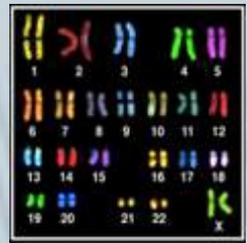


# TÉCNICAS CITOGENÉTICAS

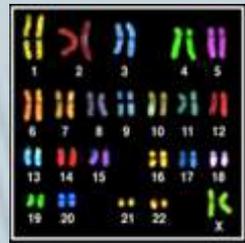
*Dra. María Teresa Lemus Valdés  
Especialista de 2do Grado Genética Clínica.  
Profesora e Investigadora Auxiliar*

# OBJETIVOS:

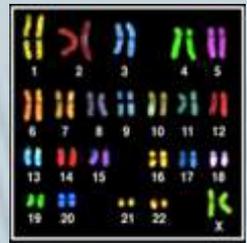


- Describir los fundamentos técnicos del estudio de los cromosomas en interfase celular.
- Describir los fundamentos técnicos para la obtención de cromosomas humanos.
- Mencionar las características del cariotipo humano y la nomenclatura que se utiliza para referirse al cariotipo normal femenino y masculino y para variantes cromosómicas normales.
- Describir tipos de bandas, resolución cromosómica y sus usos.
- Diferenciar información que brindan los análisis citogenéticos de células interfásicas y de los cromosomas.
- Mencionar avances tecnológicos en citogenética molecular.

# CONTENIDOS:

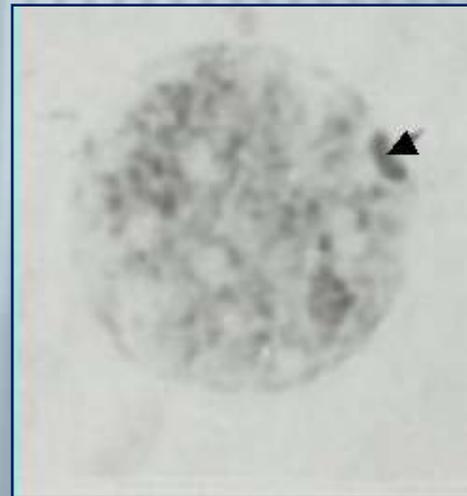


- La Citogenética. Concepto. Antecedentes históricos de los principales descubrimientos.
- Estudio de los cromosomas en interfase celular. Cromatina sexual y cuerpo y. Fundamentos técnicos.
- El cariotipo humano normal.
- Nomenclatura internacional de cromosomas humanos.
- Avances en citogenética molecular.

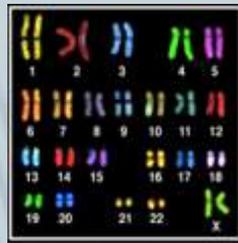


Los cromosomas se hacen visibles durante las **divisiones celulares**: mitosis y meiosis.

Estos se observan directamente a través del microscopio óptico aunque también se pueden detectar señales indirectas **en células en interfase**.

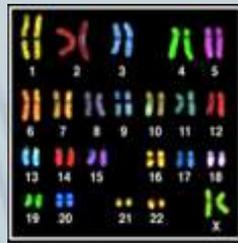


# CITOGENÉTICA



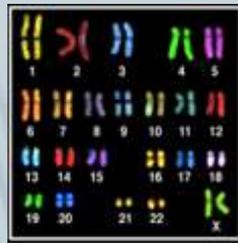
Es la rama de la genética que se ocupa del estudio de los fenómenos citológicos de origen genético. Su objetivo fundamental de estudio son los cromosomas.





