

# CARIOTIPO

BMyCG

<https://www.youtube.com/watch?v=2B9unRdTvXw>

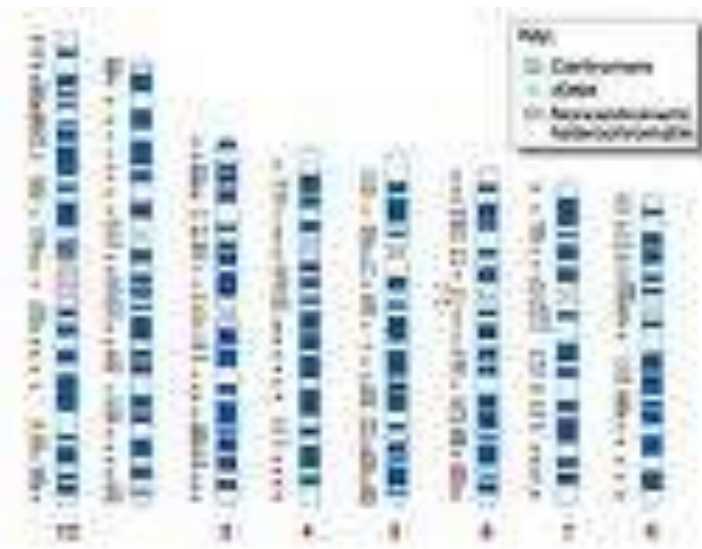
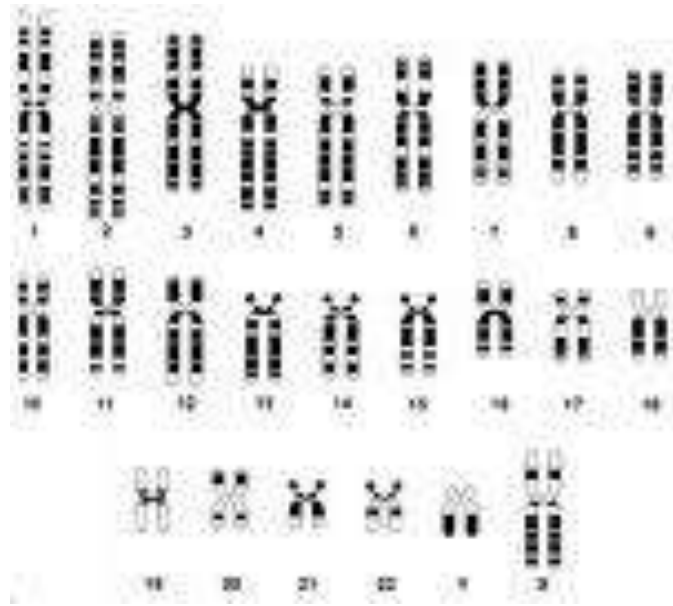
# CARIOTIPO HUMANO



centrômero



cromatídeos



Siendo los cromosomas los portadores de la información genética de mayor y mejor visualización, éstos han sido objeto de constante estudio, dado que cualquier anomalía a nivel funcional de las células y del organismo en general dependería de alteraciones localizadas en la información que llevan.

Los cromosomas aportan una gran ayuda ya que no solamente revela información valiosa acerca de la constitución genética de las personas sino que además tienen un número constante en todas las células somáticas de una especie y presentan un tamaño, estructura y morfología definidos.

La **citogenética** se encarga de estudiar el comportamiento celular basado en la información génica contenida en los cromosomas, su función, su comportamiento, su relación con patologías y sus consecuencias a nivel físico, orgánico y poblacional.

Esta disciplina es más reciente que la genética ya que solo en 1956 fue determinado el número de cromosomas humanos (46), sin embargo ya desde 1875 se tiene registro de las primeras observaciones de cromosomas en plantas por Eduard Strasburger y en 1879 – 1889 en animales por Walter Flemming.

En 1959 se describió la primera anomalía cromosómica humana, la trisomía 21 en el síndrome de Down y a partir de allí se constituyó en un campo propio de estudio dentro de la Genética Médica.

