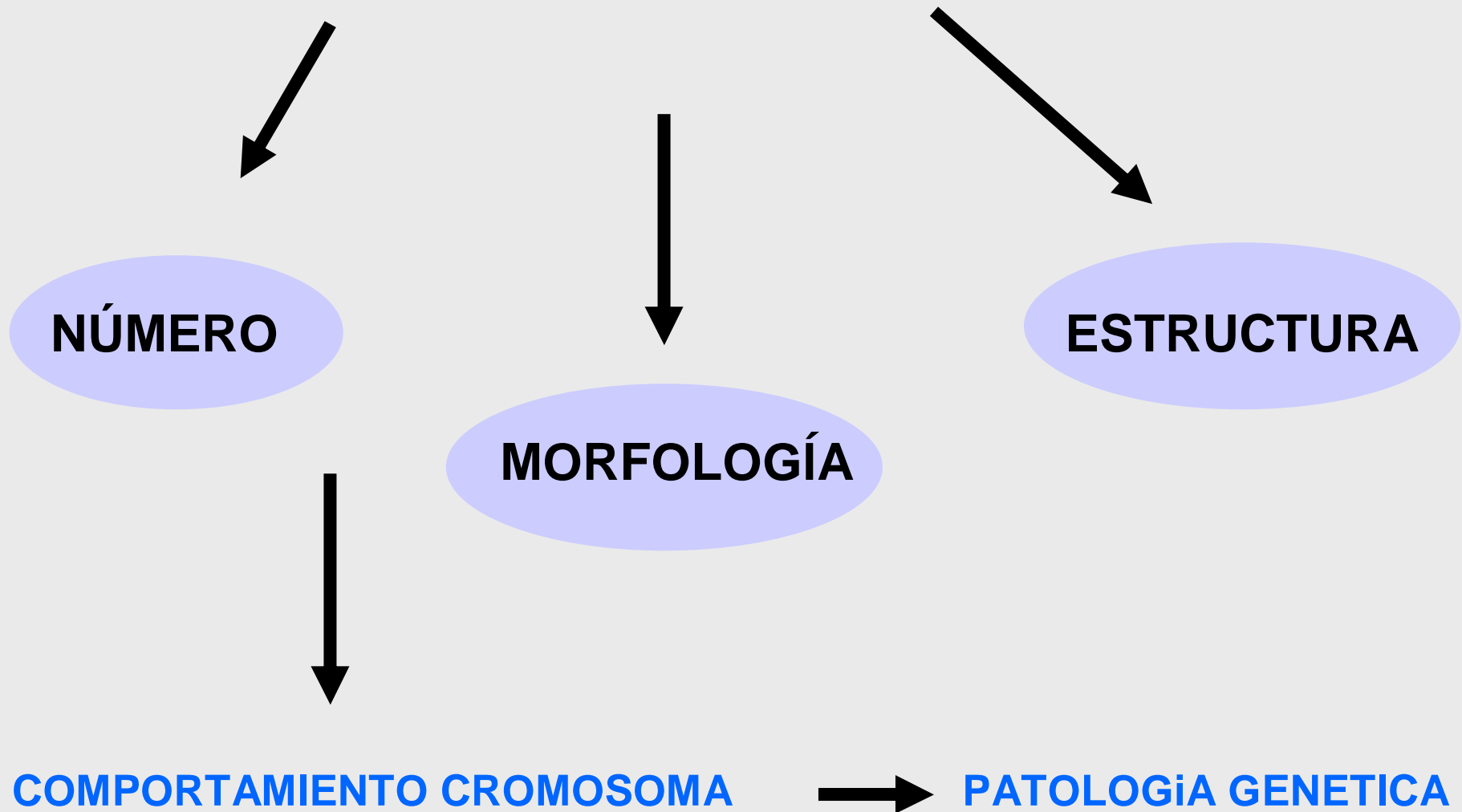


Medicina Molecular 2011

TP Citogenética Humana

CITOGENÉTICA



OBJETIVO:

- Familiarizarse con la metodología empleada en la citogenética humana.

DESARROLLO:

- 1) Observación de preparados al MO y fluorescencia.
- 2) Realización de extendidos a partir de suspensiones celulares.

OBJETIVO:

- **Familiarizarse con la metodología empleada en la citogenética humana.**

DESARROLLO:

- 1) Observación de preparados al MO y fluorescencia.**
- 2) Realización de extendidos a partir de suspensiones celulares.**



METODO PARA OBTENER PREPARACIONES DE CROMOSOMAS:

- 1) Recolección de las células-----MUESTRA.**
- 2) Cultivo celular.**
- 3) Agregado de un inhibidor de la mitosis para detener las células en metafase.**
- 4) Separación de los cromosomas.**
- 5) Fijación.**
- 6) Preparación de los extendidos y coloración.**

METODO PARA OBTENER PREPARACIONES DE CROMOSOMAS:

1) Recolección de las células-----MUESTRA.

2) Cultivo celular.

3) Agregado de un inhibidor de la mitosis para detener las células en metafase.

4) Separación de los cromosomas.