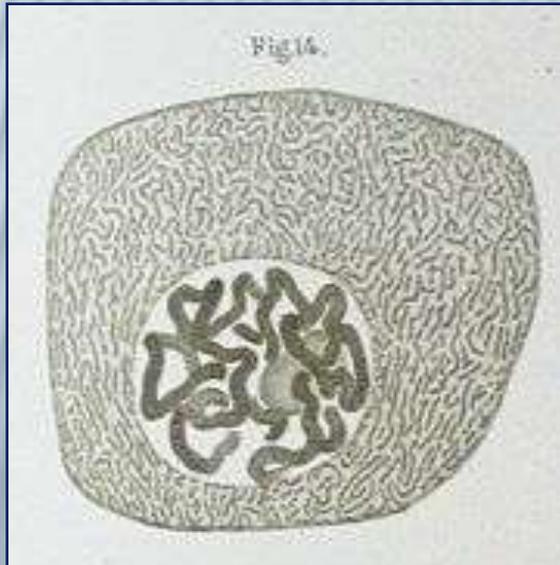
# DESARROLLO HISTÓRICO DE LA CITOGENÉTICA

# Período Oscuro: Siglo XIX-1951



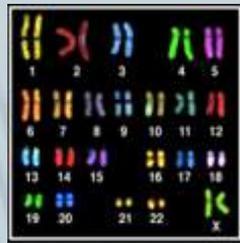
1882: Walter Fleming visualizó y dibujó los cromosomas humanos.

48 CROMOSOMAS

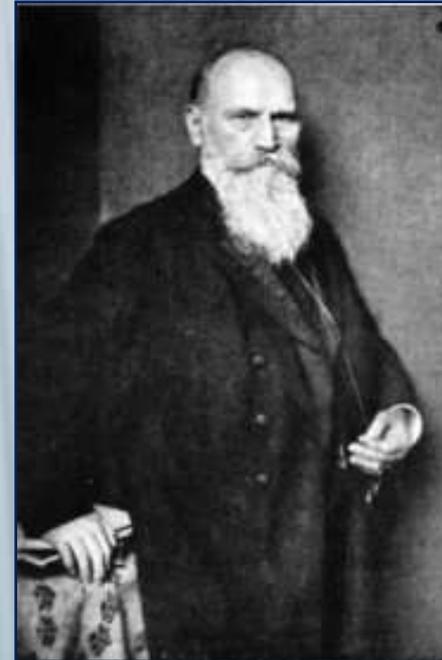


1843-1905.  
Alemania

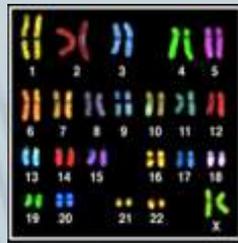
1888: Waldeyer introdujo el término  
“cromosomas”



**CROMO: COLOR**  
**SOMA: CUERPO**



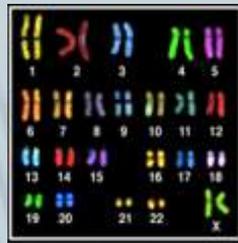
1949: Barr y Bertran descubren la  
cromatina sexual