Algunos problemas técnicos hicieron el análisis cromosómico muy difícil, dado que la coloración solo permitía agrupar los cromosomas por tamaño y figura, pero no podían ser identificados individualmente.

En 1968 Caspersson y colaboradores idearon un método de coloración que permitió identificar un patrón de regiones claras y oscuras llamadas bandas, único para cada cromosoma, lo cual permitió la detección y caracterización de muchas más anomalías citogenéticas que la tinción regular.

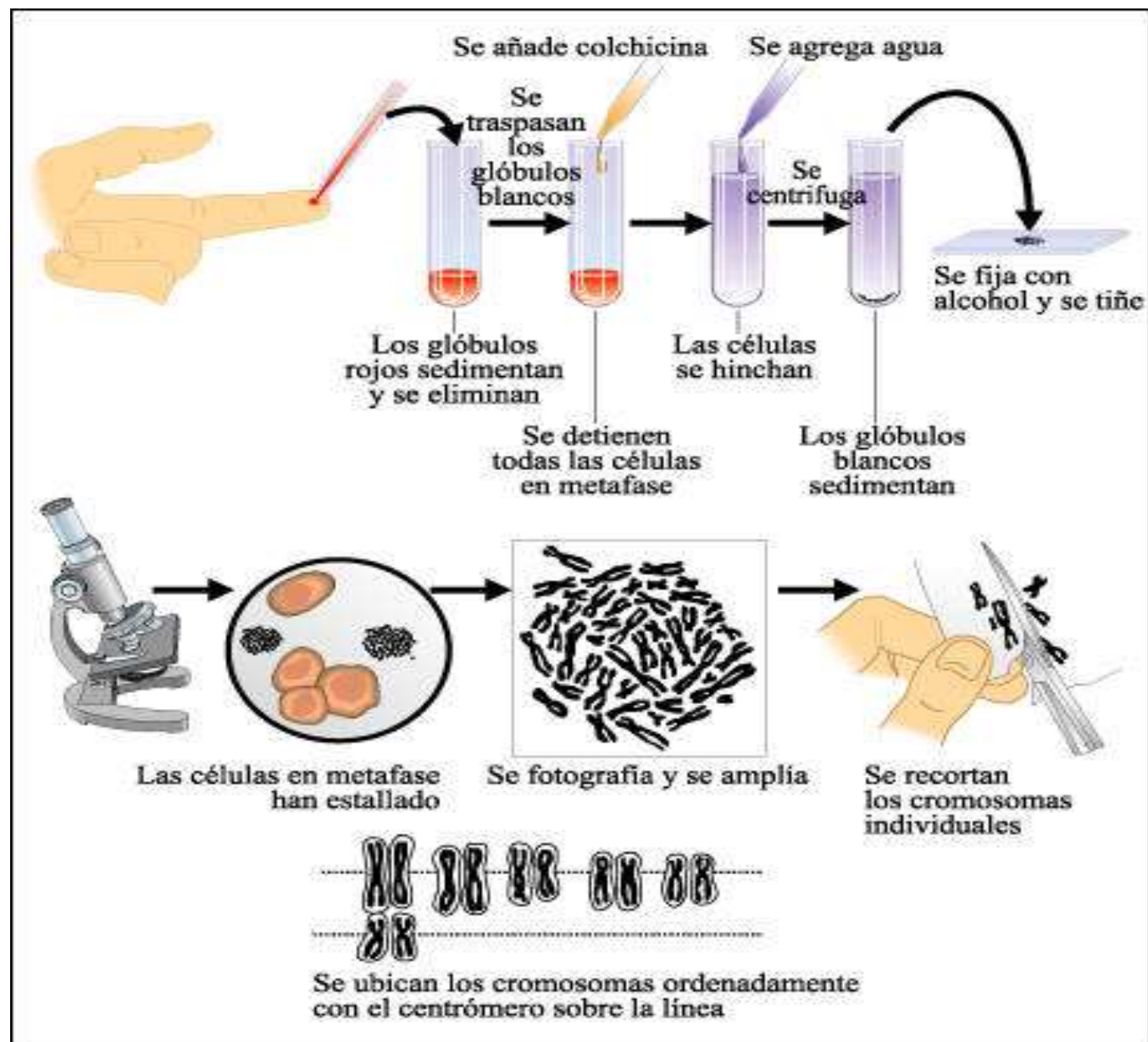
En la década de los 80' el desarrollo de la citogenética molecular revolucionó el campo al permitir la identificación de rearrreglos únicamente visibles en el nivel molecular mediante la utilización de sondas incluso en etapas del ciclo poco convencionales