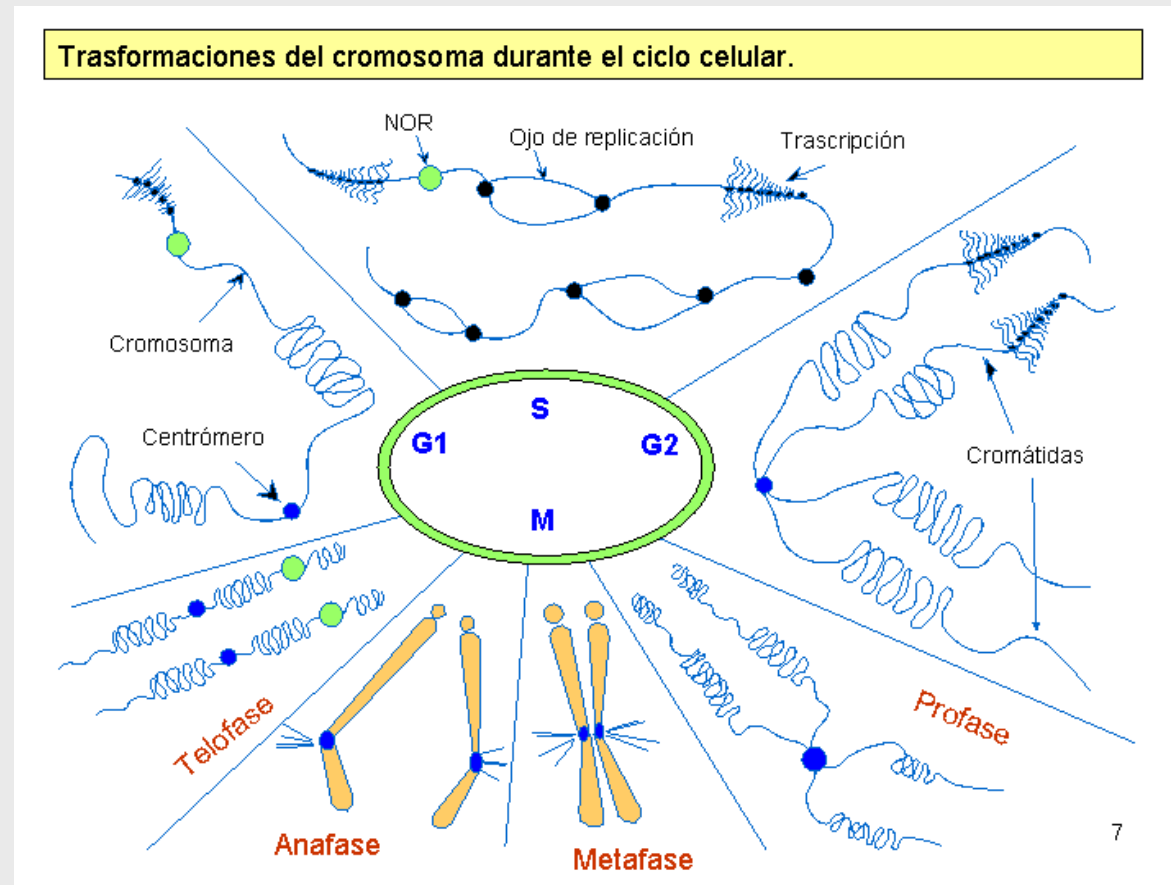
5) Fijación.

6) Preparación de los extendidos y coloración.

METODO PARA OBTENER PREPARACIONES DE CROMOSOMAS:

- 1) Recolección de las células-----MUESTRA.**
- 2) Cultivo celular.**
- 3) Agregado de un inhibidor de la mitosis para detener las células en metafase.**
- 4) Separación de los cromosomas.**
- 5) Fijación.**
- 6) Preparación de los extendidos y coloración.**

En humanos, los estudios se realizan en células en activa división mitótica → en metafase.



METODO PARA OBTENER PREPARACIONES DE CROMOSOMAS:

- 1) Recolección de las células-----MUESTRA.**
- 2) Cultivo celular.**
- 3) Agregado de un inhibidor de la mitosis para detener las células en metafase.**
- 4) Separación de los cromosomas.**
- 5) Fijación.**
- 6) Preparación de los extendidos y coloración.**

METODO PARA OBTENER PREPARACIONES DE CROMOSOMAS:

- 1) Recolección de las células-----MUESTRA.
- 2) Cultivo celular.
- 3) Agregado de un inhibidor de la mitosis para detener las células en metafase.
- 4) Separación de los cromosomas.
- 5) Fijación.
- 6) Preparación de los extendidos y coloración.

METODO PARA OBTENER PREPARACIONES DE CROMOSOMAS:

- 1) Recolección de las células-----MUESTRA.**
- 2) Cultivo celular.**
- 3) Agregado de un inhibidor de la mitosis para detener las células en metafase.**
- 4) Separación de los cromosomas.**
- 5) Fijación.**
- 6) Preparación de los extendidos y coloración.**

