a base da touceira na água.

f) Outros meristemas. Na falta de raízes adequadas, diversos outros meristemas podem também ser utilizados, como, por exemplo, a parte mais jovem e central dos brotos foliares em crescimento, anteras e parede de ovário dos menores botões florais e vários outros órgãos em crescimento ativo (gavinhas, pétalas, embriões, etc). Nesses meristemas, embora o tamanho das células seja geralmente menor que o observado em raízes, a

quantidade de células em divisão é maior e por isso eles são especialmente recomendados. Em plantas que têm sementes muito pequenas ou raízes muito finas, como muitas cactáceas, orquídeas, veloziáceas, etc, esses outros meristemas são quase sempre muito melhores que as pontas de raízes. Uma desvantagem é que nesses tecidos os antimitóticos freqüentemente não penetram tão facilmente quanto nas raízes. Isso pode ser contornado cortando o material em fatias relativamente finas. Por outro lado, em espécies com cromossomos muito pequenos, como bromélias, cactos e outros, esses meristemas podem apresentar bons resultados mesmo sem o uso de antimitóticos.

1.2 - Pré-tratamento com antimitóticos

Sempre que o objetivo for analisar o número e a morfologia cromossômica será necessário pré-tratar o material com agentes antimitóticos. Esses agentes têm as seguintes vantagens: a) bloqueiam o ciclo mitótico em metáfase, acarretando um acúmulo de células nesse estágio; b) provocam maior contração cromossônica, permitindo visualizar melhor as constrições primárias e secundárias, definindo melhor a morfologia cromossônica; c) produzem um maior espalhamento cromossômico, devido à destruição ou inibição das fibras do fuso acromático.

Os agentes mais comumente utilizados são: colchicina 0,01 a 0,5%, 8-hidroxiquinoleína (8HQ) 0,002M e soluções saturadas de *para-diclorobenzeno* (PDB) ou *α-bromonaftaleno*. O tempo ideal de tratamento com essas drogas pode variar de uma espécie para outra, dependendo, principalmente, da temperatura e da concentração utilizadas. A maioria das espécies reage bem com um tratamento de 8HQ 4-5 horas a 18 °C ou 20-24 horas a 6-8 °C. Temperaturas acima de 18 °C, especialmente no caso da 8HQ, devem ser evitadas porque podem causar aderências entre cromossomos. Espécies com cromossomos grandes, acima de 6 µm, freqüentemente reagem melhor com colchicina que com outros antimitóticos. Isso deve-se ao fato de que a colchicina promove uma condensação cromossônica mais intensa, permitindo um melhor espalhamento e definição da morfologia cromossônica. Na citogenética humana e animal, em geral, utiliza-se a colchicina ou um composto sintético similar denominado Colcemid.

Em algumas espécies, como trigo, aveia e centeio, um tratamento com *choque de frio* pode causar efeito idêntico aos antimitóticos químicos, produzindo excelentes metáfases. Nesse caso, as raízes são colocadas em um pequeno recipiente com água, o qual é colocado em uma caixa de isopor contendo água e cubos de gelo. O conjunto é mantido na geladeira por 6 a 24 horas. A temperatura da água deve ficar em torno de 0-2 °C. A maioria dos autores que trabalham atualmente com essas gramíneas prefere esse tipo de pré-tratamento.

Todos os meristemas destacados da planta e mantidos em ambiente úmido, continuam seus ciclos nucleares normalmente durante horas ou mesmo dias, dependendo do órgão de onde provêm. Para permitir uma melhor absorção do antimitótico, é preferível pré-tratar pontas de raízes, ou outros meristemas, de tamanho relativamente pequeno.

O pré-tratamento do meristema deve ser realizado *preferencialmente de manhã*, por volta das 10:00 h. Nesse horário, a maioria das espécies apresenta uma proporção mais alta de células em prófase, resultando em um maior acúmulo de metáfases bloqueadas ao final do tratamento. Certifique-se de que todo o material em contato com o antimitótico e com as raízes (pinça, frasco para pré-tratamento, etc) está rigorosamente limpo. Por outro lado, a fixação das células poderá ser feita a qualquer hora do dia, dependendo do pré-tratamento utilizado.

1.3 - Fixação das células

A fixação é uma etapa extremamente crítica para a obtenção de bons resultados, especialmente na análise meiótica e em técnicas de bandeamento cromossômico. O fixador mais utilizado é o de Carnoy 3:1 (três partes de álcool etílico P.A. para uma de ácido acético glacial). Pode-se também utilizar o álcool metílico em substituição ao etílico, embora o metílico seja desaconselhado por ser mais tóxico. A solução fixadora deve ser *preparada imediatamente antes de ser utilizada*. Antes de colocar as raízes no fixador, *agite bem a mistura fixadora*. Essas substâncias não se misturam tão facilmente quanto se pode imaginar. Após mergulhar o material no fixador, especialmente no caso de botões florais, *agite novamente o frasco* (se possível, agite algumas vezes durante o tempo de fixação). *O volume do fixador deve ser, de preferência, 10 vezes maior que o volume do material a ser fixado*. A fixação é sempre feita à temperatura ambiente, salvo indicação em contrário na técnica.

Raízes muito grossas, botões florais e brotos foliares devem sempre ser seccionados com uma lâmina (nova, de preferência) antes de serem fixados. Observe que a fixação não ocorre facilmente através de paredes grossas ou em tecidos duros.

Geralmente deixa-se o material no fixador de um dia para o outro. Contudo, após as primeiras 2 horas o material já está fixado e já pode ser estocado. Um tempo de fixação maior que 24 horas pode prejudicar o material. No caso de materiais mais sensíveis, é preferível fazer uma fixação inicial por 10 a 15 minutos e, em seguida, substituir o fixador por um novo por mais 1 a 2 horas.

1.4 - Estocagem do material

O material fixado pode ser imediatamente utilizado para coloração ou estocado para ser usado dias ou anos após. A estocagem pode ser feita simplesmente guardando o material fixado no *freezer*, no próprio fixador, ou, então, transferindo o material para etanol 70% e guardando na geladeira. Em qualquer caso, *certifique-se de que os frascos estejam hermeticamente fechados*. Use de preferência frascos com batoque de pressão e tampa de rosca.

Todas as fixações devem estar devidamente etiquetadas. As etiquetas devem ser feitas no próprio laboratório, em papel branco e de tamanho adequado para fácil visualização através do vidro. As anotações na

etiqueta são *sempre feitas a lápis*. A etiqueta é sempre mantida dentro do frasco de fixação, junto com o material, com a face anotada para fora. Nunca anote nos dois lados da etiqueta. Na etiqueta deve constar sempre um número ou *código de referência* do material, a *data da fixação* e, eventualmente, alguma outra anotação que ajude a reconhecer o material (por exemplo, o tempo de fixação, quando este for intencional ou acidentalmente diferente do normal).

Cada pesquisador deve ter suas fixações reunidas em caixas plásticas próprias, para facilitar a localização no *freezer*. Nos projetos que demandam grande quantidade de fixações é importante utilizar também uma pequena etiqueta autocolante no lado de fora do frasco para permitir uma identificação mais fácil das fixações.

2 - Como analisar cromossomos mitóticos

A observação de cromossomos mitóticos, tanto para análise do ciclo mitótico quanto para estudo do cariotípico, é geralmente feita pelas técnicas de *coloração convencional*. Essas técnicas coram os cromossomos por igual, isto é, indistintamente, sem nenhuma preferência por determinado tipo de cromatina, composição do DNA ou de proteínas. São chamadas de convencionais para serem distinguidas das técnicas de *coloração diferencial*, desenvolvidas a partir do final dos anos 60. Nessas últimas, são incluídas as *técnicas de bandeamento cromossômico* que coram principalmente, ou exclusivamente, um determinado tipo de cromatina (capítulo seguinte).

As técnicas convencionais são as mais utilizadas na citogenética vegetal e têm a vantagem de permitir uma coloração rápida e bem definida dos cromossomos. Além disso, a repetibilidade dos resultados obtidos com essas técnicas é praticamente de 100%. Por outro lado, as técnicas de coloração diferencial, por envolverem um número maior de etapas experimentais, são mais laboriosas e a repetibilidade dos resultados é sempre inferior, ou seja, nem sempre a execução da técnica produz os resultados esperados. Essas desvantagens são compensadas pelo fato de permitirem observar detalhes que não seriam visíveis com a coloração convencional.

Os resultados obtidos com qualquer dessas técnicas podem ser apresentados na forma de cariograma ou idiograma, os quais permitem uma melhor organização e visualização das principais características cariotípicas. Ao final do capítulo, são apresentados os procedimentos para construção de cariogramas e idiogramas. Atualmente, existem no comércio diversos programas para análise de imagem que ajudam bastante, ou automatizam completamente, a construção de cariogramas e idiogramas. Contudo, os programas específicos para essa finalidade são muito caros e só valem a pena ser adquiridos se houver uma rotina intensa de trabalho com essas técnicas.

2.1 – A escolha da técnica e do corante adequados

Existem muitas maneiras de preparar e corar lâminas para análise cromossômica em plantas. Neste trabalho serão enfatizadas as técnicas mais utilizadas em nosso laboratório, embora diversas outras possam ser igualmente eficientes.

A escolha da técnica mais adequada pode depender dos objetivos desejados e dos recursos disponíveis no laboratório. As técnicas mais simples, que utilizam drogas mais baratas e dispensam nitrogênio líquido (ou gelo-seco), são mais recomendadas para aula prática. Nesses casos, as células devem ser *primeiramente coradas* e depois esmagadas entre lâmina e lamínula, podendo ser analisadas logo em seguida. Essas *técnicas de coloração seguida de esmagamento* utilizam geralmente os chamados *corantes acéticos* (carmim acético, orceína acética ou hematoxilina acética) ou o reativo de Schiff. Uma outra opção é *primeiramente esmagar as células* numa lâmina em ácido acético a 45%, retirar a lamínula por congela-

mento em nitrogênio líquido e depois corá-las (*técnicas de esmagamento seguido de coloração*). A grande vantagem desse último procedimento é que, ao retirar a lamínula por congelamento, as células permanecem presas à lâmina e podem ser submetidas aos mais diversos tratamentos antes de serem coradas. Uma outra vantagem é que o material aderido à lâmina, sem a proteção da lamínula, seca e se achata, permitindo a observação de todos os cromossomos de uma metáfase em um único plano focal – o que é fundamental para a documentação fotográfica. Além disso, as lâminas feitas com essas técnicas são normalmente montadas de forma permanente, enquanto nas técnicas de coloração seguida de esmagamento a montagem permanente exige um procedimento à parte.

A escolha do corante também dependerá do objetivo e do material que está sendo analisado. Alguns corantes permitem visualizar simultaneamente os cromossomos e os nucleólos, enquanto outros coram apenas os cromossomos, porém com maior nitidez e contraste. Quando os cromossomos são grandes, a coloração com hematoxilina, orceína ou Feulgen pode ser mais adequada, por ser mais simples e permitir uma observação rápida e direta dos cromossomos. Quando os cromossomos são muito pequenos, deve ser utilizado o corante de Giemsa ou a hematoxilina, que garantem uma coloração mais intensa e melhor contrastada. Em algumas espécies o citoplasma pode reagir um pouco com o corante, diminuindo o contraste da preparação. O mesmo pode ocorrer devido à qualidade da fixação – fixações antigas ou feitas em excursões, freqüentemente coram também o citoplasma. Nesses casos, é importante tentar diferentes corantes, até se conseguir um que produza um melhor contraste.

A técnica de coloração Feulgen, descrita inicialmente por Feulgen e Rossenbeck, em 1924, utiliza uma solução corante chamada *reativo de Schiff*. É uma técnica clássica que oferece bons resultados e dispensa a retirada da lamínula. A intensidade da coloração, nesse caso, depende muito das condições de fixação e hidrólise. Quando essas condições são bem controladas, a intensidade de coloração dos núcleos é diretamente proporcional à quantidade de DNA que eles apresentam. Por isso, essa coloração é utilizada para medir a quantidade de DNA nuclear (veja mais detalhes sobre essa coloração em Mello e Vidal, 1978). Além do reativo de Schiff, alguns fluorocromos coram também de forma *estequiométrica* (isto é, proporcional à quantidade de DNA presente no núcleo) e podem ser utilizados para determinar a quantidade de DNA.

A seguir são descritas algumas das técnicas de coloração cromossômica mais comumente utilizadas na citogenética vegetal. Cada uma delas apresenta inúmeras variações de procedimentos descritas na literatura especializada. Essas variantes, geralmente, refletem apenas a experiência prática de diferentes autores e *muito raramente constituem melhorias objetivas na técnica*. Nas técnicas onde é necessário um pré-tratamento, é feita a recomendação de um procedimento geral com 8-hidroxiquinoleína, como utilizado em nosso laboratório, embora outros tipos de pré-tratamento possam ser utilizados (item 1.2). A orceína acética, o carmim acético e o reativo de Schiff são classicamente os corantes mais utilizados para vegetais. Por outro lado, o corante de Giemsa (uma mistura de corantes estabelecida por

Gustav Giemsa) é o mais utilizado na citogenética humana e animal (principalmente para vertebrados). Posteriormente, o uso desse corante foi aplicado também a vegetais e, em nossa experiência com a citogenética de plantas, a coloração com Giemsa, ou com hematoxilina, produz os melhores resultados, tanto para mitose quanto para meiose (veja mais detalhes sobre essas técnicas em Guerra, 1983, 1999).

O material ideal para treinar qualquer das técnicas descritas abaixo, relacionadas à análise de cromossomos mitóticos, é a cebola. Isso por numerosas razões: é um material universal, disponível durante todo o ano, enraíza facilmente, as raízes são macias e com meristema abundante, apresenta células e cromossomos grandes, além de ter cromossomos pouco numerosos e extensamente estudados na literatura.

2.2 - Técnicas de esmagamento seguido de coloração

Essas técnicas são recomendadas para análise convencional de cariótipos de plantas em geral. A técnica de Feulgen (item 2.3.4), é também recomendada para a análise de cariótipos. Contudo, se os cromossomos forem muito pequenos é preferível utilizar as técnicas abaixo, que coram os cromossomos mais fortemente.

2.2.1 - Coloração com Giemsa

a) Pré-tratamento. Colete pontas de raízes em crescimento ativo e mergulhe-as em um recipiente aberto contendo uma pequena quantidade de 8HQ por 20-24 horas na geladeira a cerca de 10 °C.

b) Fixação. Mergulhe as raízes em Carnoy 3:1 por 2 a 20 horas à temperatura ambiente.

c) Estocagem. Caso não queira trabalhar com o material imediatamente, estoque as raízes no próprio fixador no freezer ou em etanol na geladeira (veja item 1.4).

d) Lavagem. Lave as raízes, mergulhando-as duas vezes em água destilada (5 minutos cada).

e) Hidrólise. Enxugue as raízes rapidamente em papel de filtro e mergulhe-as em HCl 5N à temperatura ambiente por 20 minutos. No caso de espécies com raízes muito duras, como as de gramíneas, é preferível primeiro digerir a parede celular com celulase-pectinase antes de fazer a hidrólise (veja como faz a digestão da parede no item 4.1.c). Nesse caso, faça uma digestão menos intensa (metade do tempo indicado para a digestão normal) para facilitar o manuseio posterior das raízes.

f) Preparação da lâmina. Transfira uma ponta de raiz para a lâmina. Enxugue cuidadosamente a raiz com papel filtro e acrescente uma gota de ácido acético a 45%. Com o auxílio de um estereomicroscópio, retire a

coifa e as capas mais externas da raiz procurando deixar apenas o meristema. *Corte ou fragmente o meristema em pedaços tão pequenos quanto possível.* Cubra com uma lamínula e bata cuidadosamente, com uma agulha de ponta rombuda, diretamente em cima dos fragmentos do meristema até que cada um deles se transforme numa pequena mancha de células espalhadas. Verifique no microscópio comum, com o diafragma do condensador parcialmente fechado ou com o condensador do microscópio deslocado para baixo, se as células estão bem espalhadas. Se o espalhamento não estiver bom, bata novamente com cuidado, até obter um espalhamento satisfatório. Nesse ponto, esmague o material colocando o conjunto lâmina-lamínula em um papel filtro dobrado, *pressionando firme e cuidadosamente para não permitir nenhum deslize da lamínula sobre a lâmina.*

Atenção:

- ◆ Para esmagar o material, utilize de preferência 3 folhinhas de papel filtro cortadas em tamanho 35 x 90 mm e dobradas ao meio. A lâmina e a lamínula devem ser ajustadas no canto das folhinhas e então pressionadas firmemente. Isso evita que a lamínula deslize sobre a lâmina e “enrole” as células.
- ◆ Observe que as “batidas” têm apenas a função de espalhar as células, enquanto o esmagamento propriamente tem a função de espalhar melhor os cromossomos.
- ◆ É importante que cada lâmina contenha uma quantidade não muito grande de tecido, permitindo um bom espalhamento das células. A preparação deve conter o máximo de tecido meristemático e o mínimo de outros tecidos, de forma a aumentar a concentração de células em divisão na lâmina.
- ◆ Se surgirem bolhas de ar na preparação, acrescente uma gota de ácido acético a 45% ao lado da lamínula e retire o excesso com papel filtro.

g) Retirada da lamínula. Congele o conjunto lâmina-lamínula no nitrogênio líquido ou gelo-seco por alguns minutos e com o auxílio de uma gilete ou de um bisturi retire *rapidamente* a lamínula. Deixe a lâmina secar ao ar.

Atenção:

- ◆ A retenção das células exclusivamente na lâmina se deve ao fato de que elas aderem à superfície mais gelada. Como a lâmina é mais espessa, conserva mais o frio que a lamínula e por isso retém as células. Se a retirada da lamínula não for rápida, a temperatura se eleva rapidamente nas duas superfícies e as células podem ser retidas em parte na lamínula e em parte na lâmina, causando geralmente deformações tanto nas células quanto nos cromossomos.
- ◆ Caso não disponha de nitrogênio líquido, gelo-seco ou CO₂ comprimido, coloque a lâmina em uma superfície gelada dentro do freezer, por pelo menos 20 minutos, e rapidamente abra o freezer e retire a lamínula. Nesse caso, pode-se perder uma certa proporção de células, mas o que fica é suficiente para trabalhar.

h) Coloração com Giemsa. Coloque as lâminas em uma cubeta e acrescente a solução de Giemsa a 2%. Controle cuidadosamente a intensidade da coloração (veja item seguinte). Para retirar as lâminas da solução, acrescente lentamente água de torneira até que os cristais sobrenadantes transbordem. Em seguida, retire o restante da solução corante e lave rapidamente as lâminas com água destilada ou tampão fosfato.

i) Montagem da lâmina. Seque as lâminas com uma bomba de ar, acrescente uma gota de meio de montagem e cubra com uma lamínula limpa.

A Figura 1 ilustra a coloração com Giemsa em células pré-tratadas de diferentes organismos. Em **a** observa-se um par de cromossomos satelitados, em uma metáfase de *Costus pulverulentus* (zingiberácea), onde apenas um deles mostra a constrição secundária distendida e corada.

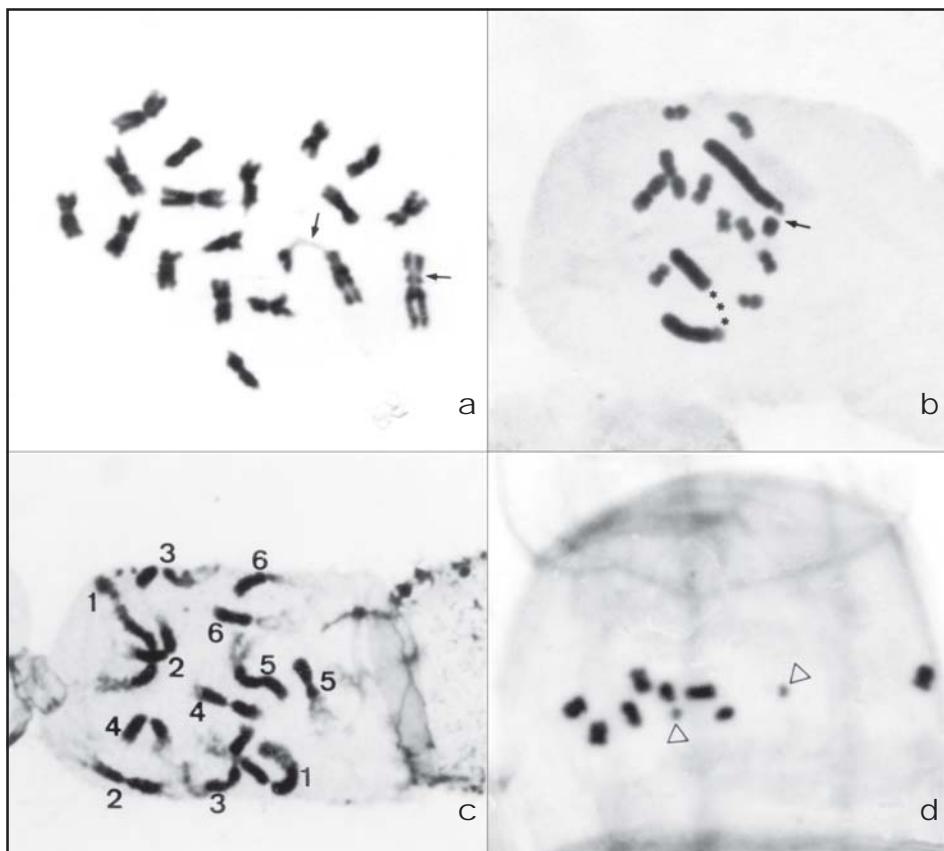


Figura 1 Cromossomos mitóticos corados com Giemsa. **a**, Metáfase de *Costus pulverulentus* ($2n=18$). **b**, Metáfase de *Eleutherine bulbosa* ($2n=12$). Setas em **a** e **b** apontam constrições secundárias. Asteriscos em **b** mostram a região onde deve existir uma constrição secundária distendida e não-corada. **c**, Prometáfase de *Sesbania tetraptera*. Os números indicam os pares cromossômicos com o mesmo padrão de condensação profásica. **d**, Metáfase de um briófito, *Notothylas vitalii* ($2n=10$). Triângulos vazios apontam microcromossomos. Fotos: **a**, Guerra, 1988a; **b**, Guerra, 1988b; **c**, Forni-Martins e Guerra, 1999; **d**, original.

Em 1b, as constrições secundárias em uma metáfase de *Eleutherine bulbosa* (iridácea) aparecem distendidas e completamente não-coradas, parecendo tratar-se de dois cromossomos extras. Satélites com a constrição secundária não-corada, como em 1b, têm freqüentemente levado a erro na contagem dos cromossomos. Observe nessa figura, a ocorrência de uma inversão pericêntrica no par maior, resultando em um cromossomo acrocêntrico e um outro metacêntrico. Como a inversão envolveu parte do satélite, os satélites têm também tamanhos diferentes.

A Figura 1c mostra uma prometáfase de *Sesbania tetraptera* (leguminosa) com alguns braços cromossômicos parcialmente descondensados, gerando um *padrão de condensação cromossônica* característico para cada par cromossômico.

Em 1d observa-se o complemento cromossômico diplóide de uma espécie de briófito do grupo dos antóceros, destacando-se a presença de *microcromossomos* (o par menor nesta metáfase), comuns em briófitos.

2.2.2 - Controle da coloração Giemsa

A coloração Giemsa é utilizada tanto na análise cromossômica convencional quanto em outras técnicas, principalmente o bandeamento C e N. Entretanto, vários fatores interferem na reação de coloração, entre eles as condições de fixação, a natureza do material e a qualidade do corante (diferentes remessas de um mesmo fabricante podem apresentar reações significativamente diferentes). Por essa razão, é importante controlar cuidadosamente a intensidade de coloração.

O tempo de coloração varia de acordo com o tamanho dos cromossomos e com a concentração e qualidade do corante. Espécies com cromossomos muito pequenos, como a maioria dos briófitos, podem precisar de 20 minutos ou mais, enquanto outras com cromossomos grandes, como cebola ou trigo, coram bem com 5 minutos ou menos. Quando não se conhece o tempo exato de coloração do material com um determinado estoque de corante, deve-se verificar a intensidade de coloração a partir dos primeiros um ou dois minutos. Para isso, retire a lâmina do corante, enxague rapidamente o verso da lâmina e confira no microscópio com a objetiva de 10x. Se a coloração não for suficiente, devolva a lâmina para o corante, agitando-a um pouco ao mergulhá-la na solução, de forma a evitar os cristais sobrenadantes.

Caso o tempo de coloração tenha sido excessivo, é possível *retirar o excesso de corante dos cromossomos e do citoplasma*, até obter um melhor contraste. Para isso, deve-se:

- a) Localizar no microscópio uma célula que esteja excessivamente corada para tomar como controle.
- b) Mergulhar a lâmina em um borel contendo água destilada ligeiramente acidificada (2 a 3 gotas de ácido acético a 45% em 80 ml de água) e movê-la firmemente na horizontal umas 6 ou 8 vezes.

c) Retirar a lâmina do borel, lavar rapidamente com um jato de água destilada, enxugar o verso da lâmina e verificar ao microscópio o efeito na intensidade de coloração. Caso não tenha sido suficiente, repita a operação até obter um contraste ideal. Ao final, lave a lâmina em água destilada, seque e monte como no procedimento normal.

Lâminas recém-montadas que ficaram mal coradas podem também ser recoradas seguindo-se as etapas abaixo:

- i)** Se o meio de montagem não endureceu ainda, pode-se destacar a lamínula, com a ajuda de uma gilete, e mergulhar a lâmina em um borel com xilol (na capela) até que o meio de montagem seja completamente dissolvido. Esse processo, que dura uma hora ou mais, pode ser acelerado agitando-se a lâmina no borel. Se o meio de montagem estiver endurecido, mergulhe o conjunto lâmina e lamínula em xilol e aguarde que o meio se dissolva e a lamínula caia. Em seguida, passe ligeiramente a lâmina em um segundo borel com xilol, para permitir uma completa retirada do meio de montagem, e seque-a com uma bomba de ar.
- ii)** Com a lâmina apoiada horizontalmente, coloque algumas gotas de ácido acético 45% sobre as células por 10-15 minutos, ou mais, *até obter uma completa descoloração*. Em seguida, retire o ácido acético com um jato de água destilada, lavando bem a lâmina.
- iii)** Seque bem a lâmina e recore com uma solução mais concentrada de Giemsa (3-4%), controlando cuidadosamente o tempo de coloração.

2.2.3 - Coloração com hematoxilina a 1%

a) Preparação da lâmina. Todo o procedimento de preparação da lâmina nessa técnica é idêntico ao anterior (itens **2.2.1.a** a **g**), diferindo apenas a partir da coloração.

b) Coloração com hematoxilina. Coloque uma gota de hematoxilina a 1% em cima da mancha de células espalhadas na lâmina e cubra com uma lamínula. A coloração é instantânea e a lâmina pode ser examinada imediatamente.

c) Montagem de lâmina permanente. Para tornar a lâmina permanente, retire a lamínula com um jato de água destilada, seque-a completamente, acrescente uma gota de meio de montagem e cubra-a com uma lamínula limpa.

Atenção:

- ◆ A coloração com hematoxilina pode facilmente ser descorada e recorada com Giemsa ou vice-versa. A hematoxilina é prontamente descorada retirando-se a lamínula e acrescentando-se algumas gotas de HCl 5N em cima da região corada. Em seguida, a lâmina deve ser

lavada com um jato de água destilada, seca e corada normalmente com Giemsa. No caso inverso, para descolorar o Giemsa, usa-se o ácido acético a 45% (item 2.2.2.ii). Depois de seca, a lâmina deve ser corada normalmente com hematoxilina, como no item b.

A Figura 2a mostra uma metáfase e núcleos interfásicos de uma espécie de orquídea corados com a técnica acima. Observe que o citoplasma

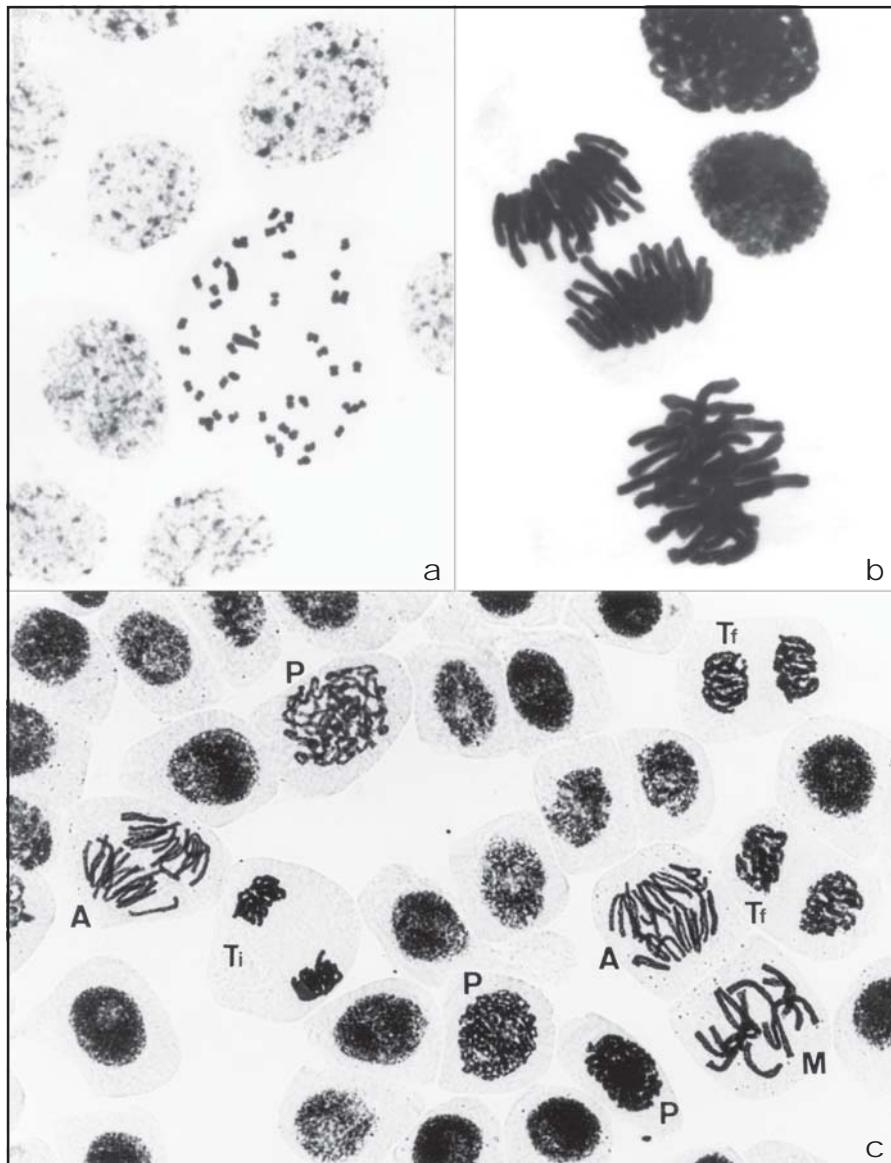


Figura 2 Coloração com hematoxilina (a, b) e com orceína (c). a, Metáfase e núcleos interfásicos de *Pelezia cf. viridis* ($2n=46$). b, c, Células sem pré-tratamento de cebola (b) e *Nothoscordum pulchellum* (c), mostrando diversas fases da mitose. P, prófase; M, metáfase; A, anáfase, Ti, telófase inicial; Tf, telófase final. Fotos: a, Leonardo Felix; b, Guerra, 1999; c, original.

das células não é visível, enquanto os cromossomos são fortemente corados. A presença de um par cromossômico acrocêntrico bem maior que os demais caracteriza esse cariotípico como *bimodal*.

2.3 - Técnicas de coloração seguida de esmagamento

Essas técnicas são mais recomendadas quando não se dispõe de nitrogênio líquido, gelo-seco ou similar. São recomendadas, principalmente, para observar o ciclo mitótico e meiótico em aulas práticas, por serem mais simples e rápidas. Contudo, tanto os ciclos nucleares quanto os cromossomos pré-tratados podem ser observados com qualquer das técnicas descritas a seguir.

2.3.1 - Coloração com hematoxilina acética a 1%

a) Obtenção de raízes. Para análise do ciclo mitótico, coloque um bulbo de cebola em um recipiente com água de torneira, de maneira que o bulbo fique suspenso na borda do recipiente e apenas sua base entre em contato com a água. Antes disso, retire com uma gilete as raízes secas, cortando inclusive parte do eixo da base da cebola (veja item 1.1b).

b) Fixação. Quando as raízes estiverem com um ou dois centímetros de comprimento, retire-as com uma pinça e coloque-as em um frasquinho de vidro com fixador de Carnoy 3:1 por 2 a no máximo 20 horas à temperatura ambiente. Se necessário, estoque as raízes no fixador ou em etanol (item 1.4).

c) Lavagem. Retire as raízes do fixador e mergulhe-as duas vezes em um recipiente com água destilada (5 minutos cada).

d) Hidrólise. Enxugue as raízes rapidamente em papel de filtro e mergulhe-as em HCl 5N à temperatura ambiente por 20 minutos.

e) Lavagem. Lave as raízes novamente, como no item c, sendo dessa vez três lavagens de 5 minutos cada, para retirar completamente o HCl.

f) Coloração. Enxugue ligeiramente as raízes em um papel filtro e as transfira para um recipiente pequeno e com tampa, como um tubo de Eppendorf ou, de preferência, uma caixinha de guardar lentes de contato com tampa de rosca. Logo em seguida, acrescente duas ou três gotas de hematoxilina a 1% e mantenha o recipiente fechado por 30 minutos à temperatura ambiente.

g) Preparação da lâmina. Transfira uma raiz para a lâmina e acrescente uma gota de ácido acético a 45%. Retire a coifa e as capas mais externas da raiz, procurando deixar apenas o meristema. Corte o tecido restante em pedaços tão pequenos quanto possível. Cubra com uma lamínula e *bata cuidadosamente* com uma agulha de ponta rombuda diretamente sobre os

fragmentos de meristema. Verifique ao microscópio se as células estão realmente bem espalhadas. Se o espalhamento estiver bom, esmague o material colocando o conjunto lâmina-lamínula em um papel filtro dobrado, pressionando com *cuidado para não permitir que a lamínula deslize*.

h) Controle da lâmina. Verifique no microscópio a qualidade final da lâmina. Lute as melhores lâminas passando esmalte de unha na borda da lamínula e as analise em seguida. A coloração pode se manter em bom estado por um ou dois dias, se estiver bem lutada.

Atenção:

- ◆ Há vários aspectos muito importantes na hidrólise e na preparação da lâmina que são comuns a outras técnicas e se encontram descritos com mais detalhes nos itens **2.2.1.e** e **f.**. Confira esses itens.

A *Figura 2b* mostra células de cebola, sem pré-tratamento, coradas com a técnica acima. Observe que os núcleos e os cromossomos estão fortemente corados enquanto o citoplasma é quase imperceptível.

2.3.2 - Coloração com orceína acética a 2%

a) Obtenção e fixação das raízes. Proceda como nos itens **a** e **b** da técnica anterior para obter e fixar raízes.

b) Coloração. Retire as raízes do fixador, enxugue-as ligeiramente em papel de filtro e coloque-as em um tubo de ensaio com orceína acética a 2%. Acrescente uma gota de HCl 1N para cada nove de orceína (ou cerca de 10% do volume de corante) e agite. Aqueça o tubo (*aberto*) na chama de uma lamparina a álcool até que o corante comece a borbulhar. Retire o tubo rapidamente da chama e deixe o material esfriar no corante por 20-30 minutos, mantendo o tubo fechado.