Los cromosomas son mejor estudiados en la metafase o la profase meiótica o mitótica, aunque algunos estudios tales como los métodos de hibridación in situ por fluorescencia pueden utilizar células interfásicas.

Es posible realizar un análisis cromosómico en una variedad de tejidos, dividiéndose espontáneamente como en médula ósea, nodos linfáticos, testículos, algunas sangres leucémicas, tumores sólidos, algunos fluidos pleurales y frecuentemente en sangre fetal o de recién nacido; pero también en células que han sido estimuladas en cultivo para entrar en activa división como linfocitos sanguíneos, fluido amniótico, piel y otros tejidos conteniendo fibroblastos.

Los procedimientos más empleados en el análisis cromosómico, recurren a técnicas de cultivo celular in vitro para analizar cromosomas durante la profase tardía o la metafase, estadios en los que están más condensados y con una morfología más definida que permita ordenarlos, compararlos y analizarlos.

Para el estudio de los cromosomas se han desarrollado diversos procedimientos que comprenden tres pasos fundamentales:  
**SIEMBRA, PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS**



# LA SIEMBRA

Aunque el estudio puede llevarse a cabo en forma directa sobre cualquier tipo de célula de multiplicación activa, las células vivas más fácilmente accesibles son las obtenidas mediante punción venosa de sangre periférica, a la cual se añade heparina para evitar su coagulación.

El término sembrar hace referencia a la incorporación de la muestra, p.e. sangre, en un medio apropiado para su crecimiento bajo estrictas condiciones de esterilidad.

Las células que se estudian son los linfocitos dado que los eritrocitos y las plaquetas han perdido su núcleo y por lo mismo no tienen cromosomas.



El medio contiene los siguientes reactivos:

- RPMI 1640 es un medio bufferizado a base de bicarbonato, enriquecido con proteínas, carbohidratos, aminoácidos, vitaminas, minerales y otros suplementos en proporciones adecuadas para mantener el crecimiento celular.
- Suero Fetal Bovino (SFB) es un suplemento del medio que entre muchos otros componentes posee factores de crecimiento que estimulan el cultivo y es determinante para la adaptación de las células al nuevo ambiente artificial.

- Fitohemaglutinina (PHA) es una glucoproteína vegetal (lectina) la cual se acopla a las proteínas de la membrana de los linfocitos en las primeras 24 horas de crecimiento del cultivo para actuar como un agente mitógeno que induce la transformación blástica de los linfocitos. Posteriormente los propios linfocitos segregan interleuquina 2 para continuar el estímulo.
- Solución penicilina – estreptomicina para evitar cualquier tipo de proliferación bacteriana o micótica durante las 72 horas que estarán en crecimiento a 37º C.

# EL PROCESAMIENTO

Como se deben obtener cromosomas en metafase es necesario detener las células que están en división activa, en dicho estadio.

Esto se logra con el empleo de la colchicina o el colcemid, una sustancia que impide la formación del huso acromático, evitando la polimerización de las fibras del uso, de tal forma que no se puede avanzar en las etapas de mitosis.

Así mismo los cromosomas deben presentar una adecuada dispersión que permite visualizarlos en toda su extensión. Por tanto, el uso de soluciones hipotónicas es importante, ya que incrementan el volumen celular y los cromosomas encuentran el espacio suficiente para dispersarse.

El precalentamiento de la solución hipotónica a 37°C puede incrementar la efectividad por la rapidez con que el agua se transporta a través de la membrana

# EL ANÁLISIS

Para ser observados bajo el microscopio de luz los cromosomas se deben teñir con un colorante que resalte su morfología.