Técnica standard

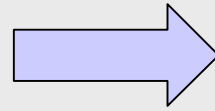
Coloración con colorante Giemsa



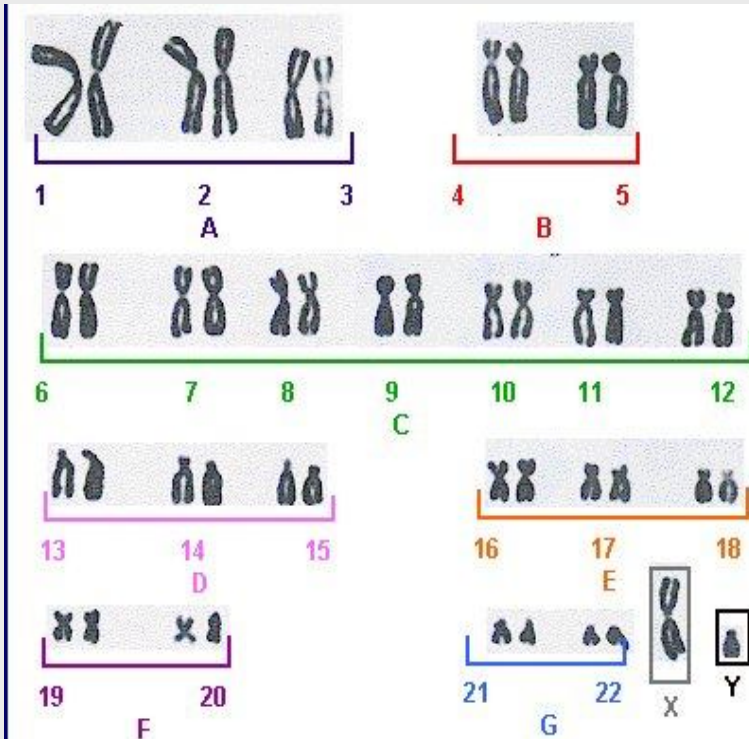
NÚMERO



MORFOLOGÍA



- ✓ Tamaño
- ✓ Posición del centrómero



22 PARES AUTOSÓMICOS

1 PAR SEXUAL → XX ó XY

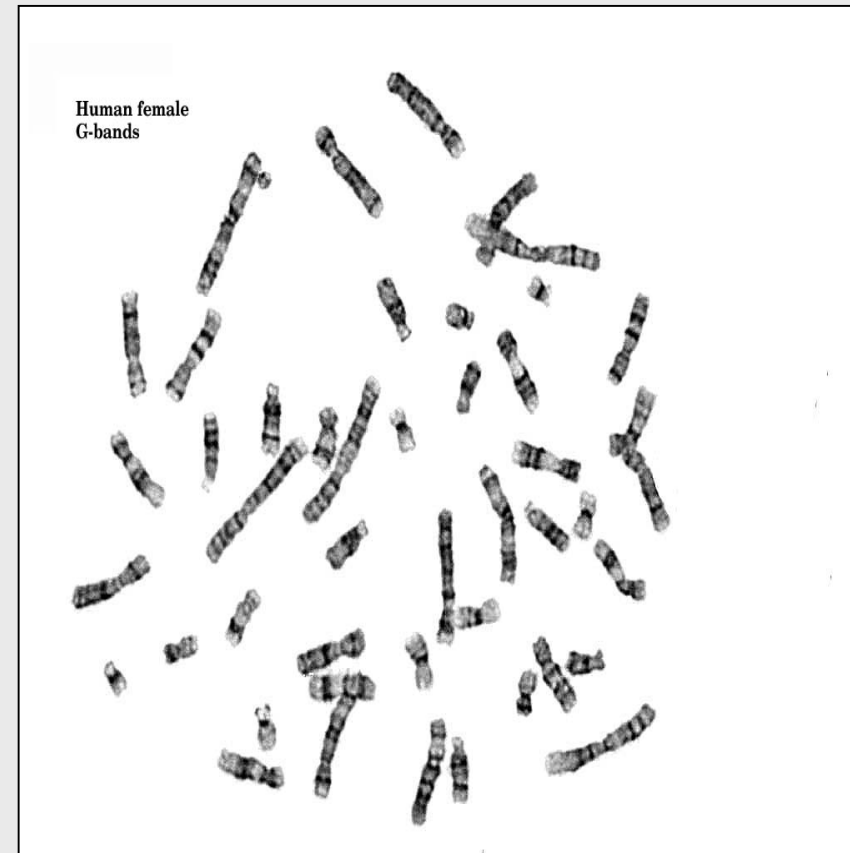
GRUPO	MORFOLOGÍA	PARES CROMOSÓMICOS
A	Metacéntricos Grandes	1 - 2 - 3
B	Submetacéntricos Grandes	4 - 5
C	Submetacéntricos Medianos	6-7-8-9- 10-11-12-X
D	Acrocéntricos Medianos	13 - 14 - 15
E	Submetacéntricos Pequeños	16 - 17 - 18
F	Metacéntricos Pequeños	19 - 20
G	Acrocéntricos Pequeños	21 - 22 - Y

Técnica de Bandeado "G"

Tratamiento con tripsina 0.1%
Coloración con colorante Giemsa



ESTRUCTURA



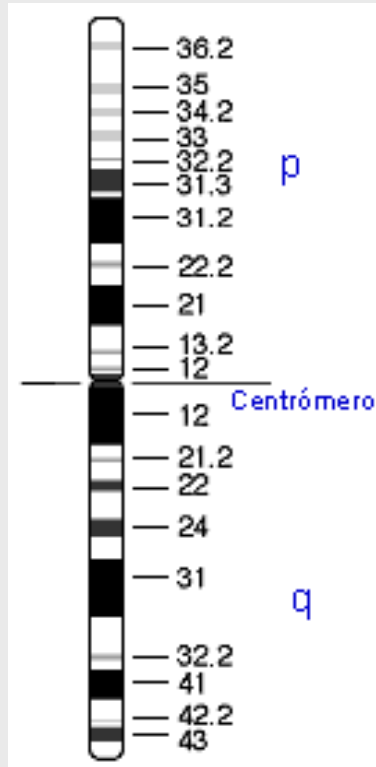
Simbología citogenética

- 1-22 pares cromosomas
 - X Cromosoma X
 - Y Cromosoma Y
 - p Brazo corto
 - q Brazo largo
 - +
- Ej. **+21** --crom. 21 adicional.
- 13p+** -- duplicación parcial de una región.

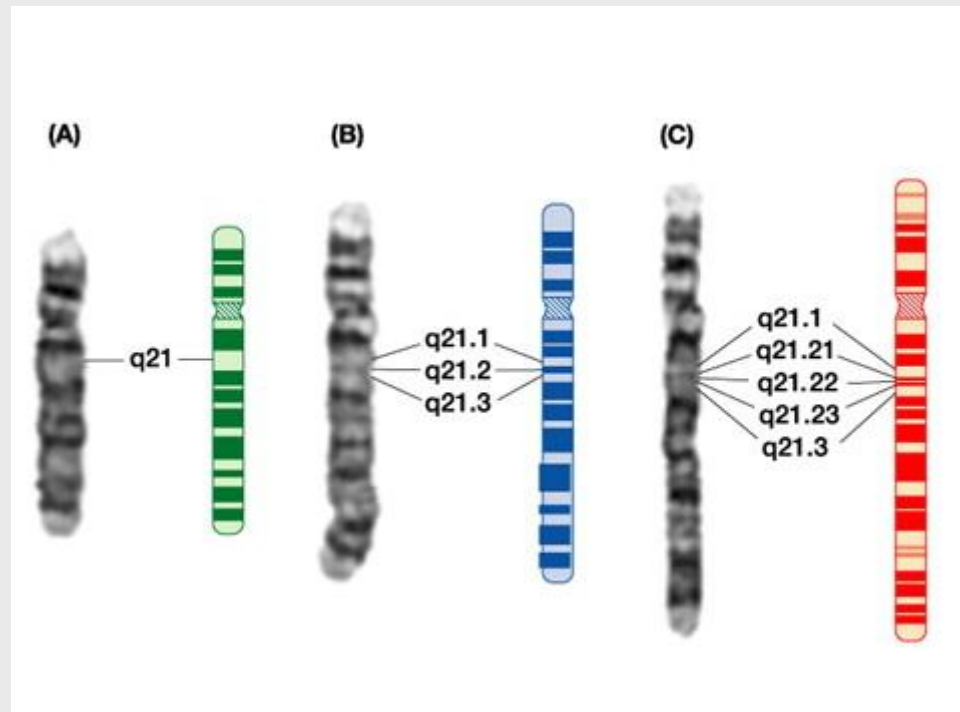
- -
- Ej. **-21** --crom. 21 de menos.
- 5p-** --Pérdida brazo p del crom 5.
- / Presencia de un mosaico.
 - del Delección
 - dup Duplicación
 - S Satélite