Atenção:

- ◆ Observe que nessa técnica não há necessidade de lavar as raízes antes de corar.
- ◆ Use apenas uma quantidade de orceína suficiente para cobrir todas as raízes.
- ◆ Quando aquecido na chama, o corante pode ferver bruscamente e expulsar violentamente todo o conteúdo do tubo. Por essa razão, durante o aquecimento, deve-se manter a boca do tubo voltada para a parede, de preferência azulejada.

c) Preparação da lâmina. Coloque uma raiz numa lâmina limpa, seccione a porção apical da raiz e elimine o restante do material. Tente deixar apenas o meristema da raiz, eliminando as capas de tecidos mais externos. Com a ajuda de agulhas, fragmente o meristema em pedaços menores, tendo *cuidado para o tecido não ressecar na lâmina* enquanto o manuseia. Acrescente uma gota de corante não aquecido e cubra com uma

lamínula limpa. Bata levemente com uma agulha de ponta rombuda por cima da lamínula, diretamente sobre o material, até espalhar bem as células de cada fragmento. Controle ao microscópio o espalhamento das células. Pressione a lamínula contra a lâmina, dentro de uma folha dobrada de papel filtro (veja mais detalhes no item 2.2.1.f). Observe ao microscópio e lute com esmalte de unha, se necessário.

A Figura 2c ilustra essa coloração em células de *Nothoscordum pulchellum* (aliácea), sem pré-tratamento. Observe que o citoplasma, embora fracamente corado, é mais visível que nas técnicas anteriores. A foto ilustra também as várias etapas do ciclo mitótico.

2.3.3 - Preparação de lâminas permanentes com corantes acéticos

a) Congele a lâmina-lamínula no gelo-seco ou nitrogênio líquido por alguns minutos e, com o auxílio de uma gilete ou um bisturi, retire rapidamente a lamínula.

b) Transfira a lâmina para um borel com etanol absoluto por cerca de 1 minuto.

c) Transfira para outro borel com etanol absoluto, pelo mesmo tempo.

d) Mergulhe a lâmina rapidamente em um borel com xilol puro. Observe que todo trabalho com xilol deve ser feito em uma capela.

e) Com a lâmina ainda molhada de xilol coloque uma gota de Entellan, ou outro meio de montagem, e cubra com uma lamínula limpa. Mantenha a lâmina deitada até o meio secar (cerca de 24 h).

Atenção:

- ◆ No caso de preparações para meiose, a retirada da lamínula em nitrogênio líquido freqüentemente provoca rachaduras nas células e por essa razão é preferível analisar e fotografar as células antes.
- ◆ Caso não disponha de nitrogênio líquido ou gelo seco, mergulhe a lâmina corada num borel com ácido acético 20% até a lamínula cair. Se tiver ficado muito material na lamínula, faça com a lamínula uma segunda lâmina permanente.
- ◆ Em geral, as preparações com corantes acéticos (carmim, hematoxilina, orceína) apresentam melhor contraste antes de serem tornadas permanentes. A coloração da lâmina fresca pode se manter estável por poucos dias. Se as lamínulas forem bem lutadas e mantidas na geladeira, podem ser conservadas por uma semana ou mais, embora o contraste seja inferior ao dos primeiros dias.

2.3.4 - Coloração Feulgen

- a) **Pré-tratamento.** Colete e pré-trate as raízes como no item 2.2.1.a.

b) Fixação. Transfira as raízes para o fixador de Carnoy 3:1 por 2 a 20 horas à temperatura ambiente.

c) Lavagem. Lave as raízes, mergulhando-as duas vezes em água destilada (5 minutos cada).

d) Hidrólise. Enxugue as raízes rapidamente em papel de filtro e mergulhe-as em HCl 5N à temperatura ambiente por 20 minutos. No caso de espécies com raízes muito duras, como as de gramíneas, é preferível fazer primeiro uma digestão enzimática (veja item 4.1) e em seguida a hidrólise.

e) Coloração. Mergulhe as pontas de raízes no reativo de Schiff em um vidro tampado e protegido da luz por 1 a 2 horas (até ficarem bem coradas). Após a coloração, transfira as raízes para um vidro com água sulfurada por 10 minutos e repita essa operação mais duas vezes. Ao final, transfira as raízes para a água destilada enquanto prepara as lâminas.

Atenção:

- ◆ Observe que a ponta da raiz fica mais corada que o lado cortado. Isso se deve ao menor volume do citoplasma das células do meristema, aumentando, assim, a densidade de núcleos corados nessa região.

f) Preparação da lâmina. Transfira uma ponta de raiz para a lâmina. Retire o excesso de água com papel filtro e acrescente uma gota de ácido acético a 45%. Com o auxílio de agulhas e de um estereomicroscópio, retire a coifa e as capas mais externas da raiz, procurando deixar apenas o meristema. Corte o tecido em pedaços tão pequenos quanto possível. Cubra com uma lamínula e bata cuidadosamente, com uma agulha de ponta rombuda, diretamente em cima dos fragmentos do meristema até que cada um deles se transforme numa pequena mancha de células espalhadas. Em seguida, esmague o material colocando o conjunto lâmina-lamínula em um papel filtro dobrado, pressionando firme e cuidadosamente para não permitir nenhum deslize da lamínula sobre a lâmina. A lâmina pode ser analisada imediatamente ou lutada e conservada na geladeira por um ou dois dias.

Atenção:

- ◆ Durante a preparação, a gota de ácido acético 45% colocada no início dessa etapa, utilizada para facilitar o espalhamento das células, pode ser substituída por uma gota de carmim ou orceína acética. Esse procedimento é amplamente empregado (exceto quando o objetivo é medir a quantidade de DNA) por intensificar a coloração cromossômica, corando apenas levemente o citoplasma. Em células com cromossomos grandes, como na *Figura 3a*, esse reforço na coloração é dispensável.

g) Montagem de lâmina permanente. Congele a lâmina-lamínula

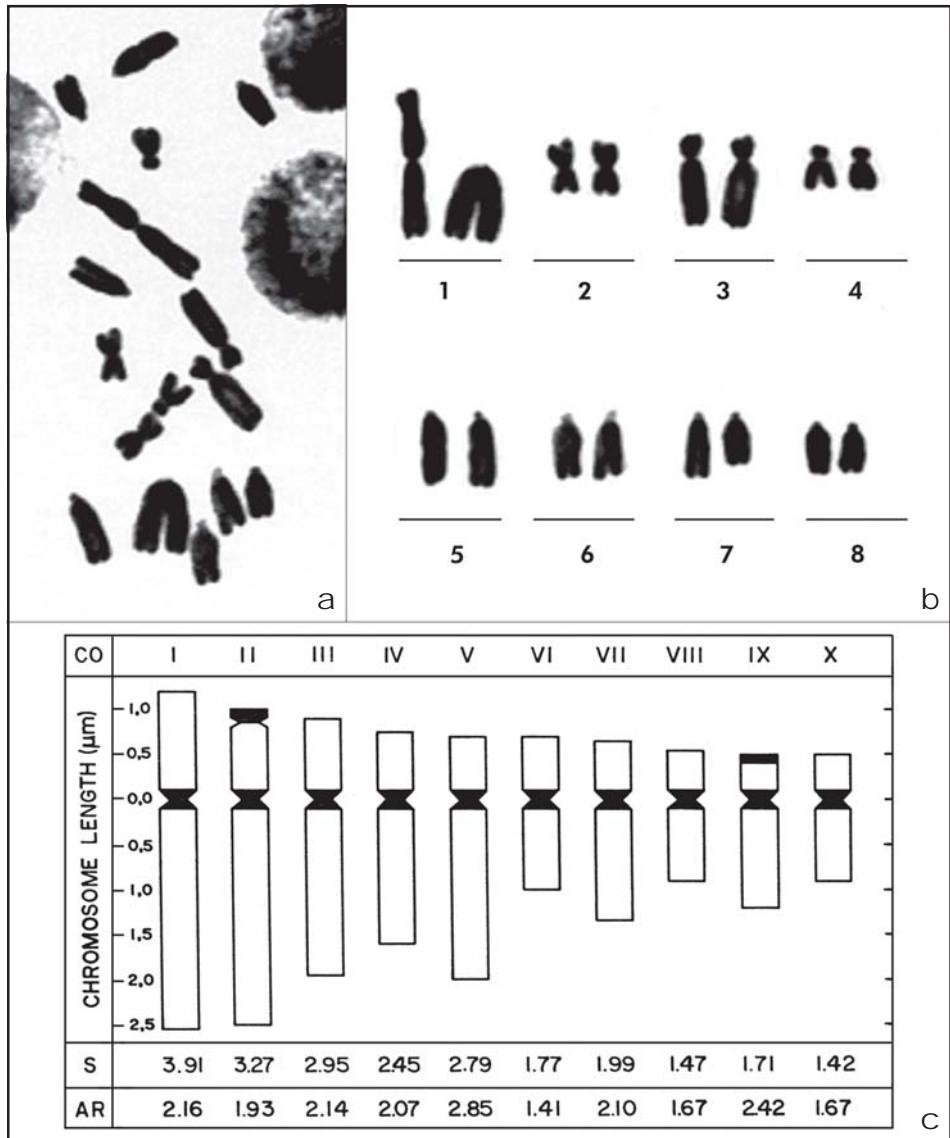


Figura 3 Representação do cariótipo através de cariograma (**a, b**) e idiograma (**c**). **a, b** Metáfase e cariograma de *Alstroemeria* sp. **c**, Idiograma de *Emilia fosbergii*, com a localização das bandas C. Fotos em **a** e **b** foram digitalizadas e o cariograma montado pelo programa Qwin da Leica. Fotos: **a, b**, Leonardo Felix e Nataniel Melo; **c**, Guerra e Nogueira, 1990.

no nitrogênio líquido ou gelo-seco por alguns minutos e com o auxílio de uma gilete ou de um bisturi, *retire rapidamente a lamínula* e deixe a lâmina secar ao ar. Em seguida, acrescente uma gota de meio de montagem e cubra com uma lamínula. Veja mais detalhes sobre a preparação e montagem da lâmina nos itens **2.2.1.f e g**.

Atenção:

- ◆ Para medição da quantidade de DNA, o procedimento para coloração Feulgen exige alguns cuidados a mais, principalmente na fixação, que pode ser realizada em Carnoy 3:1 ou formaldeído, dependendo do material (veja detalhes em Greilhuber, 1988; Greilhubert e Ebert, 1994).

2.4 – Representação do cariótipo na forma de cariograma ou idiograma

2.4.1 – Construção de um cariograma

a) Seleccione a melhor foto do material, considerando os seguintes parâmetros: 1) célula completa, bem focada e contrastada; 2) cromossomos sem superposição ou com o menor número possível delas; 3) constrições primárias (centrómeros) e secundárias visíveis; 4) cromossomos sem distorções mecânicas causadas pelo esmagamento.

b) Se a célula tiver uma diferenciação na morfologia e tamanho cromossômicos bastante evidente e não apresentar superposição de cromossomos, basta uma cópia fotográfica para recortar e montar o cariograma.

c) Pelo contrário, se a célula contiver cromossomos bem espalhados e diferenciados mas com superposições, serão necessárias ao menos duas cópias fotográficas, de maneira a permitir recortar cada um dos cromossomos superpostos de uma cópia diferente.

d) Para células que apresentem muitos cromossomos, é preferível ter ao menos duas cópias. Uma delas servirá para identificar e anotar (em cima da própria foto, com tinta removível) os prováveis pares cromossômicos, começando pelos mais evidentes. A segunda cópia será utilizada para recortar os cromossomos e montar o cariograma. A tentativa de identificar os pares cromossômicos na célula, antes de começar a recortá-los, ajuda na identificação correta dos pares por permitir uma melhor comparação de cada cromossomo com todos os demais do complemento. Ainda assim, alguns pares precisarão ser reordenados na montagem do cariograma.

e) Para a montagem do cariograma os cromossomos poderão ser organizados de diferentes maneiras. Mais freqüentemente, os pares são alinhados pelos centrómeros, dispondo-se os braços curtos para cima e numerando-se os pares cromossômicos por ordem decrescente do maior para o menor braço curto. Dessa maneira, a silhueta superior do cariograma apresenta-se como uma escada decrescente, facilitando a visualização da variação na morfologia cromossônica.

f) É importante apresentar uma escala (barra com equivalência em micrômetros) para que se possa estimar o tamanho real dos cromossomos.

Uma cópia da metáfase inteira pode também ser apresentada junto com o cariograma, comprovando que os cromossomos pertencem a uma única célula (*Figuras 3a, e b*).

2.4.2 – Construção de um idiograma

- a)** Selecione e fotografe cinco a dez metáfases completas, sem distorções mecânicas, e que permitam visualizar bem os centrômeros e as extremidades dos cromossomos.
- b)** Coloque o filme negativo de cada uma das metáfases em uma ampliadora fotográfica (ou um projetor de eslaides), projete a imagem em uma folha de papel branco e desenhe os contornos de cada cromossomo. Desenhe todas as células na mesma ampliação.
- c)** Retire o negativo da metáfase e coloque o negativo de uma escala micrométrica fotografada na mesma ampliação que os cromossomos. Desenhe no mesmo papel, uma linha reta entre dois intervalos consecutivos da escala. A escala deve indicar a quantos micrômetros corresponde um milímetro na figura ampliada, sendo válida para todos os desenhos.
- d)** Após desenhar todas as células na mesma ampliação, meça o comprimento de cada braço cromossômico e dos satélites, utilizando uma régua milimetrada comum. Numere todos os cromossomos arbitrariamente, de maneira a lhe permitir identificar cada um deles.
- e)** Em uma outra folha de papel , construa uma tabela com quatro colunas, como exemplificado a seguir. A primeira, apresenta os números de 1 ao equivalente ao número $2n$ daquela espécie. A segunda, apresenta os tamanhos do braço curto, braço longo e comprimento total para cada um dos cromossomos. Nessa coluna, o cromossomo que aparece na nona linha, por exemplo, correspondente na coluna anterior ao número 9 e contém os dados do cromossomo anotado no seu desenho como 9, embora não necessariamente seja o nono maior cromossomo. A terceira coluna apresenta os mesmos valores da segunda, porém ordenados em pares pela similaridade de tamanho e morfologia cromossômica. Nessa coluna, o maior cromossomo será colocado na linha 1, o segundo maior na linha 2, etc. À direita desses valores, coloque, entre parênteses, o número que cada cromossomo apresentava na coluna anterior, de maneira a permitir o reconhecimento daquele cromossomo no desenho a qualquer momento. A quarta coluna apresenta os tamanhos médios desses pares para o braço curto, o braço longo e o comprimento total.
- f)** Cromossomos com satélites têm o tamanho do satélite medido e apresentado separadamente, como um terceiro segmento cromossômico. Contudo, na determinação do tamanho do braço cromossômico ao qual o satélite se encontra ligado, o tamanho do satélite é acrescido ao do restante do braço. Na representação esquemática final do idiograma, o satélite

deve aparecer separado do restante do braço cromossômico por uma constrição ou um pequeno intervalo.

Número do cromossomo no desenho	Braço curto + braço longo = total	Cromossomos ordenados do maior para o menor	Média dos pares de cromossomos
1		()	
2		()	
3		()	
4		()	
5		()	
6		()	

g) Após construir uma tabela para cada metáfase, reúna em uma outra tabela os valores médios dos pares cromossônicos, como mostrado abaixo.

Pares cromossômicos	Metáfase 1	Metáfase 2, etc	Valores médios em milímetros	Tamanhos médios (convertidos para micrômetros)
1				
2				
3				

h) Na última coluna da tabela acima, converta os tamanhos ampliados de cada par cromossômico, de milímetros para valores reais em micrômetros. Para isso, compare o tamanho da escala micrométrica com o tamanho dos braços cromossômicos, utilizando uma “regra de três”.

i) Os valores médios para cada par cromossômico podem também ser seguidos do desvio padrão de cada média, indicando a variação das medidas obtidas.

j) Os valores em milímetros podem ser utilizados para construir uma representação esquemática desses dados.

A *Figura 3c* mostra uma das maneiras possíveis de apresentar um idiograma. Nesse caso, além da representação esquemática do complemento haplóide, os valores obtidos para tamanho (S) e proporção entre braços (AR), para cada cromossomo dessa espécie (*Emilia fosbergii*), estão claramente indicados (veja uma célula metafásica correspondente a esse idiograma na *Figura 8b*). Havendo heteromorfismo cromossômico para esses parâmetros, em todos os indivíduos analisados, as duas formas encontradas devem ser apresentadas no idiograma. Os cromossomos na Figura 3c estão ordenados pelo tamanho do braço curto, do maior para o menor.

3 - Como analisar cromossomos meióticos

A análise convencional de cromossomos meióticos é feita praticamente da mesma maneira que a análise mitótica. A coloração classicamente mais utilizada é a coloração com carmim acético seguida de esmagamento, embora para cromossomos pequenos, as técnicas de esmagamento seguido de coloração permitam melhor espalhamento e contraste e sejam, por isso, mais recomendadas. As técnicas utilizadas para análise meiótica permitem também observar a *primeira divisão mitótica dos grãos-de-pólen*. Nesse último caso, deve-se utilizar preferencialmente a coloração com hematoxilina ou com carmim. A coloração com Giemsa não é muito recomendada para esse fim porque cora a exina do pólen, necessitando, portanto, estourar os grãos de pólen.

A análise das fases da meiose, e especialmente a interpretação dos bivalentes, não é muito fácil em espécies com cromossomos pequenos. Por isso, é fortemente recomendado adquirir alguma experiência inicial com espécies que apresentem cromossomos grandes e pouco numerosos. Entre essas espécies, destacamos o centeio com $n=7$, as espécies de *Allium* (cebola, alho) com $n=8$ e as espécies diplóides de *Nothoscordum* (alho de cheiro) com $n=5$. O milho ($n=10$), o maracujá ($n=9$), o tomate e a jurubeba (*Solanum*), com $n=12$, embora tenham cromossomos bem menores, são materiais fáceis de coletar e também permitem uma análise satisfatória das fases da meiose.

Da mesma maneira que na análise mitótica, as técnicas de análise meiótica podem ser divididas em dois grupos. As *técnicas de coloração seguida de esmagamento* são mais simples e rápidas, enquanto as de *esmagamento seguido de coloração* são um pouco mais demoradas, mas resultam em lâminas permanentes, cromossomos sempre em um mesmo plano focal e coloração, geralmente, mais contrastada, sendo por isso mais recomendadas para a rotina de pesquisa. Ambas as técnicas possuem uma série de detalhes comuns na coleta, fixação e seleção dos botões, descritos no item abaixo.

3.1 - Observações gerais para a preparação das lâminas

a) Coleta de material. Colete botões florais com tamanhos próximos à metade do tamanho do botão na antese. Se possível, antes de iniciar a fixação, retire uma das anteras de um desses botões, coloque em uma lâmina com uma gota de ácido acético a 45%, dilacere a antera, cubra com uma lamínula e verifique no microscópio, com o condensador abaixado, se já tem grãos de pólen. Em caso positivo, eliminate os botões maiores que esse. Para estabelecer um tamanho mínimo a ser coletado, localize, da mesma maneira, um botão bem menor que esse que não apresente pólen nem meiócitos. Definidos os limites, procure fixar o maior número possível de botões.

b) Fixação. Fixe os botões em álcool-ácido acético 3:1 por 2 a 20

horas e estoque no freezer ou transfira o material para etanol 70% e estoque na geladeira.

Atenção:

- ◆ Uma boa fixação dos meiócitos é fundamental para a posterior análise dos cromossomos e exige bastante atenção. A fixação dos meiócitos é dificultada pela presença de sépalas e pétalas que protegem as anteras e formam uma barreira à penetração do fixador no seu interior. No caso de *Nothoscordum* e de algumas outras plantas, quando as anteras estão em meiose, as pétalas ou tépalas são ainda muito mal desenvolvidas e as anteras ficam bastante expostas, facilitando a fixação. Nesse caso, basta remover as brácteas e outras estruturas que protegem a inflorescência, retirar os botões mais velhos e mergulhar a inflorescência no fixador. Na maioria das espécies, no entanto, é necessário remover ou afastar as sépalas e pétalas, de forma a permitir uma fixação rápida e eficiente dos meiócitos. Em algumas espécies, como em ciperáceas e orquídeas, é preferível remover as anteras e fixá-las em um pequeno frasco ou tubo de Eppendorf. Esses procedimentos precisam ser feitos na lupa, demandando mais tempo, mas sempre produzem resultados de mais alta qualidade.
- ◆ Quando não houver condições de proceder a uma dissecção cuidadosa, deve-se ao menos fazer um corte longitudinal no botão, com uma gilete, partindo da base para o ápice. Uma pequena compressão do eixo maior de cada metade do botão ajuda a relaxar um pouco a estrutura interna do botão, facilitando a penetração do fixador.
- ◆ Lembre-se de colocar cinco a dez vezes mais fixador que material a ser fixado em cada frasco. Enquanto está colocando os botões ou anteras no fixador, agite regularmente o frasco com fixador para garantir que os líquidos dos tecidos sejam realmente substituídos pelo fixador. Em casos mais críticos, mude o fixador após os primeiros 10 a 15 minutos. Caso demore mais de 20 minutos dissecando ou cortando os botões, feche o frasco com os botões já fixados, faça um novo fixador e continue a fixação.

c) Seleção do botão floral adequado e preparação da lâmina.

Coloque em uma lâmina cinco ou seis botões, alinhados por ordem de tamanho, mantendo todos bem umedecidos. Afaste um dos botões e, com a ajuda de uma lupa, retire uma das anteras. Coloque a antera em outra lâmina com uma gota de ácido acético a 45%. Com uma agulha de seringa, corte a antera transversalmente e bata em cima das duas metades de forma que os meiócitos sejam liberados da antera. Verifique no microscópio o estágio exato do botão floral. Para isso, abaixe o condensador do microscópio e utilize a objetiva de 5x ou de 10x (*certifique-se de que a objetiva não tem possibilidade de encostar no material*). Se a meiose já tiver sido concluída, os grãos de pôlen aparecerão soltos e em grande número na lâmina. Isso pode ser visto ao microscópio com a objetiva de menor aumento, ainda antes de cobrir o material com a lamínula. Nesse caso, limpe a lâmina e tente a antera de outro botão mais jovem. Anteras em

estágios pré-meióticos não liberam imediatamente o seu conteúdo e podem também ser facilmente reconhecidas. Anteras em meiose são prontamente reconhecidas pelo grande número de meiócitos, que são células maiores que as demais (em algumas espécies as células do tapete podem ser ainda maiores), arredondadas e envoltas por uma capa refringente, formada pela parede de calose (ausente nas células do tapete). Em caso de dúvida, ou caso haja meiócitos em estágio apropriado, retire os restos de parede da antera deixando apenas os meiócitos, cubra com uma lâminula e analise ao microscópio. Ao final, esmague cuidadosamente a preparação com a ajuda de folhas de papel de filtro e analise novamente.

Atenção:

- ◆ Dentro de uma antera, o desenvolvimento meiótico é geralmente sincrônico, mesmo em espécies com anteras grandes. As anteras de um mesmo botão têm também desenvolvimento mais ou menos sincrônico, podendo conter fases distintas da meiose. Entretanto, se ocorrer pólen, ou estágios pré-meióticos, será impossível encontrar células em meiose no mesmo botão, exceto em botões com grande número de estames (cactáceas, p. ex.) e em espécies com flores heterodinâmicas (flores com dois ou mais conjuntos de estames de tamanhos diferentes, ex. *Crotalaria*).
- ◆ A localização da antera no estágio correto pode exigir muitas tentativas e por isso é necessário *organizar essa etapa de forma a permitir analisar um grande número de botões num mínimo de tempo*. Com prática em uma determinada espécie, no entanto, é possível reconhecer o botão adequado pelo seu tamanho ou pelo aspecto geral das anteras.

A *Figura 4a* mostra uma meiose sincrônica, em uma espécie de orquídea. A *Figura 4b* mostra meiócitos de uma única antera de *Psittacanthus* sp (lorantácea), com diferentes fases do ciclo meiótico. Observe que as células aparecem sempre envoltas na capa de calose. Essas células foram apenas hidrolisadas com HCl 5N, mas não foram coradas nem esmagadas, deixando os cromossomos mais contrastados e a parede de calose inteira. Observe a presença de uma ponte anafásica em uma célula em final de anáfase II.

3.2 - Técnicas de coloração seguida de esmagamento

3.2.1 - Coloração com carmim acético a 2%

- a) **Coleta e fixação de botões.** Como descrito nos itens **3.1.a e b.**
- b) **Seleção de botões, coloração e preparação das lâminas.** A seleção dos botões deve ser feita como no item **3.1.c**. Quando transferir uma antera para outra lâmina, coloque uma gota de carmim a 2%, ao invés do ácido acético a 45%. O restante do procedimento é igual, apenas a análise ao microscópio não precisa ser feita com o condensador abaixado, uma vez que o material já deve estar corado.

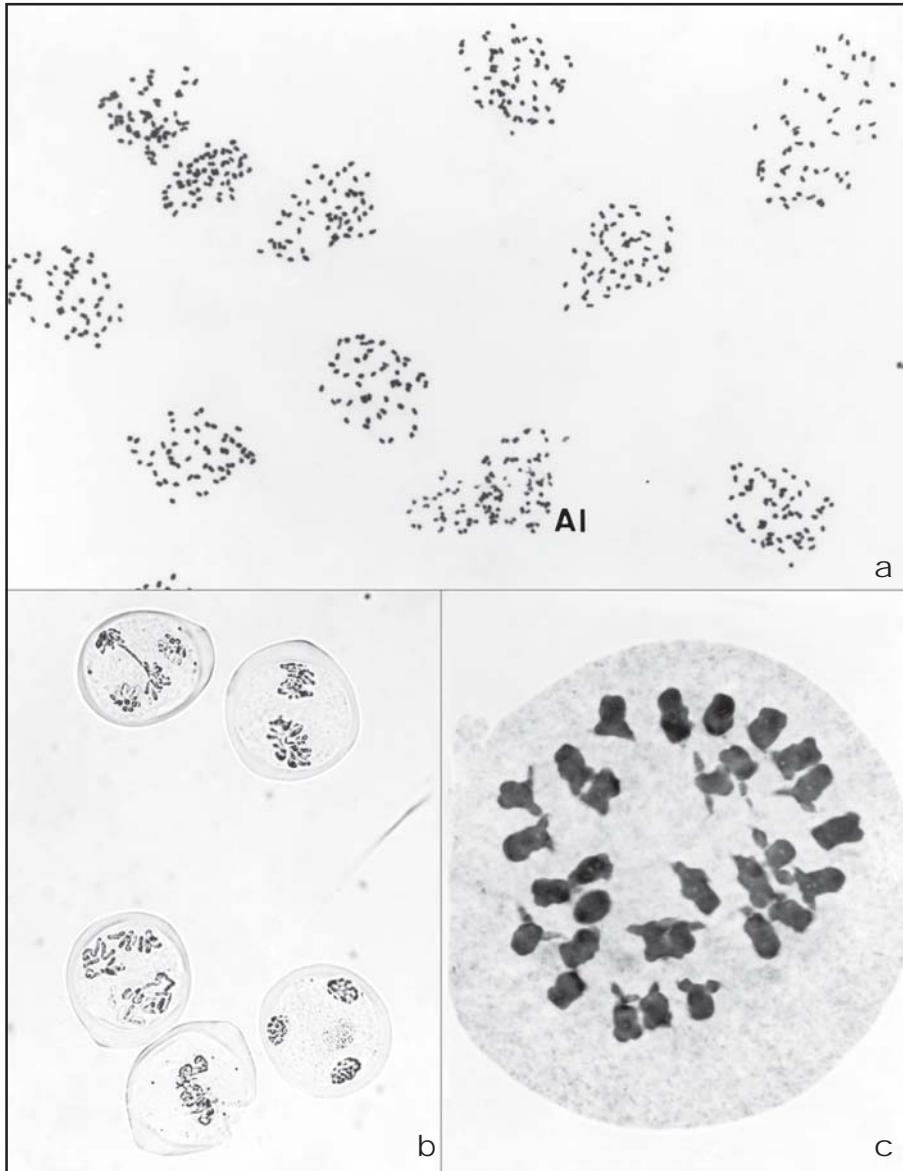


Figura 04 Observação da meiose. **a**, Células de *Oncidium varicosum* ($n=56$), todas em metáfase I, exceto uma única célula (AI) que iniciou a anáfase I. Coloração com hematoxilina. **b**, Meiócitos de *Psittacanthus* sp sem corante, apenas hidrolisados com HCl 5N e observados ao microscópio com o condensador abaixado. **c**, Metáfase I de uma pteridófita, *Acrostichum aureum* ($n=30$), corada com carmim. Fotos: **a**, Leonardo Felix; **b**, original; **c**, Adriana Marcon.

Atenção:

- ◆ Alguns autores recomendam o uso de agulhas de ferro nessa etapa da técnica, ao invés de agulhas inoxidáveis. Nesse caso, enquanto os meiócitos estiverem no corante, a agulha de ferro ajuda a oxidar mais o corante e intensificar a coloração dos cromossomos. Bons resultados

podem também ser obtidos aquecendo-se inicialmente os botões fixados em um tubo de ensaio com o carmim, como na técnica descrita anteriormente para coloração de mitose de raiz com orceína.

◆ Se o citoplasma estiver muito corado, *aqueça levemente a lâmina* numa chama até clarear o citoplasma. Esse aquecimento ajudará também na dilatação da célula e no espalhamento dos cromossomos.

c) Conservação da lâmina. A lâmina corada com carmim deve ser lutada e analisada dentro de um ou poucos dias. Caso queira torná-la permanente, siga o roteiro descrito no item **2.3.3**.

A Figura 4c mostra uma metáfase I de uma pteridófita (*Acrostichum aureum*), fotografada em uma lâmina recém-preparada. Observe que o citoplasma é claramente observado, o que não ocorre na Figura 4a.

3.2.2 - Coloração com hematoxilina acética a 1%

a) Coleta e fixação de botões. Como descrito nos itens **3.1.a e b**.

b) Lavagem. Lave os botões mergulhando-os duas vezes em água destilada (5 minutos cada).

c) Hidrólise. Retire os botões da água, enxugue-os rapidamente em papel-filtro e mergulhe-os em HCl 5N à temperatura ambiente por *apenas 5 a 10 minutos*.

d) Lavagem. Lave novamente os botões em água destilada (duas vezes, 5 minutos cada), com cuidado para não perder o material (se a hidrólise for excessiva, o material pode ficar demasiadamente macio e frágil).

e) Coloração. Transfira o material para um pequeno recipiente (placas de Petri bem pequenas, ou mesmo um vidro de relógio), acrescente uma ou mais gotas de hematoxilina acética a 1%, de forma que todos os botões fiquem imersos, e cubra para não evaporar. Mantenha o material no corante por 30 minutos à temperatura ambiente.

f) Preparação da lâmina. Transfira um dos botões para uma lâmina, acrescente uma gota do corante e destaque uma das anteras. Transfira essa antera para outra lâmina com uma gota de corante, corte-a transversalmente e procure liberar o conteúdo da antera. Retire os restos de parede de antera, cubra com uma lamínula e observe ao microscópio. Se houver meiócitos, esmague cuidadosamente a preparação. Maiores detalhes são descritos no item **3.1.c**.

g) Conservação da lâmina. Se a lâmina estiver boa, ela poderá ser lutada com esmalte de unha, para análise dentro de um ou dois dias, ou tornada permanente. Nesse último caso, siga exatamente o procedimento descrito no item **2.3.3**.

A Figura 5a mostra uma célula de *Nothoscordum cf pulchellum* em final de diplóteno, corada com essa técnica. Nesse caso, o tempo de hidrólise foi encurtado para permitir a visualização do nucléolo (associado a uma constrição secundária terminal).

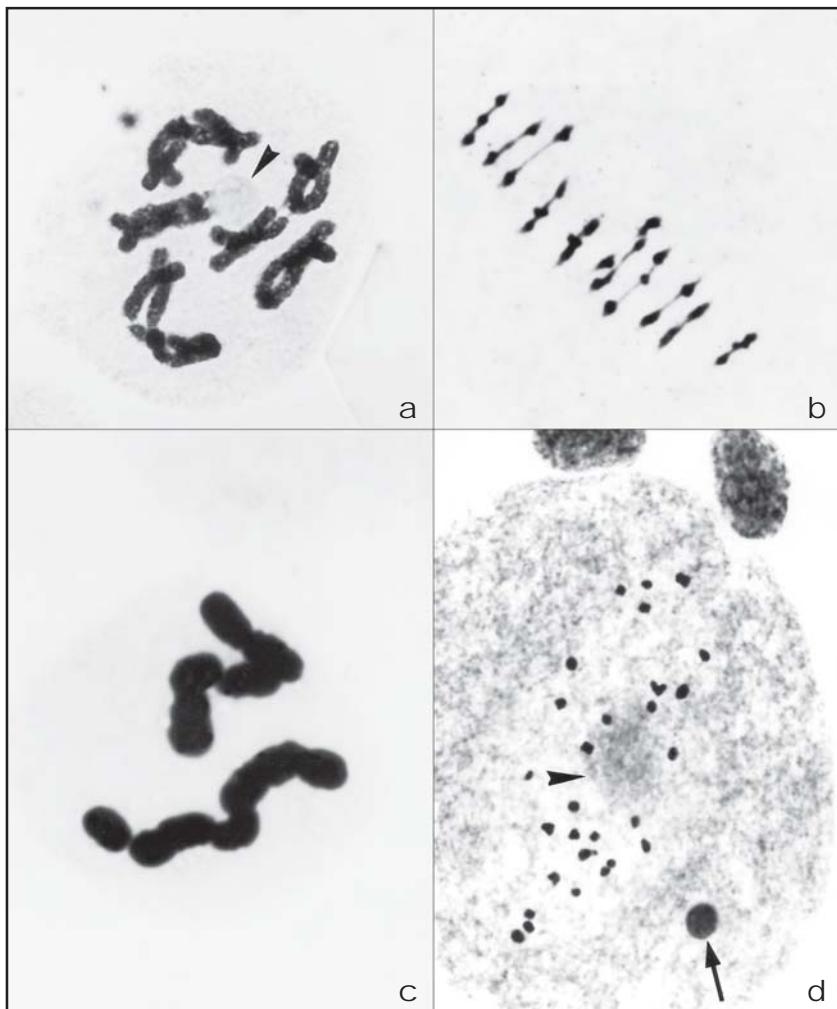


Figura 05 Observação da meioses. **a**, Final de diplóteno de *Nothoscordum pulchellum* ($n=5$) corado com hematoxilina. **b**, Metáfase I de *Vigna unguiculata* ($n=11$) corada com Giemsa. **c**, Metáfase I de *Rhoeo spathacea* ($n=6$), corada com Giemsa, mostrando uma cadeia de 7 e outra de 5 cromossomos. **d**, Metáfase I e núcleos interfásicos de uma alga vermelha, *Laurencia* sp. ($n=29$), corados com hematoxilina acética a 4%. Cabeças de setas em **a** e **d** apontam nucléolo; seta em **d** indica a região de conexão com a célula vizinha. Fotos: **a**, Guerra, 1999; **b**, Reginaldo de Carvalho; **c**, original; **d**, Fujii e Guerra, 1998.

3.3 - Técnica de esmagamento seguido de coloração

3.3.1 - Coloração com Giemsa

a) Coleta, fixação, lavagem, hidrólise, seleção do botão e

preparação da lâmina. Como descrito na técnica anterior (veja também os itens **3.1.a, b e c**). A única diferença é que na coloração com Giemsa não há necessidade de uma lavagem após a hidrólise, como indicado na técnica anterior. Nesse caso, após a hidrólise transfira os botões para um recipiente com água destilada e inicie o procedimento de seleção do botão adequado.

b) Coloração com Giemsa. Após a preparação da lâmina, a lamínula deve ser retirada em nitrogênio líquido e secada ao ar. A coloração com Giemsa a 2% pode ser feita mergulhando a lâmina na solução corante, como descrita na técnica **2.2.1.h** para células de raiz. O tempo de coloração depende do material analisado, variando em geral de 5 a 20 minutos. Após a coloração, deixe a lâmina secar completamente e monte em Entellan ou similar.