Después se cuenta un número significativo de metafases entre 25 y 100 según sean normales o no, se escogen las mejores en cuanto a morfología y dispersión de cromosomas y se les toma una fotografía se recortan los cromosomas homólogos y se elabora así un cariotipo, objetivo final de todo este procedimiento.

El cariotipo es una forma de análisis cromosómico que se basa en el ordenamiento estándar de los cromosomas contenidos en una célula, de acuerdo con su tamaño, localización del centrómero y patrón de bandeo.

Con base en el criterio de tamaño y posición del centrómero los cromosomas pueden ser de cuatro tipos:

- Metacéntricos: Si el centrómero está localizado en la parte media del cromosoma designando dos brazos sensiblemente iguales.
- Submetacéntrico: Si el centrómero está mas cerca de uno de los extremos del cromosoma, determinando claramente un brazo corto o p (petit) y uno largo o q ( por ser la letra del alfabeto que le sigue a la p).
- Acrocéntrico: Si el centrómero está situado hacia uno de los extremos quedando un brazo p muy reducido poco observable. En el caso de los humanos se observan dos pequeñas estructuras similares a palillos de tambor denominados Satélites.
- Telocéntricos: Si carece totalmente de brazo corto. En el caso de los humanos no existe este tipo de cromosomas.

La precisión del ordenamiento propuesto por los procedimientos de análisis para la elaboración del cariotipo, se ha logrado establecer a través del desarrollo de las TÉCNICAS DE BANDEO, es decir, el tratamiento de una placa para obtener una secuencia de segmentos claros y oscuros o fluorescente y no fluorescentes que aparecen a lo largo del cromosoma, tiñéndolo en forma no uniforme cuando se le aplican colorantes, que permiten establecer correlaciones más precisas entre los síndromes clínicos y las alteraciones cromosómicas que los ocasionaron.

Estas técnicas permiten visualizar un patrón estable y característico para cada cromosoma, de gran utilidad práctica porque permite la identificación precisa de cada cromosoma y la caracterización de regiones particulares dentro de cada brazo cromosómico, haciendo posible comparar los cromosomas individualmente con IDEOGRAMAS estándar (*esquema que representa la distribución normal de las bandas cromosómicas obtenidas bajo una técnica particular*) y el patrón de bandeo entre los miembros de un par homólogo.

El patrón de bandas varía según el estado de elongación de los cromosomas.

En cromosomas metafásicos, acortados por mayor tiempo de exposición a la colchicina, el número total de bandas detectables en todo el cariotipo humano no pasa de 400.

En cromosomas prometafásicos, como son más elongados, el número de bandas puede llegar a sobrepasar las 1000 y es llamado **bandeo de alta resolución** y difiere del anterior en el desdoblamiento de bandas metafásicas en subbandas.



# Algunas de las técnicas de bandeo más utilizadas son:

## **BANDEO G**

Esta técnica ha llegado a ser la más utilizada para la tinción de rutina de placas de cromosomas, dado que los procedimientos son muy simples y pueden ser mantenidas por muchos años sin deteriorarse.

1. Desnaturalización por calor (60°C) en buffer de la placa extendida (para que las proteínas que empaquetan el cromosoma se suelten un poco)
2. Digestión con el enzima proteolítica Tripsina, elimina aquellas que están en las zonas menos empaquetadas
3. De esta forma el colorante Giemsa se pega solo a aquellas zonas que aún conservan proteínas.
  - Es decir, la heterocromatina por ser de replicación tardía va a quedar intensamente coloreada
  - Mientras las zonas de eucromatina quedan claras por la pérdida más fácil de sus proteínas.

Al compararlas con el ideograma se puede determinar qué genes se han perdido y por consiguiente, qué proteínas no se están sintetizando, para así asociarlas a patologías específicas. Especialmente las asociadas a los cromosomas autosómicos y a las anomalías numéricas.

## **BANDEO R**

Es contraria a las bandas G, ya que evidencian las zonas de replicación tardía como zonas claras.