SISTEMA INTERNACIONAL DE NOMENCLATURA CITOGENÉTICA HUMANA (ISCN)

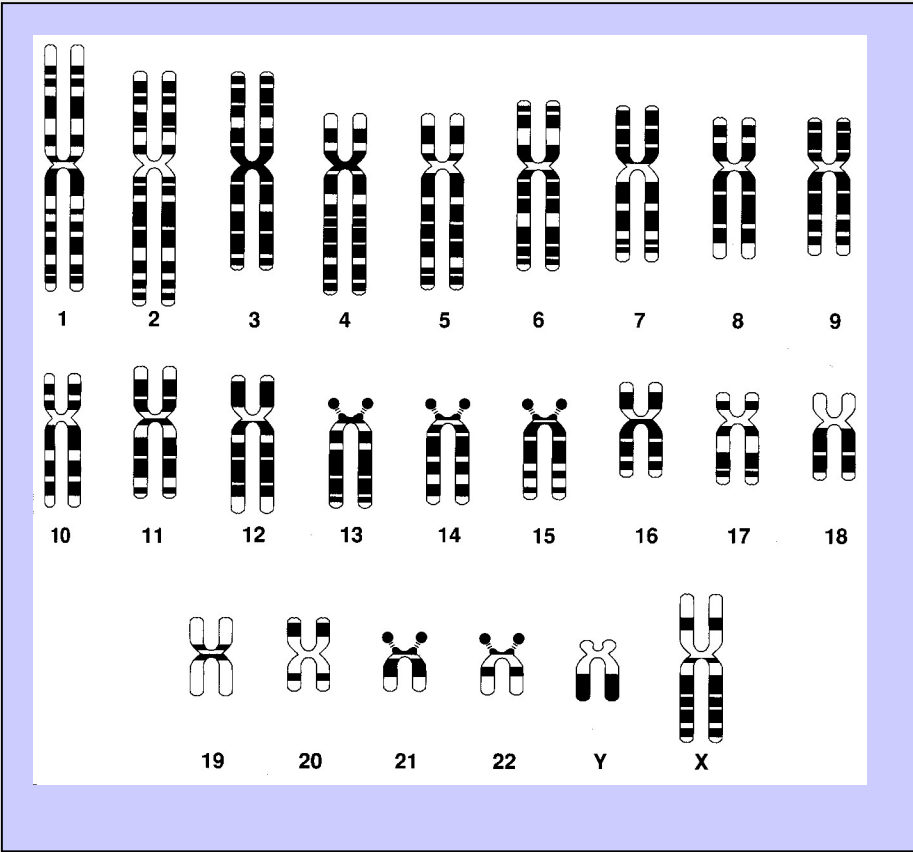
- ✓ Landmarks o “puntos de referencia”
- ✓ Región
- ✓ Bandas
- ✓ Sub-bandas