Atenção:

- ◆ Se a coloração com Giemsa resultar excessiva, descore um pouco a lâmina mergulhando-a em água acidificada (veja item **2.2.2**).
- ◆ Devido principalmente a problemas na fixação, o citoplasma dos meiócitos pode corar com o Giemsa. Se a coloração do citoplasma não for muito intensa, a descoloração indicada acima é suficiente para resolver o problema. Entretanto, se o citoplasma corar fortemente (geralmente em fixações feitas em campo) é preferível descorar a lâmina e corar novamente com hematoxilina ou carmim, que reagem menos com o citoplasma.
- ◆ A retirada da lamínula no nitrogênio líquido, devido ao congelamento excessivo, freqüentemente racha os meiócitos estragando a preparação. Por essa razão, é recomendado ao invés de mergulhar a lâmina diretamente no nitrogênio líquido, mantê-la suspensa na câmara fria acima da superfície do nitrogênio, ou usar gelo seco, que é menos frio.

As Figuras 5b e c mostram metáfases I com cromossomos pequenos (b) e grandes (c) corados com Giemsa. Os cromossomos da comelinácea *Rhoeo spathacea* (5c) apresentam um complexo de translocação, formando geralmente um anel de 12 cromossomos. Nessa célula, no entanto, dois quiasmas não se formaram, resultando em uma cadeia de sete cromossomos e uma menor com cinco.

3.3.2 - Coloração com hematoxilina acética a 1%

a) Coleta, fixação, lavagem, hidrólise e preparação da lâmina como descrito na técnica anterior.

b) Coloração com hematoxilina. Após retirar a lamínula no nitrogênio líquido e deixar a lâmina secar, coloque uma gota de hematoxilina acética a 1% em cima das células na lâmina, cubra com uma lamínula e analise ao microscópio. Para tornar a lâmina permanente, retire a lamínula com um jato de água, seque a lâmina e monte em Entellan ou similar.

Atenção:

- ◆ Se houver interesse em observar o nucléolo, a etapa da hidrólise deve ser excluída ou realizada em HCl 1N por cerca de 3 a 5 minutos. Nesse caso, entretanto, o citoplasma poderá ficar um pouco mais corado.
- ◆ A coloração com hematoxilina pode facilmente ser descolorada e recolorada com Giemsa ou vice-versa (item **2.2.3**).
- ◆ Para análise da mitose pós-meiótica, é preferível analisar os micrósporos antes de tornar a lâmina permanente.
- ◆ Nessa técnica é possível corar com carmim acético ao invés de hematoxilina, principalmente se os cromossomos não forem pequenos. A coloração com carmim, no entanto, é menos intensa.

A *Figura 4a*, mostra células de *Oncidium varicosum*, em meiose I, coradas com hematoxilina a 1%. Na *Figura 5d*, observa-se uma metáfase I de uma alga vermelha, do gênero *Laurencia*, na qual o nucléolo persiste durante todo o ciclo meiótico. Para revelar o nucléolo e evidenciar melhor os pequenos cromossomos, a célula foi corada com hematoxilina a 4%. O disco escuro, bem corado, abaixo dos cromossomos, corresponde a uma estrutura da parede celular dessas algas que liga células vizinhas.

3.4 - Análise de células do tapete e da mitose polínica

Quando se analisa a meiose na antera, é possível observar dois outros tipos de células da antera em divisão: as células do tapete e a mitose polínica.

O tapete é formado por uma camada de células grandes, com paredes celulares geralmente finas, que envolve a massa de meiócitos. Em alguns casos, como na maioria das aráceas, a parede das células do tapete desaparece, formando uma única grande massa de citoplasma e núcleos. As células do tapete são geralmente *binucleadas* (raramente *mononucleadas* ou *multinucleadas*), ficando os núcleos bem próximos um do outro, ou mesmo parcialmente fusionados (*Figura 6a*). No estágio de zigóteno a paquíteno, é frequente se observar essas células em prófase ou prometáfase. Nesse estágio, cada núcleo do tapete é diplóide, mas posteriormente todos se tornam poliplóides (*Figura 6b*) devido à ocorrência de *ciclos endomitóticos*. Em alguns grupos de plantas, como em várias espécies do gênero *Vigna*, ao invés de formarem núcleos poliplóides, esses ciclos resultam na formação de *núcleos politénicos* (*Figura 6c*). O tapete tem a função de nutrir o meiócito e ajudar na formação do grão de pólen, degenerando logo após a formação desse. Essas células são facilmente visíveis com qualquer técnica de coloração cromossômica.

Logo após a dissolução da tétrade e a formação da exina, o grão de pólen apresenta uma primeira divisão mitótica (*Figuras 7a, e b*), originando o núcleo reprodutivo e o generativo (na realidade, duas células distintas). A observação dessa primeira mitose pós-meiótica pode ser feita mais facilmente com as técnicas de coloração com carmim ou hematoxilina, descritas nos itens **3.2.1** e **3.2.2**, uma vez que esses corantes não reagem com a exina, como ocorre com o Giemsa. As técnicas de esmagamento seguido

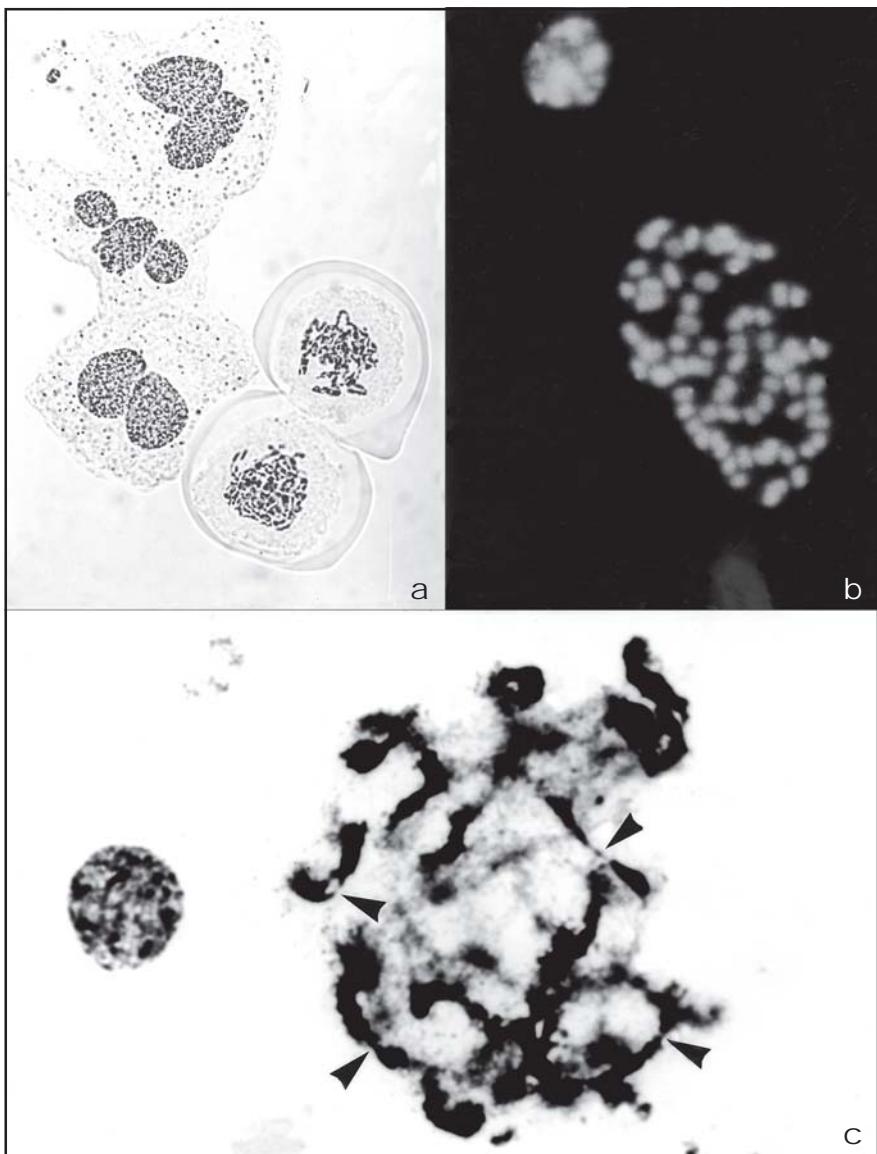


Figura 06 Células do tapete. **a**, Uma célula binucleada e duas outras trinucleadas ao lado de células zigotênicas em *Psittacanthus* sp, sem coloração **b**, Célula octoplóide do tapete de *Passiflora racemosa*, que normalmente apresenta $2n=18$, corada com DAPI. Acima observa-se alguns núcleos diplóides. **c**, Célula politênica ao lado de um núcleo diplóide em *Vigna unguiculata* ($2n=22$), corados com Giemsa. Cabeças de seta apontam a constricção primária distendida em alguns cromossomos. Fotos: **a, b**, originais; **c**, Gianna Carvalheira.

de coloração não são aconselhadas, nesse caso, porque freqüentemente se perdem muitos grãos de pólen durante ou após a retirada da lamínula. Igualmente, quando as lâminas coradas com carmim ou hematoxilina são tornadas permanentes, os grãos de pólen podem ser perdidos, sofrer distorções e ter a coloração do citoplasma intensificada.

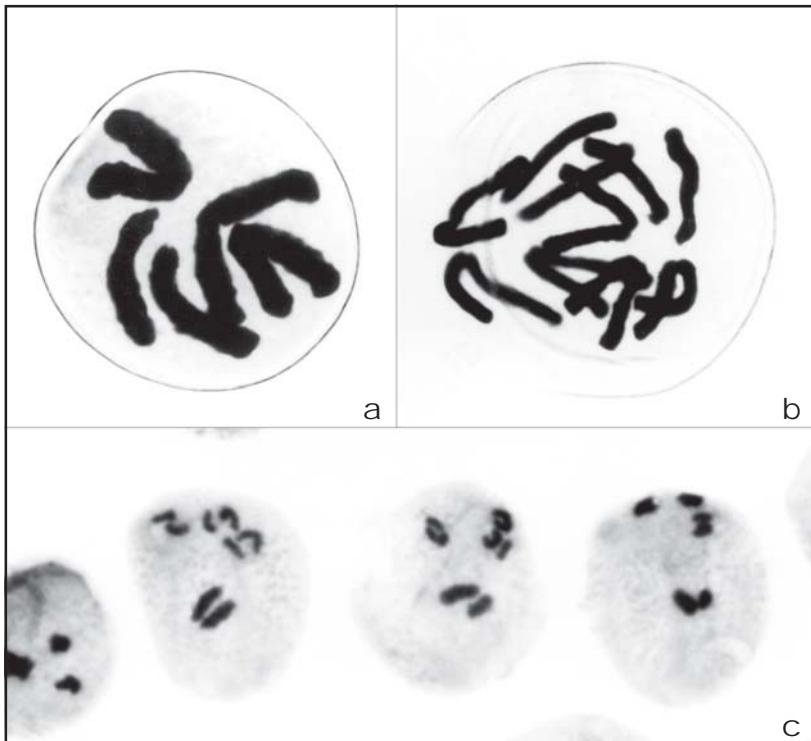


Figura 07 Primeira mitose polínica, corada com hematoxilina (**a, b**) ou com Giemsa (**c**). **a, b**, Metáfase (**a**) e anáfase (**b**) em *Nothoscordum pulchellum* ($n=5$), com dois cromossomos acrocêntricos e três metacêntricos. Observe o contorno da exina e o círculo formado pelos centrômeros nos dois polos da anáfase. **c**, Metáfases em *Rhynchospora tenuis* ($n=2$) mostrando a exina ligeiramente corada. Fotos: **a**, Guerra, 1999; **b**, original; **c**, André Vanzela.

Alguns grupos de plantas apresentam um comportamento diferenciado dos demais no final da microsporogênese (após o estágio de tétrade) ou no início da microgametogênese (primeira divisão do pólen), dificultando a interpretação dos resultados para um citologista não familiarizado com essas variantes. Algumas leguminosas mimosoídes, por exemplo, ao invés de produzirem grãos de pólen isolados, produzem *políades* (agregados de quatro, oito ou mais micrósporos), enquanto muitas orquídeas produzem *mássulas* (agrupamentos irregulares com números variados de micrósporos). Nas ciperáceas, as quatro células resultantes da meiose permanecem reunidas, formando um único grão de pólen. Todas as quatro células iniciam a primeira divisão mitótica. Entretanto, três delas, deslocadas para uma posição periférica, alcançam no máximo a fase de metáfase, degenerando em seguida. A Figura 7c ilustra essa particularidade das ciperáceas em *Rhynchospora tenuis* ($n=2$). Nessa figura, aquilo que parece ser uma só célula, na realidade, são quatro micrósporos unidos, cada um com apenas dois cromossomos. Três conjuntos desses são visivelmente menores (provavelmente porque não passaram por uma fase S antes dessa mitose) e apenas a célula maior e central continua o seu desenvolvimento, formando o microgametófito.

4 - Como corar diferencialmente algumas regiões cromossômicas

Muitos cromossomos possuem um ou mais segmentos, com constituição ou organização molecular diferente, os quais podem ser corados de forma diferencial. Esses segmentos diferenciais podem estar restritos a uma determinada região do cromossomo, formando as chamadas *bandas*, ou podem envolver todo o cromossomo. A presença de bandas permite caracterizar melhor alguns cromossomos, identificar homólogos e auxiliar na análise da evolução cromossômica comparada.

A preparação de lâminas para todas as técnicas de coloração diferencial, inclusive a hibridização *in situ*, segue o mesmo protocolo inicial de digestão enzimática. Os procedimentos anteriores à preparação das lâminas, como por exemplo, o tipo de antimitótico utilizado ou o tempo de pré-tratamento, são iguais aos das técnicas convencionais.

As técnicas para coloração diferencial, especialmente para o bandeamento C, podem ser realizadas de maneiras muito diferentes. Os procedimentos apresentados aqui são os mais freqüentemente referidos na literatura e funcionam bem em uma grande diversidade de organismos. O roteiro para bandeamento C está baseado na técnica proposta por Schwarzacher *et al.* (1980), a coloração com CMA e DAPI está baseada na técnica de Schweizer (1976), descrita com mais detalhes por Deumling e Greilhuber (1982), e a coloração com nitrato de prata está baseada em Stack *et al.* (1991). Uma característica comum a todas essas técnicas é que a obtenção de bons resultados não ocorre todas as vezes. No caso do bandeamento C, é freqüente que em algumas tentativas apenas os satélites corem diferencialmente, enquanto as demais bandas corem fracamente ou não corem. Portanto, é muito importante repetir o procedimento algumas vezes para se certificar de que os resultados estejam corretos.

4.1 - Preparação de lâminas com digestão enzimática

a) Pré-tratamento e fixação como descrito nas técnicas anteriores

b) Lavagem. Lave as raízes, mergulhando-as duas vezes em água destilada ou tampão citrato (5 minutos cada).

c) Digestão enzimática. Enxugue ligeiramente as raízes em papel filtro, coloque-as em uma lâmina e acrescente uma gota da solução enzimática, contendo 2% de celulase e 20% de pectinase. Mantenha a lâmina em câmara úmida a 37 °C até as raízes ficarem macias. Após a primeira 1/2 hora, verifique a cada 1/2 hora quando as raízes estão suficientemente macias. Esse tempo varia muito entre espécies. Por exemplo, cebola e feijão são digeridos mais rapidamente (60-90 minutos), enquanto gramíneas podem necessitar de 2 a 3 horas. Se a atividade das enzimas estiver muito forte, após o tempo ideal de digestão as raízes devem ser transferidas para um recipiente com água destilada para evitar que se dissolvam.

Atenção:

- ◆ A concentração das enzimas pode ser modificada dependendo da atividade que apresentem (a celulase é menos crítica e é geralmente mantida em 2%, enquanto a pectinase pode variar entre 4 e 20%). O importante é que as raízes fiquem bastante macias, sem que se dissolvam ao toque.
- ◆ Em algumas espécies, após a digestão, a região terminal da ponta da raiz se desprende facilmente. Nesse caso, é preferível fazer a digestão na própria lâmina onde será realizado o esmagamento.
- ◆ No caso da preparação de lâminas para meiose, a digestão enzimática deve ser feita num tempo muito mais curto (em torno de 20 minutos). As demais etapas seguem essencialmente iguais.

d) Preparação da lâmina. Transfira uma ponta de raiz para a lâmina. Enxuge cuidadosamente a raiz com papel filtro e acrescente uma gota de ácido acético a 45%. Com o auxílio de um estereomicroscópio, retire a coifa e as capas mais externas da raiz, procurando deixar apenas o meristema. Utilizando estiletes bem finos ou agulhas de seringas, fragmente o tecido em pedaços tão pequenos quanto possível. Cubra com uma lamínula e bata cuidadosamente com uma agulha de ponta rombuda, diretamente em cima dos fragmentos de meristema, até que cada um deles se transforme numa pequena mancha de tecido espalhado. Verifique ao microscópio com o condensador abaixado, se as células estão bem espalhadas. Nesse caso, esmague as células colocando o conjunto lâmina-lamínula em um papel filtro dobrado, pressionando *firme e cuidadosamente para não permitir nenhum deslize da lamínula sobre a lâmina*.

e) Retirada da lamínula. Congele a lâmina-lamínula no gelo-seco ou no nitrogênio líquido por alguns minutos e, com o auxílio de uma gilete ou um bisturi, *retire rapidamente a lamínula*. Deixe a lâmina secar ao ar.

f) Estocagem das lâminas. Em algumas técnicas, a lâmina recém-preparada pode ser utilizada imediatamente. Em outras, como no bandeamento C, a lâmina precisa ser “envelhecida” (isto é, guardada à temperatura ambiente por um ou mais dias). O efeito ao nível molecular do envelhecimento não é conhecido, mas sabe-se que tem um papel fundamental no funcionamento dessas técnicas. Em qualquer caso, as lâminas recém-preparadas e secas devem ser mantidas em caixa protegida de poeira, de preferência em jarros de Coplin tampados.

Atenção:

- ◆ Essas lâminas podem ser conservadas por vários meses, como se fossem frescas, se forem mantidas secas no freezer, em recipiente vedado.

4.2 - Bandeamento C - Observação da heterocromatina constitutiva

a) Preparação e envelhecimento de lâminas. Prepare as lâminas com digestão enzimática e guarde-as por 2 dias à temperatura ambiente. O

tempo de envelhecimento pode ser posteriormente ajustado para 1 a 3 dias ou mais, dependendo do material.

b) Hidrólise. Mergulhe as lâminas em ácido acético a 45% em banho-maria pré-aquecido a 60 °C durante 10 minutos. Após esse período, verta o ácido acético a 45% em um outro recipiente – essa mesma solução será reutilizada mais adiante à temperatura ambiente.

Atenção:

- ◆ Os recipientes contendo o ácido acético 45% e o 2xSSC (item f) devem ser colocados no banho-maria, para pré-aquecimento, ao menos 20 minutos antes de utilizar essas soluções. A temperatura deve ser controlada diretamente na solução e o nível desta deve ser igual ou inferior ao da água do banho-maria.
- ◆ O jarro de Coplin não suporta grande variação de temperatura entre seus lados interno e externo. Por isso, antes de colocar uma solução no jarro em banho-maria, deve-se primeiro aquecer a solução em um bêquer ou Erlenmeyer do tipo pyrex, depois transferir a solução para o jarro e mergulhá-lo imediatamente no banho-maria.

c) Lavagem. Lave as lâminas em água de torneira corrente por cerca de 1 minuto e em seguida seque-as com uma bomba de ar.

d) Desnaturação. Mergulhe as lâminas cuidadosamente em um jarro de Coplin contendo uma solução saturada de hidróxido de bário à temperatura ambiente, durante 10 minutos. Alternativamente, pode ser tentada a mesma solução a 50-60 °C pelo mesmo tempo.

e) Lavagem. Acrescente água de torneira na cubeta cuidadosamente, até que os cristais sobrenadantes transbordem junto com a água. Em seguida, retire a água do jarro e adicione a solução de acético a 45% utilizada no item b. Imediatamente depois, devolva o ácido acético para o recipiente onde estava. Essa rápida lavagem em ácido acético visa apenas eliminar o hidróxido de bário das lâminas. Lave as lâminas em água corrente no jarro de Coplin por 2 minutos. Enxágüe com água destilada.

Atenção:

- ◆ Não descarte o ácido acético a 45% na pia. Estoque em depósito apropriado para ácidos usados (veja capítulo 7).

f) Renaturação e extração diferencial de DNA. Seque as lâminas, transfira-as para um jarro de Coplin e acrescente uma solução de 2xSSC pré-aquecida a 60 °C. Imediatamente em seguida, coloque o jarro em banho-maria durante 80 minutos.

Atenção:

- ◆ Nessa etapa, é preferível não trabalhar com o jarro cheio de lâminas e sim com a metade da capacidade de lâminas do jarro.

◆ O tempo de renaturação pode ser ajustado para cada espécie. Se ao final do procedimento, toda a preparação ficar descolorada demais, pode ser devido à extração excessiva de DNA no 2xSSC.

g) Lavagem, coloração e montagem. Lave as lâminas rapidamente em água destilada, seque com uma bomba de ar e core com Giemsa a 2% por 15-30 minutos. Controle a coloração geral das células (item 2.2.1.e) e monte a lâmina em Entellan ou similar. Observe que no bandeamento C a eucromatina (a maior parte da cromatina total) deve ficar fracamente corada (*Figuras 8a e b*) e, portanto, *a lâmina deve parecer menos corada que na técnica convencional*. Os núcleos interfásicos geralmente evidenciam melhor o bandeamento e podem servir como um indicador confiável da coloração. Em caso de dúvida, coloque uma gota de água destilada e monte com uma lamínula para checar melhor a coloração. Em seguida, retire a lamínula com um jato de água destilada, seque a lâmina novamente e monte em Entellan, ou devolva a lâmina para o Giemsa.

Atenção:

◆ Após o procedimento para bandeamento C, a coloração geralmente utilizada é a de Giemsa, mas outras colorações, como o Hoechst e o DAPI, podem também ser utilizadas. As *Figuras 8c e d* mostram uma metáfase de centeio, tratada com a técnica de bandeamento C, corada com Hoechst (8c), descolorada e corada com Giemsa (8d). Nesse tipo de coloração, em geral, as bandas coradas com o Hoechst são idênticas às coradas com Giemsa.

4.3 - Dupla-coloração com os fluorocromos CMA e DAPI

a) Preparação da lâmina. Prepare as lâminas com digestão enzimática (item 4.1) e guarde-as em uma cubeta, protegidas da poeira, por 3 dias à temperatura ambiente.

b) Coloração com CMA. Coloque uma gota de CMA (0,5 mg/ml) em cima das células e cubra com uma lamínula. Guarde a lâmina em câmara úmida, escura, por 1 hora. Retire a lamínula e o excesso de corante com um jato de água destilada e seque a lâmina rapidamente com uma bomba de ar.

c) Coloração com DAPI. Coloque uma gota de DAPI (2 µg/ml) em cima das células e cubra com uma lamínula. Guarde em caixa escura por 30 minutos. Retire a lamínula e o excesso de corante com um jato de água destilada e seque rapidamente a lâmina.

d) Montagem da lâmina. Coloque uma gota de meio de montagem glicerol/McIlvaine (contendo MgCl₂), cubra com uma lamínula e comprima ligeiramente entre duas folhas de papel de filtro para tirar o excesso de meio. *Guarde em caixa escura por pelo menos três dias* antes de analisar ao microscópio.

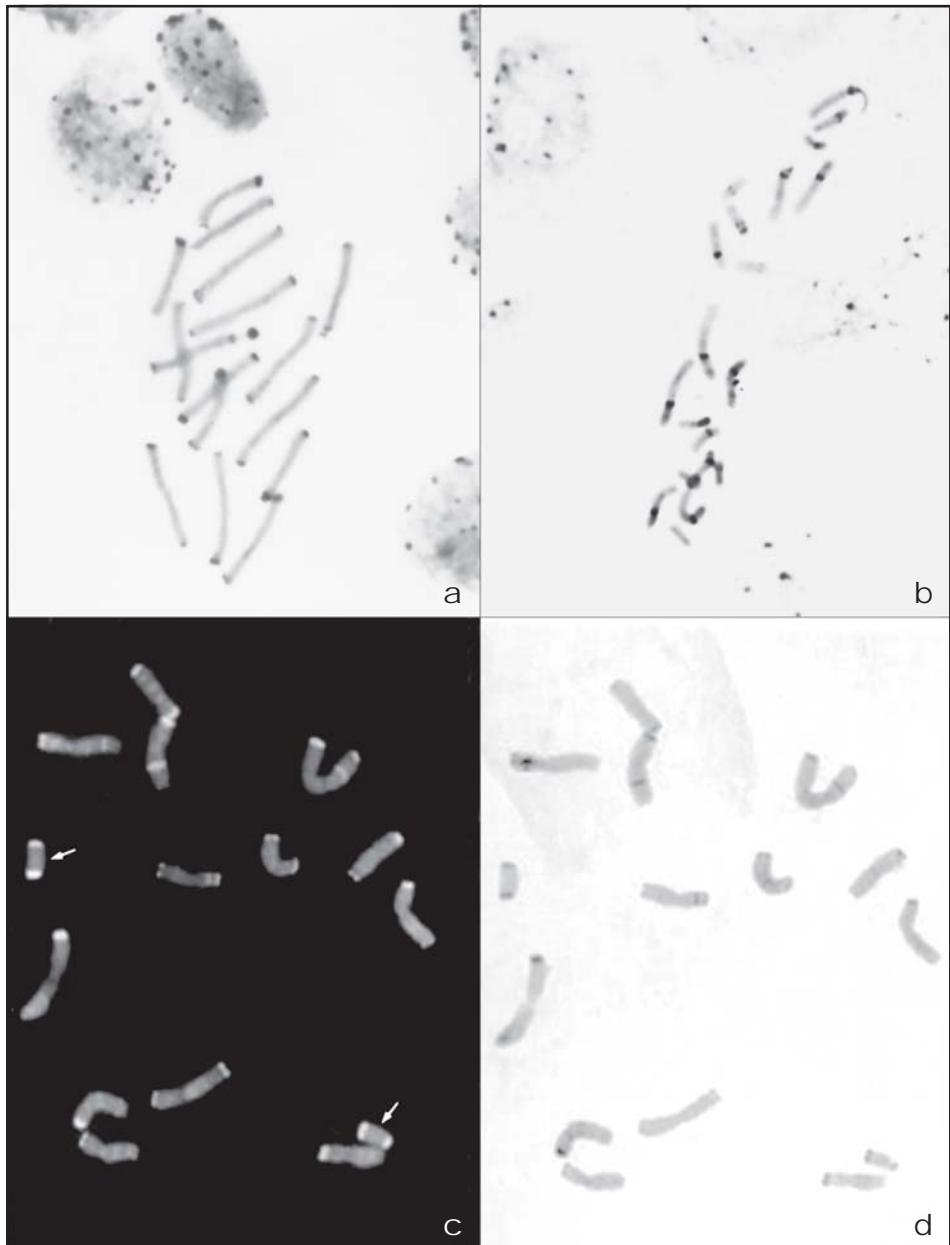


Figura 08 Bandeamento C. **a**, Metáfase e núcleos interfásicos de cebola. **b**, Metáfase e núcleos interfásicos de *Emilia fosbergii* ($2n=20$). **c, d**, Metáfase incompleta de centeio, bandeada e corada com Hoechst (**c**), decorada e corada com Giemsa (**d**). Observe a presença de dois cromossomos B (setas) com blocos de heterocromatina terminais. Células em **a** e **b**, coradas com Giemsa. Fotos: **a**, Maria José Gomes de Andrade; **b**, Guerra e Nogueira, 1990; **c, d**, Ana Cristina Brasileiro.

e) Análise ao microscópio. Para observar a coloração DAPI use filtro de 340 a 380 nm. Para o CMA use filtro de 390 a 490 nm ou outro comprimento dentro dessa faixa.

f) Fotografia. Ao contrário da fotografia de microscopia de campo claro (coloração com carmim, Giemsa, etc), a fotografia com luz ultravioleta é geralmente feita com o sistema manual de fotomicroscopia. Para isso, precisará fazer inicialmente alguns testes com diferentes tempos de exposição para as colorações CMA e DAPI (em geral o tempo ideal para CMA é muito maior que para DAPI). Também é possível fotografar as células coradas com DAPI ou outro fluorocromo estável com exposição automática, necessitando para isso um ajuste adequado do sistema fotográfico. No caso de fluorocromos mais instáveis, utilize filme de ASA alta (ASA 400 ou mais).

As *Figuras 9a* e *b* mostram uma mesma metáfase de *Eleutherine bulbosa* fotografada com o filtro para CMA (*a*) e para DAPI (*b*). Observe que com essa coloração é possível observar que o maior par cromossômico sofreu uma inversão pericêntrica, mudando a posição das bandas e a morfologia dos cromossomos (compare com a *Figura 1b*).

Atenção:

- ◆ Após a coloração com fluorocromos, é possível descorar a lâmina e corar com outras técnicas. As *Figuras 9c* e *d* mostram uma mesma metáfase de uma gimnosperma (*Podocarpus macrophyllus*) corada com CMA/DAPI (apenas a foto com DAPI é apresentada), descorada e corada com Giemsa a 2%. Observe uma banda terminal DAPI⁺ em quase todos os cromossomos e um par de cromossomos com uma banda DAPI⁻ correspondente à região da constrição secundária em *9d*.
- ◆ Dependendo dos objetivos, pode ser usada ao invés da dupla-coloração CMA/DAPI apenas CMA ou apenas DAPI. Nesses casos, o procedimento é o mesmo, dispensando apenas o item **b** ou **c**, respectivamente.
- ◆ Alguns autores preferem utilizar a chamada *coloração seqüencial CMA-DAPI*. Nesse caso, é feita primeiro a coloração DAPI, com montagem, análise da lâmina e fotografia. Em seguida, a lâmina é descorada e recorada com CMA, como descrito acima, e refotografada.
- ◆ *Para descorar a lâmina*, retire a lamínula com um jato de água destilada e mergulhe a lâmina em um borel com fixador Carnoy 3:1 recém-preparado, por 30 minutos. Em seguida, transfira a lâmina para um borel com etanol 100% por pelo menos 2 horas (de preferência deixe de um dia para o outro na geladeira).
- ◆ *Todos os corantes diminuem sua coloração com a exposição demais à luz, porém os fluorocromos são particularmente sensíveis.* Por essa razão, durante toda a preparação da lâmina, evite exposição intensa ou prolongada à luz. *Mantenha as soluções de fluorocromos sempre em frascos escuros e envoltos em papel alumínio.*
- ◆ Muitos fluorocromos são mutagênicos, devendo ser evitado contato com a pele. Pela mesma razão, não devem ser jogados diretamente na pia. É recomendável ter um depósito de boca larga para fazer a retirada da lamínula e do excesso de fluorocromo (itens **b** e **c** anteriores). Quando o depósito estiver com metade da sua capacidade preenchida, seu conteúdo deve ser eliminado em local de difícil acesso à rede fluvial (veja item **6.5**).

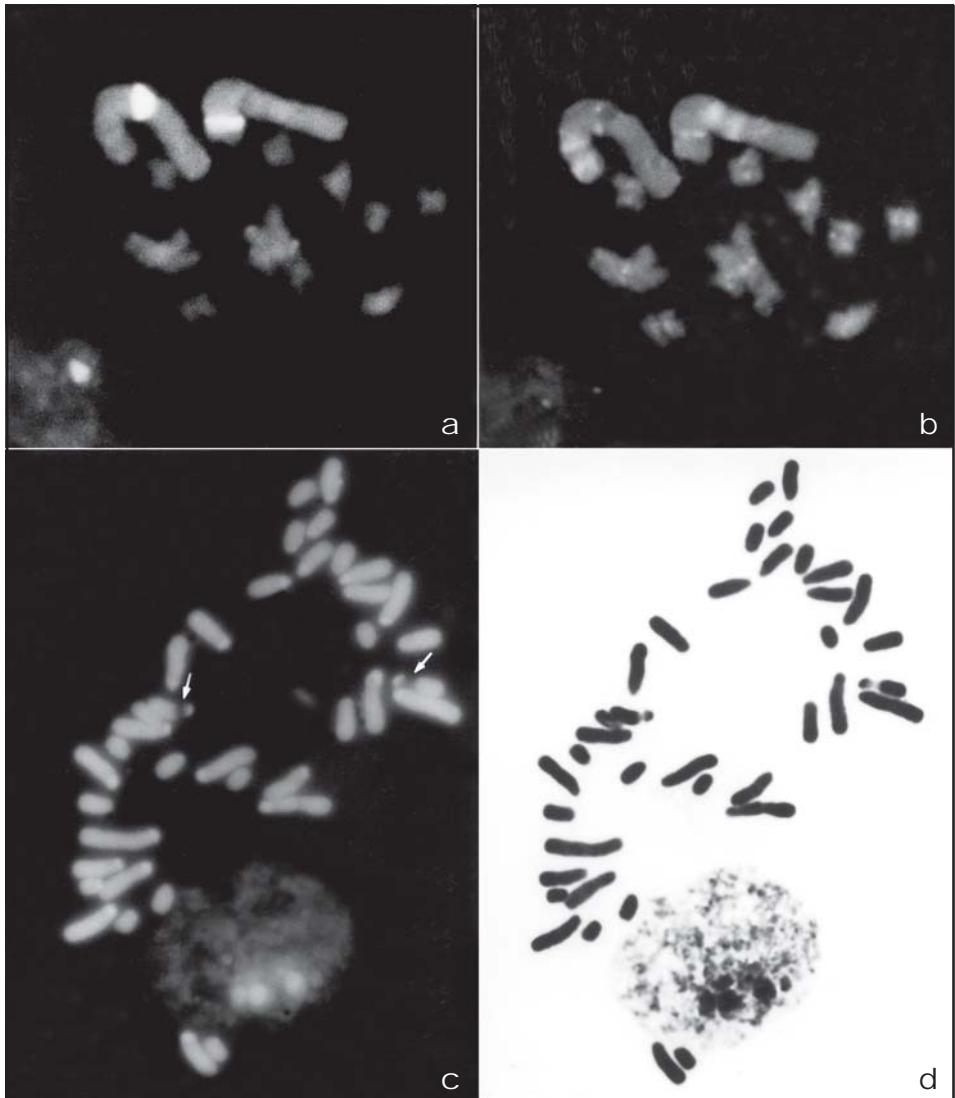


Figura 09 Dupla coloração CMA/DAPI e coloração seqüencial com hematoxilina. **a, b**, Metáfase de *Eleutherine bulbosa* ($2n=12$) corada simultaneamente com CMA (**a**) e DAPI (**b**). **c, d**, Metáfase e núcleo interfásico de uma gimnosperma, *Podocarpus macrophyllus* ($2n=38$), corados com CMA/DAPI (foto, em **c**, mostra apenas a coloração com DAPI), descorados e corados com Giemsa (**d**). Setas em **c** apontam as constricções secundárias. Fotos: **a, b**, Guerra, 1998b; **c, d**, originais.

4.4 - Tripla coloração CMA/DA/DAPI

a) Preparação da lâmina e coloração com CMA. Prepare e core a lâmina como descrito nos itens **4.3.a** e **b** da técnica anterior.

b) Contracoloração com Distamicina A (DA). Acrescente uma gota de distamicina A (0,1mg/ml) em cima das células e cubra com uma lamínula.

Guarde em caixa escura por 30 minutos. Retire a lamínula e o excesso de corante com um jato de água destilada e seque rapidamente a lâmina com uma bomba de ar.

c) Coloração com DAPI, montagem da lâmina, análise e fotografia. Como descrito nos itens **4.3.c, d, e e f** da técnica para dupla-coloração com CMA/DAPI.