Para tal fin se utilizan reactivos afines a la Timina como la Bromodesoxiuridina y el H $\ddot{o}$ echst.

- la Bromodesoxiuridina es un reactivo análogo de la timina que desplaza dicha base en la síntesis del ADN
- el H $\ddot{o}$ echst es un fotolítico que presenta gran afinidad por la bromodesoxiuridina y provoca la ruptura y pérdida de las zonas ricas en A-T .

Por lo tanto el giemsa se une a las proteínas de la eucromatina que se conservan .

Este bandeo es útil para identificar cualquier anomalía estructural por pequeña que sea, especialmente, las relacionados con los cromosomas sexuales.

## BANDEO C

Solo evidencia las zonas de replicación tardía mas empaquetadas, es decir, la heterocromatina constitutiva (correspondiente a las regiones  $\alpha$ -satélite, centroméricas y teloméricas).

Con un tratamiento con ácido clorhídrico (HCl), Hidróxido de Bario ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ) y desnaturalización al calor se sueltan todas las proteínas asociadas al ADN excepto las más empaquetadas.

Este bandeo es muy útil cuando se sospechan daños en las zonas centroméricas como inversiones pericéntricas y para la búsqueda de polimorfismos de heterocromatina de los cromosomas autosómicos 1, 9,16 y la parte distal del brazo largo del cromosoma Y.

## **BANDEO Q**

Utilizando mostaza de quinacrina (un tinte de acridina que se une al ADN por intercalación o por unión iónica externa) y estimulando los cromosomas con una luz ultravioleta, se ponen de manifiesto bandas fluorescentes de idéntico patrón al de las bandas G excepto en las zonas heterocromáticas de los cromosomas 1, 9 y 16, en los satélites de los acrocéntricos y en la porción distal del cromosoma Y, que dan una tinción variable.

# FISH

Actualmente la citogenética médica usa metodologías derivadas de la genética molecular para complementar, verificar y ampliar sus posibilidades diagnósticas.

La Citogenética Molecular como una de las más recientes aplicaciones a los estudios clínicos de aberraciones cromosómicas es la visualización de loci utilizando la técnica bioquímica dinámica de *Hibridación In Situ*.

La técnica de Hibridación In Situ por fluorescencia (FISH) ha progresado en la actualidad hasta tal punto, que incluso más de 27 sondas coloreadas de ADN, pueden ser hibridadas simultáneamente y detectadas con un set de filtros especializados y un software acoplado a un analizador de imágenes.

Al aplicar conjuntamente los criterios de organización aportados por el cariotipo y el patrón de bandas ha sido más fácil la ubicación de los pares homólogos en grupos morfológicos que en el caso de los humanos comprende 7 grupos designados con letras así:

Grupo A: Son los Metacéntricos Grandes, que incluyen los pares homólogos 1, 2 y 3, aunque el 2 tiende a ser submetacéntrico

Grupo B: Son los Submetacéntricos Grandes, que incluyen los pares homólogos 3 y 4.