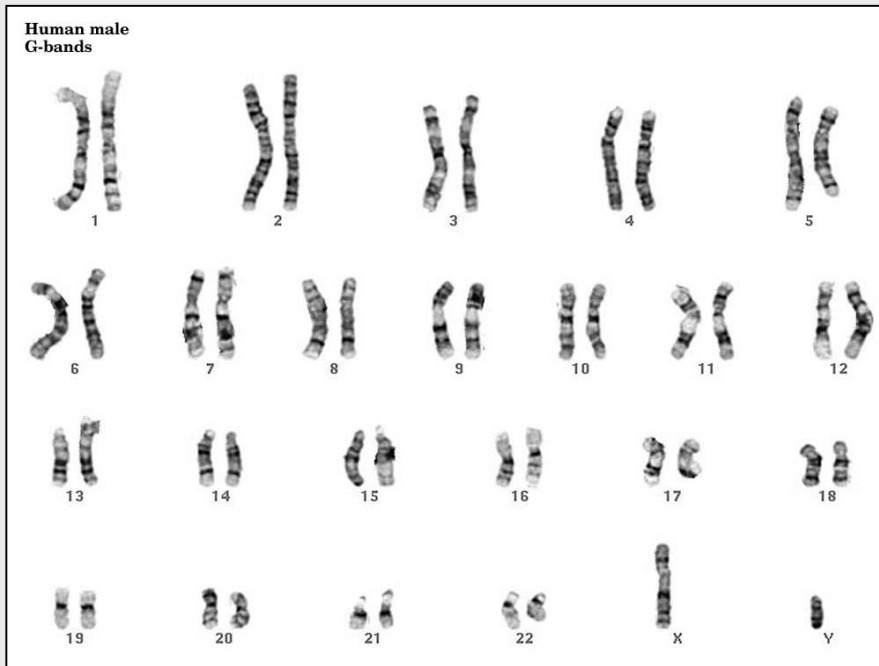


CROMOSOMA 1

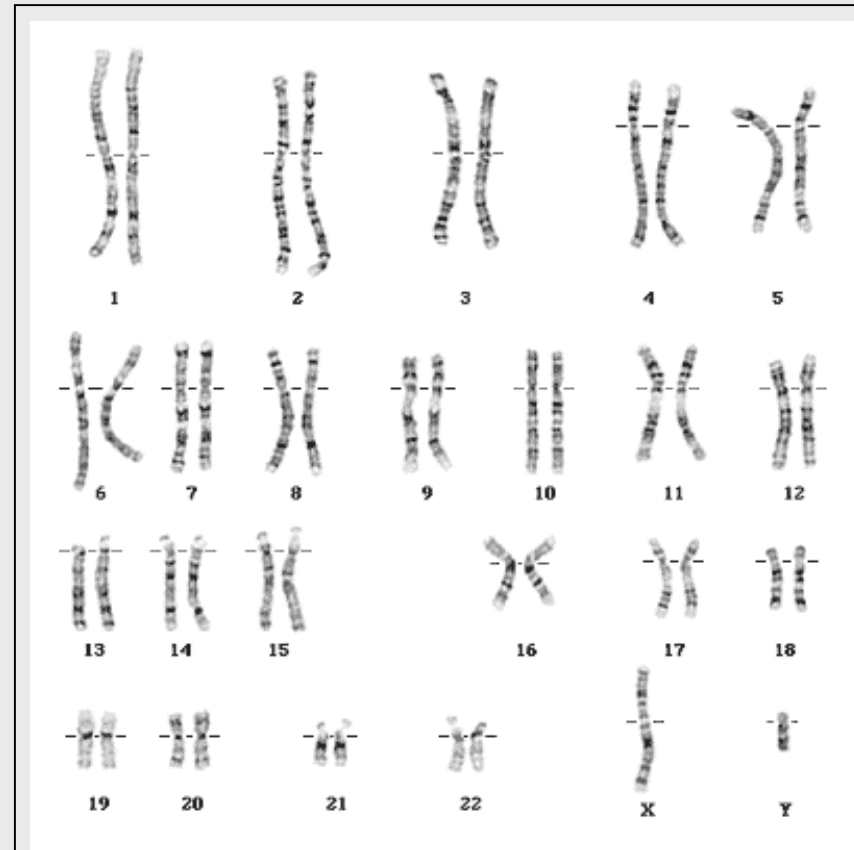


BANDEO G





46,XY
Nivel de resolución = 400



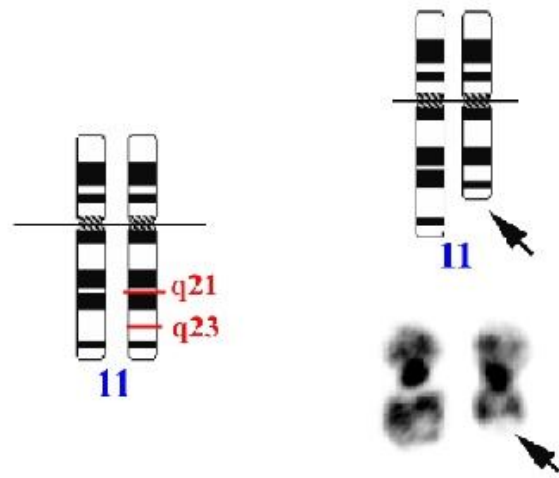
46,XY
Nivel de resolución = 550

ALTA RESOLUCIÓN

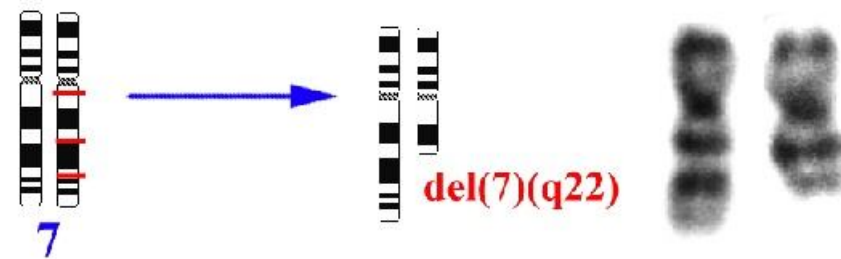
Gentileza Centro Nacional de Genética Médica

Ejemplos de Fórmulas Cariotípicas

46 , XX	♀ normal
46 , XY	♂ normal
45 , X	Síndrome Turner
47 , XXY	Síndrome Klinefelter
47 , XX , +21	Síndrome Down
46 , XX / 47 , XX , +21	Mosaico (Síndrome Down)
46 , XX , 5p-	Síndrome Cri-du-chat
47 , XY , +13	Síndrome de Patou
47 , XY , +18	Síndrome de Edwards
46, XY, -13, +T (13q . 21q)	Translocación (Síndrome Down)

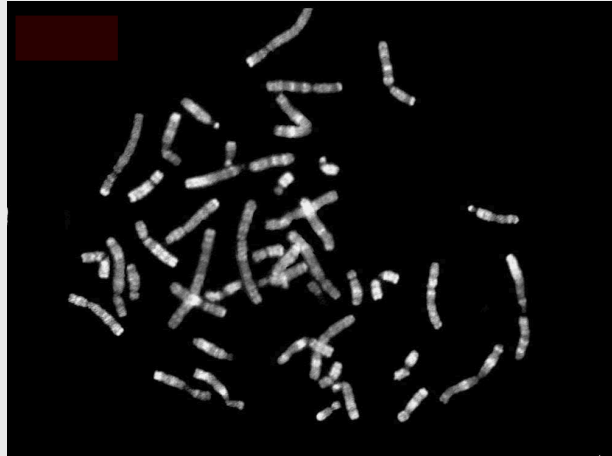


del(11)(q21q23)



del(7)(q22)

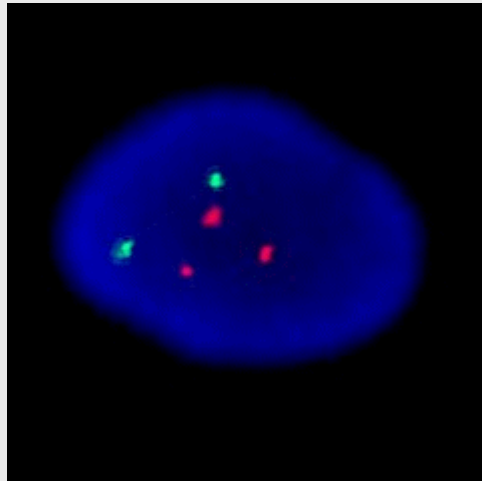
OTRAS TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN CROMOSÓMICA