4.5 - Coloração seqüencial CMA-DAPI com contracorantes (CMA/DAPI/AMD)

a) Preparação da lâmina, coloração com CMA e contracoloração com Distamicina A. Como descrito no itens **4.3.a e b e 4.4.b.**

b) Montagem, análise e fotografia do CMA/DA. Como descrito nos itens **4.3.d, e e f.**

c) Retirada dos corantes CMA/DA. Retire a lamínula com um jato de água, seque a lâmina e a mantenha em Carnoy 3:1 por 12 a 24 horas na geladeira, mudando o fixador após os primeiros 30 minutos e pelo menos mais duas vezes durante esse período. Em seguida, seque a lâmina e a transfira para etanol (P.A.) por 1 a 2 horas à temperatura ambiente ou 24 horas na geladeira.

d) Coloração com DAPI. Como descrito no item **4.3.c.**

e) Contracoloração com Actinomicina D (AMD). Acrescente uma gota de AMD (0,2 mg/ml) na lâmina e cubra com uma lamínula. Guarde em caixa escura por 30 minutos. Retire a lamínula e seque a lâmina.

f) Retirada dos corantes DAPI/AMD. Como descrito no item **4.3.c.**

g) Montagem da lâmina, análise e fotografia. Como descrito nos itens **4.3.d, e e f.**

Atenção:

◆ Em algumas espécies podem ser obtidos melhores resultados *combinando a técnica de bandeamento C com a de CMA/DAPI*. Para isso, realize todo o procedimento para o bandeamento C seguido da coloração com os fluorocromos. Muito cuidado deve ser tomado com o fato de que, utilizando a combinação dessas duas técnicas, as bandas brilhantes com DAPI ou CMA *podem não ser especificamente ricas em AT ou GC*, como as observadas na coloração direta. Em geral, todas as bandas C aparecem positivas se coradas apenas com DAPI, *inclusive aquelas ricas em GC*, como a heterocromatina associada à RON.

4.6 – Coloração com Hoechst 33258, quinacrina ou iodeto de propídeo

a) Preparação da lâmina. Para qualquer coloração com fluorocromos, trate as raízes com digestão enzimática e prepare as lâminas como descrito no item **4.1**.

b) Coloração com Hoechst. Coloque uma gota de Hoechst (0,5 µg/ml) em cima das células, cubra com uma lamínula e guarde em caixa escura por 30 minutos. Em seguida, retire a lamínula com um jato de água, seque e monte em glicerol/tampão McIlvaine (item **4.3.d**).

c) Coloração com quinacrina. Siga o mesmo procedimento do item anterior, utilizando uma solução de quinacrina a 0,5% e um tempo de coloração de 10 minutos.

d) Coloração com iodeto de propídeo. Siga o mesmo procedimento do item **b**, utilizando uma concentração de iodeto de propídeo de 1 µg/ml e um tempo de 10 minutos.

Atenção:

- ◆ O corante Hoechst, à semelhança do DAPI, pode também ser utilizado em combinação com o CMA ou após o bandeamento C (*Figura 8c e d*).

4.7 - Coloração com nitrato de prata: observação de nucléolos e RONs

a) Prepare as lâminas com digestão enzimática (item **4.1**). As lâminas, nesse caso, não precisam ser envelhecidas, embora também seja possível trabalhar com lâminas feitas alguns dias antes.

b) Acrescente *uma pequena gota* (para isso, utilize uma pipeta Pasteur de ponta bem fina) de nitrato de prata a 50% (0,5 g de nitrato de prata em 1 ml de água destilada) em cima da mancha de células na lâmina e cubra com uma tela de náilon, de poros bem estreitos, cortada em tamanho e formato de uma lamínula. Também pode ser utilizada lamínula comum, embora a tela produza freqüentemente uma coloração mais uniforme.

c) Coloque a lâmina em uma câmara úmida (placa de Petri fechada contendo papel de filtro molhado e dois suportes para a lâmina) na estufa a 60 °C.

d) Após os primeiros 15 minutos, verifique periodicamente se a mancha de células na lâmina assume uma coloração marrom ou dourada. Verifique ao microscópio, com a lente de menor aumento, a intensidade de coloração dos nucléolos.

e) Quando os nucléolos apresentarem coloração escura (marrom a preto), a coloração deve ser interrompida com um jato de água ao lado da tela de náilon, expulsando a tela e o excesso de nitrato.

f) Caso seja necessário evidenciar melhor os cromossomos, é possível contracorar com carmim (no caso de meiose), orceína, hematoxilina

ou Giemsa. Nos dois primeiros casos, basta colocar um gota do corante e cobrir com uma lamínula. No caso da coloração com hematoxilina ou Giemsa, a lâmina ficará mais limpa se for primeiramente hidrolisada com HCl 5N por 10 minutos, depois lavada em água destilada e então corada. Em qualquer caso, as estruturas coradas com prata não são alteradas pela segunda coloração.

g) Seque a lâmina com uma bomba de ar e monte-a com Entellan ou similar.

Atenção:

- ◆ A coloração dos nucléolos é facilmente observada, entretanto a obtenção de RONs bem marcadas geralmente exige várias tentativas.
- ◆ A solução de nitrato de prata deve ser preparada de preferência na quantidade mínima necessária para o uso imediato.

4.8 - Descoloração de lâminas coradas com prata

a) Descoloração. Coloque 1-2 gotas de hexacianoferrato de potássio ($K_3[Fe(NC)_6]$) a 1%, recém-preparado e resfriado a aproximadamente 0 °C, em cima da mancha de células na lâmina e cubra com uma lamínula. Deixe descorando por 15 a 60 segundos.

b) Limpeza da lâmina. Retire a lamínula e a solução descolorante com um jato de água destilada. Mergulhe a lâmina em tiosulfato de sódio penta-hidratado a 20% por cerca de 15 segundos. Lave em água destilada e deixe secar ao ar.

Atenção:

- ◆ Esta técnica é utilizada para coloração seqüencial prata-banda C, prata-convencional, etc. Em qualquer caso, é preferível fazer primeiro a coloração com nitrato de prata, para evitar precipitação excessiva da prata.

A Figura 10a mostra uma metáfase de *Eleutherine bulbosa* com as constrições secundárias e a heterocromatina adjacente marcadas com nitrato de prata. O cariótipo apresenta uma constrição secundária maior no cromossomo metacêntrico e uma outra menor no cromossomo acrocêntrico (compare com o da Figura 1b). A Figura 10b mostra núcleos interfásicos de *Emilia sonchifolia* (serralheira) com um único nucléolo bem corado e uma prófase com as constrições secundárias associadas ao nucléolo. Observe os satélites, bem corados, ao lado do nucléolo.

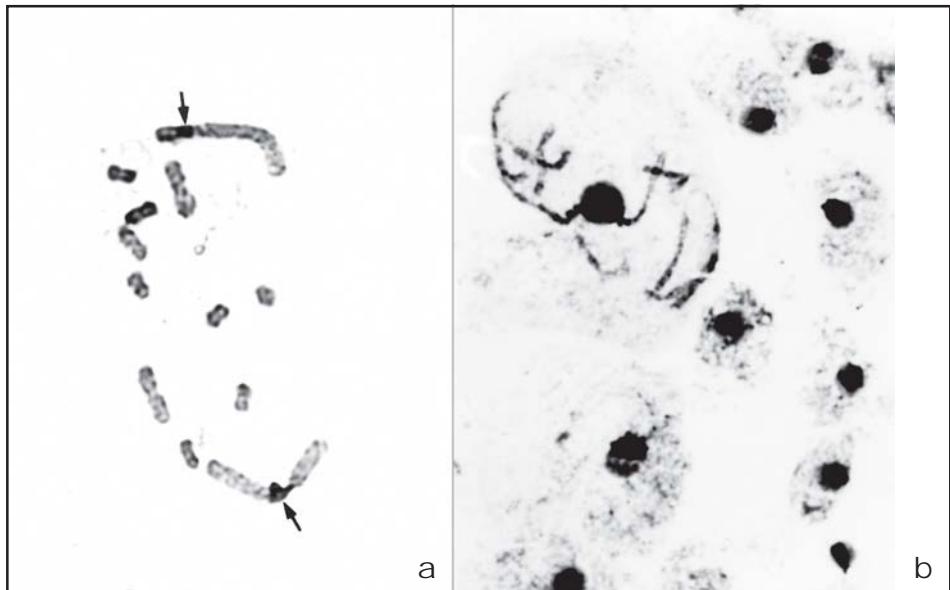


Figura 10 Coloração com nitrato de prata. **a**, Metáfase de *Eleutherine bulbosa* ($2n=12$). **b**, Núcleos interfásicos e prófase de *Emilia fosbergii* mostrando o nucléolo e os cromossomos associados ao nucléolo. Setas em **a** apontam RONs. Fotos: **a**, Guerra, 1991; **b**, Guerra e Nogueira, 1990.

5 - Como preparar as soluções mais utilizadas em citogenética vegetal

Ao preparar as soluções abaixo, certifique-se de que toda a vidraria a ser utilizada esteja rigorosamente limpa. Todos os depósitos de soluções devem estar etiquetados, com as anotações feitas a grafite ou com tinta insolúvel em água, nunca com caneta esferográfica comum. A etiqueta deve *indicar claramente* o nome do produto, a concentração e a data de preparação.

Para cada solução foi sugerido um volume que consideramos mais prático, os quais devem ser ajustados às necessidade de cada laboratório. Como regra, prepare apenas os volumes mínimos necessários, para evitar que as soluções percam ou diminuam suas atividades antes de serem utilizadas.

Os fluorocromos, em geral, são substâncias caras e vendidas geralmente em pó e em pequenas quantidades. Quando a quantidade é muito pequena, como no caso da cromomicina A, é aconselhável primeiramente injetar um pouco de solvente (uma mistura de tampão com água) no frasco, dissolver completamente o fluorocromo, retirar a solução e completar com o solvente para o volume indicado.

Todas as soluções de fluorocromos devem ser divididas em alíquotas, para evitar o aquecimento desnecessário de todo o estoque a cada vez que vai ser usado. As alíquotas podem ser acondicionadas em tubos de Eppendorf de 1 a 2 ml, todos etiquetados e numerados, de forma a permitir o uso de apenas uma alíquota de cada vez.

5.1 - Fixador Carnoy 3:1 - 20 ml

- a)** Misture 15 ml de etanol com 5 ml de ácido acético glacial.
- b)** Agite bastante a solução *antes e depois* de acrescentar o material a ser fixado.

Atenção:

- ◆ A solução deve ser preparada *imediatamente antes de ser usada*.
- ◆ O volume de fixador deve ser aproximadamente 10 vezes o volume do material a ser fixado.

5.2 - Colchicina a 0,1% ou 0,5% - 50 ml

- a)** Dissolva 0,05 g ou 0,025 g de colchicina em 50 ml de água destilada.
- b)** A solução deve ser dividida em alíquotas e mantidas no congelador. Apenas uma delas deve ser mantida na geladeira (por até 6 meses), se estiver em uso frequente.

5.3 - 8-Hidroxiquinoleína (8HQ) 0,002M - 300 ml

a) Dissolva 0,087 g de 8HQ em 300 ml de água destilada à temperatura ambiente. Para isso, utilize um agitador magnético *em uma capela* (exala gases tóxicos).

b) Guarde a solução em frasco bem fechado na geladeira.

Atenção:

- ◆ É preferível não estocar a solução por mais de 6 meses na geladeira.
- ◆ Evite expor a solução à luz. Se com o tempo a coloração da solução esmaecer pode indicar perda da atividade.

5.4 - HCl 1N e 5N - 300 ml

a) **HCl 1N:** Coloque *primeiramente* 275,16 ml de água destilada em uma proveta e acrescente 24,84 ml de HCl.

b) **HCl 5N:** Coloque *primeiramente* 175,8 ml de água destilada em uma proveta e acrescente 124,2 ml de HCl.

c) Guarde em recipiente bem fechado.

5.5 - Carmim acético a 2% - 100 ml

a) Dissolva 2 g de carmim em uma solução contendo 55 ml de água destilada e 45 ml de ácido acético glacial.

b) Deixe fervendo em um condensador de refluxo por 2 a 3 horas.

c) Deixe esfriar, filtre e guarde a solução em recipiente fechado.

5.6 - Hematoxilina acética a 1% - 100 ml

a) Dissolva com um bastão de vidro 1 g de hematoxilina e 0,25 g de alúmem ferroso em 100 ml de ácido acético a 45%.

b) Coloque a mistura em um vidro escuro tampado com uma chumaço de algodão, em ambiente aberto para evitar os gases. Após uma semana, filtre a solução e conserve em vidro escuro fechado.

5.7 - Orceína acética a 2% - 100 ml

a) Dissolva 2 g de carmim em uma solução contendo 55 ml de água destilada e 45 ml de ácido acético glacial.

b) Deixe fervendo (de preferência em um condensador de refluxo) por 2 a 3 horas.

c) Deixe esfriar, filtre e guarde a solução em recipiente fechado.

5.8 - Solução corante de Giemsa (solução estoque) - 66 ml

a) Dissolva 0,5 g do corante de Giemsa em pó em 33 ml de glicerina a 60 °C em banho-maria por 2 horas.

b) Depois que a solução esfriar, adicione 33 ml de álcool metílico, guarde em vidro escuro bem fechado por uma semana e, em seguida, filtre e mantenha em vidro escuro.

5.9 - Giemsa a 2% (solução de uso) - 100 ml

- Misture 2 ml da solução estoque de Giemsa (ou da solução comprada pronta) e 98 ml de tampão fosfato pH 6,8. Para uso rotineiro, a diluição pode ser feita em água destilada.

5.10 - Reativo de Schiff - 400 ml

Na literatura há diversas maneiras diferentes de preparar o reativo de Schiff, utilizando os mesmos componentes. Aqui são apresentados dois protocolos diferentes. Dependendo da qualidade dos produtos utilizados, um dos dois pode apresentar coloração cromossômica mais intensa.

Protocolo 1 (baseado em Greilhuber e Ebert, 1994)

- a)** Dissolva 2 g de fucsina básica em 60 ml de HCl 1N.
- b)** Dissolva 7,6 g de metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) em 340 ml de água destilada.
- c)** Misture as duas soluções em um Erlenmeyer, com agitador magnético por no mínimo 3 1/2 horas.
- d)** Adicione aproximadamente 1 g de carvão vegetal à solução. Agite bastante e filtre com a ajuda de uma bomba de vácuo.
- e)** Repita a etapa anterior duas vezes ou mais, sempre adicionando mais carvão, até o filtrado ficar perfeitamente incolor e cristalino.
- f)** Verifique o pH, que deve estar entre 1,9 e 2,2. Ajuste com HCl ou NaOH.
- g)** Guarde na geladeira em frasco escuro ou coberto com papel alumínio.

Protocolo 2 (baseado em Garcia, 1990)

- a)** Coloque 400 ml de água destilada em um Erlenmeyer e aqueça ao ponto de ebulação.

b) Acrescente 0,8 g de fucsina básica e 0,8 ml de ácido clorídrico concentrado. Tampe o Erlenmeyer com uma placa de vidro e coloque a solução no agitador magnético durante 20 minutos.

c) Acrescente 16 g de metabissulfito de sódio à solução e agite por mais 30 minutos.

d) Acrescente 3,2 g de carvão ativado e agite por mais 45 minutos.

e) Deixe o carvão decantar por 1 a 2 horas e filtre.

f) Verifique se o pH está entre 1,9 e 2,2. Ajuste com HCl ou NaOH.

g) Guarde na geladeira em frasco escuro ou coberto com papel alumínio.

Atenção:

◆ O metabissulfito de sódio pode ser substituído por 8,9 g de metabissulfito de potássio ($K_2S_2O_5$) para o mesmo volume de solução.

◆ O metabissulfito de sódio ou potássio é volátil e muito tóxico. Por essa razão, o preparo do reativo de Schiff deve ser *inteiramente realizado em capela*.

◆ Se a solução apresentar coloração rósea ou outra qualquer, deve ser eliminada.

◆ Para usar o corante, retire-o do frasco de preferência por meio de uma pipeta bem limpa e seca, ao invés de verter o frasco.

5.11 - Água sulfurada - 300 ml

- Dilua 18 ml de uma solução 1% de metabissulfito de sódio (1 g de $Na_2S_2O_5$ dissolvido em 100 ml de água destilada) em 300 ml de água destilada e acrescente 15 ml de HCl 1N.

5.12 - Tampão fosfato pH 6,8 (tampão de Sorensen) - 2 litros de soluções estoque

a) Soluções estoque:

- Solução A. Dissolva 9,079 g de fosfato de potássio (KH_2PO_4) em cerca de 500 ml de água destilada e *complete* posteriormente para um litro. Guarde na geladeira.

- Solução B. Dissolva 11,876 g de fosfato de sódio bi-hidratado $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ em cerca de 500 ml de água destilada e *complete* posteriormente para um litro. Guarde na geladeira.

b) Solução de uso (100 ml):

- Misture 50,9 ml da solução A com 49,1 ml da solução B.

Atenção:

◆ Os tampões em geral, principalmente as soluções de uso, não po-

dem ser estocadas por muitos meses, porque facilmente fungam. Verifique sempre se aparecem pequenos flocos brancos na solução (neste caso, deve ser substituída por uma nova solução).

◆ A solução de uso de todos os tampões deve ter o pH indicado no protocolo. Contudo, é importante checar o pH dessas soluções e, se necessário, ajustar com HCl ou NaOH.

5.13 - Tampão McIlvaine pH 7,0 - 2 litros de soluções estoque

a) Soluções estoque:

- Solução A: Dissolva 21,14 g de ácido cítrico mono-hidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) em 500 ml de água destilada e posteriormente complete para um litro (0,1M).

- Solução B: Dissolva 28,39 g de fosfato de sódio (Na_2HPO_4) ou 71,63 g de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ em 500 ml de água destilada e posteriormente complete para um litro (0,2M).

b) Solução de uso (100 ml):

- Misture 17,6 ml de A com 82,4 ml de B.

5.14 - Tampão McIlvaine pH 5,5 - 20 ml

a) Esse tampão é utilizado no preparo do Hoechst e é constituído das mesmas soluções do tampão McIlvaine pH 7,0, mudando apenas as proporções.

b) Misture 9 ml de ácido cítrico 0,1M (solução A do item anterior) com 11 ml de fosfato de sódio 0,2M (solução B).

5.15 - Tampão citrato-fosfato pH 4,8 - 1 litro

- Dissolva 10,5 g de ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) e 32,25 g de fosfato de sódio dibásico doze vezes hidratado ($Na_2HPO_4 \cdot 12(H_2O)$) em 500 ml de água destilada e posteriormente complete para um litro. O último composto pode ser substituído por 12,76 g de fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4).

5.16 - 20xSSC - 1 litro

a) Dissolva em um béquer, no agitador magnético, 175,6 g de cloreto de sódio ($NaCl$) e mais 88,2 g de citrato de sódio bihidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) em cerca de meio litro de água destilada.

b) Complete com água destilada até um litro e agite até a completa dissolução.

c) Guarde na geladeira. Verifique sempre se não surgem fungos na solução.

5.17 - 2xSSC - 100 ml

- a) Dilua 10 ml de 20xSSC em 90 ml de água destilada.
- b) Agite antes de utilizar.

5.18 - Solução de celulase 2% - pectinase 20% - 20 ml

- a) Dissolva 0,4 g de celulase em 4 ml de pectinase.
- b) Complete para 20 ml com tampão citrato-fosfato pH 4,8.
- c) Divilde os 20 ml em 10 tubos de Eppendorf de 2 ml cada e mante-nha-os no congelador.

Atenção:

- ◆ Essas concentrações indicadas se referem à celulase de *Aspergillus* (100.000 unidades da Calbiochem 21947) e à pectinase da Sigma (já fornecida diluída em glicerol 40%). Enzimas de outras marcas, com atividade diferente, devem ser testadas em diferentes proporções e concentrações até produzirem um efeito semelhante.

5.19 - Solução saturada de hidróxido de bário - 120 ml

- a) Aqueça 120 ml de água destilada até a ebulição e adicione rapidamente 5 g de hidróxido de bário.
- b) Agite com o auxílio de um bastão de vidro e deixe esfriar.

Atenção:

- ◆ Esta solução deve ser preparada em uma capela. Quando em contato com a água quente, o bário pode efervescer rapidamente, transbordar e causar um acidente.

5.20 - DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) 2 µg/ml - 10 ml de solução estoque

- a) Solução estoque (100x):
 - Dissolva 2 mg de DAPI em 10 ml de água destilada. Divilde em alíquotas e conserve no freezer.
- b) Solução de uso (2µg/ml):
 - Dilua 100 µl da solução estoque em 10 ml de tampão McIlvaine pH 7,0. Divilde em alíquotas e guarde no freezer.

Atenção:

- ◆ Dependendo do material, concentrações mais diluídas (1 ou 0,5 µg/ml) podem dar melhor resultado.

◆ Tanto a solução estoque quanto a de uso devem ser mantidas no freezer. A solução estoque deve ser dividida em pequenas alíquotas, em tubos de Eppendorf de 1 a 2 μ l cada, mantidas no freezer e utilizadas até o final, uma a uma.

5.21 - CMA (Cromomicina A₃) 0,5 mg/ml - 10 ml

a) Dissolva 5 mg de CMA em 10 ml de uma mistura 1:1 de tampão McIlvaine pH 7,0 e água destilada.

b) Acrescente 10 μ l de MgCl₂ 5M ou utilize um tampão contendo 10 mM de MgCl₂ (0,2033 g de MgCl₂.6H₂O em 100 ml de tampão).

c) Prepare essa solução pelo menos uma semana antes de ser utilizada e guarde na geladeira.

5.22 - AMD (Actinomicina D) 0,2 mg/ml - 5 ml

a) Dissolva 1 mg de AMD em 5 ml de tampão McIlvaine pH 7,0.

b) Acrescente 1 mM de EDTA, agite, divida em alíquotas e guarde no freezer.

5.23 - DA (Distamicina A) 0,1 mg/ml - 10 ml

a) Dissolva 1 mg de distamicina A em 10 ml de tampão McIlvaine pH 7,0.

b) Divida em alíquotas de 2 ml e conserve no freezer.

5.24 - Hoechst 0,5 μ g/ml - 2 ml de solução estoque

a) Solução estoque (50 μ g/ml):

- Dissolva 100 μ g de Hoechst 33258 em 2 ml de água destilada. Conserves no freezer

b) Solução de uso (0,5 μ g/ml):

- Dilua 0,1 ml da solução estoque em 9,9 ml de tampão McIlvaine pH 7,0.

- Divida os 10 ml da solução de uso em alíquotas e guarde no freezer.

Atenção:

◆ Como a concentração de Hoechst utilizada é muito baixa, fica difícil pesar com precisão os poucos microgramas. Nesse caso, é mais prático pesar o mínimo possível do Hoechst em pó, conferir o peso exato e, a partir dessa quantia, preparar o volume correspondente de solução estoque na proporção de 50 μ g/ml.

◆ Alguns autores usam concentrações duas a cem vezes mais altas

que o sugerido aqui. Entretanto, soluções entre 0,5 e 2 mg parecem adequadas para corar bem qualquer tipo de cromossomo.

5.25 - Quinacrina 0,5% - 10 ml

a) Dissolva 0,05 g de quinacrina di-hidroclorídrica em 10 ml de água destilada

b) Divilde em alíquotas e conserve na geladeira

5.26 - Iodeto de propídeo 1 µg/ml - 10 ml de solução estoque

a) Solução estoque (100 µg/ml):

- Dissolva 1 mg de iodeto de propídeo em 10 ml de água destilada. Divilde em alíquotas e conserve no freezer.

b) Solução de uso (1 µg/ml):

- Dilua 10 µl da solução estoque em 1 ml de água destilada. Conserve no freezer.

5.27 - Meio de montagem glicerol/McIlvaine 1:1 (para fluorocromos) - 50 ml

a) Misture 25 ml de tampão McIlvaine pH 7,0 em 25 ml de glicerol para fluorescência (ou glicerol comum).

b) Guarde na geladeira.

Atenção:

◆ Quando esse meio de montagem for usado para lâminas coradas com CMA ele deve conter 2,5 mM de cloreto de magnésio. Para isso, acrescente 0,1017 g de MgCl₂.6H₂O em 100 ml de tampão. Agite bastante e guarde na geladeira.

◆ Esse meio pode ser usado para qualquer fluorocromo, embora apenas para as lâminas coradas com CMA seja importante a presença de cloreto de magnésio.

◆ Todas as soluções de fluorocromos, assim como o meio de montagem, devem ser usados à temperatura ambiente.

6 – Como revelar os filmes fotográficos

Em citogenética, a documentação fotográfica é muito importante para a análise comparada dos resultados e principalmente para a apresentação dos dados. A revelação e cópia dos filmes preto-e-branco é bastante simples e deve ser feita pelo próprio pesquisador ou por pessoal especializado nesse tipo de fotografia.

A qualidade do filme depende fundamentalmente do tamanho médio dos grãos de prata, que definem sua sensibilidade indicada por uma unidade padrão denominada ASA ou ISO. Como as marcas de filmes fotográficos disponíveis no comércio mudam com o lugar ou o tempo, é mais importante considerar a sensibilidade do filme adequado para cada situação. Filmes com grãos muito finos (ASA 25, por exemplo) apresentam baixa sensibilidade à luz e exigem um tempo de exposição fotográfica relativamente longo. Esses filmes apresentam um alto contraste e são indicados para a microscopia de campo claro em geral. Por outro lado, filmes com grãos mais grossos (ASA 400, por exemplo) possuem maior sensibilidade à luz e necessitam um tempo de exposição menor para sensibilizar (queimar) adequadamente todos seus grãos. Estes filmes apresentam um menor contraste e podem produzir imagens “granuladas”. Apesar dessas desvantagens, são muito recomendados para fotografar cromossomos corados com determinados fluorocromos, como o CMA ou o FITC, que perdem o brilho rapidamente quando expostos à luz ultravioleta. Fluorocromos que não perdem o brilho com a exposição, como o DAPI em uma coloração cromossômica direta, podem ser fotografados com filmes de baixa sensibilidade.

A sensibilidade da maioria dos filmes pode ser um pouco alterada, modificando-se o tempo de exposição e o processo de revelação. Além disso, alguns filmes, como o Kodak Technical Pan, possuem sensibilidade variável, podendo ser utilizados para alto e baixo contraste, dependendo da revelação utilizada. Assim, é possível utilizar esse filme tanto para ASA 25 quanto para ASA 400.

Os papéis fotográficos também podem apresentar alto ou baixo contraste. Em geral, utiliza-se papéis de alto contraste, mas papéis de baixo contraste também são muito úteis para amenizar o contraste excessivo de determinados filmes negativos. Alguns papéis podem ter seu contraste ajustado mediante o uso de filtros acoplados à ampliadora fotográfica.

Abaixo estão indicados alguns tipos de reveladores, fixadores e filmes comumente utilizados para fotografia em preto-e-branco. Outros filmes, com idêntica sensibilidade, poderão ser utilizados e revelados de maneira similar.

6.1 - Reveladores e fixadores mais comuns

6.1.1 - Revelador Dektol - 1 litro de solução estoque

- a)** Prepare um litro de solução estoque de revelador Dektol (Kodak) segundo instruções na embalagem.

- b)** Prepare um litro de solução de uso diluindo a solução-estoque em água de torneira na proporção de 1 de revelador para 2 de água.
- c)** Mantenha ambas as soluções na geladeira.

Atenção:

◆ O volume a ser utilizado depende das dimensões do tanque de revelação. Em geral, 300 ml são suficientes para mergulhar completamente o filme no revelador. Essa solução deve ser preparada na quantidade necessária para uso e guardada em recipiente separado para ser reutilizada.

6.1.2 - Revelador Microdol – 1 litro de solução estoque

- a)** Prepare um litro de solução estoque do revelador Microdol (Kodak) segundo instruções na embalagem e mantenha na geladeira.
- b)** Prepare a solução de uso diluindo o estoque na proporção 1:3 (75 ml da solução estoque + 225 ml de água).

6.1.3 - Revelador HC-110 (para filme de ASA 400)

a) Solução estoque:

- Dissolva a solução de HC-110 (Kodak) em água de torneira na proporção de 1:3 (100 ml de revelador em 300 ml de água).

b) Solução para uso:

- Dissolva a solução estoque na proporção de 1:7 em água.

6.1.4 - Fixador universal - 1 litro

- a)** Dissolva 200 g de hipossulfito de sódio e 20 g de metabissulfito de potássio em cerca de 800 ml de água de torneira em um bêquer de 1 litro. Agite com um bastão de vidro ou em um agitador magnético.
- b)** Após completa dissolução dos cristais acrescente mais água, até completar 1 litro.

Atenção:

◆ Esse fixador é dito universal por ser utilizado para qualquer tipo de filme ou papel fotográfico. Como o produto é relativamente barato, na maioria dos laboratórios esse fixador é comprado pronto e dissolvido conforme indicações na embalagem.

◆ Para a fixação de filmes, o fixador deve ser usado apenas uma vez. Esse mesmo fixador poderá ser estocado em garrafa apropriada e reutilizado várias vezes na fixação de papel fotográfico até apresentar turbidez ou coloração mais escura.

6.2 - Cuidados com os reveladores e fixadores

a) Reveladores e fixadores devem ser guardados na geladeira e substituídos quando apresentarem coloração amarelo-escura, turbidez ou precipitação.

b) Certifique-se de que os frascos onde armazena essas soluções fiquem sempre bem fechados. O contato com o ar oxida mais rapidamente essas soluções diminuindo sua vida útil.

c) O revelador Dektol, utilizado na revelação de filme Copex ou Imagelink, pode ser reutilizado várias vezes, desde que não apresente alteração visível. Para revelação de papel fotográfico, pode-se usar um revelador já utilizado para filme, uma vez que na revelação do papel o tempo de revelação é controlado visualmente. Em todo caso, o revelador deve ser substituído sempre que o tempo de revelação do papel se tornar mais longo que o usual.

d) É recomendável dispor ao menos das seguintes soluções de uso em garrafas etiquetadas: 1) Revelador para filme de ASA 25; 2) Revelador para filme de ASA 400; 3) Revelador Dektol para papel; 4) Fixador para filme; 5) Fixador para papel.

6.3 - Revelação dos filmes mais comumente utilizados

6.3.1 - Filme Copex Pan Agfa ou Imagelink Kodak (ASA 25)

a) Revele em Dektol por 5 a 6 minutos (testar) à temperatura de 18 °C, virando o tanque a cada ½ minuto ou agitando freqüentemente o tanque de revelação. Devolva o revelador para a garrafa de revelador usado.

b) Encha o tanque com água de torneira, agite bastante e elimine a água.

c) Fixe por 15 minutos e lave por 1 hora em água corrente.

Atenção:

- ◆ Esses filmes não são específicos para ASA 25, mas produzem bons resultados quando revelados nas condições indicadas acima.
- ◆ A tonalidade desse filme, como de qualquer outro, pode ser intensificada modificando-se cuidadosamente o tempo ou a temperatura de revelação.
- ◆ Pode também ser usado o *revelador HC-110* da Kodak, diluído em água de torneira na proporção de 1:50 (v/v). O tempo de revelação é de 12 minutos a 20 °C, agitando a intervalos regulares. Esse revelador deve ser usado uma só vez e jogado fora.

6.3.2 - Filme T-Max ou Tri-X Pan Kodak (ASA 400)

a) Revele o filme no Microdol a 24 °C, virando o tanque a cada $\frac{1}{2}$ minuto ou agitando freqüentemente o tanque de revelação durante 14 a 16 minutos (testar). Pode também utilizar o HC-110 a 21 °C por 7 minutos e meio. *Após o uso, descarte o revelador*, encha o tanque de revelação com água de torneira e agite fortemente.

b) Retire a água e acrescente o fixador universal por 15 minutos à temperatura ambiente.

c) Remova o fixador e lave por 1 hora em água corrente.

6.3.3 - Filme Panatonic X ou T-Max Kodak (ASA 100)

- Procedimento igual ao indicado para filmes de ASA 400, apenas o tempo de revelação deve ser alterado, passando a ser de 6 minutos a 20 °C.

7 - Como organizar melhor seu laboratório e apresentar seus resultados

Antes de encerrar essa primeira parte, deixamos algumas sugestões de ordem prática, visando a auxiliar na rotina do laboratório e na organização e apresentação dos dados obtidos.

Diferentes laboratórios têm encontrado as mais diversas soluções para trabalhar com maior eficiência, evitando desperdício de material e contornando pequenos problemas. O pesquisador não deve sentir-se desconfortável por precisar improvisar para contornar a falta de determinados equipamentos ou vidrarias apropriadas, *desde que isso não comprometa a qualidade e fidelidade dos resultados obtidos*. Em muitos dos laboratórios mais produtivos são freqüentes o improviso e as medidas para diminuir os gastos. Uma atenção especial deve ser dada ao registro fotográfico, que na citogenética atual é muito importante e nem sempre os iniciantes se apercebem dos cuidados que precisam tomar. Freqüentemente, só se percebe os cuidados que devem ser tomados com o registro fotográfico no momento da publicação ou anos depois, quando se precisa de uma foto original para ilustrar determinado tema. Abaixo estão indicadas algumas soluções encontradas na rotina do nosso laboratório que poderão ser úteis para aqueles que estão se iniciando na pesquisa em citogenética vegetal ou animal.

7.1 - Cuidados gerais com os protocolos

A maioria das técnicas bem estabelecidas, como as colorações convencionais, funcionam muito bem em praticamente qualquer material e em qualquer laboratório, enquanto técnicas como o bandeamento C podem exigir algum ajuste. Em princípio, deve-se sempre seguir fielmente o protocolo e não considerar que a técnica não funciona para determinado material antes de repetí-la ao menos três vezes ou com alguém com experiência nessa técnica. Lembre-se que a maioria das técnicas exige um mínimo de prática e várias não têm 100% de repetibilidade. *Caso necessite fazer ajustes, altere apenas uma etapa de cada vez* (por exemplo, apenas o tempo de envelhecimento da lâmina, no bandeamento C).

Alguns autores descrevem, na metodologia empregada, infundáveis detalhes, como numerosas lavagens, frações de tempo e temperatura muito precisas, produtos de marca e estoques específicos, etc, parecendo assim extremamente meticulosos. Essas variantes técnicas muito minuciosas raramente foram definidas com base em experimentos adequadamente controlados e repetidos, e só muito raramente têm alguma importância para a repetição da técnica por outro pesquisador.

Assim, para a rotina do laboratório, procure sempre as alternativas de protocolo mais simples, tornando sua rotina mais ágil e produtiva. Por exemplo, a solução de Giemsa normalmente pode ser preparada com água destilada, evitando, nesse caso, ter que preparar tampão fosfato. Entretanto, se ao tentar dessa forma uma técnica já conhecida, não obtiver bons resulta-

dos, volte ao protocolo com o máximo de rigor, procurando inclusive utilizar soluções químicas novas e de qualidade comprovada.

7.2 - Preparação da bancada

Antes de iniciar o trabalho, verifique se tudo o que vai precisar (banho-maria a 60 °C, solução de uso do tampão, nitrogênio líquido, corante, etc) está disponível, em quantidade suficiente e em bom estado de uso. Cada pesquisador deve possuir seu próprio estojo com o “kit” básico para preparar lâminas contendo ao menos agulhas (seringas de insulina são muito boas) ou estiletes, pinça fina, bloco de papel filtro, placa escura (muito útil para preparar lâminas sem coloração), caneta para retroprojetor, etc. Limpe com álcool todas as lâminas e lamínulas que vai utilizar e equipe a bancada ou o seu espaço de trabalho com tudo o que vai precisar. Uma tábua de madeira, com aproximadamente um centímetro de espessura, por oito de largura e 15 de comprimento, contendo ranhuras inclinadas, fundas e paralelas, é muito útil para apoiar convenientemente as lâminas e lamínulas limpas e para secar ao ar as preparações após a retirada da lamínula.

7.3 - Anotações gerais no laboratório

É muito importante ter ao menos três cadernetas no laboratório: uma para técnicas, outra para resultados e uma terceira para anotar coordenadas do microscópio. Na *caderneta de técnicas*, deve ser anotado exatamente como as técnicas foram feitas (há sempre uns detalhes não previstos nos protocolos e algumas modificações sugeridas por diferentes autores). Essa caderneta deve ainda conter informações sobre os produtos e equipamentos utilizados (marca, modelo, capacidade, fórmula química, etc). Essas informações poderão ser muito úteis meses ou anos depois.