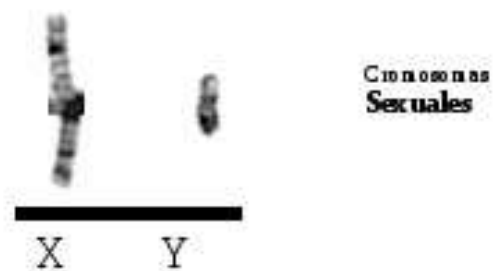
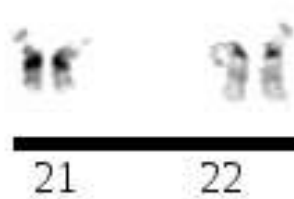
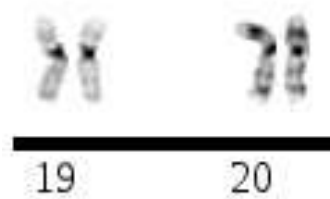
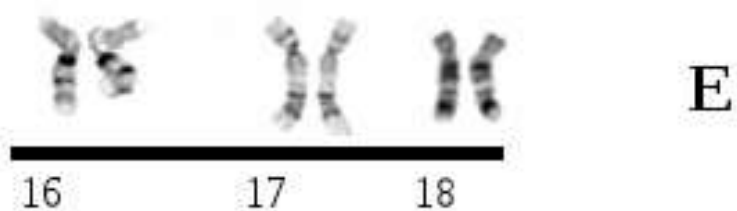
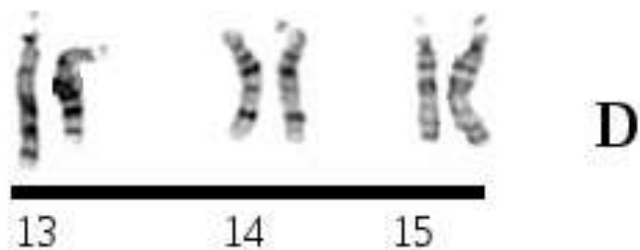
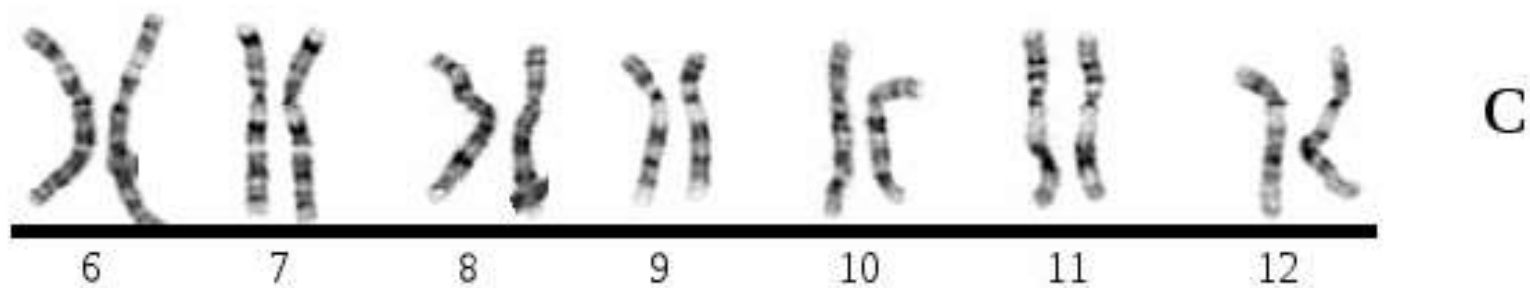
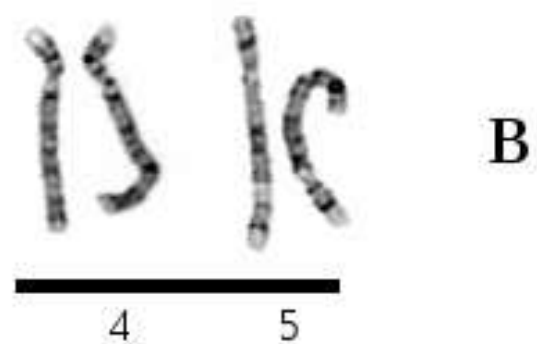
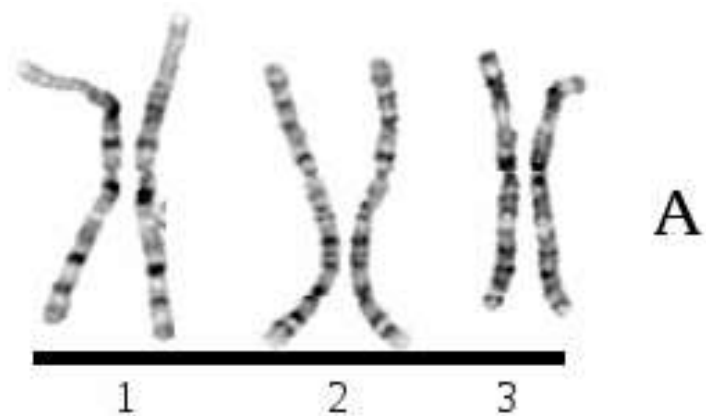
Grupo C: Son los Submetacéntricos Medianos, que incluyen los pares autosómicos del 6 al 12 y el gonosoma X, que por su tamaño y morfología puede ser ubicado entre el 7 y el 8.