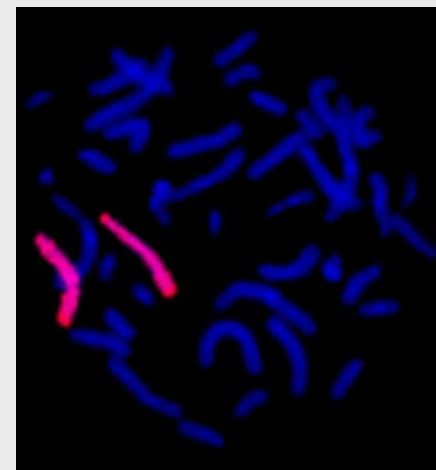
BANDEO "Q"



BANDEO "C"



FISH
Cen 21



FISH
WCP 4

FISH

Hibridación *in situ* fluorescente

- **Es una técnica que combina citogenética clásica con biología molecular.**
- **Es una herramienta de utilidad en investigación y diagnóstico en humanos.**

Se usa para detectar o confirmar anomalías genéticas que generalmente están más allá de la capacidad de resolución de la citogenética de rutina.

Pasos

- **Obtener muestra**
- **Cultivo celular**
- **Inhibidores mitosis**
- **Soluciones hipotónicas**
- **Fijación**
- **Extendidos**
- **Coloración: Giemsa o
Bandeo**



**CITO-
GENETICA**

Pasos

- **Obtener muestra**
- **Cultivo celular**
- **Inhibidores mitosis**
- **Soluciones hipotónicas**
- **Fijación**
- **Extendidos**
- **Coloración: Giemsa o Bandeo**

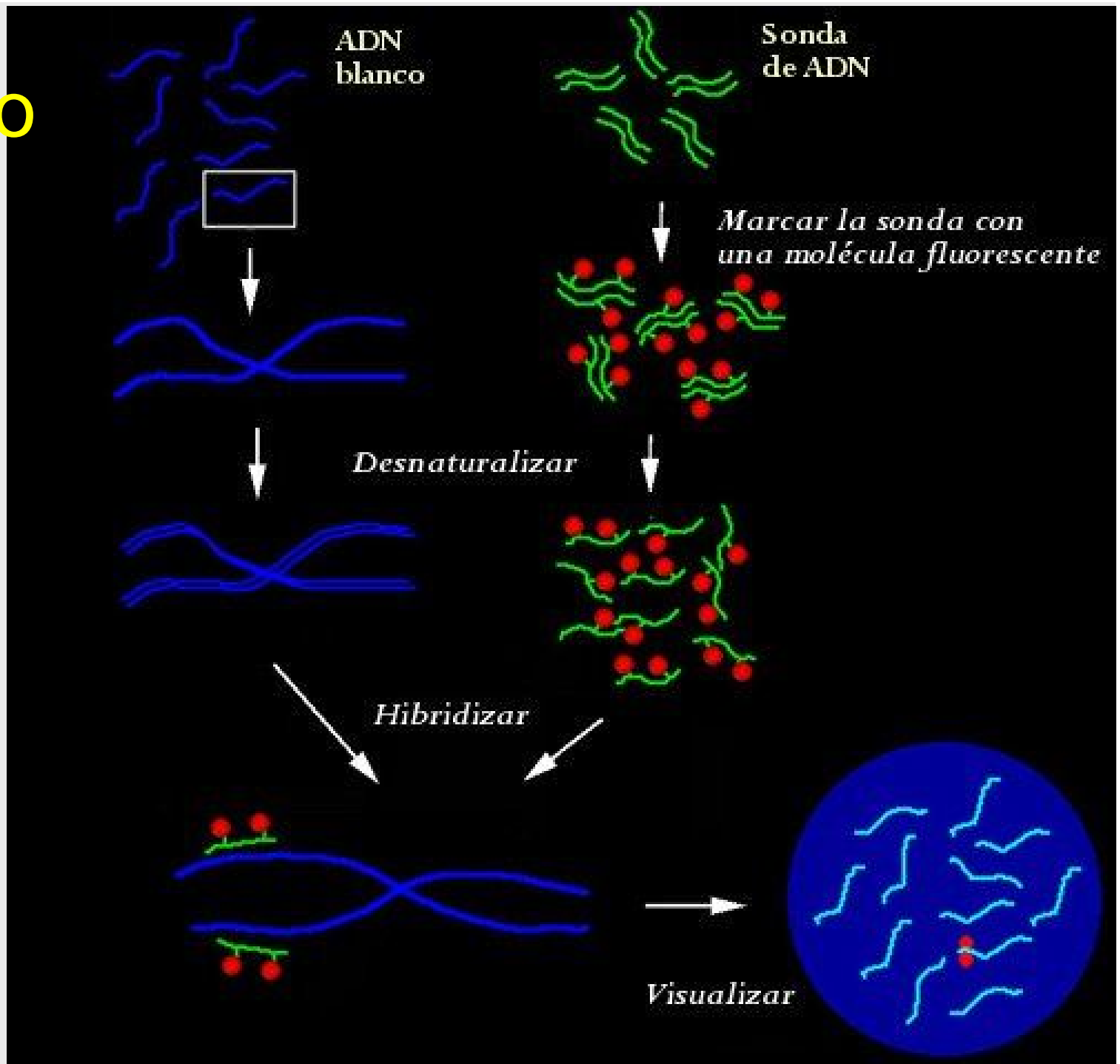
**CITO-
GENETICA**



FISH

Protocolo

FISH



Tipos de sondas

- **Sec ADN repetitivo:** sondas centroméricas.
- **Sec ADN específicas de una región:** genes o loci de interés.
- **Sondas de cromosomas enteros:** secuencia específica de un determinado cromosoma.