A *caderneta de resultados* deve conter todas as observações diárias da pesquisa. É aconselhável colocar *data em tudo o que fizer* (nas cadernetas, nas etiquetas de fixação, nos vidros de soluções, nas lâminas, nos filmes, etc). Além de indicar quando foi realizado cada procedimento, essa “rede” de datas pode ajudar a reconstituir situações e evitar pequenas falhas de anotações. Uma regra fundamental no laboratório é *nunca delegar à própria memória a função de guardar quaisquer dados*.

A *caderneta de coordenadas* contém apenas as coordenadas das células analisadas, com indicações ao lado ajudando a reconhecer a célula ou chamando a atenção para algum detalhe. Observe que as coordenadas de um *charriot* (as duas réguas atrás e ao lado da lâmina no microscópio) só valem para aquele microscópio. Portanto, é necessário anotar também em qual microscópio foram feitas as coordenadas.

Para aqueles trabalhos que incluem coletas de plantas no campo, é muito importante ter ainda uma *caderneta de registro de plantas*, contendo todos os dados relativos à planta e local de coleta, além da data e nome do coletor (raramente o autor do trabalho é o coletor de todas as plantas que analisa). Cada espécie ou população diferente deve receber um número diferente. Indivíduos diferentes da mesma população devem ter o mes-

mo número seguido do numeral 1, 2, etc, separados por barra ou traço. Esse número deve ser o mesmo contido na etiqueta de fixação e deve constar nas lâminas que forem preparadas desse material.

7.4 - Reutilização de lâminas e lamínulas

Lâminas e lamínulas podem ser reutilizadas diversas vezes, exceto se contiverem falhas ou arranhões. Cada pesquisador deve ter seu próprio frasco para lamínulas usadas, assim cada um controla melhor a qualidade de seus materiais. As lâminas usadas podem ser mantidas em álcool em um depósito etiquetado de uso comum do laboratório. Isso se aplica principalmente a lâminas que não foram montadas em meio rígido, como o bálsamo do Canadá ou similares. Embora esses meios possam ser removidos em xanol, o trabalho e a qualidade da lâmina resultante nem sempre compensam. Para técnicas que envolvem muitas etapas e/ou não apresentam repetibilidade de resultados elevada, como o bandeamento C, por exemplo, é recomendado o uso de lâminas e lamínulas novas, exceto se essas técnicas já forem bem dominadas pelo pesquisador.

7.5 - Descarte de ácidos e substâncias tóxicas

As soluções ácidas mais freqüentemente utilizadas na citogenética vegetal (ácido acético a 45%, fixador Carnoy, HCl 5N e 1N) não devem ser descartadas na pia, mas sim estocadas em garrafas de vidro de 1 litro, bem fechadas, e posteriormente descartadas em local de difícil acesso à rede fluvial. Antes de ser descartada, essa mistura de ácidos pode ser utilizada na limpeza de vidrarias e na inativação de substâncias tóxicas. Toda a vidaria em contato com corantes, hidróxido de bário e outras substâncias que aderem ao vidro, pode ser mais facilmente limpa se passada primeiramente em uma solução ácida. Igualmente, substâncias muito tóxicas, como a 8-hidroxiquinoleína e os fluorocromos, não devem ser descartadas diretamente na pia, mas primeiramente misturados com ácidos, para perderem a atividade, e depois descartados longe da rede fluvial.

Além dessas garrafas, é importante ter também no balcão um ou dois recipientes de vidro de boca larga, com tampa e capacidade para cerca de 2 a 3 litros. Esses depósitos são úteis na retirada das lamínulas com fluorocromos ou com hematoxilina, utilizando um jato de água, como por exemplo nos procedimentos **3.3.2** e **4.3**. É preferível ter um depósito de descarte só para fluorocromos em geral. Antes que esse depósito chegue na metade de sua capacidade deve ser acrescido de igual volume da mistura ácida e posteriormente descartado. As lamínulas acumuladas no fundo desse depósito não devem ser reutilizadas, exceto se extensamente lavadas em água corrente.

7.6 - Conservação de corantes e lâminas coradas

Todos os corantes devem ser guardados em vidro escuro. As lâminas coradas também devem ser guardadas em caixas apropriadas, igualmente

protegidas da luz. A exposição à luz contribui fortemente para descorar os pigmentos em geral, ligados aos cromossomos ou a qualquer outra estrutura. O meio de montagem e a temperatura elevada também contribuem para descorar o Giemsa (corantes acéticos são muito menos sensíveis). Alguns meios de montagem, como o Entellan, descoram menos o Giemsa. As lâminas que se deseja guardar por muito tempo, podem ser melhor conservadas em uma caixa de lâminas na geladeira.

7.7 - Observação de uma célula em diferentes microscópios

Para localizar em um microscópio as células observadas em outro microscópio, é necessário usar uma lâmina acessória com a posição da célula marcada, uma vez que as coordenadas do ‘charriot’ são diferentes para cada microscópio. Para isso, deve-se utilizar uma *lâmina branca* ou similar. A lâmina branca é uma lâmina comum de microscopia com uma fita de papel branco colada em cima.

Para marcar a posição de uma célula na lâmina branca localize primeiro a célula no microscópio, substitua essa lâmina pela lâmina branca, feche o diafragma do condensador (localizado logo abaixo da lâmina) deixando apenas um ponto de luz no papel e, com um grafite, faça um ponto no centro da área iluminada. Volte novamente para a preparação e certifique-se de que aquele ponto está corretamente marcado e que não houve deslocamento do ‘charriot’. Leve a lâmina branca para outro microscópio, feche o diafragma e coloque o ponto preto no centro da área iluminada no papel da lâmina. Certifique-se, com a objetiva de menor aumento, de que o ponto preto esteja exatamente no centro do campo. Nesse caso, substitua a lâmina branca pela preparação com a célula, abra o diafragma do condensador e localize a célula. Em todo esse procedimento, é fundamental que a lâmina tenha sido sempre colocada bem encostada no ‘charriot’, caso contrário será difícil reencontrar a célula.

Cada lâmina branca pode conter vários pontos, identificados por letras ou números. Alternativamente, pode-se utilizar uma lâmina especial, denominada ‘England finder’, contendo uma gravação no vidro com uma série de letras e números muito pequenos. Substituindo-se a lâmina da preparação pela ‘England finder’ é possível fazer uma descrição segura da posição da célula na lâmina, a qual poderá ser localizada em qualquer outro microscópio. Essa lâmina tem como única desvantagem o preço elevado. As lâminas brancas podem ser preparadas utilizando lâminas que não servem mais para ser reutilizadas.

7.8 - Cuidados com a fotografia

Para fotografar em cores, principalmente células coradas com Giemsa, é preferível fazer a foto no mesmo dia da coloração. Após poucos dias as cores podem ficar menos vivas ou mesmo descoloradas. Fotos coloridas devem ser feitas com filtro neutro, azul-claro. *Nunca use filtro verde ou de outra cor para fotos coloridas*. Fotos em preto e branco ficam geralmente melhor contrastadas com filtro verde, especialmente quando os cromosso-

mos estão corados em vermelho ou uma cor próxima a esta. Se os cromossomos tiverem coloração azulada, o contraste com o filtro verde poderá ser inferior ao esperado. Nesse caso, o contraste dos cromossomos poderá ser melhorado utilizando um filtro amarelo ou alaranjado. Como o filme tem sensibilidade diferente a cores diferentes, o tempo ideal de exposição do filme deverá ser testado, ajustando a máquina fotográfica para diferentes valores de ASA, até obter o mesmo tom de preto e branco que obtinha nas demais fotos. É importante lembrar que o que aparece bem contrastado para a nossa vista não é necessariamente o que produz melhor contraste no filme fotográfico.

7.9 - A escolha dos filmes

Filmes de baixa sensibilidade (ASA 25 ou 32) produzem, em geral, fotos mais contrastadas com qualquer tipo de coloração. Entretanto, trabalhando com fluorocromos que perdem o brilho rapidamente quando expostos à luz ultravioleta, como por exemplo a cromomicina A, deve-se utilizar de preferência filmes com grãos de prata mais grossos e mais sensíveis (ASA 400 ou mais), que exigem um tempo muito menor de exposição. A imagem obtida com esses filmes pode ser um pouco granulada, mas o resultado é quase sempre melhor do que com filmes de baixa sensibilidade. O tempo de exposição ideal, para fotografia em ultravioleta, depende do tipo de fluorocromo usado, da intensidade da coloração e do tamanho dos cromossomos. Portanto, esse tempo geralmente tem que ser determinado experimentalmente, usando o controle manual do sistema fotográfico. Com a prática, se adquire uma noção do tempo aproximado para cada situação. Os filmes coloridos, negativos (para impressão em papel) ou positivos (para eslaides), mais comumente usados são os de ASA 100 e 400, para microscopia de campo claro e fluorescência, respectivamente. O tempo ideal de exposição para uma determinada célula é o mesmo com filme preto-e-branco ou colorido, desde que a ASA seja a mesma.

7.10 - Organização da documentação fotográfica

É fundamental que os resultados obtidos durante a pesquisa sejam constantemente organizados para permitir uma análise final dos dados de maneira fácil e correta. Para isso, certifique-se de que os filmes negativos estejam adequadamente guardados e identificados, protegidos de umidade e poeira. Faça uma cópia pequena de cada negativo, cole as fotos numa folha de papel branco (de preferência papel 40 kg) e *anote todos os dados importantes do material*, ao lado ou em cima de cada foto, destacando as particularidades enfocadas (satélites, regiões heteropiconóticas, bandas, etc). É mais rápido e mais econômico fazer uma cópia de todos os negativos de um filme em uma única folha de papel fotográfico. Para isso, os negativos devem ser organizados em cima de uma folha de papel fotográfico, coberto com um vidro limpo e sem arranhões e exposto à luz da ampliadora por um tempo previamente testado em um dos negativos. Essa cópia lhe dará uma boa idéia de suas fotos, embora uma ou outra foto deva ser ampliada para visualização de algum detalhe.

Não acumule filmes que não foram revelados e/ou copiados. Observe nas cópias se há alguma sujeira nas lentes do microscópio que deva ser removida. Verifique nas fotos que têm grande chance de virem a ser publicadas, se há alguma falha que possa ser evitada ou se seria possível melhorar o contraste ou a centralização da célula. Algumas semanas após, poderá ser impossível refazer as fotos para corrigir pequenas falhas.

7.11 - Seleção de fotos para publicação

Selecionar fotos para uma publicação pode parecer uma tarefa simples mas exige bastante atenção, uma vez que além do conteúdo técnico as fotos devem apresentar também uma estética própria da citogenética. A seleção de fotos deve se basear nos seguintes princípios: a) as fotos devem ilustrar claramente os resultados relatados; b) os cromossomos devem ter o mínimo de superposição e permitir visualizar bem as constrições; c) os cromossomos devem *prioritariamente estar bem focados, nítidos e bem contrastados* contra um fundo branco ou gelo (fotos de fluorescência devem ter um fundo preto *uniforme*, mas o mais importante é que os cromossomos e as bandas estejam bem visíveis e contrastados); d) fotos que apresentem algum tipo de “sujeira” (cromossomos de outra célula, poeira nas lentes do microscópio, bolhas de ar, etc) devem ser sistematicamente evitadas. Fotos com cromossomos desfocados ou fundo muito escuro, embora possam ser devidas às condições técnicas de que se dispõe, desvalorizam muito o trabalho e são geralmente interpretadas como desleixo e imperícia do autor.

7.12 - Montagem de fotos em uma prancha

A montagem de uma prancha pode demorar horas e exige um certo planejamento. Antes de cortar as fotos para a prancha considere as seguintes sugestões: a) desenhe numa folha de papel branco um retângulo da prancha nas dimensões desejadas ou permitidas pelo veículo de publicação; b) divida a prancha no número de retângulos correspondentes às fotos que pretende incluir, sempre que possível, em espaços regulares, procurando preencher toda a prancha; c) use uma ampliação suficiente para mostrar bem seus resultados. Ampliações excessivas, além de freqüentemente diminuírem a nitidez das fotos, não são bem vistas pelos editores (a reprodução fotolítica é a parte mais cara da publicação); d) procure apresentar todas as fotos numa mesma ampliação, mesmo quando a revista não impõe essa restrição; e) evite cortar as fotos muito próximo aos cromossomos. Isso atrapalha a individualização de cada foto dentro da prancha e causa a sensação de que o autor procurou retirar no corte outros cromossomos ou imperfeições ao lado da célula; f) ao colocar a foto na prancha, escolha a melhor posição da foto, certificando-se de que o canto onde aparecerá a letra ou número da foto esteja limpo, garantindo sua perfeita visualização; g) sempre que possível, utilize uma única barra de escala para toda a prancha. A barra de escala deve ter um tamanho próximo ao dos cromossomos apresentados; h) letras, setas e outros acréscimos na foto

devem ter um tamanho discreto, que não chame mais a atenção para si do que para os cromossomos. Evidentemente, nem sempre se consegue preencher todos esses requisitos.

Alguns periódicos solicitam que as fotos sejam enviadas soltas e não montadas em pranchas. Mesmo assim, é preferível simular a montagem completa das fotos e enviar as fotos soltas, cortadas no tamanho certo e numeradas no verso.

Um bom truque para cortar as fotos, corretamente enquadradas e nos tamanhos certos, é utilizar como referência a própria folha de papel com as divisões em retângulos (itens **a** e **b** anteriores). Para isso, fixe a folha com os retângulos no vidro de uma janela bem iluminada ou em um megatoscópio (caixa com lâmpadas fluorescentes coberta com uma tampa de vidro fosco) e sobreponha a foto que deseja cortar em cima do retângulo correspondente, ficando o verso da fotografia voltado para o observador. O retângulo de papel e a imagem dos cromossomos devem ficar simultaneamente visíveis, permitindo enquadrar corretamente a foto no retângulo. Agora, com o auxílio de pequenas etiquetas autocolantes ou fita adesiva, fixe a foto em cima do papel, na posição ideal. Com a juda de uma régua ou esquadro, desenhe o retângulo no verso da foto. Leve a foto para a guilhotina e recorte-a com cuidado. Para produzir um corte absolutamente seguro com a guilhotina, coloque a foto com as marcas do retângulo para baixo e, com um espelho debaixo do local de corte da guilhotina, ajuste as marcas da foto precisamente em cima da linha de corte. Nas fotos de fluorescência, com fundo preto, é impossível visualizar as linhas do retângulo. Nesse caso, é preferível sobrepor o retângulo em cima da foto e marcar os quatro cantos do retângulo furando com uma agulha. A partir desses furos, é possível reconstruir o retângulo e cortar corretamente.

PARTE II

**CITOGENÉTICA
ANIMAL E HUMANA**

8 - Como observar cromossomos mitóticos em insetos

Estudos citogenéticos em insetos têm contribuído de forma significativa para o entendimento de diferentes aspectos envolvendo características numéricas, morfológicas, estruturais, diferenciação e movimento cromossômico durante os processos de mitose e meiose, além de esclarecer eventos cromossômico-evolutivos nesse grupo de organismos.

Entre os insetos, os gafanhotos oferecem um dos melhores materiais para estudo de mitose e especialmente da meiose. Esses animais de fácil obtenção, são encontrados em qualquer área com gramíneas ou campos abertos. São de fácil coleta, podendo ser capturados com redes entomológicas ou mesmo manualmente. Seus cromossomos são grandes e a maioria das espécies possui cromossomos acrocêntricos e números diplóides de $2n=23$ X0, nos machos, e $2n=24$ XX nas fêmeas. Além disso, são portadores de diferentes tipos de rearranjos cromossômicos e muitas espécies apresentam grande variabilidade de heterocromatina constitutiva. As técnicas usadas para obtenção de cromossomos meióticos de gafanhotos podem ser também utilizadas em outros grupos de insetos, como coleópteros e hemípteros. A análise de cromossomos mitóticos de diferentes grupos de insetos e de gafanhotos, em particular, pode ser feita a partir de células de embriões (material de melhor qualidade), células de cecos gástricos de adultos, células de parede de ovariolos e também células espermatogoniais. No caso de gafanhotos, para obtenção de embriões, fêmeas e machos adultos devem ser coletados e mantidos em cativeiro.

8.1 - Manutenção de gafanhotos em cativeiro

Para manutenção dos animais, use caixa modelo de madeira (*Figura 11a*), onde se coloca um recipiente contendo areia ou vermiculita (material de origem mineral micáceo) para que a postura seja feita (*Figura 11a-b*). Na seleção dos indivíduos, exemplares machos poderão ser reconhecidos com auxílio de lupa, pela ausência do ovopositor (modificação especial dos três últimos somitos abdominais usados para a postura) (*Figura 12a*), existente na fêmea. É conveniente deixar fêmeas e machos adultos juntos para que possam continuar cruzando (pode-se colocar um macho para cada duas fêmeas) e, assim, facilitar a realização de posturas (= ootecas). Devem ser mantidos, em cada compartimento da caixa modelo (45 x 40 x 13 cm), um máximo de 8 indivíduos. Em geral, as posturas (envolvidas por uma camada de material espumoso) são feitas dentro do recipiente contendo vermiculita, localizado no piso da caixa (*Figura 11a*). Eventualmente, em cativeiro, as fêmeas podem fazer a ovoposição nas paredes ou piso da caixa e também na vegetação (folhas de couve, gramíneas, etc), colocada como alimento. Os ovos assim depositados também são usados para obtenção de embriões. As caixas, devem ser colocadas em local arejado e ensolarado pelo menos por 3 a 5 horas por dia. Além disso, devem ser

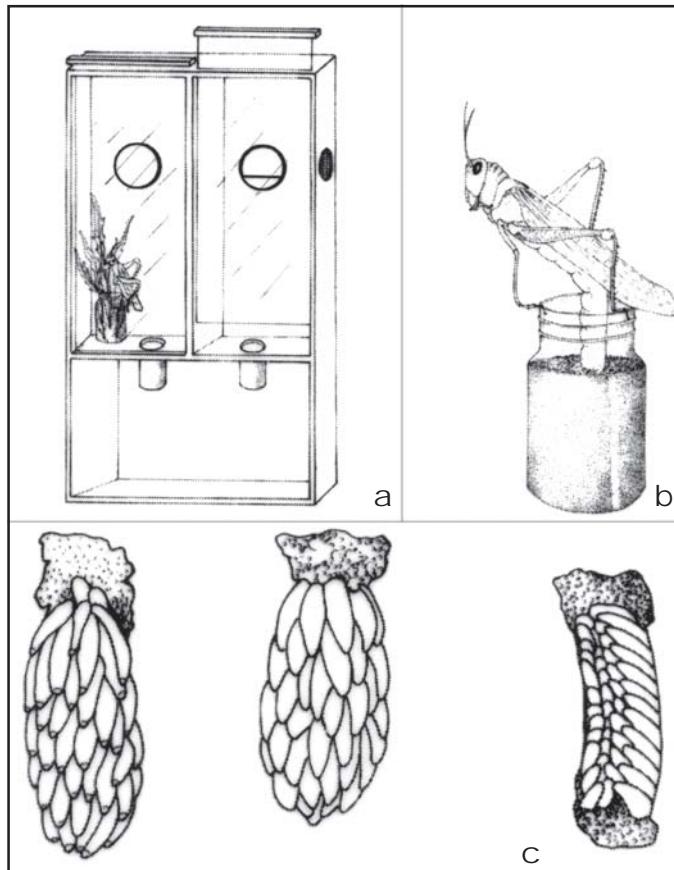


Figura 11 Caixa modelo (a) usada para manutenção de gafanhotos em cativeiro; (b e c) esquema representativo da postura de fêmea e diferentes formas de ootecas, respectivamente; Nota: medidas da caixa modelo (42x40x13cm).

observadas diariamente, tanto para a realização da limpeza, como para a retirada e incubação dos ovos. Na maioria das espécies de acridídeos, os ovos têm forma alongada e cor esbranquiçada ou amarelo claro.

O conhecimento prévio da biologia reprodutiva da espécie escolhida para a obtenção de embriões é extremamente importante. Espécies cujos períodos de incubação dos ovos são muito longos (mais de 60 dias) são de difícil manejo, especialmente por proliferação de fungos e ácaros que atacam os ovos, afetando o desenvolvimento embrionário. Para incubar os ovos, use uma placa de Petri de tamanho médio (10 cm de diâmetro), contendo preferencialmente vermiculita. Os ovos devem ficar cobertos pela vermiculita levemente umedecida e a placa de Petri colocada na estufa a 30 °C. Experimentos realizados com espécies dos gêneros *Rhammatocerus*, *Schistocerca* e *Abracris* mostraram que ovos incubados numa temperatura de 30 °C, após um período de 10 a 13 dias fornecem embriões (Figura 12c) em bom estágio de desenvolvimento, sendo adequados para a realização das preparações citológicas.

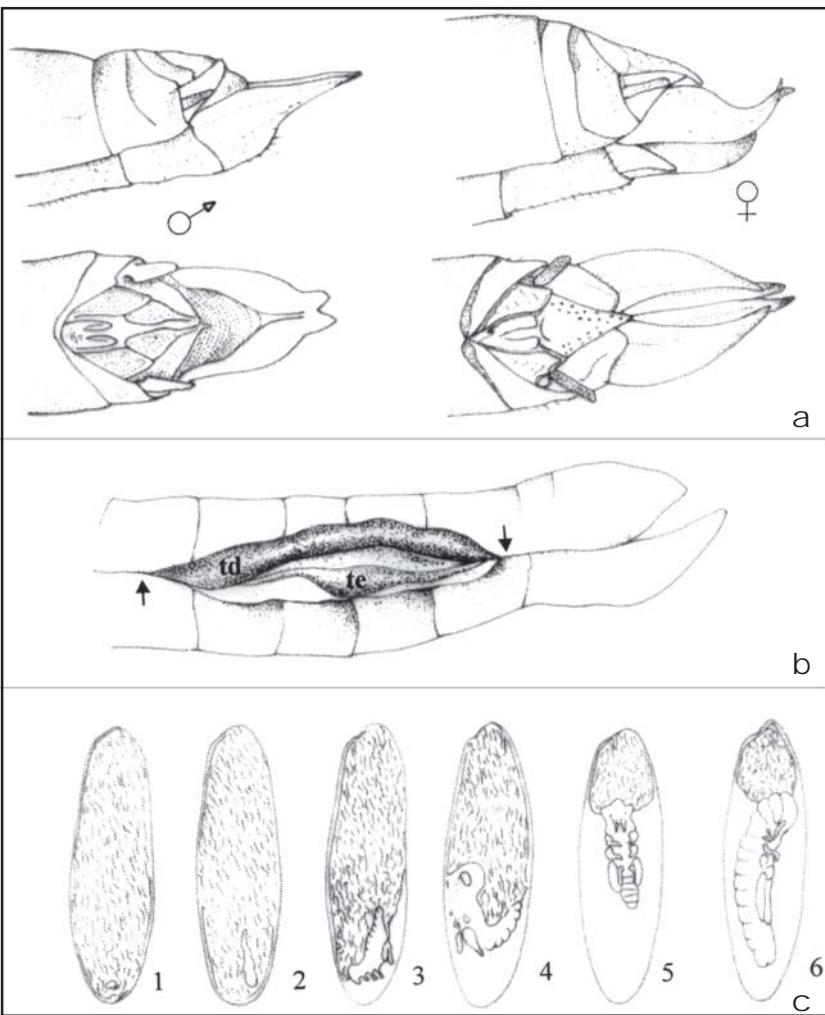


Figura 12 Exemplo esquemático da extremidade abdominal em gafanhotos fêmeas e machos (a) permitindo a distinção do sexo. (b) Corte abdominal para a retirada do testículo ou ovário. (c) Representação esquemática em diferentes estágios de desenvolvimento de embriões de gafanhoto. Os estágios 3 e 4 são mais adequados para fazer as preparações citológicas (td=tubo digestivo; te=testículo ou ovário)

8.2 - Obtenção de embriões

As ootecas devem ser coletadas da vermiculita e transferidas imediatamente para uma placa de Petri. A vermiculita deve ser umedecida. Depois de incubados por 10 a 13 dias a 30 °C, transfira os ovos, em lotes de 5, para uma pequena placa de Petri com 5 cm de diâmetro. Use um pincel pequeno de pêlos finos e delicados para retirar cuidadosamente os resíduos de vermiculita dos ovos. Depois de limpos (*Figura 11c*) os ovos são transferidos para outra pequena placa contendo 5 ml de solução de Ringer. Use uma pinça de ponta bem fina para prender cada ovo por uma das extremidades e faça um pequeno corte com uma tesoura de ponta fina na extremidade

oposta. Uma leve pressão com a pinça expulsará o embrião de dentro do ovo, o qual será facilmente reconhecido pela morfologia e cor esbranquiçada, diferente do vitelo de cor amarelada. Repita esse procedimento para obter os demais embriões. Retire toda a solução de Ringer usando uma pipeta Pasteur. Retire também as “cascas” vazias dos ovos. Adicione 3 ml de colchicina (0,01%) diluída em solução salina para insetos. Deixe por 45 minutos à temperatura ambiente. Retire a solução de colchicina com uma pipeta Pasteur. Adicione 3 ml de água de torneira para fazer a hipotonização. Deixe por 5 minutos. Retire a água de torneira usando pipeta Pasteur. Adicione 3 ml de fixador (etanol-ácido acético 3:1). Após 15 minutos de fixação os embriões ficam mais “rígidos”, o que facilita a manipulação. Transfira os embriões, em lotes de 10, para um pequeno tubo Eppendorf contendo 2 ml de fixador novo. Nessa condição, podem ser estocados em freezer por um período longo de tempo e utilizados para preparações citológicas sempre que necessário.

8.3 - Preparação de lâmina a partir de embrião total

a) Coloque um único embrião em uma lâmina contendo duas gotas de orceína acética a 2% (para a coloração convencional) ou duas gotas de ácido acético a 45% (caso a lâmina se destine a algum tipo de coloração diferencial - bandas C, coloração com nitrato de prata, etc).

b) Cubra o embrião com uma lamínula e bata levemente com a ponta de um estilete. Verifique a qualidade da preparação no microscópio e, se tiver células bem espalhadas, esmague cuidadosamente a preparação entre lâmina e lamínula envoltas em papel de filtro.

c) Se a lâmina já estiver corada, pode ser diretamente analisada. As melhores células podem ser desenhadas ou fotografadas. As lâminas assim coradas podem ser mantidas em caixas fechadas, colocadas no freezer por um período de até 60 dias sem perder a qualidade de coloração.

d) Se a lâmina for preparada com ácido acético a 45%, a lamínula deve ser retirada no nitrogênio líquido, gelo-seco ou no freezer. A lâmina deve secar ao ar para ser utilizada posteriormente em diferentes técnicas de coloração diferencial.

Atenção:

◆ Caso as lâminas se destinem a colorações especiais (bandas C, coloração com nitrato de prata, fluorocromos, etc.) devem ser mantidas em estufa a 30 °C por um período de 5 a 8 dias. Entretanto, lâminas recentemente preparadas (24 a 48 horas) podem ser usadas para essas colorações. Esses procedimentos também são válidos para as preparações citológicas obtidas de acordo com os itens **8.4** e **8.5**.

◆ Quando necessário, os ovos podem permanecer incubados até que ocorra a eclosão e o surgimento das ninhas de primeiro estágio. Estas ninhas podem ser mantidas em cativeiro até atingirem a fase adulta.

8.4 - Obtenção de cromossomos mitóticos a partir de células de parede de ovaríolos

- a)** Para essa preparação injete colchicina nos animais (solução a 0,1% na proporção de 0,2 ml para cada 5 g de peso, por 6 horas).
- b)** Anestesie, com éter ou clorofórmio, fêmeas adultas ou jovens, previamente colchicinizadas, para fazer as preparações citológicas.
- c)** Disseque a fêmea, sob a lupa, fazendo um corte longitudinal na região dorsal (*Figura 12b*) do abdome, retirando os ovários. No caso de machos, os testículos se encontram na mesma posição. Esse procedimento deve ser realizado com o animal colocado numa placa de Petri de tamanho médio (10 cm de diâmetro), cujo fundo deve ser coberto com uma camada de cortiça. O animal deve estar preso com alfinetes e submerso em solução de Ringer.
- d)** Transfira os ovários para uma pequena placa de Petri (5 cm de diâmetro) contendo 5 ml de água de torneira, para induzir a hipotonização durante 5 minutos.
- e)** Transfira os ovários para uma pequena placa de Petri (5 cm de diâmetro) contendo 5 ml de fixador (etanol-ácido acético 3:1) durante 15 minutos. Para ovários muito volumosos, é conveniente lavar em novo fixador antes de estocar no freezer. Isso irá melhorar as condições de fixação do material.
- f)** Transfira os ovários para um pequeno frasco com tampa contendo 3 ml de fixador fresco e estoque no freezer.
- g)** Para preparar uma lâmina use dois ovaríolos. Descarte os ovócitos mais desenvolvidos de cada ovaríolo, visto que prejudicam a qualidade da preparação pela presença do vitelo. Faça o esmagamento entre lâmina e lamínula, contendo duas gotas de orceína acética a 2%, caso a lâmina se destine à coloração convencional, ou duas gotas de ácido acético a 45%, quando a lâmina se destinar à coloração cromossômica diferencial.

Atenção:

- ◆ As lâminas coradas com orceína podem ser mantidas em caixas fechadas, colocadas dentro do freezer por um período de até 60 dias, sem perder a qualidade de coloração. Esse procedimento também é válido para as preparações meióticas obtidas a partir de células de folículos testiculares.

8.5 - Obtenção de cromossomos mitóticos a partir de células de cecos gástricos (suspenção celular)

- a)** Disseque fêmeas ou machos previamente colchicinizados (solução de colchicina a 0,1% por 6 horas), sob a lupa, mantendo o animal

submerso em solução de Ringer, de acordo com o item **8.4. a-c**. Faça a retirada dos cecos gástricos (*Figura 13*), transferindo-os para uma pequena placa de Petri (5 cm de diâmetro) contendo 3 ml de solução de Ringer.

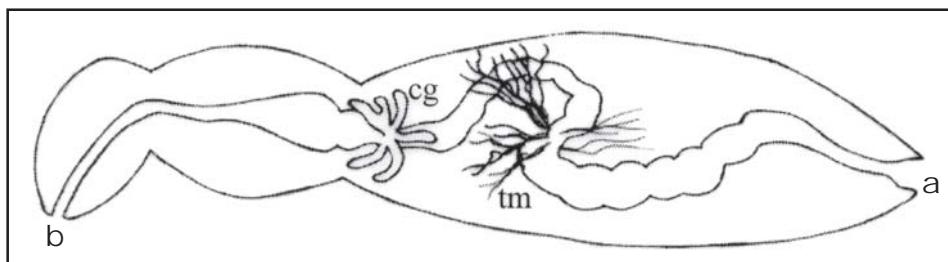


Figura 13 Diagrama do sistema digestivo de um inseto. Nota: b=boca; cg=cecos gástricos; tm=túbulos de Malpighi; a=ânus.

b) Limpe os cecos com auxílio de estilete e pinça, e os transfira para outra placa de Petri contendo 1 ml de Ringer. Corte os cecos em pequenos fragmentos e macere com um bastão de vidro até conseguir uma boa suspensão de células.

c) Transfira a suspensão de células obtida, para um tubo de centrifuga contendo 3 ml de solução hipotônica (KCl 0,075M). Deixe hipotonizar por 15 minutos.

d) Centrifugue o material a 900 rpm durante 5 minutos. Jogue fora o sobrenadante e adicione 3 ml de fixador fresco. Centrifugue, jogue fora o sobrenadante. Repita o processo de fixação por mais duas vezes.

e) Ressuspenda o material em 0,5 ml de fixador fresco. Coloque 2 gotas da suspensão sobre cada lâmina limpa e seca.

f) Para a análise convencional, core a lâmina com Giemsa a 5%, durante 5 minutos. Seque a lâmina e monte em bálsamo do Canadá ou Euparal.

9 - Como observar cromossomos mitóticos humanos e de pequenos mamíferos

Em material humano e de outros mamíferos como roedores, morcegos e marsupiais, os cromossomos metafásicos mitóticos são adequados para análise cariotípica, principalmente pelo seu alto grau de condensação e espalhamento em metáfase. Isso facilita a contagem do número diplóide, a definição de morfologia e a identificação dos cromossomos sexuais (no caso de heteromorfismo do par sexual). Cromossomos mitóticos, obtidos por diferentes técnicas de preparação citológica, podem ser utilizados tanto para análise convencional como para as identificações cromossômicas especiais.

9.1 - Cultivo de linfócitos humanos

A técnica mais usada para estudo de cariotípico humano é o cultivo de linfócitos de sangue circulante periférico. Essa técnica tem a vantagem de oferecer grande número de metáfases em apenas três dias e de eliminar a necessidade de biópsias, como no cultivo de fibroblastos. No cultivo de linfócitos empregue um agente mitogênico, a fitohemaglutinina, que estimula a atividade mitótica e tem ação aglutinante sobre as hemácias. Nesse cultivo, use apenas 1 ml de plasma. Para evitar contaminação do material, todo o processo, desde a obtenção do sangue até o tratamento com colchicina, deve ser feito sob a mais completa condição de assepsia. Toda a manipulação com o meio de cultura, o soro bovino fetal e o sangue, deve ser feita em fluxo laminar. No caso de cultivo de linfócitos de pequenos mamíferos, a diferença consiste apenas no tempo de cultivo (de 72 a 96 horas) devendo esse tempo ser testado para cada espécie.

Existem basicamente duas técnicas para cultivo de linfócitos humanos: a macrotécnica e a microtécnica. A diferença entre elas, é que na primeira coleta-se um volume maior de sangue (5 ml) e as hemácias são excluídas por sedimentação, enquanto na segunda o volume de sangue é menor (0,2 ml) e trabalha-se com o sangue total. A microtécnica pode ser utilizada para análise cariotípica de recém-nascidos. O cultivo de linfócitos segue a técnica de Moorhead et al. 1960, com algumas modificações.

9.1.1 - Macrotécnica para cultivo de linfócitos

- a)** Com uma seringa previamente umedecida de heparina, colete 5 ml de sangue.
- b)** Deixe a seringa em posição vertical com a agulha para cima até que com a sedimentação das hemácias, os linfócitos sejam separados no plasma sobrenadante.
- c)** Transfira 1 ml do plasma, com a própria seringa, para um frasco de

cultura contendo 10 ml de meio completo (meio RPMI 1640 da Sigma), contendo 0,2 ml de fitohemaglutinina (preparada conforme indicado pelo fabricante). Esse meio deve estar suplementado com 20% de soro bovino fetal. Adicione os antibióticos Penicilina (10.000U/ml), Estreptomicina (10 mg/ml) e, também, a Glutamina-A (29 mg/ml). Feche bem o frasco, coloque etiqueta de identificação e deixe na estufa a 37 °C, por 72 horas.

d) Após 71 horas de cultivo, adicione 3 gotas de colchicina 0,0016% e deixe por 1 hora.

e) Ao completar 72 horas de cultivo, transfira o material para um tubo de centrifuga e centrifugue a 900 rpm durante 5 minutos. Elimine o sobre-nadante sem agitar o sedimento celular.

f) Coloque 5 ml de solução hipotônica (KCl 0,075M), homogeneize e deixe na estufa a 37 °C por 10 minutos.

g) Centrifugue o material por 5 minutos a 900 rpm, elimine o sobre-nadante, coloque 5 ml de fixador (metanol-ácido acético, 3:1) e homogeneize. Repita este procedimento duas vezes.

h) Ressuspenda o sedimento em 0,5 a 1 ml de fixador fresco e pingue duas gotas da suspensão em cada lâmina. Para obter uma lâmina de melhor qualidade, o material deve ser pingado, em lâmina extremamente limpa e inclinada, a uma distância de mais ou menos 30 cm. Deixe secar a lâmina.

i) Identifique cada lâmina com lápis diamante ou caneta para retroprojetor.

j) Core cada lâmina com Giemsa a 5%, durante 5 minutos, caso a lâmina se destine a análise convencional. A Figura 14 e mostra uma metáfase mitótica humana.