Grupo D: Son los Acrocéntricos Grandes, que incluyen los pares homólogos 13, 14 y 15 caracterizados por presentar satélites en sus brazos cortos.

Grupo E: Son los Submetacéntricos pequeños, que incluyen los pares homólogos 16, 17 y 18, aunque el par 16 tiende a ser metacéntrico.

Grupo F: Son los Metacéntricos Pequeños, que incluyen los pares homólogos 19 y 20.

Grupo G: Son los Acrocéntricos Pequeños, que incluyen los pares homólogos 21 y 22 que presentan satélites en sus brazos cortos y el gonosoma Y, que aunque es morfológicamente acrocéntrico carece de satélites y constituye junto con el X el par 23, único del cariotipo no homólogo estructuralmente.



# POLIMORFISMO

Aunque los pares cromosómicos establecidos a través del cariotipo deben corresponderse en tamaño, estructura y forma, existen variaciones en algunos segmentos cromosómicos que no implican ningún tipo de patología específica o anormalidad cromosómica.

Los Polimorfismos se definen entonces como variantes cromosómicas cuya frecuencia en la población, es más elevada de lo que se esperaría en una tasa normal de mutación recurrente (es decir que es mucho más habitual que una mutación común).



# **Algunos De Los Polimorfismos Más Habituales Son Los Relacionados Con:**

- Tamaño:** (Longitud del cromosoma) ocasionado por artefactos adicionados por las técnicas de preparación de los cromosomas o por cambios reales en la longitud de algunos segmentos cromosómicos.
- Satélites:** Los brazos cortos, los tallos o los satélites en sí pueden aparecer duplicados, en tandem o separados. El brazo corto puede aparecer notablemente aumentado ( $p+$ ) o con aparente delección ( $p-$ ), pueden presentar variación en la intensidad de tinción o fluorescencia o en su funcionalidad.

**Constricciones secundarias o Zonas Heterocromáticas:**  
Corresponden a aquellas regiones que revelan la localización de la heterocromatina constitutiva, regiones ampliamente polimórficas en la población humana, asiento de los distintos tipos de ADN satélite o altamente repetitivo, que se tiñe pálidamente con las técnicas usuales. Se encuentra en las regiones proximales de los brazos largos de los cromosomas 1,9 y 16, la porción distal del brazo largo del cromosoma Y y los brazos cortos y satélites de los acrocéntricos.

**Polimorfismos con las técnicas de Bandas:** Generalmente corresponden a la heterocromatina constitutiva o en el caso de las bandas Q pueden ponerse de manifiesto polimorfismos en la intensidad de fluorescencia de zonas Heterocromáticas.

En general, dichos polimorfismos resultan útiles para identificar el origen paterno o materno de las anormalidades cromosómicas.

Se ha establecido un Sistema Internacional de Nomenclatura para la Citogenética Humana (ISCN) por medio del cual la descripción del cariotipo normal y patológico está estandarizado. La denominación de un cariotipo comienza con el número cromosómico, continúa con la fórmula sexual y después se inscriben las diferentes anormalidades cromosómicas encontradas designadas por sus respectivas abreviaturas en letra minúscula y especificando los cromosomas, regiones, bandas y subbandas implicadas (46, XX o 46,XY).

Los centrómeros, los telómeros y las zonas intermedias se usan como hitos, para definir regiones principales en el cromosoma y se expresan como un primer dígito después de la designación del cromosoma y del brazo, empezando siempre desde el centrómero. Luego se designa un segundo dígito que corresponde a las bandas de cada región de proximal a distal (alejada del centrómero), y en cromosomas más elongados, de alta resolución se usa un tercer dígito separado de los dos anteriores por un punto para denotar las subbandas (46,XX,del(1)(q18); 46,XY,t(1;8)(p21;q32); 47,XXY).

FIIIIIIIIN