Marcación de la sonda:

Directa

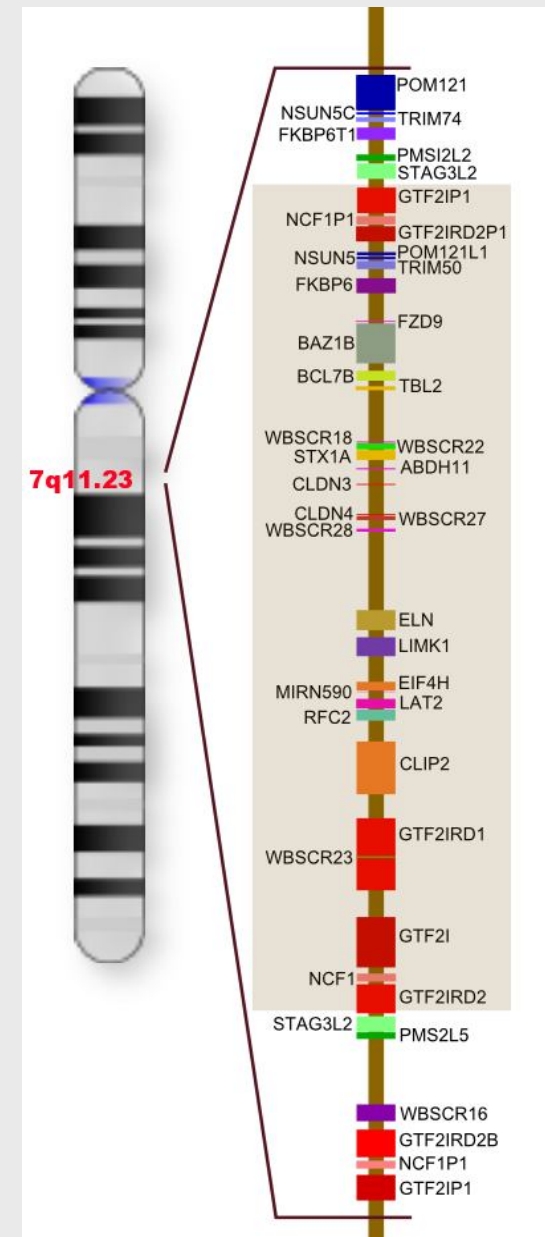
- **FITC**-12-dUTP
- **Rhodamine**-6-dUTP
- **Cy3**-dCTP

Indirecta

- Biotin-11-dUTP
- Digoxigenin-11-dUTP

Síndrome de Williams

Se trata de un desorden genético (prevalencia: 1/7500 a 1/20000 RNV), causado por una deleción en el brazo largo del cromosoma 7, específicamente en 7q11.23.



- **El Síndrome de Williams es un trastorno de origen genético, que cursa con trastornos relacionados al desarrollo.**
- **Esporádico.**
- **Se presenta desde el nacimiento y afecta igualmente a varones y mujeres.**
- **No tiene preferencia étnica.**
- **Suele manifestarse recién a los 2 ó 3 años.**

Los síntomas más destacados del síndrome consisten en:

- expresión fenotípica característica de la cara
- retraso mental
- dificultad en el habla
- defecto coronario de nacimiento, conocido como estenosis supravalvular aórtica (ESA), que se debe a un estrechamiento de la aorta en las proximidades del corazón.

- La zona de la deleción varía entre 1.5-1.8 mega pares de bases (Mb), e involucra aproximadamente 30 genes.
- El gen más estudiado dentro de esta zona es el gen de la elastina, una proteína que brinda elasticidad a los vasos sanguíneos y otros tejidos corporales cuya deficiencia causa estenosis aórtica.
- La deleción se produce casi siempre durante la división celular que da origen al espermatozoide o al óvulo, es decir durante la meiosis.