9.1.2 - Microtécnica para cultivo de linfócitos

a) Colete 0,2 ml de sangue capilar, através de punção na ponta do dedo da mão ou na planta do pé utilizando uma seringa de 3 ml heparinizada. Previamente, faça uma assepsia da área com álcool 70%.

b) Em condições de assepsia, transfira o sangue total colhido para o frasco de cultura contendo 5 ml de meio de cultura completo. Misture o sangue ao meio, agitando levemente.

c) Incube na estufa a 37 °C por 72 horas.

d) Decorridas 71 horas, adicione 3 gotas de colchicina na concentração de 0,0016% e deixe por 1 hora.

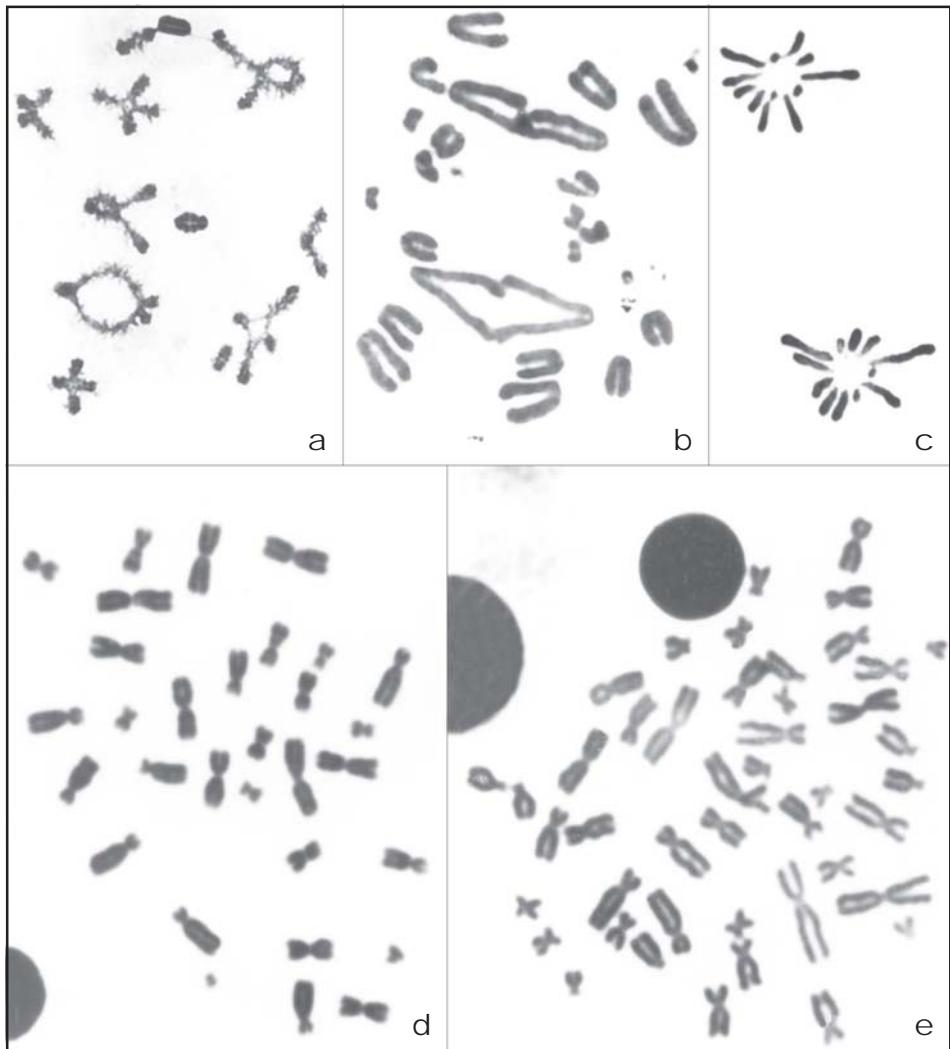


Figura 14 Coloração convencional em células meióticas do gafanhoto *Xyleus angulatus* (a=diplóteno; b-c=anáfase I e II, respectivamente) e mitóticas do morcego *Artibeus lituratus* (d) e humano (e). Fotos do autor.

e) A partir daí, prossiga de acordo com a técnica anteriormente descrita, a partir do item **e** para cultivo de linfócitos.

9.2 - Cultivo de fibroblastos em pequenos mamíferos

O cultivo de fibroblastos é uma técnica bastante utilizada para obtenção de cromossomos mitóticos em mamíferos. O procedimento para obtenção de cromossomos mitóticos pelo cultivo de fibroblastos consiste nas seguintes etapas: obtenção das biópsias, implantação do cultivo, tripsinização e preparo do material para estudo cromossômico. Também

serão descritos procedimentos para manutenção, congelamento e descongelamento de células.

Para o cultivo de fibroblastos, pode ser utilizado o meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) da Gibco (preparado conforme indicado pelo fabricante). O meio deve ser enriquecido com 20% de soro bovino fetal, com os antibióticos Neomicina (50 mg/ml) e Gentamicina (4 mg/ml) e com solução de Fungizon (= anfotericina A) (0,01 mg/ml). Em pequenos mamíferos, o material comumente usado para cultivo de fibroblastos é retirado da orelha ou da cauda. Entretanto, tecido muscular também é bastante utilizado para este tipo de cultivo. Para o cultivo de fibroblastos foram seguidos os procedimentos técnicos descritos por Freshney (1986) com modificações.

9.2.1 - Obtenção de biópsias

a) Depois de anestesiar o animal com éter, faça a assepsia da região escolhida, procedendo a limpeza com algodão embebido, na seguinte sequência: água, detergente neutro a 5% (Extran ou similar), água, etanol 70%, éter e solução de merfene. Repita esse procedimento várias vezes até que a região escolhida fique completamente limpa.

b) No caso de biópsia de orelha, corte na extremidade cerca de 0,3 ou 0,5 cm. No caso de cauda, é conveniente garrotear acima do local do corte para evitar sangramento. Seccione transversalmente a extremidade da cauda e retire cerca de 0,5 a 0,8 cm. Use tesouras e pinças esterilizadas.

c) Imediatamente, transfira o material cortado para uma placa de Petri estéril contendo 3 ml de meio completo. Retire e despreze a pele, no caso da cauda. Coloque o material em um pequeno frasco (capacidade para 5 ml) estéril, contendo 3 ml de meio completo. Mantenha na geladeira a 4 °C por 24 horas. Esse tempo permite um acompanhamento do material para detecção de possíveis contaminações. Mudança de coloração ou aparência turvada do meio de cultura pode ser indicativo de contaminação. Nesse caso, o material deve ser desprezado.

Atenção:

- ◆ O cultivo de fibroblastos também pode ser feito a partir de material de embrião obtido de fêmea prenhe em pequenos mamíferos. Nesse caso, as fêmeas são sacrificadas e o útero inteiro é retirado e colocado numa pequena placa de Petri (5 cm de diâmetro) contendo solução de Hanks estéril, com Neomicina (50 mg/ml). No fluxo laminar, proceda como segue:

- ◆ Retire o embrião ou embriões de dentro do útero, usando tesoura e pinças estéreis. Transfira para outra placa de Petri contendo 3 ml solução de Hanks com Neomicina (50 mg/ml).

- ◆ Corte orelha, cauda ou membrana de asa (caso de morcegos) e transfira os fragmentos para pequenos frascos estéreis contendo 3 ml de meio de cultura completo. Deixe na geladeira a 4 °C por 24 horas, como no caso do item **9.2.1 c.**

9.2.2 - Implantação do cultivo

a) Corte o material obtido pela biópsia (cauda, orelha ou embrião) em fragmentos de, no máximo 1 mm³ em placa de Petri pequena, estéril, contendo 3 ml de meio de cultura completo. No caso de embriões, pode-se escolher fragmentos de cauda, orelha, tecido muscular ou órgãos internos. Para fragmentar esse material, use pinças e tesouras esterilizadas e trabalhe no fluxo laminar.

b) Para implantação do cultivo, use frascos de plástico (marca Corning, Costar ou similar), com capacidade para 25 cm². Umedeça a face interna do frasco, na qual será feito o implante, com soro bovino fetal (*Figura 15a*).

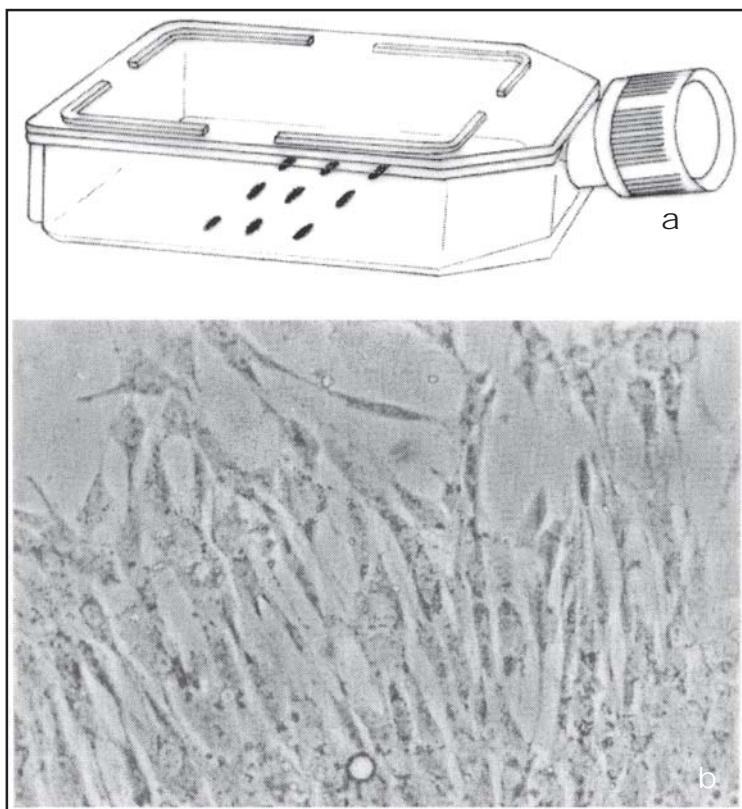


Figura 15 Frasco modelo usado para o cultivo de fibroblastos (**a**). Em destaque (-) a distribuição dos fragmentos de tecido de cauda de morcego. Em (**b**) crescimento típico de células fibroblásticas.

c) Use pipeta Pasteur para transferir os fragmentos de tecido para o frasco de cultura, colocando-os sobre a parede já umedecida com soro bovino fetal. Depois de distribuir os fragmentos no frasco, coloque no fundo do mesmo 2 ml de meio de cultura completo, deixe o frasco em posição vertical e em repouso durante 30 minutos na estufa a 37 °C.

d) Vire o frasco com cuidado para que os fragmentos de tecido entrem em contato com o meio de cultura e não se destaqueem da parede do frasco. Deixe na estufa a 37 °C durante 3 dias.

e) Quando as células iniciarem a proliferação, adicione 3 ml de meio de cultura completo.

f) A partir desse momento, é necessário observar diariamente o desenvolvimento do cultivo. É importante manter o pH do meio de cultura entre 7,2 e 7,6. Caso o meio apresente uma coloração amarelada (indicativo de acidez), adicione algumas gotas de bicarbonato de sódio a 2,8%. Caso o meio se apresente avermelhado (indicativo de alcalinidade), use algumas gotas de HEPES (N-2-hidroxi-etil-perazina-N-2-ácido etanossulfônico) a 2,5% (todas as soluções devem ser estéreis). Com a proliferação celular (*Figura 15b*), o meio de cultura deve ser trocado diariamente ou, no máximo, a cada dois dias, para retirada de produtos tóxicos e reposição de novos nutrientes. Quando cerca de 90% da superfície do frasco de cultura ficar coberta por uma monocamada de células, é necessário fazer a tripsinização para repicagem das células. Esse procedimento visa evitar a interrupção do processo de divisão celular decorrente do grande número de células confluentes no frasco.

9.2.3 -Tripsinização

a) Retire os frascos da estufa, despreze o meio de cultivo e adicione 2 ml de solução de Hanks sem cálcio e sem magnésio. Deixe o frasco em repouso por 3 minutos e, em seguida, despreze a solução de Hanks.

b) Adicione ao frasco de cultivo 2 ml de solução de tripsina/EDTA (Etileno Diamino Ácido Tetracético) (0,005 g de tripsina mais 0,002 g de EDTA em 10 ml de solução de Hanks). Observe ao microscópio invertido o destacamento das células que se caracteriza pelo arredondamento destas. Nesse momento, retire com pipeta Pasteur a solução de Hanks com tripsina e EDTA.

c) Adicione 3 ml de meio completo e bata nas paredes do frasco para desprender as células da superfície do frasco. Acompanhe ao microscópio invertido.

d) Divida o conteúdo do frasco para dois novos frascos de cultivo e acrescente 3 ml de meio completo em cada um deles.

e) Coloque os frascos na estufa a 37 °C. Acompanhe o novo crescimento e proliferação celular diariamente, como descrito no item **9.2.2 e, f.**

9.2.4 - Preparação do material para análise cromossômica

a) Nas últimas 24 horas antes da colheita do material, o meio de cultura deve ser trocado por um meio novo, para acelerar o processo de divisão celular.

b) Adicione 2 gotas de solução de colchicina a 0,01% no frasco de cultivo. Após 40 minutos transfira o conteúdo do frasco para um tubo de centrífuga e reserve. Acrescente ao frasco de cultivo 2 ml de solução de Hanks sem cálcio e sem magnésio, deixe na estufa a 37 °C por 5 minutos e, em seguida, faça a transferência para o mesmo tubo de centrífuga anterior. A partir desta etapa até o item **d**, todo material celular e respectivos sobrenadantes devem ser colocados em um mesmo tubo de centrífuga para evitar maior perda de células.

c) Coloque 2 ml de solução de tripsina / EDTA, conforme o item **9.2.3 b**, no frasco de cultivo. Observe ao microscópio invertido para acompanhar o arredondamento das células.

d) Transfira a solução de tripsina mais EDTA para o tubo de centrífuga. Coloque 2 ml de Hanks sem cálcio e sem magnésio e solte as células com batidas nas paredes do frasco. Transfira todo o material para o tubo de centrífuga e, por última vez, adicione 2 ml de meio completo para fazer uma retirada completa das células do frasco de cultura. Transfira esse meio para o tubo de centrífuga.

e) Centrifugue o material a 1200 rpm durante 10 minutos. Despreze o sobrenadante

f) Adicione 5 ml de solução hipotônica (KCl 0,075M), homogeneize e coloque a 37 °C por 10 minutos.

g) Centrifugue, despreze o sobrenadante, adicione vagarosamente 5 ml de fixador (metanol- ácido acético, 3:1) e homogeneize.

h) Centrifugue a 1200 rpm por 10 minutos. Repita o processo de fixação mais duas vezes.

i) Ressuspenda o material em 1 ml de fixador e pingue 2 gotas sobre cada lâmina que deve estar rigorosamente limpa.

j) Seque, core com solução de Giemsa a 5% diluída em tampão fosfato pH 6.8 durante 5 minutos. Lave em água destilada, seque e monte em bálsamo do Canadá ou Euparal.

9.2.5 - Congelamento de células

a) Para iniciar o procedimento de congelamento de células proceda inicialmente como nos itens **a** e **b**, da tripsinização (item **9.2.3**).

b) Coloque no frasco de cultivo 2 ml de meio de cultura completo adicionando 1 ml de DMSO (dimetil-sulfóxido) a 10%.

c) Bata nas paredes do frasco de cultivo para soltar as células. Adicione 2 ml de DMSO a 10%.

d) Transfira o material para frascos criogênicos (por exemplo, da marca Nalgene) com capacidade para 1,8 ou 2,0 ml. Esses frascos devem ser mantidos em cuba com gelo antes de receber o material.

e) Os frascos criogênicos, depois de receberem o material, devem ser submetidos a um congelamento progressivo na geladeira a 4 °C (2 horas), no freezer a -20 °C (5 horas), no gelo seco a -60 °C (5 horas) e, finalmente, no botijão de nitrogênio líquido (temperatura de -196 °C), onde poderão ser mantidos por muito tempo.

9.2.6 - Descongelamento de células

a) Os frascos criogênicos são retirados do botijão de nitrogênio líquido e colocados em banho-maria a 37 °C. Espere o descongelamento completo (cerca de 5 minutos).

b) Leve os frascos criogênicos ao fluxo laminar e antes de abri-los, passe um algodão, embebido de álcool 70%, sobre os mesmos. Transfira o material para um tubo de centrífuga estéril contendo 5 ml de meio de cultura completa. Feche o tubo e centrifugue a 800 rpm por 10 minutos. Jogue fora o sobrenadante.

c) Ressuspenda o material em 2 ml de meio de cultura completo e transfira-o para um frasco de cultura, adicionando mais 3 ml de meio.

d) Mantenha o frasco na estufa a 37 °C e acompanhe o desenvolvimento da cultura, como descrito no item **9.2.2 e, f.**

9.3 - Observação de cromossomos mitóticos em células de medula óssea e de baço de pequenos mamíferos

As duas técnicas a seguir podem ser facilmente empregadas para obtenção de cromossomos mitóticos de pequenos mamíferos (roedores, morcegos e marsupiais), sem necessidade de fazer cultivo de células. A intensa atividade hematopoiética, tanto da medula óssea como do baço, permite uma maior riqueza na quantidade de células em divisão mitótica nesses órgãos. Para a preparação citológica de medula óssea foi seguido o método de Ford e Hamerton (1956) e para baço Yonenaga (1972) com modificações.

9.3.1 - Utilizando células de medula óssea

a) Selecione o animal a ser estudado, bloqueeie a divisão das células em metáfase com injeção subcutânea de colchicina a 0,2%, na proporção de 1 ml para cada 100 g de peso do indivíduo. Após um período de 1 a 2 horas anestesie o animal com éter ou clorofórmio e disque em seguida.

b) Retire os fêmures e úmeros. Corte as epífises e retire a medula

com lavagens repetidas do canal ósseo, em 5 ml de solução hipotônica (KCl 0,075M), obtendo uma suspensão de células (use placa de Petri pequena, 5 cm de diâmetro).

c) Transfira a suspensão de células para um tubo de centrífuga e leve para a estufa a 37 °C por 10 minutos.

d) Centrifugue a suspensão celular a 800 rpm durante 5 minutos e jogue fora o sobrenadante.

e) Ressuspenda o material em fixador (metanol-ácido acético, 3:1). Centrifugue e elimine o sobrenadante. Esse procedimento deve ser repetido mais duas vezes.

f) Ressuspenda o material em fixador fresco e pingue duas gotas em lâmina limpa, conservada na geladeira. Passe a lâmina rapidamente na chama para evaporar o fixador ou deixe secar à temperatura ambiente.

g) Core o material com uma solução de Giemsa a 5%, durante 5 minutos. Lave em água corrente. Se o clima do Laboratório for seco, deixe secar ao ambiente. Caso seja muito úmido, seque a lâmina imediatamente com secador elétrico. Passe em xilol e monte em bálsamo do Canadá ou Euparal. A Figura 14d, mostra uma metáfase mitótica do morcego *Artibeus lituratus*.

9.3.2 - Utilizando células de baço

a) Depois de selecionar o animal, injete subcutaneamente uma solução de colchicina a 0,2% na proporção de 1 ml para cada 100 g de peso do indivíduo. Sacrifique o animal após um período de 1 a 2 horas, utilizando éter ou clorofórmio.

b) Retire o baço e coloque numa placa de Petri pequena (5 cm de diâmetro) contendo 5 ml de solução hipotônica (KCl 0,075M).

c) Use uma seringa de 10 ml para injetar várias vezes no órgão a solução hipotônica. Esse procedimento deve ser repetido até o órgão ficar transparente e se obter uma suspensão celular a partir das células desprendidas.

d) Siga o procedimento descrito para a preparação de medula óssea a partir do item 9.3.1 e.

Atenção:

- ◆ Melhores resultados da análise cromossômica são obtidos à medida em que se tem preparações mais ricas em metáfases. O índice mitótico pode ser aumentado, em pequenos mamíferos e mesmo em alguns outros vertebrados, com o pré-tratamento dos animais, com uma solu-

ção de fermento biológico Fleischmam, ou similar, por um período de 18 a 24 horas. Esse procedimento acarreta o aumento da atividade hematopoiética da medula óssea e do baço, desencadeando um aumento na freqüência de mitoses nesses órgãos.

◆ Nos animais mais resistentes, que suportam um período mais longo de pré-tratamento com fermento biológico, por exemplo, 48 horas, o tempo de tratamento com colchicina pode ser reduzido para 1 hora. Esse procedimento permitirá um acúmulo de metáfases mitóticas, com cromossomos menos condensados, que serão mais adequados para diferentes tipos de análises citogenéticas. Isto é válido tanto para as preparações citológicas de medula óssea como de baço.

9.4 - Análise do cariótipo mitótico

9.4.1 - Construindo um cariograma: o exemplo do cariograma humano

Os cromossomos humanos e de outros mamíferos podem ser melhor analisados a partir de montagem de seus cariótipos. Para isto, pode-se usar fotomicrografias de metáfases de diferentes espécies. Para analisar o cariótipo humano, esses cromossomos são alinhados de acordo com o tamanho e a morfologia (posição do centrômero) em sete grupos designados pelas letras A até G. Os autossomos são numerados de 1 a 22 pela ordem decrescente de tamanho e os cromossomos sexuais representados pelas letras X e Y, conforme descrito abaixo:

GRUPO A - os três maiores pares cromossômicos. O par 1 e 3 são metacêntricos, enquanto o par 2 é submetacêntrico.

GRUPO B - pares 4 e 5, submetacêntricos. O tamanho de seus braços curtos equivale a 1/3 de seus braços longos.

GRUPO C - pares 6 a 12. O cromossomo X é incluído neste grupo, ficando representado por apenas um cromossomo no caso do homem. É impossível a identificação individual dos cromossomos deste grupo pela análise morfológica. Devem ser pareados em ordem decrescente de tamanho.

GRUPO D - pares 13, 14 e 15. São acrocêntricos de tamanho médio, com satélites nem sempre visíveis nos braços curtos. Não são distinguíveis entre si pela análise morfológica.

GRUPO E - pares 16, 17 e 18. O par 16 é metacêntrico e os pares 17 e 18 são submetacêntricos. O par 17 tem os braços curtos ligeiramente maiores que os do par 18.

GRUPO F - pares 19 e 20. São os menores metacêntricos e não são distinguíveis pela análise morfológica.

GRUPO G - pares 21 e 22 na mulher, e mais o cromossomo Y, no homem. Os pares 21 e 22 apresentam satélites nos braços curtos, nem sempre visíveis. Não é possível a distinção individual desses dois pares. O Y é identificável em muitos casos pela posição paralela dos braços longos, pela ausência de satélites e localização preferencial na periferia da metáfase.

9.4.2 - A montagem do cariograma

a) Conte o número de cromossomos da metáfase antes de iniciar o trabalho. No caso de material humano, numere na foto, os pares de cromossomos, de acordo com a classificação descrita acima (grupos A até G mais os cromossomos sexuais). No caso de material de outros mamíferos, numere os pares cromossômicos em ordem decrescente de tamanho.

b) Depois de identificados na foto, recorte cada cromossomo e agrupe os pares segundo os critérios destacados acima. A Figura 16 mostra uma metáfase humana com seus cromossomos antes e depois do pareamento.

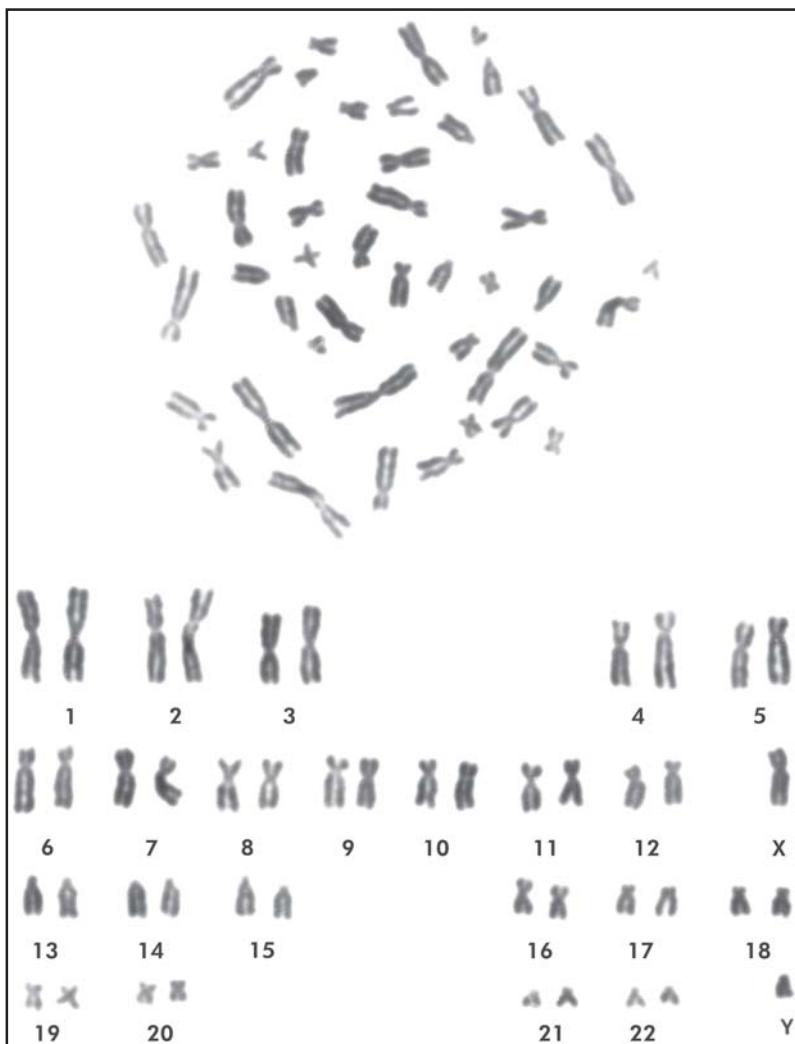


Figura 16 Cariótipo humano masculino normal ($2n=46$, XY). Foto do autor.

c) Para material de outros mamíferos, a montagem de cariótipo pode obedecer à ordem decrescente de tamanho dos cromossomos. Estes, por sua vez, podem também ser agrupados por ordem de tamanho, porém levando em conta as características morfológicas, por exemplo, metacêntricos, submetacêntricos, acrocêntricos, etc.

Atenção:

◆ cariótipo humano e de outros mamíferos, pode também ser representado esquematicamente por um idiograma. Para isso, pode-se utilizar valores médios da posição do centrômero e tamanho de cada cromossomo. Além disso, o idiograma pode mostrar a representação de diferentes padrões de bandeamento cromossômico. Na Figura 17 estão apresentados os idiogramas humanos, a partir da coloração convencional acima e, também, a partir do padrão de bandas G abaixo visto em cromossomos metafásicos.

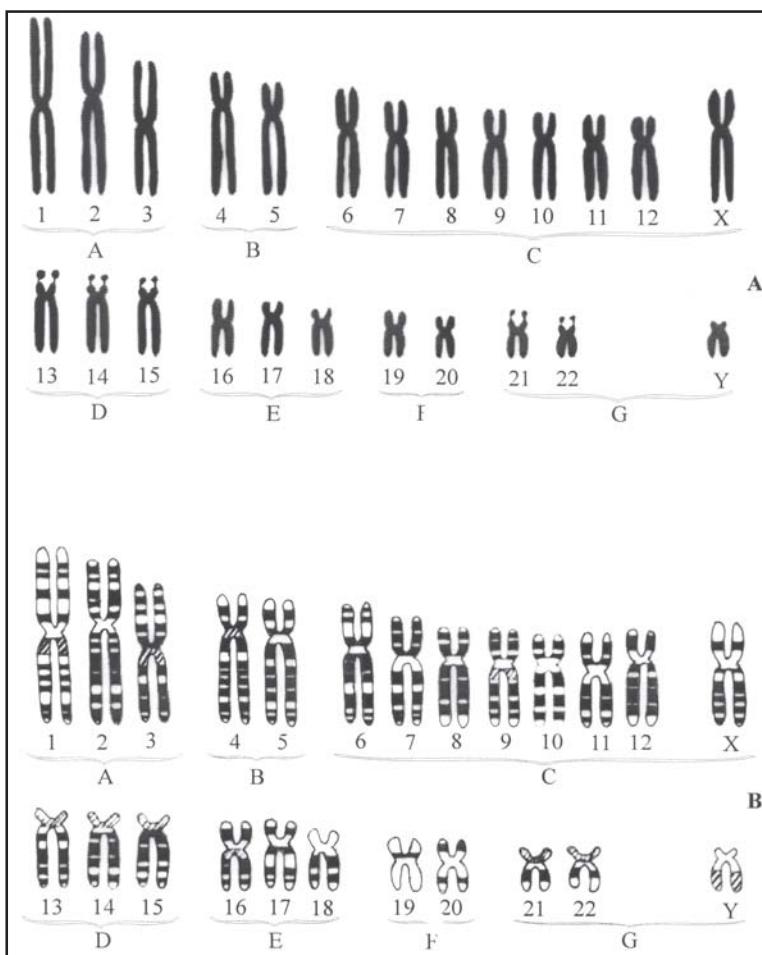


Figura 17 Esquemas representativos de idiogramas humanos. Coloração convencional e bandeamento G. Nota: idiogramas do sexo masculino.

10 - Como observar cromossomos meióticos e complexos sinaptonêmicos

A meiose se caracteriza por apresentar duas divisões sucessivas do material hereditário (divisão I e divisão II) precedidas de um único período de síntese de DNA (fase S). A prófase da primeira divisão meiótica é bastante ampla, podendo durar desde dias (em machos) até anos (geralmente em fêmeas de mamíferos). Nos machos, o resultado final do processo é a formação, por parte de cada uma das células que entraram na prófase I, de quatro células haplóides, que são as espermatídes. Em seguida, por um processo denominado espermiogênese que se caracteriza por uma série de mudanças tanto citoplasmáticas como nucleares, as espermatídes se transformam em espermatozóides. Nas fêmeas, ocorre eliminação de núcleos e a meiose termina com um único gameta.

Nas técnicas a seguir, são apresentados diferentes procedimentos para obtenção e análise de cromossomos meióticos em insetos e pequenos mamíferos. O procedimento é muito mais simples para análise da meiose masculina, por isso o estudo da meiose é feito quase sempre nos machos. Por fim, são descritas também algumas técnicas para análise de quiasmas e do complexo sinaptonêmico, que ocorre durante início da prófase I da meiose.

Há pelo menos duas técnicas principais na preparação de lâminas para análise meiótica: por esmagamento e por suspensão de células testiculares. Essas duas técnicas podem ser usadas tanto em insetos (gafanhotos, coleópteros, hemípteros, etc.) como em pequenos mamíferos. Entretanto, a técnica de esmagamento é comumente usada em insetos e a técnica de suspensão celular em mamíferos. A Figura 14a-c apresenta fases da meiose do gafanhoto *Xyleus angulatus*. Para a obtenção de cromossomos meióticos e mitóticos em gafanhotos foram seguidas a técnicas clássicas de esmagamento e a de suspensão celular descrita por Souza (1991). Preparação meiótica de pequenos mamíferos foi segundo Eicher (1966) e a obtenção de complexos sinaptonêmicos segundo Pathak e Hsu (1979), Pathak et al. (1979) e Albani e Jones (1984) com modificações.

10.1 - Dissecção de gafanhotos

a) Anestesie o animal usando um chumaço de algodão embebido com éter ou clorofórmio. Isso pode ser feito dentro de um pequeno recipiente de vidro com tampa.

b) Disseque o animal, sob lupa, fazendo um corte longitudinal na parte dorsal do abdome, expondo assim os testículos. Ao dissecar o animal, é importante evitar rompimento da extremidade do abdome (parte externa da genitália), uma vez que esta estrutura é importante no caso da identificação taxonômica da espécie. Separe os testículos (*Figura 12b*) em solução de

Ringer para não secar os órgãos durante a dissecção. Use placa de Petri pequena (5 cm de diâmetro).

c) Limpe bastante os testículos. Retire a membrana peritoneal e transfira os órgãos para uma pequena placa de Petri, contendo 3 ml de fixador (etanol-ácido acético, 3:1). Deixe fixando durante 10 minutos. O material assim fixado pode ser estocado no freezer por um período de 2 ou mais anos.

10.1.1 - Preparação de lâminas por esmagamento de folículos testiculares de gafanhotos

a) Prepare cada lâmina colocando 1 ou 2 folículos testiculares sobre uma lâmina limpa e seca. Adicione uma gota de ácido acético 45%. Fragmente os folículos usando estilete ou pinça de ponta fina, para facilitar o espalhamento das células sobre a lâmina. Coloque uma lamínula sobre o material e deixe por 1 minuto.

b) Faça o esmagamento, entre lâmina e lamínula envoltas em papel de filtro, pressionando o dedo polegar firmemente sobre o papel. Deve-se ter cuidado ao esmagar para não deslocar a lamínula e estragar o material.

c) Retire a lamínula no gelo seco ou nitrogênio líquido. Coloque a lâmina para secar na estufa a 37 °C.

Atenção:

◆ As lâminas assim preparadas podem ser usadas para diferentes técnicas de identificação cromossômica, tais como bandeamento C, coloração com nitrato de prata e coloração com fluorocromos.

◆ Se as lâminas se destinarem a análise convencional, no item **10.1.1 a.** o ácido acético deve ser substituído pela orceína lácto acética a 2%. Prosseguindo, coloque uma lamínula sobre o material e deixe corando por 2 minutos. A coloração deve ser acompanhada ao microscópio. Quando os cromossomos já estiverem corados, faça o esmagamento. “Lutar” a lâmina usando esmalte de unha para fixar a lamínula sobre a lâmina e impedir o ressecamento do corante. Lâminas assim coradas podem ser mantidas em caixa fechada e colocadas no freezer ou congelador da geladeira. Nessa condição, as lâminas mantêm um bom estado de coloração, durante pelo menos 2 meses.

◆ Para fazer uma preparação permanente (no caso de coloração convencional com orceína) proceda a retirada da lamínula, em gelo seco, nitrogênio líquido ou mesmo no freezer. Passe a lâmina rapidamente no álcool 70%. Em seguida, seque e faça a montagem em bálsamo do Canadá ou Euparal.

◆ Alternativamente, a lâmina seca preparada como descrito acima, pode ser corada diretamente com hematoxilina a 1%. Nesse caso, coloque uma gota de hematoxilina na lâmina, cubra com uma lamínula e analise ao microscópio. Para tornar a lâmina permanente, retire a

lamínula com um jato de água, seque a lâmina e monte em bálsamo do Canadá ou Euparal.

10.1.2 - Preparação de lâminas por suspensão de células testiculares de gafanhotos

a) Anestesie o animal usando éter ou clorofórmio, como na técnica anterior.

b) Disseque o animal, separe os testículos usando uma solução de Ringer em placa de Petri pequena (5 cm de diâmetro), para a retirada da membrana peritoneal e limpe os testículos.

c) Transfira o material para uma pequena placa de Petri (5 cm de diâmetro) contendo 1 ml de solução hipotônica (KCl 0,075M). Use um pequeno bastão de vidro para macerar o material até que as células sejam liberadas dos folículos.

d) Acrescente 3 ml de solução hipotônica (KCl 0,075M), homogeneize com pipeta Pasteur e deixe por 20 minutos à temperatura ambiente.

e) Centrifugue a 900 rpm durante 5 minutos e elimine o sobrenadante.

f) Ressuspenda o material em 3 ml de fixador (etanol-ácido acético, 3:1). Centrifugue e elimine o sobrenadante. Repita esse procedimento mais duas vezes.

g) Ressuspenda o material em 0,5 a 1,0 ml de fixador e pingue duas gotas por lâmina. O material deve ser pingado na lâmina a uma distância de 30 cm. Isso permite um melhor espalhamento das células.

h) Seque a lâmina em estufa a 37 °C. Core com orceína lácto-acética a 2%, por 3 minutos ou com Giemsa a 5%, por 5 minutos. Lave com água destilada, seque e monte com bálsamo do Canadá ou Euparal.

