

CROMOSSOMOS DE PEQUENOS MAMÍFEROS OU VERTEBRADOS DE MODO GERAL - OBTENÇÃO POR MEIO DA MEDULA ÓSSEA (TRATAMENTO COM COLCHICINA *IN VIVO*)

Obtenção dos cromossomos

As preparações citológicas para o estudo dos cromossomos metafásicos somáticos podem ser realizadas a partir de células da medula óssea (tecido hematopoiético) e baço.

Preparações mitóticas

Aproximadamente 48 horas antes da preparação, injeta-se subcutaneamente, na proporção de 1 ml para cada 100 g de peso do animal, uma solução preparada com 2 g de fermento biológico *Fleishmann* e 5 g de açúcar dissolvidos em 25 ml de água destilada (Lee & Endler, 1980) para estimular as divisões celulares (opcional).

Cerca de 1 hora antes da eutanásia do animal injeta-se intraperitonealmente (cerca de 1 ml para cada 100 g de peso), colchicina a 0,1 % (variação de 0,02 até 0,5 %). Após este passo, inicia-se a preparação direta e obtenção do material para a análise cromossômica.

Preparações *in vivo* de medula óssea, segundo Ford & Hammerton (1956), com modificações

Após a eutanásia do animal:

1. Fazer uma pequena incisão na região ventral do animal, retirar os fêmures, limpar e cortar as epífises. Colocá-los em uma Placa de Petri contendo cerca de 5 ml de solução de Hanks.
2. Com a ajuda de uma seringa com agulha, lavar sucessivas vezes o canal ósseo, até retirar todo o material.

3. Transferir o material para um tubo de centrífuga e centrifugar por 10 minutos a 1.200 rpm.
4. Desprezar o sobrenadante e adicionar 7 ml de solução hipotônica KCl 0,075 M. Incubar por cerca de 15 minutos (15-30 minutos) em banho-maria a 37° C.
5. Retirar do banho-maria, adicionar 6 gotas de fixador (3:1 - metanol: ácido acético) e ressuspender delicadamente. Deixar 5 minutos à temperatura ambiente.
6. Acrescentar mais 3 ml de fixador, homogeneizar vagarosamente e deixar por 10 minutos em temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 1.200 rpm durante 10 minutos.
8. Desprezar o sobrenadante e adicionar 6 a 7 ml de fixador. Homogeneizar, pipetando por cerca de 100 vezes.
9. Centrifugar novamente e desprezar o sobrenadante.
10. Fazer mais duas lavagens, trocando o fixador em cada uma delas, ressuspensando por cerca de 100 vezes.
11. Após a última centrifugação, desprezar o sobrenadante e adicionar fixador suficiente para que o material não fique muito concentrado.
12. Pingar 1 ou duas gotas de suspensão celular em lâminas limpas e secas. Deixar secar.

Preparações *in vivo* de baço, segundo Yonenaga (1972), com modificações

1. Retirar o baço e colocá-lo em Placa de Petri contendo 5 ml de Hanks.
2. Lavar o órgão várias vezes com o auxílio de seringa e agulha até que fique bem transparente. Desprezar os resíduos teciduais e homogeneizar a suspensão celular.
3. Os procedimentos seguintes são idênticos aos descritos nos itens 4 e 13 para as técnicas de medula óssea.

BANDAMENTO CROMOSSÔMICO

Bandas C segundo Sumner, com modificações

1. Hidrolizar as lâminas em HCl 0,2 N durante 30 minutos à temperatura ambiente.
2. Lavar em água destilada e deixar secar.
3. Mergulhar as lâminas em hidróxido de bário octahidrato 5 % a 60°C, durante 10 a 12 segundos, aproximadamente.
4. Imediatamente lavá-las em água destilada e passar rapidamente em HCl 1N a 60°C. Lavar em água destilada e deixar secar.
5. Incubar em 2xSSS (pH 7,0) a 60 °C durante 15 minutos. Após este período, retirar e lavar em água destilada.
6. Corar em solução Giemsa (Merck) preparada com 1 ml de corante para 20 ml de solução de tampão fosfato pH 6,8 durante 30 minutos, lavar em água destilada e secar.

Bandas G, segundo Seabright (1971), com modificações

1. Hidrolizar a lâmina por 15 minutos em 2xSSC a 60°C. Lavar em água destilada e deixar secar.
2. Preparar em banho-maria a 37°C, uma solução de tripsina (0,02 g em 75 ml de tampão fosfato pH 6,8). Mergulhar a lâmina nesta solução fazendo movimentos para a frente e para a trás, durante 1 minuto (*Rattus*).
3. Lavar em água destilada.
4. Corar durante sete minutos com solução de Giemsa (Merck) preparada com 1 ml do corante para 30 ml de solução tampão fosfato pH 6,8.
5. Lavar com água destilada e secar.

Obs: os tempos em cada reagente irão variar dependendo do tempo de envelhecimento das lâminas e do organismo que está sendo investigado. O melhor é começar com um tempo teste (o que está no protocolo, por exemplo), olhar as lâminas, e dependendo dos resultados obtidos, decidir por aumentar ou diminuir o tempo dos tratamentos.