Secuencia Única

*Síndrome de
Williams-Beuren*

7q11.23

ELN

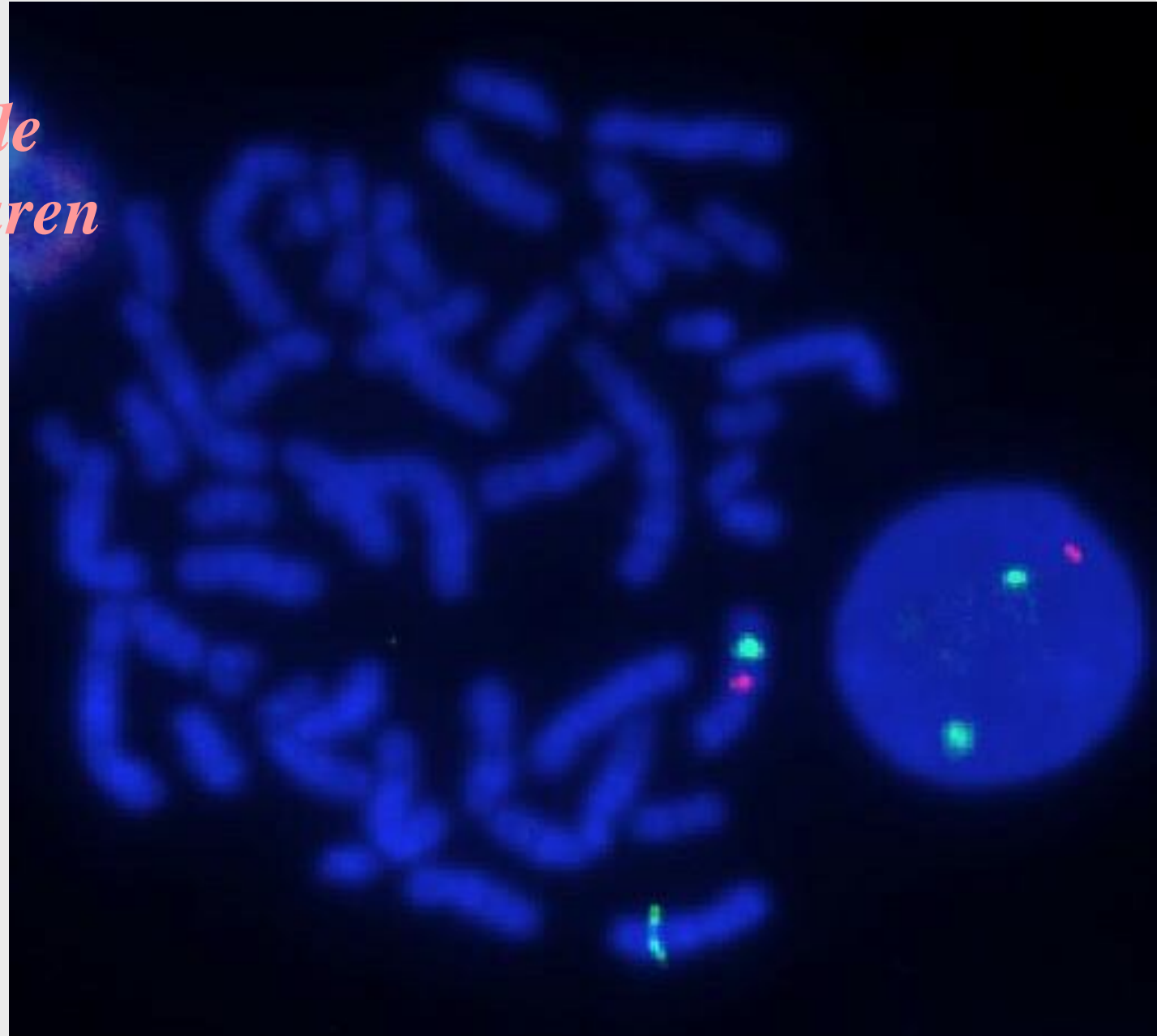
LIMK1

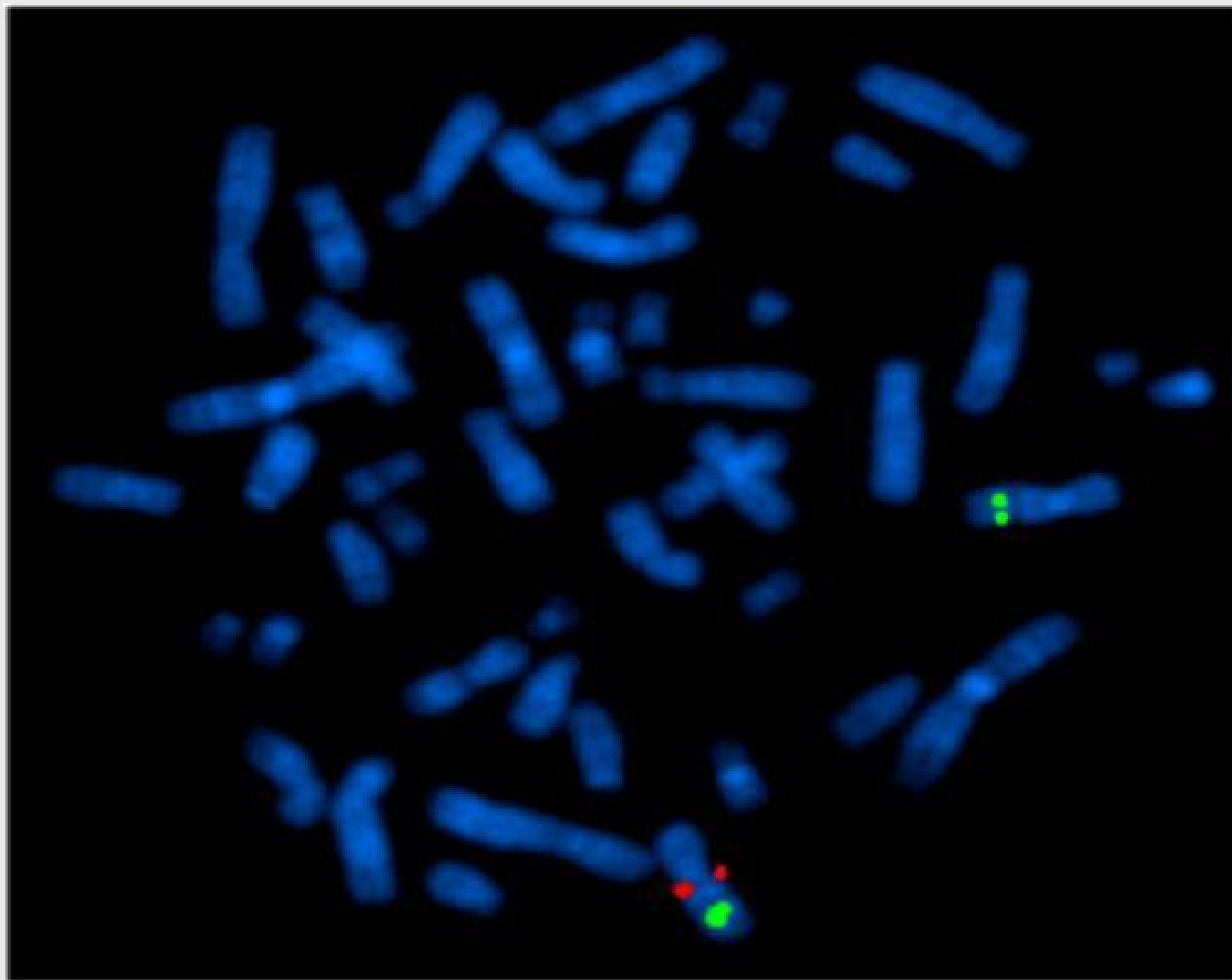
D7S613

7q23

D7S486

D7S522





Limitaciones:

- 1. Se debe tener un conocimiento previo o una sospecha previa de la naturaleza de la aberración.**
- 2. Se debe contar con la sonda de la región de interés.**

Ventajas:

- **FISH de interfase.**
- **Un diagnóstico certero y precoz es fundamental para evitar pasos innecesarios y planificar las medidas óptimas de seguimiento y tratamiento de un paciente.**

DESARROLLO:

- 1) Observación de preparados con tinción standard o bandeo G al MO.**
- 2) Realización de extendidos a partir de pellets celulares fijados.**
- 3) Observación de preparados de pacientes con diagnóstico certero de Síndrome de Williams al microscopio de fluorescencia.**

La realización de este TP es posible gracias al aporte de material biológico proveniente del Dpto. Diagnóstico Genético del Centro Nacional de Genética Médica, ANLIS “Dr. C. Malbrán”, Ministerio de Salud.

Los preparados de Síndrome de Williams fueron gentilmente cedidos por el Dr. Eduardo Pastene, del mismo instituto.