10.2 - A meiose em pequenos mamíferos (roedores, morcegos e marsupiais)

a) Anestesie o animal e faça a retirada dos testículos, colocando-os numa placa de Petri pequena (5 cm de diâmetro) contendo 5 ml de solução de Hanks.

b) Retire a túnica albugínea que envolve os testículos fazendo um corte com o auxílio de uma lâmina de bisturi para liberar os túbulos seminíferos.

c) Transfira o material para outra placa de Petri contendo 3 ml de solução de Hanks. Corte os túbulos seminíferos repetidas vezes para liberar as células. Um bastão de vidro pode também ser usado para macerar o materi-

al e aumentar a quantidade de células ou, ainda, o material pode ser passado em seringa (sem agulha) repetidas vezes.

d) Transfira o material para um tubo de centrífuga e adicione 5 ml de solução de Hanks. Centrifugue a 1200 rpm por 10 minutos.

e) Despreze o sobrenadante e adicione 8 ml de solução hipotônica (KCl 0,075M). Deixe em banho-maria a 37 °C por 10 minutos.

f) A partir daí, prossiga conforme o item **9.3.1.d**, da técnica de preparação cromossômica a partir de medula óssea.

Atenção:

- ◆ Tanto testículos de indivíduos jovens quanto de adultos, desses mamíferos podem fornecer material qualitativa e quantitativamente bons para análise da meiose.

10.3 - Análise da freqüência e distribuição de quiasmas em gafanhotos

O estágio de diplóteno se caracteriza pela aparência dupla dos cromossomos e pela melhor visualização dos quiasmas. Embora apareçam no diplóteno, os quiasmas são formados no final do zigóteno ou no paquíteno, quando as cromátides estão emparelhadas. Nos bivalentes meióticos os quiasmas podem se localizar em posição proximal (P), intersticial (I) ou distal (D), em relação ao centrômero.

Assim, a freqüência média de quiasmas por célula e a posição (P, I, D) dos mesmos podem ser determinadas em células diplotênicas. Essa análise pode revelar variação na taxa de recombinação meiótica, que pode ser provocada por cromossomos B, heterocromatina supernumerária, etc. Apesar dos quiasmas serem visualizados com a coloração convencional, eles são melhor identificados quando as lâminas são preparadas pela técnica de bandeamento C. Isto decorre do fato de que a heterocromatina constitutiva freqüentemente tem uma posição centromérica, servindo como um marcador para delimitar essa região e facilitar a localização precisa do quiasma. Para esta análise, podem ser usados tanto desenhos quanto fotos. Para facilitar a organização dos seus dados considere os seguintes aspectos:

a) Use o espaço à direita do Quadro 1 para fazer o desenho ou para colar a foto representativa da fase meiótica em diplóteno.

b) Numere, na foto ou no desenho, cada bivalente em ordem decrescente de tamanho, por exemplo, de 1 a 11, mais o cromossomo X univalente (para as espécies com $2n=23, XO$), que representa a maioria dos acridoídeos.

c) Analise 10 células usando o modelo do Quadro 1 para cada célula. Os resultados obtidos permitirão calcular a freqüência média de quiasmas por célula e por posição no cromossomo.

QUADRO 1 - Modelo para análise da freqüência e distribuição de quiasmas. (P) proximal; (I) intersticial; (D) distal

	Bivalente	Quiasmas		Total
	P	I	D	
1				
2				
3				
4				
-				
-				
-				
X				
Totais	()	()	()	()

10.4 - Análise de complexo sinaptonêmico em insetos e pequenos mamíferos

O complexo sinaptonêmico (CS) é uma estrutura nuclear característica dos bivalentes cromossômicos em estágio de zigóteno-paquíteno organizando-se e desorganizando-se durante a primeira divisão meiótica. Essa estrutura é tripartida e formada por dois elementos laterais e um elemento central. Sua composição é fundamentalmente protéica, e forma um eixo no bivalente, que vai de telômero a telômero, passando pela região centromérica. A zona compreendida entre o elemento central e os elementos laterais é menos densa e está constituída por filamentos finos denominados fibrilas, sendo associados com os nódulos de recombinação. Nos procedimentos a seguir, são mostradas duas diferentes técnicas usadas para análise de complexos sinaptonênicos de pequenos mamíferos: a técnica de espalhamento (*spreading*) e a técnica de suspensão celular de espermatócitos. Ambas as técnicas usam coloração com nitrato de prata para visualizar os CS. A diferença principal entre as mesmas é que a primeira usa o detergente Lipsol ou similar como solução hipotônica e paraformaldeído como fixador, enquanto que a segunda técnica usa citrato de sódio e etanol-ácido acético, 3:1, respectivamente, como solução hipotônica e fixador. As duas técnicas, por sua vez, permitem analisar o CS identificando-o em toda a sua extensão, individualizando cada bivalente e localizando, por exemplo, centrômeros e RONs. Além disso, são bastante úteis para analisar o comportamento citogenético associado às anomalias cromossômicas estruturais como duplicações, inversões, translocações, além do par XY dentro da vesícula sexual, no caso de mamíferos.

10.4.1 - Análise do complexo sinaptonêmico em pequenos mamíferos (técnica de dispersão ou *spreading*)

- a)** Anestesie o animal, retire os testículos e coloque numa pequena placa de Petri (5 cm de diâmetro) contendo 3 ml de solução salina de Hanks. Com auxílio de uma lâmina de bisturi, retire a membrana albugínea que envolve os túbulos seminíferos.
- b)** Transfira os testículos para outra placa de Petri contendo 1 ml de solução de Hanks. Corte os túbulos várias vezes e macere com a ponta de um bastão de vidro para liberar as células. A suspensão testicular deve ser bastante concentrada.
- c)** Transfira o material para um pequeno tubo de centrífuga. Mantenha o tubo num becker com gelo.
- d)** Numa lâmina limpa e seca, coloque 3 gotas do detergente Lipsol (Lip. Ltd. Shipley, England) a 1% e, sobre estas, 1 gota da suspensão de material testicular. Misture e observe ao microscópio em contraste de fase ou abaixe o condensador do microscópio comum, para acompanhar o rompimento dos núcleos. Isto ocorre em 1 ou 2 minutos, em material de morcego ou roedor.
- e)** Adicione 4 gotas de uma solução de paraformaldeído a 4% ao redor do material em lâmina.
- f)** Passe um bastão de vidro sobre a suspensão, sem tocar na lâmina, como se fosse um rolo, permitindo espalhar a suspensão pela superfície da lâmina.
- g)** Coloque a lâmina numa caixa fechada para secar durante 18-24 horas.
- h)** Lave as lâminas com água destilada em jarro de Coplin e seque-as ao ar.
- i)** Hidrolise as lâminas em HCl 1N a 60 °C durante 20 minutos. Lave com água destilada e seque as lâminas.
- j)** Coloque sobre cada lâmina 2 gotas de solução coloidal de gelatina e 3 gotas de solução de nitrato de prata a 50%. Com movimentos suaves misture as duas soluções sobre a lâmina.
- k)** Cubra com lamínula e coloque em câmara úmida a 70 °C durante 5 minutos. Esse tempo deve ser determinado individualmente, checando a lâmina ao microscópio. Lave com água destilada e seque.
- l)** Monte em bálsamo do Canadá ou Euparal.

10.4.2 - Análise de complexo sinaptonêmico de pequenos mamíferos (técnica de suspensão celular)

- a)** Anestesie o animal, retire os testículos e coloque numa placa de Petri (5 cm de diâmetro) contendo 10 ml de solução hipotônica de citrato de sódio a 0,7%.
- b)** Separe os túbulos seminíferos com auxílio de uma pinça e despreze a túnica albugínea. Macere bastante os túbulos para liberação das células e obtenção da suspensão celular.
- c)** Coloque a suspensão celular na estufa a 37 °C durante 30-40 minutos.
- d)** Aspire lentamente o sobrenadante com uma pipeta Pasteur e coloque-o em um tubo de centrífuga.
- e)** Centrifugue o sobrenadante aspirado a 1200 rpm durante 7 minutos. Jogue fora o sobrenadante.
- f)** Ressuspenda o material em metanol e ácido-acético 3:1 (fixador). Centrifugue e elimine o sobrenadante. Repita essa operação três vezes.
- g)** Ressuspenda o material em fixador fresco e pingue 2 gotas em lâmina limpa e seca.
- h)** Siga o procedimento usado para corar as RONs (item **11.6**) em vertebrados, do item **a** até **e**.

A Figura 18 a-b mostra complexos sinaptonêmicos do roedor *Thrichomys apereoides*.

Atenção:

- ◆ Outra maneira de corar as lâminas é pingando, em cada uma, 4 gotas de uma solução de nitrato de prata (diluído em água destilada) a 50% e cobrindo com uma lamínula. Incube na estufa a 70 °C, em câmara úmida de 2 a 4 horas. Esse tempo de incubação pode ser reduzido para 45 minutos, colocando-se na solução de nitrato de prata (2 ml) 1 gota de formol a 3%.

10.4.3 - Análise de complexo sinaptonêmico em gafanhotos (técnica de dispersão ou spreading)

- a)** Anestesie o animal, disseque e limpe os testículos pelo método de rotina usando Ringer, como descrito no item **10.1 a-b**.
- b)** Transfira os testículos para uma pequena placa de Petri (5 cm de diâmetro), contendo cerca de 1,5 ml de Ringer.

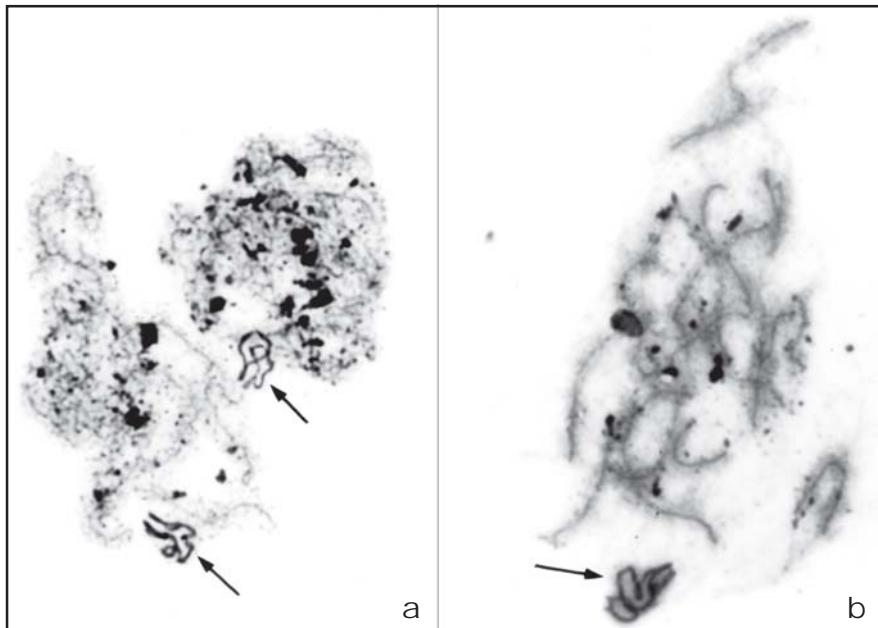


Figura 18 Complexo sinaptonêmico no roedor *Thrichomys apereoides*. (a) zigóteno e (b) paquíteno. As setas indicam a vesícula sexual. Fotos do autor.

c) Separe um folículo testicular, esmaque em orceína acética e verifique a qualidade do material. Caso o material esteja rico em paquítenos, separe um dos testículos para análise normal, fixando-o como de rotina. Use apenas um testículo para a preparação de complexo sinaptonêmico.

d) Macere bastante o material, em 2 ml de solução de Ringer, até conseguir uma boa suspensão de células.

e) Limpe lâminas de boa qualidade com álcool 70% e seque-as.

f) Coloque na lâmina 4 gotas de detergente Lipsol (Lip. Ltd. Shipley, England) a 1% e em seguida 1 gota da suspensão de células de testículos. Misture bem e acompanhe ao microscópio para observar o aumento de tamanho dos núcleos. Quando os núcleos começarem a romper, coloque 5 gotas de fixador (4 gramas de paraformaldeído em 100 ml de água destilada a 70 °C, mais 3.4 g de sacarose. Evite os vapores), para interromper a ação do detergente. Depois de adicionar o fixador, mexa a lâmina para misturar o material e, em seguida, passe um bastão de vidro para fazer um filme sobre a lâmina.

g) Coloque as lâminas numa caixa fechada, para evitar poeira, de 12 a 18 horas.

h) Lave as lâminas com água destilada, colocando-as dentro de uma cuba de vidro. Deixe secar ao ar.

i) Core a lâmina com uma solução de nitrato de prata a 50%. Cubra com lâminula e deixe por 30-50 minutos em estufa a 70 °C. A coloração deve ser acompanhada ao microscópio para controlar o tempo.

j) Lave as lâminas em jarro de Coplin com água destilada, seque e analise. A Figura 19 c-d apresenta complexos sinaptonêmicos do gafanhoto *Xyleus angulatus* e do morcego *Sturnira lilium*, respectivamente.

Atenção:

- ◆ Para obter uma melhor coloração pode-se substituir a lâminula do item **i** por retalho de tecido de *nylon*, de tamanho idêntico à lâminula e que contenha poros estreitos.
- ◆ Esta técnica também pode ser utilizada em outros grupos de insetos, por exemplo coleópteros, heterópteros, etc.

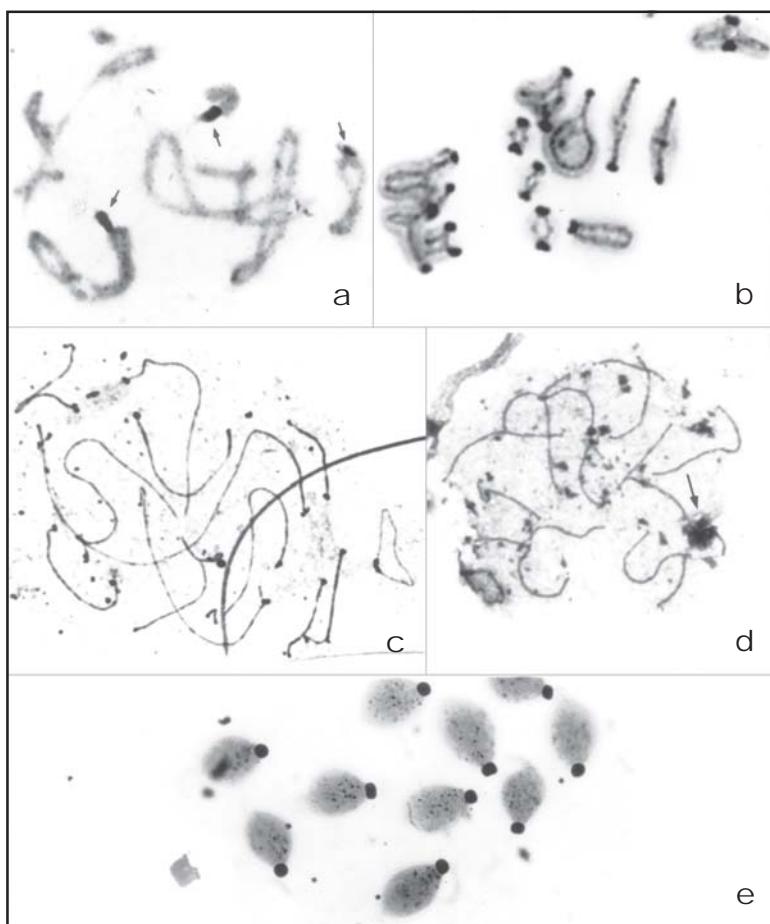


Figura 19 Coloração com nitrato de prata em células meióticas de gafanhoto e morcego. Em **a** diplóteno com marcação das RONs. Em **b** metáfase I com marcação de “cores” e cinetócoros. Em **c** e **d** complexos sinaptonêmicos. Em **e** espermátidies com centríolos adjuntos (CA) marcados. Em **a**, **b**, **c** e **e** são mostradas células do gafanhoto *X. angulatus*. Em **d** célula do morcego *Sturnira lilium*. Setas em **a** mostram remanescentes nucleares dos cromossomos com RONs e em **d** a vesícula sexual. Fotos do autor.

11 - Como corar diferencialmente cromossomos mitóticos, meióticos, politênicos e cromatina sexual

A coloração convencional dos cromossomos permite apenas uma identificação grosseira do cariotípico, não levando a uma caracterização mais precisa do mesmo. Técnicas de identificação cromossômica, como bandamento G e R, fornecem uma diferenciação longitudinal dos cromossomos, o que permite identificar individualmente os mesmos. Rearranjos estruturais e numéricos também podem ser identificados usando essas técnicas. Outras técnicas como bandamento C e coloração com nitrato de prata, permitem identificar, respectivamente, regiões de heterocromatina constitutiva e regiões organizadoras de nucléolos (RONs).

O bandamento C é a técnica mais amplamente utilizada para estudo da heterocromatina constitutiva em animais e plantas, desde o início da década de setenta. Os fluorocromos cromomicina A₃ (CMA₃) e 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) também têm sido utilizados com o objetivo de obter informações sobre a natureza da heterocromatina constitutiva com respeito à sua composição de bases. Esses corantes coram preferencialmente seqüências de DNA ricas em pares de bases GC e AT, respectivamente.

Embora o bandamento G seja o principal método usado para evidenciar as bandas eucomáticas em vertebrados, o bandamento R (bandamento reverso ao padrão de bandas G) ainda é bastante utilizado. Existe um número de diferentes técnicas para a produção de bandas R. Essas técnicas podem ser divididas em duas classes principais: aquelas que usam o Giemsa como corante e as que usam fluorocromos, por exemplo, a acridina orange. Em geral, o bandamento R tem sido aplicado em material de cultivo de linfócitos ou fibroblastos onde se usa incorporação com 5-BrdU (5-bromodeoxiuridina). O 5-BrdU incorporado às áreas cromossômicas que estão replicando, bloqueia o ciclo celular na fase S. A incorporação de 5-BrdU nos cromossomos induz padrão de bandamento que depende do momento da fase S durante o qual esse nucleotídeo análogo da timina foi incorporado ao DNA. Então, essas bandas são denominadas bandas de replicação, indicando o padrão de replicação cromossômica.

Já o uso da coloração com nitrato de prata, em geral, possibilita identificar nucléolos e regiões organizadoras de nucléolos (RONs) em células mitóticas de vertebrados. Em cromossomos meióticos, especialmente em gafanhotos, a prata permite detectar, além de nucléolos (ou remanescente nucleolar) (*Figura 19a*), outras estruturas de cromossomos, como cintócoros e “core” (*Figura 19b*) e o centríolo adjunto (CA) das espermatídes (*Figura 19e*). Vale destacar que em várias espécies de insetos, gafanhotos em particular, o nucléolo (remanescente nucleolar) desintegra no início (paquíteno/diplóteno) da prófase I da meiose. Também, nesses organismos, as RONs dificilmente são detectadas em cromossomos mitóticos.

Para as diferentes técnicas de coloração especiais apresentadas nesse capítulo foram seguidos os procedimentos descritos por Sumner (1990) e Verma e Babu (1995) com algumas modificações, adaptadas para cada grupo de organismos.

11.1 - Bandeamento C (para vertebrados e invertebrados, especialmente insetos)

a) Lâminas envelhecidas durante 3 ou 4 dias produzem bons resultados, entretanto, é possível usar lâminas recentemente preparadas. Nesse caso, basta que depois de preparadas fiquem na estufa a 40 °C, por um período de 3 horas.

b) Mergulhe a lâmina em uma solução de ácido clorídrico 0,1N por 30 minutos à temperatura ambiente.

c) Lave com água destilada.

d) Mergulhe a lâmina em solução de hidróxido de bário 5% a 60 °C de 10 segundos a 3 minutos, dependendo da idade da lâmina. Lâmina mais velha (a partir de 5 dias) requer maior tempo de tratamento com bário.

e) Lave em banhos rápidos (2 minutos em cada um) de HCl 0,2N e água destilada.

f) Mergulhe em solução de 2 x SSC a 60 °C por 45 minutos.

g) Lave com água destilada.

h) Core com uma solução de Giemsa a 2% em tampão fosfato pH 6,8 por 10 minutos. Acompanhe ao microscópio. Caso a coloração não fique adequada, submeta a lâmina novamente ao corante, por mais 5-10 minutos.

i) Lave com água destilada, seque, passe no xilol e monte com bálsamo do Canadá ou Euparal.

j) Analise ao microscópio. Observe na (*Figura 20 a-b*) padrões de bandeamento C em células do gafanhoto *X. angulatus* e do roedor *Clyomys laticeps laticeps*, respectivamente.

11.1.1 - Bandeamento C (coloração com acridina orange)

a) Para fazer essa coloração siga o pré-tratamento que foi descrito para o bandeamento C (item 11.1 a-g).

b) Core a lâmina com uma solução de acridina orange na concentração de 0,01%. Coloque sobre a lâmina 5 gotas desta solução e deixe por 1 minuto (esse tempo deve ser testado para cada material).

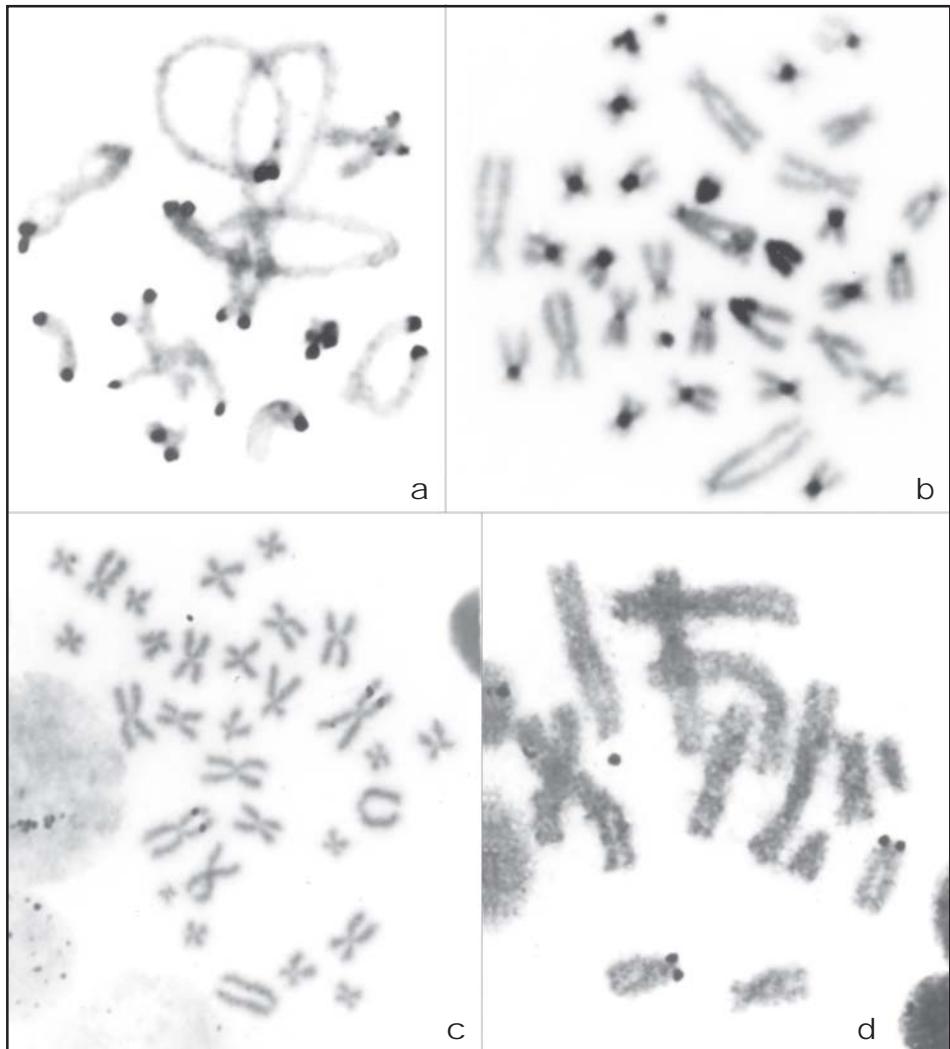


Figura 20 Bandeamento C (**a, b**) em meiose (diplóteno) de gafanhoto *X. angulatus* e mitose (metáfase) de roedor *Clyomys laticeps laticeps*, respectivamente. Em **c** e **d** marcações das RONs coradas com nitrato de prata no roedor *Thrichomys apereoides* e no marsupial *Marmosa sp.*, respectivamente. Fotos do autor.

- c)** Lave a lâmina com água destilada e, em seguida, coloque duas gotas de água destilada e cubra com uma lamínula.
- d)** Analise ao microscópio de fluorescência e fotografe as melhores fases (mitóticas ou meióticas).
- e)** Depois de fotografadas as fases a lamínula, pode ser retirada com uma lavagem rápida com água destilada e, a seguir, corada com Giemsa. Proceda como foi descrito no item **11.1 h-j**. Os mesmos pontos (fases) fotografados após a coloração com acridina orange podem ser também foto-

grafados após a coloração com Giemsa e, assim, têm-se as mesmas células analisadas com as duas colorações. A (Figura 21 a-b) apresenta uma mesma metáfase I do gafanhoto *Phaeoparia megacephala* pré-tratada para o bandeamento C e corada com acridina orange e em seguida com Giemsa.

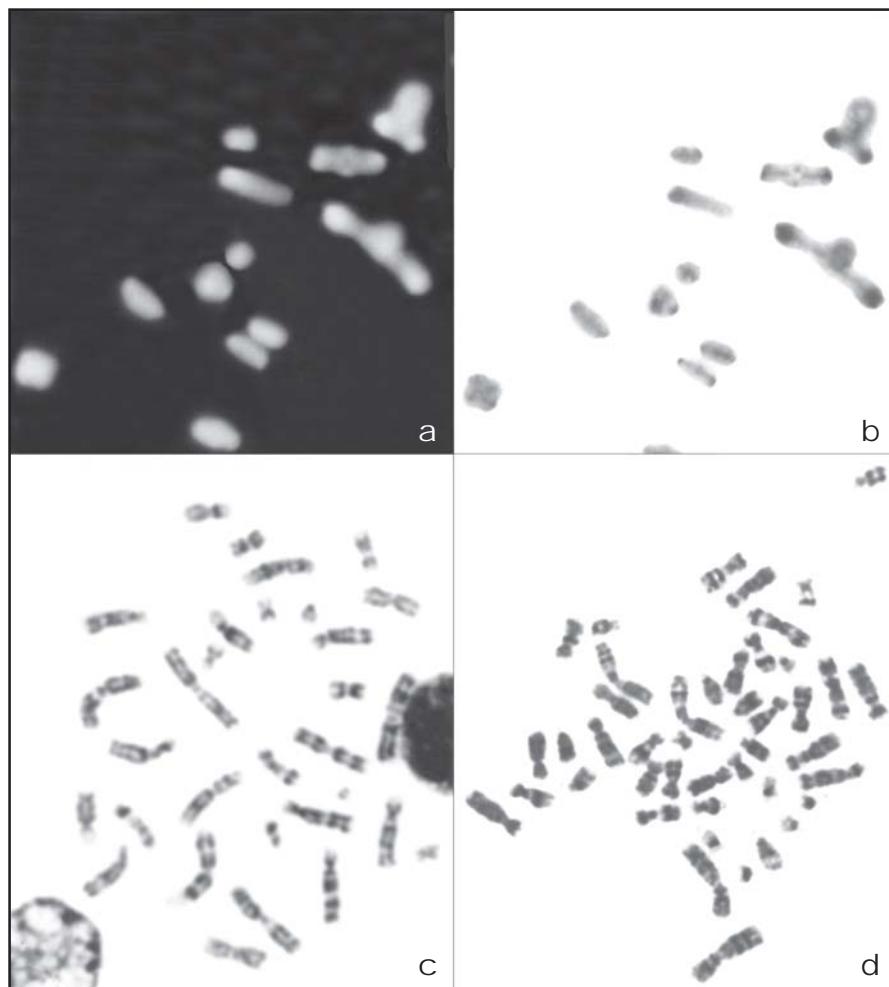


Figura 21 Metáfase I de macho do gafanhoto *Phaeoparia megacephala* mostrando o padrão de bandas C corado com acridina orange (**a**) e em (**b**) a mesma célula corada com Giemsa. Em **c** e **d** padrão de bandas G no morcego *A. lituratus* e em humano, respectivamente. Fotos do autor.

Atenção:

- ◆ Em geral, existe uma correspondência entre os padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva (bandas C) quando as lâminas são pré-tratadas para o bandeamento C, coradas com acridina orange e a seguir, com Giemsa. Entretanto, uma das vantagens de usar as duas colorações é que, quando os blocos de heterocromatina do complemento são muito pequenos, eles aparecem com maior definição na coloração com acridina orange.

11.2 - Análise da heterocromatina constitutiva através da coloração com os fluorocromos CMA₃/DA/DAPI (tríplice coloração).

- a)** Coloque duas gotas da solução de CMA₃ (0,5 mg/ml) sobre a lâmina, cubra com lamínula e incube, no escuro e em caixa fechada. Deixe por 40 minutos (esse tempo deve ser ajustado para cada espécie).
- b)** Para retirada de lamínulas e excesso do corante lave as lâminas com água destilada e seque à temperatura ambiente.
- c)** Coloque duas gotas da solução de Distamicina A (0,1 mg/ml) e cubra com lamínula. Deixe corar por 30 minutos (o tempo deve ser ajustado para cada espécie) à temperatura ambiente. Manter em caixa fechada.
- d)** Lave com água destilada e seque.
- e)** Coloque duas gotas da solução de DAPI (0,5 mg/ml) e cubra com lamínula. Deixe corar por 30 minutos (adequar o tempo para cada espécie) à temperatura ambiente. Manter em caixa fechada.
- f)** Lave com água destilada e seque ao ar.
- g)** Monte a lâmina com meio de montagem com glicerol/tampão MacIlvaine/MgCl₂.
- h)** Examine em microscópio de fluorescência e fotografe as melhores fases. A (*Figura 22 a-b*) apresenta fases da meiose do gafanhoto *Schistocerca pallens* e a (*Figura 23 a-b*) mitose do morcego *Carollia perspicillata* marcadas pela tríplice coloração CMA₃/DA/DAPI.

Atenção:

- ◆ Para cromossomos humanos, de pequenos mamíferos e de insetos esses fluorocromos podem ainda ser usados para fazer colorações duplas, em lâminas diferentes, da seguinte maneira: CMA₃ + Distamicina A (CMA₃/DA) ou DAPI + Distamicina A (DA/DAPI). O DAPI também pode ser contracorado com actinomicina D (DAPI/AMD).
- ◆ CMA₃ e DAPI podem igualmente, ser usados em lâminas pré-tratadas para o bandeamento C. Nesse caso, em vez de serem coradas com Giemsa, são coradas com esses fluorocromos. Após serem fotografadas, as lâminas são descoradas (colocadas no fixador etanol-ácido acético, 3:1 no caso de insetos, e metanol-ácido acético 3:1, no caso de vertebrados, durante 18 horas) para a retirada do fluorocromo e, em seguida, coradas com Giemsa. Desta maneira, obtém-se uma coloração seqüencial CMA₃/DA/DAPI/bandas C na mesma preparação.
- ◆ Em vertebrados, particularmente em mamíferos, a coloração com os fluorocromos DAPI e CMA₃ (tríplice coloração CMA₃/DA/DAPI) pode induzir padrões de bandeamento da eucromatina. Assim, a coloração

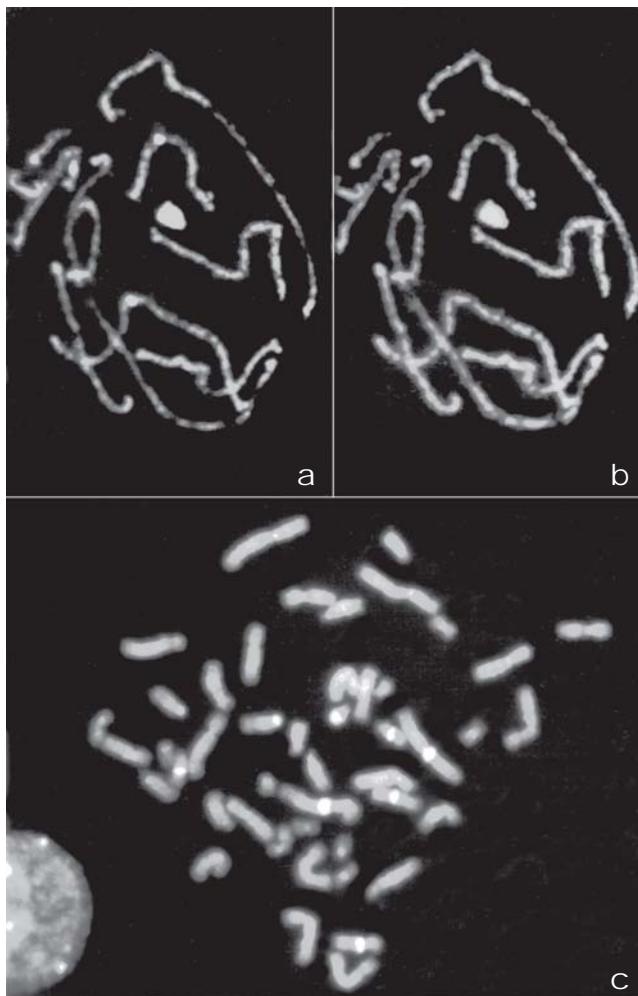


Figura 22 Tríplice coloração CMA₃/DA/DAPI em célula meiótica do gafanhoto *Schistocerca pallens* (**a, b**) e coloração DA/DAPI em metáfase mitótica humana (**c**). Notar as regiões CMA₃+ em **a** e a marcação dos cromossomos 1,9,16 e Y em **c**. Fotos do autor.

com DAPI mostra padrão de bandas G (bandas de replicação tardia e ricas em AT). Por sua vez, a coloração com CMA₃ mostra padrão de bandas R (bandas de replicação precoce e ricas em GC).

11.3 - A coloração DA/DAPI em cromossomos humanos

a) Use lâminas com envelhecimento de 3 a 5 dias

b) Coloque 3 gotas da solução de Distamicina A (DA) (0,5 mg/ml) sobre a lâmina. Cubra com lamínula e incube, no escuro e em caixa fechada. Deixe por 15 minutos na temperatura ambiente.

c) Lave a lâmina em água destilada e seque à temperatura ambiente.

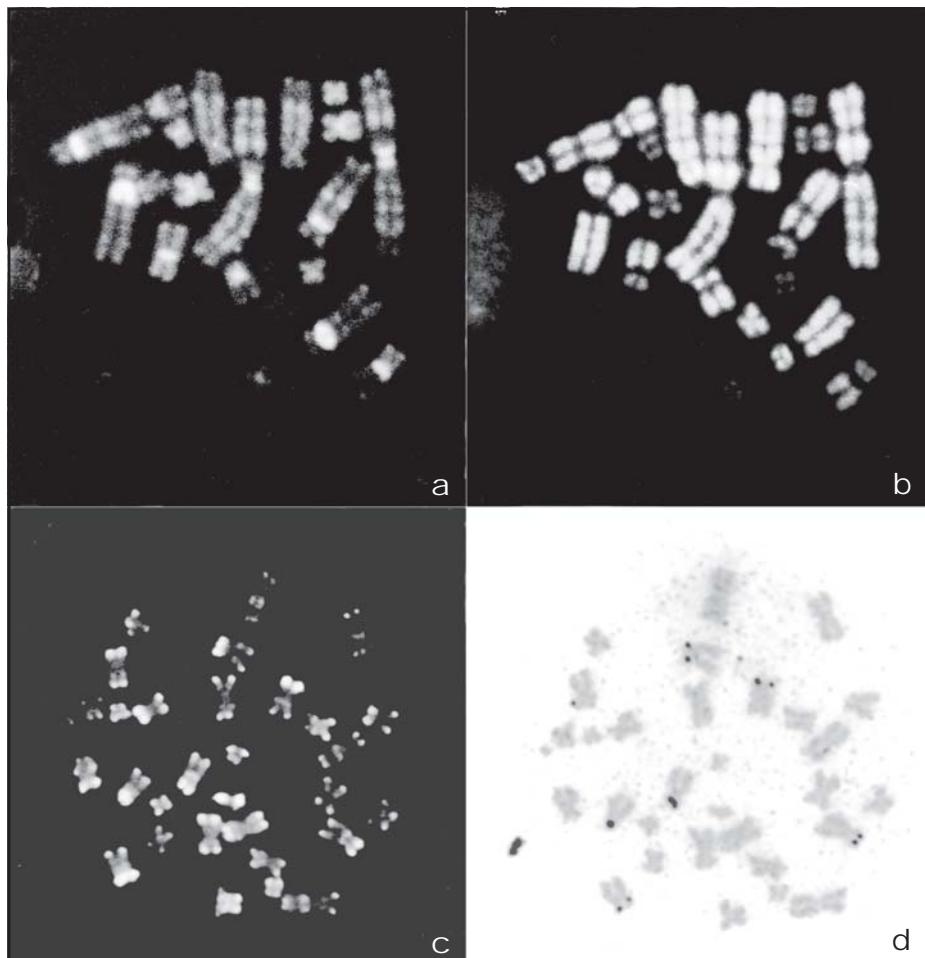


Figura 23 Tríplice coloração CMA₃/DA/DAPI em metáfase mitótica do morcego *Carollia perspicillata* (**a, b**) e coloração sequencial AgNO₃/CMA₃ no morcego *Artibeus lituratus* (**c, d**). Notar em **a** os blocos CMA₃+ e o padrão de bandas R (rico em GC) e em **b** o padrão de bandas G (rico em AT). Em **c** está destacada a coloração CMA+ das RONs e em **d** a marcação das mesmas com nitrato de prata (Fotos: Santos e Souza, 1998a, 1998b).

d) Coloque 3 gotas da solução de DAPI (0,5 mg/ml) e cubra com lamínula. Core no escuro durante 30 minutos à temperatura ambiente.

e) Lave com água destilada e seque à temperatura ambiente.

f) Faça a montagem da lâmina e retire o excesso do meio de montagem.

g) Guarde a lâmina no escuro em caixa fechada por um período de 24 a 72 horas, para estabilizar a coloração, antes de analisar no microscópio de fluorescência. A (Figura 22c), mostra a coloração DA/DAPI em humano.

Atenção:

- ◆ Cromossomos humanos corados com DA/DAPI mostram fluorescência brilhante nas regiões pericentroméricas dos cromossomos 1, 9 e 16. Adicionalmente, a região proximal do braço curto do 15 e distal do braço longo do Y também são marcadas.

11.4 - Coloração seqüencial AgNO₃/CMA₃

- a) Coloque sobre a lâmina 4 gotas da solução coloidal de gelatina, juntamente com 4 gotas da solução de nitrato de prata a 50% e cubra com lamínula.
- b) Coloque a lâmina em câmara úmida e, em seguida, no forno à temperatura de 70 °C por 3 a 5 minutos.
- c) Lave com água destilada e monte a lâmina usando 2 ou 3 gotas de água destilada.
- d) Analise ao microscópio e fotografe as melhores células com RONs marcadas.
- e) Retire a lamínula com um leve jato de água destilada.
- f) Descore a lâmina usando algumas gotas da solução de hexacianoferrato de potássio ($K_3(Fe(NC)_6)$) a 1% recém-preparado e resfriado a 1 °C. Cubra com lamínula e deixe descorar por 20-60 segundos. Retire a lamínula lavando com água destilada.
- g) Mergulhe a lâmina numa solução de tiossulfato de sódio pentahidratado a 20%, por 20 segundos. Lave a lâmina e deixe secar à temperatura ambiente e em repouso por dois dias.
- h) Faça a coloração CMA₃/DA/DAPI conforme descrito no item **11.2 a-h**.

- i) Analise a lâmina ao microscópio de fluorescência e fotografe as mesmas células (metáfases, por exemplo) marcadas pelo nitrato de prata e anteriormente fotografadas. A *Figura 23 c-d* mostra coloração seqüencial AgNO₃/CMA₃ no morcego *Artibeus lituratus*.

Atenção:

- ◆ A coloração seqüencial AgNO₃/CMA₃ pode também ser feita iniciando pela coloração com CMA₃ conforme o item **11.2 a-h**. Depois de fotografar as fases, descore a lâmina mergulhando-a em fixador metanol acético, 3:1 por um período de 18 horas. A partir daí, proceda a coloração com AgNO₃ de acordo com o item **11.4 a-d**, fotografando as mesmas células já fotografadas com a coloração CMA₃. Em alguns materiais, com esse procedimento, é possível diminuir o grau de precipitação do nitrato de prata sobre a lâmina.

11.5 - Observação de nucléolos , RONs, "cores" e cinetócoros de insetos

- a)** Prepare as lâminas por esmagamento (item **10.1.1**) ou suspensão (item **10.1.2**) de folículos testiculares. Para essa coloração, as lâminas não precisam envelhecer, mas após serem preparadas devem ficar por 3 horas na estufa a 40 °C.
- b)** Passe as lâminas na solução de 2 x SSC aquecido a 60 °C, durante 10 minutos.
- c)** Lave com água destilada.
- d)** Prepare uma câmara úmida (uma placa de Petri forrada com papel de filtro e umedecida com água destilada). Deve-se colocar alguns bastões de vidro para servir como suporte para as lâminas e colocar na estufa até atingir de 70 a 80 °C.
- e)** Coloque uma gota da solução de nitrato de prata sobre cada lâmina. Cubra com lamínula e coloque em câmara úmida previamente aquecida.
- f)** Após 2 minutos, acompanhe ao microscópio até o material se apresentar corado.
- g)** Lave a lâmina retirando a lamínula.
- h)** Seque, monte em bálsamo do Canadá ou Euparal. Analise e fotografe as RONs, "cores", cinetócoros e centríolos adjuntos (CA).

Atenção:

A solução de nitrato de prata AgNO_3 , nesse caso, deve ser preparada da seguinte maneira:

- ◆ Em 100 ml de água destilada coloque uma gota de ácido fórmico. Deve ser atingido o pH 3,0 a 3,5.
- ◆ Dissolva o nitrato de prata na solução acima, na proporção de 0,5 grama de AgNO_3 para 1 ml de água com ácido fórmico.
- ◆ Os centríolos adjuntos (CA) corados pelo nitrato de prata podem ser indicadores do nível de ploidia das espermatídides. As espermatídides normais (n) tem somente 1 CA e aquelas anormais ($2n$, $3n$, etc) mostraram 2 CA, 3 CA, respectivamente. Esse padrão tem sido usado para analisar anormalidades relacionadas com baixos níveis de fertilidade em algumas espécies de gafanhotos, portadores de cromossomos B.

11.6 - Análise das RONs em vertebrados

- a)** Coloque na lâmina 4 gotas da solução coloidal de gelatina, juntamente com 4 gotas da solução de nitrato de prata (2 g de AgNO_3 em 4 ml de

água destilada). Misture as duas soluções movimentando a lâmina delicadamente. Cubra com lamínula.

- b)** Coloque as lâminas numa câmara úmida, conforme item **11.5 d.**
- c)** Coloque em banho-maria a 70 °C ou em forno na mesma temperatura, por 3 a 5 minutos. Acompanhe a coloração ao microscópio.
- d)** Lave com água destilada, seque, passe no xanol e monte em bálsamo do Canadá ou Euparal.
- e)** Analise ao microscópio. A *Figura 20 c-d* mostra coloração AgNO₃ no roedor *Thrichomys apereoides* e no marsupial *Marmosa* sp, respectivamente.

Atenção:

- ◆ Lâminas recentemente preparadas geralmente dão bons resultados. Nesse caso, depois de preparadas, as lâminas devem ficar na estufa a 40 °C por pelo menos 2 horas antes da coloração.

11.7 - Bandeamento G e bandeamento R em humano e outros mamíferos

11.7.1 - Bandeamento G para humano e outros mamíferos

- a)** É conveniente usar lâminas com envelhecimento de 4 dias a 1 semana. Bons resultados, entretanto, podem ser obtidos com lâminas recentemente preparadas. Nesse caso, coloque-as na estufa a 40 °C por 24 horas e reduza o tempo de tratamento com tripsina.
- b)** Dissolva 0,25 g de tripsina em 50 ml da solução de cloreto de sódio a 0,85%. A tripsina também pode ser diluída em tampão fosfato pH 6,8 ou em Hanks.
- c)** Faça um filme da solução de tripsina sobre a lâmina e deixe de 10 segundos a 1 minuto dependendo da idade da lâmina. Em lâminas mais velhas aumente o tempo de tratamento.
- d)** Lave com água destilada.
- e)** Core com uma solução de Giemsa a 5%, diluída em tampão fosfato pH 6,8, durante 7 minutos.
- f)** Lave com água destilada, seque, passe no xanol e monte em bálsamo do Canadá ou Euparal.
- g)** Analise ao microscópio e fotografe as melhores células. Observe na *Figura 19 c-d* padrões de bandeamento G no morcego *Artibeus lituratus* e em humano, respectivamente.

Atenção:

- ◆ Em mamíferos, preparações citológicas provenientes de diferentes tecidos respondem diferentemente quando tratadas com tripsina. Cromossomos obtidos a partir de fibroblastos, linfócitos e medula óssea reagem com aumento de sensitividade, nessa ordem, podendo, portanto, ser tratados com diferentes tempos de tripsina.

11.7.2 - Bandeamento R por incorporação de 5-Bromodesoxiuridina (5-BrdU)

a) Tanto para material a ser obtido por cultivo de fibroblastos como de linfócitos, nas últimas 6-12 horas, do cultivo celular, adicione 5-BrdU numa concentração final de 25 mg/ml. Envolva o frasco de cultura com papel de alumínio e deixe-o na estufa a 37 °C.

b) Aproximadamente 45 minutos antes da colheita do material, adicione 1 gota da solução de colchicina (0,01%) para cada 5 ml de meio de cultura contido no frasco. Devolva o frasco à estufa a 37 °C, durante 1 hora. Prepare as lâminas de acordo com o que foi descrito anteriormente para o cultivo de fibroblastos (**9.2.4. e-i**) ou para cultivo de linfócitos (**9.1.1 f-i**).

c) Para iniciar o processo de coloração, mergulhe as lâminas na solução de Hoechst 33258 na concentração final de 10 mg/ml, em jarro de Coplin envolto com papel de alumínio, por 20 minutos. Lave em água destilada.

d) Passe as lâminas rapidamente na solução de 2 x SSC à temperatura ambiente. Coloque 3 gotas de 2 x SSC sobre cada lâmina e cubra com lamínula.

e) Monte uma câmara úmida com 2 x SSC, numa placa de Petri grande (10 cm de diâmetro) forrada com papel de filtro. Disponha as lâminas sobre bastões de vidro (suporte) e cubra a placa com filme de PVC transparente (Plastic film). Coloque sob luz negra por duas horas. As lâminas devem ficar a uma distância de aproximadamente 30 cm da lâmpada. Como luz negra pode ser utilizado a lâmpada UVK 125-2 C4 da Phillips ou similar.

f) Lave as lâminas em água destilada e deixe por 15 minutos em solução de 2 x SSC a 60 °C.

g) Lave as lâminas em água destilada e core com uma solução de Giemsa a 5%, diluído em tampão fosfato pH 6,8 por 5-8 minutos.

h) Lave as lâminas em água destilada, seque e monte com bálsamo do Canadá ou Euparal. Analise em microscopia de luz visível.

Atenção:

- ◆ O padrão de bandas R (bandas reversas ao padrão de bandas G)

também pode ser obtido corando a lâmina com uma solução de acridina orange. Inicie com a solução mãe de 1mg/ml e dilua na proporção de 2,5 ml desta solução em 50 ml de tampão fosfato pH 6,8. Core as lâminas por 20 minutos. Lave com tampão fosfato pH 6,8. Monte cada lâmina colocando 2 gotas de tampão fosfato pH 6,8 e cubra com lamínula. Analise e fotografe usando microscópio de fluorescência.

◆ Usando as técnicas de bandas R, tanto com a coloração com Giemsa como com acridina orange é possível identificar o cromossomo X de replicação tardia em fêmeas de mamíferos, diferenciando-o do X de replicação precoce.

◆ Uma grande vantagem do uso da técnica de bandas R é que ela cora fortemente regiões teloméricas de vários cromossomos do complemento cujas marcações são negativas pela técnica de bandas G.

11.8 - Análise de cromossomos politênicos de drosófila e da cromatina sexual humana

11.8.1 - Coleta de drosófila na natureza

As drosófilas são um grupo de insetos (dípteros) bastante usadas para estudos de cromossomos politênicos. Os cromossomos politênicos podem ser vistos principalmente em células das glândulas salivares, bem como em células de ceco gástrico e túbulos de Malpighi das larvas. Diferentes espécies de drosófila podem ser obtidas usando-se iscas de bananas, contidas em frascos de boca larga, colocadas em diferentes locais (jardins, pomares, etc). As moscas farão a postura nas iscas permitindo, assim, a posterior obtenção de larvas. Também pode ser usado o próprio meio de cultura.

Existem diferentes protocolos para preparação de meio de cultura para drosófila. Um dos aspectos mais importantes em experimentos e manutenção destas culturas é o cuidado com o material (frascos, tampas) usado na preparação do meio de cultura, que deverá ser limpo e esterilizado. Durante o seu ciclo vital, a drosófila passa pelas fases de ovo, larva, pupa e ímago (animal emergido da pupa). A duração do ciclo vital varia de acordo com a temperatura e com a espécie. Na temperatura de 25 °C, o ciclo de *Drosophila melanogaster* ocorre com a seguinte cronologia: ovo-larva (3 dias), larva-pupa (5 dias) e pupa-ímago (7 dias). Existem diferentes procedimentos para preparação de meio de cultura, obtenção de cromossomos politênicos, e também diferentes manejos para esse grupo de dípteros.

11.8.2 - Preparação de lâminas para obtenção de cromossomos politênicos

a) Selecione as larvas maiores. Coloque cada larva em uma lâmina limpa e seca, acrescente uma gota de solução de Ringer.

b) Com o auxílio de uma pinça, segure a porção posterior do corpo da

larva (*Figura 24a*) e, com um estilete, firme a cabeça de encontro com a lâmina. Um movimento firme deverá romper a parte anterior do corpo e expor as glândulas salivares.

c) As glândulas salivares deverão ser transportadas para uma pequena cuba de vidro, onde serão mergulhadas no fixador (etanol-ácido acético 3:1) durante 10 minutos.

d) As glândulas devem ser transferidas para uma lâmina contendo uma gota de ácido acético 45%, por 2 minutos. Retire o excesso de ácido acético, usando uma tira de papel de filtro para absorção do mesmo.

e) Coloque uma gota de orceína acética a 2% e ponha uma lamínula sobre o material. O tempo de coloração deve ser acompanhado ao microscópio.

f) Faça o esmagamento entre lâmina e lamínula. As lâminas ricas em células politênicas devem ser lutadas para evitar a evaporação do corante.

Maiores informações sobre técnicas básicas e mais avançadas para *Drosophila* poderão ser obtidas nos trabalhos de Shorrocks (1972) e Sullivan et al.(2000).

A *Figura 24 a - b* apresenta um esquema para dissecção de larvas e um conjunto de cromossomos politênicos de *Drosophila*.

11.8.3 - Localizando a cromatina sexual humana

a) Usando uma espátula raspe a face interna da bochecha. Despreze o primeiro raspado e raspe novamente. Faça um esfregaço do material sobre uma lâmina limpa e seca.

b) Mergulhe a lâmina no fixador (éter-etanol a 95%, 1:1) por 10 minutos.

c) Mergulhe a lâmina no etanol 79% e 50%, 2 minutos em cada.

d) Coloque duas gotas de orceína acética a 2% sobre a lâmina, cubra com lamínula e acompanhe a coloração ao microscópio.

e) Quando o material estiver corado faça o esmagamento, colocando a lâmina envolta no papel de filtro pressionando com o polegar.

f) Analise ao microscópio. Selecione os núcleos mais integros e identifique o corpúsculo de cromatina sexual.

g) A orceína acética pode ser substituída pelo reativo de Schiff. Para isso, as lâminas são mergulhadas em um borel contendo o reativo, por um

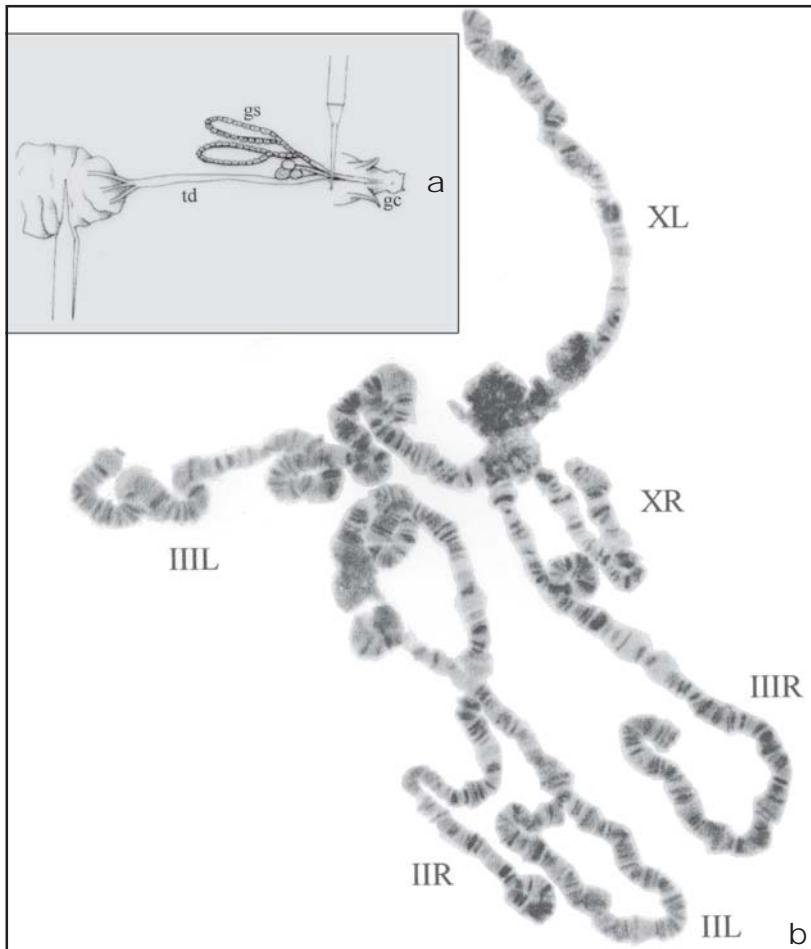


Figura 24 Em **a** esquema usado para dissecção de larva de *Drosophila*, visando à obtenção da glândula salivar. (**b**) cromossomos politênicos de *Drosophila melanogaster*. gs=glândula salivar; gc=gânglio cerebral; td=tubo digestivo (Foto: Tania T. Rieger/UFPE).

período de, pelo menos, 2 horas. A coloração é feita no escuro (envolver o borel com papel de alumínio). Essa coloração define o corpúsculo de cromatina com mais nitidez.

Atenção:

- ◆ A cromatina sexual (corpúsculo de Barr) representa um corpúsculo heteropicnótico positivo observável em núcleos interfásicos de células somáticas de fêmeas de mamíferos e que desaparece na mitose. Esse corpúsculo tem relação com o sexo do indivíduo em cujas células ele aparece. Existe uma relação entre os corpúsculos e os cromossomos X: o número de corpúsculos de Barr observado é igual ao número de cromossomos X menos um. Portanto, não aparecem nas células somáticas do homem normal (XY) e nas células somáticas de mulheres normais (XX), aparece apenas um.

12 - Como preparar as soluções e meios de cultura usados na citogenética animal.

12.1 - Solução de Ringer (solução fisiológica de insetos) - 1000 ml

a) Use um bêquer de 1500 ml e coloque 500 ml de água destilada estéril. Dissolva 6,5 g de NaCl em seguida 0,25 g de KCl e nessa ordem, 0,20 g de NaHCO₃ e 0,30 g de CaCl₂. Para dissolver essas substâncias use o agitador magnético.

b) Complete para 1000 ml de água destilada e deixe no agitador por mais 5 minutos.

Atenção:

◆ Dissolva as substâncias na ordem descrita acima. Cada substância só deve ser colocada quando a precedente estiver completamente dissolvida. Manter a solução na geladeira.

12.2 - Solução de Hanks (solução salina balanceada) - 500 ml

a) Use um bêquer de 1000 ml e coloque 250 ml de água destilada estéril. Dissolva 4,0 g de NaCl, em seguida 0,2 g de KCl e, nessa ordem, 0,024 g de Na₂HPO₄; 0,5 g de C₆H₁₂O₆ e 0,17 g de NaHCO₃. Dissolva essas substâncias usando agitador magnético.

b) Por último, coloque 0,5 g de vermelho fenol.

c) Complete para 500 ml com água destilada estéril. Agite até completa dissolução. Mantenha na geladeira.

12.3 - Solução desinfetante de merfene - 75 ml

a) Use um bêquer de 250 ml e coloque 25 ml de água destilada estéril. Dissolva 0,025 g de borato de fenilmercúrio. Adicione 25 ml de etanol 95%.

b) Complete para 75 ml com água destilada e mantenha na geladeira.

12.4 - Orceína acética a 2% - 100 ml

a) Use um bêquer de 250 ml e coloque 100 ml de ácido acético 45%

b) Coloque o bêquer no agitador magnético e adicione 2,0 g de orceína. Deixe agitando por 10 minutos.

c) Filtre e guarde em frasco fechado, na temperatura ambiente.

12.5 - Orceína lácto acética a 1% - 100 ml

a) Dissolva 1,0 g de orceína em 25 ml de água destilada estéril. Adicione 25 ml de ácido acético glacial. Ferva, acrescente 25 ml de ácido láctico a 85% e deixe ferver.

b) Acrescente 25 ml de água destilada e ferva novamente por 3 minutos. Deixe esfriar.

c) Filtre e conserve na temperatura ambiente.

12.6 - Solução de fermento - 25 ml

a) Dissolva de 2,0 a 3,0 g de fermento Fleischam biológico seco em 25 ml de água destilada aquecida (temperatura de 37 °C).

b) Adicione de 2,0 a 6,0 g de dextrose. Misture com um bastão de vidro e deixe em repouso por 5 minutos.

c) Para injetar nos animais, use sempre solução fresca, feita no momento do uso.

12.7 - Solução coloidal de gelatina - 50 ml

a) Dissolva 1,0 g de gelatina p. a. em 50 ml de água destilada aquecida (temperatura de 30 °C). Use agitador magnético.

b) Depois de dissolver a gelatina, acrescente 0,5 ml de ácido fórmico. Mantenha na geladeira por até 3 semanas.

12.8 - Meio de cultura para drosófila

Ágar	9 g
Água	630 ml
Fubá	65 g
Mel de abelha	65 ml
Fermento biológico Fleischmann, fresco	25 g
Solução de Nipagin a 10%	5 ml

Para preparar o meio, dissolva o ágar em 500 ml de água fria, agite e leve ao fogo. Adicione o mel de abelha mexa e deixe ferver. Em outro recipiente misture o fubá e o fermento nos 130 ml de água restantes. Adicione esse conteúdo ao recipiente contendo mel e ágar e ferva, mexendo, durante 10 a 15 minutos, para que o meio adquira uma boa consistência. Retire do fogo e deixe esfriar um pouco. Adicione 5 ml da solução de Nipagin a 10%. Em cada frasco com capacidade para 200 ml distribuir uma camada de meio com cerca de 2 cm de espessura. Tampe os frascos com tampa de gase com recheio de algodão. Antes dos frascos serem usados deve-se colocar uma tira dupla de papel de filtro embebida da solução de Nipagin a 10%. Esse papel absorverá o excesso de umidade do meio e servirá como suporte para as moscas e pupas.

Para preparar a solução de Nipagin a 10% dissolva 10 gramas de Nipagin em 100 ml de etanol a 96%.

12.9 - Meio de cultura para linfócitos - 120 ml

a) Prepare o meio RPMI 1640 conforme instrução do fabricante e em condições estéreis. Para preparar o meio use vidraria (béquer, pipeta, etc.) estéril e realize todo procedimento dentro do fluxo laminar. Em geral, prepara-se 1 litro de meio (solução estoque). Filtre o meio, usando filtro Millipore ou similar. Esse meio deve ser dividido em alíquotas de 100 ml, e guardado no freezer.

b) Preparo de meio para uso: em 100 ml de meio estéril adicione 20 ml de soro bovino fetal; 1,3 ml de Penicilina (10.000 U/ml); 1,3 ml de Estreptomicina (10 mg/ml) e 1,3 ml de Glutamina-A (29 mg/ml).

Atenção:

- ◆ O meio de cultura RPMI 1640 pode ser substituído por outros meios, como, por exemplo, TC199, McCoy 5 A ou RPMI 1630 (preparar segundo instrução do fabricante);
- ◆ A fitohemaglutinina liofilizada deve ser dissolvida numa quantidade apropriada de água destilada estéril (conforme sugestão do fabricante). A solução de uso pode ser estocada no freezer por algumas semanas. A forma liofilizada pode ser estocada numa temperatura de 2 a 5 °C por vários meses;
- ◆ Cada frasco de cultivo deve conter 10 ml de meio completo. A fitohemaglutinina (0,2 ml/10 ml do meio), entretanto, deve ser adicionada no momento de iniciar o cultivo de linfócitos;
- ◆ Todo preparo do meio completo ou de seus componentes particulares deve ser realizado em condições estéreis e dentro do fluxo laminar.

12.10 - Meio de cultura para fibroblastos - 120 ml

a) Prepare o meio de cultura Dulbecco's, conforme instrução do fabricante, e em condições estéreis. Em geral, prepara-se 1 litro (solução estoque) de meio. Esse meio deve ser filtrado, dividido em alíquotas de 100 ml e mantido no freezer. Para preparar o meio completo para uso, descongele cada alíquota de 100 ml.

b) Em 100 ml de meio (estéril/filtrado) adicione 20 ml de soro bovino fetal; 0,6 ml de Neomicina (50 mg/ml); 0,0012 mg de Fungizon (=Anfotericina A - 0,01 mg/ml) e 0,5 ml de Gentamicina A (4 mg/ml).

Atenção:

- ◆ Para preparar a Neomicina, pese 0,5 mg da substância e dissolva em 10 ml da solução de Hanks estéril (concentração final 50 mg/ml); coloque 0,6 ml dessa solução em 120 ml de meio completo.
- ◆ Para usar a Fungizon, pese 0,0012 mg desta substância, coloque em 100 ml de meio e filtre antes de colocar o soro bovino fetal.

Referências bibliográficas

Literatura citada

- Albani, S.M. e Jones, G.H.** (1984). Synaptonemal complex-associated centromeres and meiocytes prepared by an improved surface-spreading technique. *Exp. Cell Res.* 155: 588-592.
- Deumling, B. e Greilhuber, J.** (1982). Characterization of heterochromatin in different species of the *Scilla siberica* group (Liliaceae) by *in situ* hybridization of satellite DNAs and fluorochrome banding. *Chromosoma* 84: 535-555.
- Eicher, E.** (1966). An improved air-drying technique for recovery of all stages of meiosis in the mammalian testis. *Mammal. Chrom. Newslett.* 20:74.
- Ford, C.E. e Hamerton, J.L.** (1956). A colchicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Technol.* 3:247-251.
- Forni-Martins, E. e Guerra, M.** (1999). Longitudinal differentiation in chromosomes of *Sesbania Scop.* (Fabaceae) species. *Caryologia* 52: 97-103.
- Freshney, R.I.** (1986). *Animal Cell Culture - A Practical Approach*. Oxford, Washington. 247 pp
- Fujii, M. e Guerra, M.** (1998). Improved haematoxylin staining to algae cytogenetics. *Biotech. and Histochem.* 73: 132-136.
- Garcia, A.** (1990). *Manual de Técnicas Citogenéticas*. Colégio de Pósgraduados, Chapingo, México, 196 pp.
- Greilhuber, J.** (1988). "Self-tanning" - a new and important source of stoichiometric error in cytophotometric determination of nuclear DNA content in plants. *Plant Syst. Evol.* 158: 97-96.
- Greilhuber, J. e Ebert, I.** (1994). Genome size variation in *Pisum sativum*. *Genome* 37: 646-655.
- Guerra, M.** (1983). High amount of heterochromatin in a tropical tree species: *Genipa americana* L. (Rubiaceae). *Cytologia* 58: 427-432.
- Guerra, M.** (1988a). Characterization of different types of condensed chromatin in *Costus* (Zingiberaceae). *Plant Syst. Evol.* 158 : 107-115.
- Guerra, M.** (1988b). Mitotic and meiotic analysis of a pericentric inversion associated with a duplication in *Eleutherine bulbosa* (Iridaceae). *Chromosoma* 97: 80-87.
- Guerra, M.** (1991). *Cis*-acting regulation of NOR cistrons in *Eleutherine bulbosa* (Iridaceae). *Genetica* 83: 235-241.
- Guerra, M.** (1999). Hematoxylin: a simple, multiple-use dye for chromosome analysis. *Genet. Mol. Biol.* 22: 77-80.
- Guerra, M. e Nogueira, M.T.M.** (1990). The cyt taxonomy of *Emilia* (Asteraceae: Senecioneae) species occurring in Brazil. *Plant Syst. Evol.* 170: 229-236.
- Melo, M. L. S. e Vidal, B. de C.** (1978). A reação de Feulgen. *Ci. e Cult.* 30: 665-676.
- Moorhead, P. S., Nowell, P.C., Mellinan, W. J., Battips, D.M e Hungerford, D.A** (1960). Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 20: 613-616.

- Pathak, S e Hsu, T.C.** (1979). Silver-stained structures in mammalian meiotic prophase. *Chromosoma* 70: 195-203.
- Pathak, S., Lau, Y e Dewinga, H.L.** (1979). Observations on the synaptonemal complex in American hamster spermatocytes by light microscopy. *Chromosoma* 73: 53-60.
- Schwarzacher, T., Ambros, P. e Schweizer, D.** (1980). Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Syst. Evol.* 134: 293-297.
- Shorrocks, B.** (1972). *Drosophila*. Ginn & Company Limited, London, 144 pp.
- Santos, N e Souza, M.J.** (1998a). Characterization of the constitutive heterochromatin of *Carollia perspicillata* (Phyllostomidae, Chiroptera) using the base-specific fluorochromes CMA₃ (GC) and DAPI (AT). *Caryologia* 51: 51-60.
- Santos, N e Souza, M.J.** (1998b). Use of fluorochromes chromomycin and DAPI to study constitutive heterochromatin and NORs in four species of bats (Phyllostomidae). *Caryologia* 51 : 265-278.
- Souza, M.J.** (1991). Two simple methods for the preparation of mitotic and meiotic chromosomes of Orthoptera. *Rev. Bras. Genet.* 14: 1079-1084.
- Sumner, A.T.** (1990). *Chromosome Banding*. London, Unwin Hyman, 434 pp.
- Stack, S., Herickhoff, L., Sherman, J. e Anderson, L.** (1991). Staining plant cells with silver. I. The salt-nylon technique. *Biotech. Histochem.* 66: 69-78.
- Verma, R.A e Babu, A.** (1995). *Human Chromosomes: Principles and Techniques*. Sec. Edition, McGraw-Hill, Inc., 419 pp.
- Yonenaga, Y.** (1972). Polimorfismos cromossônicos em roedores brasileiros. Tese de Doutoramento. Departamento de Biologia. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. São Paulo, 214 pp.

Literatura recomendada

- Fukui, K. e Nakayama, S., Eds.** (1996). *Plant Chromosomes: Laboratory Methods*. CRC Press, Boca Raton, 274 pp.
Trata-se de uma seleção muito objetiva de técnicas usuais em citogenética vegetal, descritas por diferentes autores. Cada capítulo apresenta também uma boa introdução teórica sobre o tema. As técnicas são descritas com bastante detalhes, excelentes ilustrações e extensa revisão bibliográfica.
- Freshney, R.I.** (1986). *Animal Cell Culture - A Practical Approach*. Oxford, Washington. 247 pp.
Este livro corresponde a um completo manual de técnicas básicas para cultivo de células animais. O texto inclui consistente fundamentação teórica e prática para o cultivo de diferentes tipos de células. Além disso, apresenta informações detalhadas sobre equipamentos para laboratórios, técnicas de esterilização e diferentes meios de cultura.
- Leitch, A. R., Schwarzacher, T., Jackson, D. e Leitch, I. J.** (1994) - *In Situ Hybridization: A Pratical Guide*. Bios Scientific Publishers, Oxford, 118 pp.

Apresenta o protocolo para hibridização *in situ* em vegetais, utilizado pelos autores em numerosos trabalhos, além de alguns outros procedimentos complementares. Cada etapa do protocolo é precedida de uma introdução clara e objetiva sobre a teoria relacionada àquela etapa. O capítulo final discute os principais tipos de falhas técnicas e indica sugestões de como corrigi-las.

Schwarzacher, T. e Heslop-Harrison, P. (2000). *Practical In Situ Hybridization*. Springer-Verlag, New York, 203 pp.

Trata-se de um manual prático, com um roteiro semelhante ao de Leitch *et al.* (1994), dividindo o procedimento em suas várias etapas, com uma pequena introdução teórica para cada. Ao final, os autores discutem as falhas mais comuns da técnica e sugerem alternativas para solucioná-las, indicam uma relação dos principais fornecedores de reagentes e equipamentos e uma extensa lista de referências bibliográficas. Escrito em uma linguagem simples, apresenta ainda bons esquemas e diversas fotos estimulantes.

Sullivan, W., Ashburner, M e Hawley, R. S. (2000). *Drosophila Protocols*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 728 pp.

O livro apresenta diferentes protocolos relativos a estudos de biologia clássica e molecular em *Drosophila*. Os diferentes capítulos incluem uma introdução teórica, além de excelentes ilustrações, figuras e tabelas.

Sharma, A.K. e Sharma, A. (1999). *Plant Chromosomes - Analysis, Manipulation and Engineering*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 371 pp.

Uma revisão extensa sobre praticamente todas as principais técnicas tradicionais e modernas em citogenética vegetal. O texto inclui além das técnicas tradicionais da citogenética, diversos protocolos sobre manipulação de cromossomos e células, microscopia eletrônica e confocal, mapeamento e seqüenciamento de fragmentos de DNA, cultura de células, transformação gênica, etc. Os mesmos autores publicaram alguns outros livros anteriores mais extensos sobre técnicas em citogenética vegetal, as mais importantes das quais foram incluídas neste volume.

Sumner, A.T. (1990). *Chromosome Banding*. London, Unwin Hyman, 434 pp.

Um excelente livro, contendo um conjunto de técnicas usuais de identificação cromossômica e de regiões específicas, além de um conteúdo teórico para cada técnica em particular. Muitas das diferentes técnicas apresentadas podem ser utilizadas em diferentes grupos de organismos, desde invertebrados até vertebrados. Uma extensa revisão bibliográfica também consta do conteúdo do livro.

Verma, R.A e Babu, A. (1995). *Human Chromosomes: Principles and Techniques*. Sec. Edition, McGraw-Hill, Inc. 419 pp.

Este livro apresenta uma relação de técnicas clássicas e principalmente avançadas para o estudo de cromossomos humanos. Estas técnicas abrangem desde procedimentos para obtenção de preparações citológicas de cromossomos humanos, até os diferentes protocolos para identificação cromossômica.

Este livro foi impresso pela Paym Gráfica e Editora Ltda.
para FUNPEC-Editora em Outubro de 2002.
A fonte utilizada no texto foi Benguiat no corpo 10/12 e o
papel do miolo é Alta Print 90 g/m² fornecido pela
Cia. Suzano de Papel e Celulose.