# Período hipotónico : 1952-1958

1956: Tjio y Levan establecen los 46 cromosomas de la especie humana





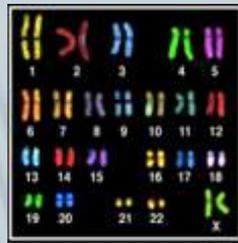
# Período Trisómico: 1959-1969

1959: Lejeune descubre la Trisomía 21 como causa del Síndrome Down

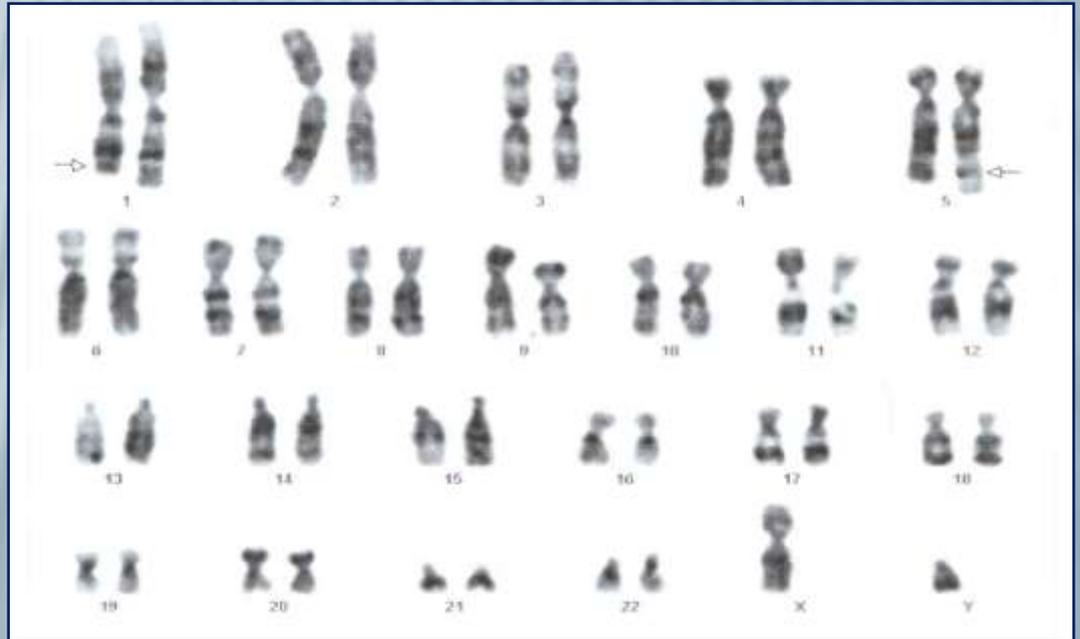
1960: Jacobs y Strong describen el cariotipo 47XXY en el Síndrome de Klinefelter

1961: Ford describe el Síndrome Turner con el cariotipo 45X

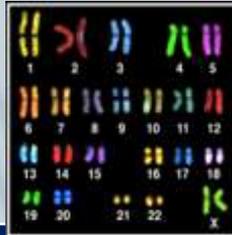
# Período Citogénética Humana: 1970-1977



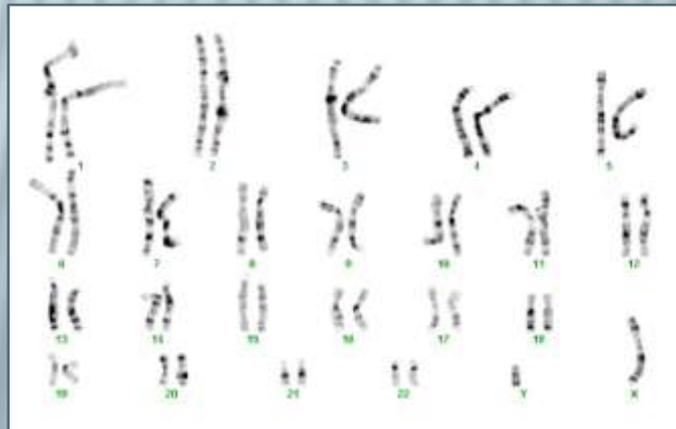
1970: Casperson introdujo la tinción de bandas fluorescentes para cromosomas humanos, describiendo un patrón de bandas.



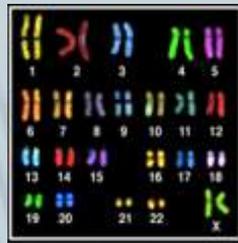
# Período Alta Resolución:



1973: Junis y cols. logran la obtención de cariotipos de cromosomas de mayor resolución, mediante la sincronización de los cultivos y se detectan alteraciones cromosómicas más finas del orden de los 3mb



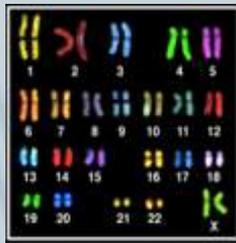
# Período Citogenética Molecular: 1987-actual



Ha permitido entrar en la visualización y análisis de la estructura fina de los cromosomas y su alteración a nivel molecular.

Una secuencia de DNA conocida o modificada químicamente es marcada con colorantes (radiactivos o fluorescentes) hibridando una preparación de cromosomas o núcleos en interfase y se visualizan al microscopio.

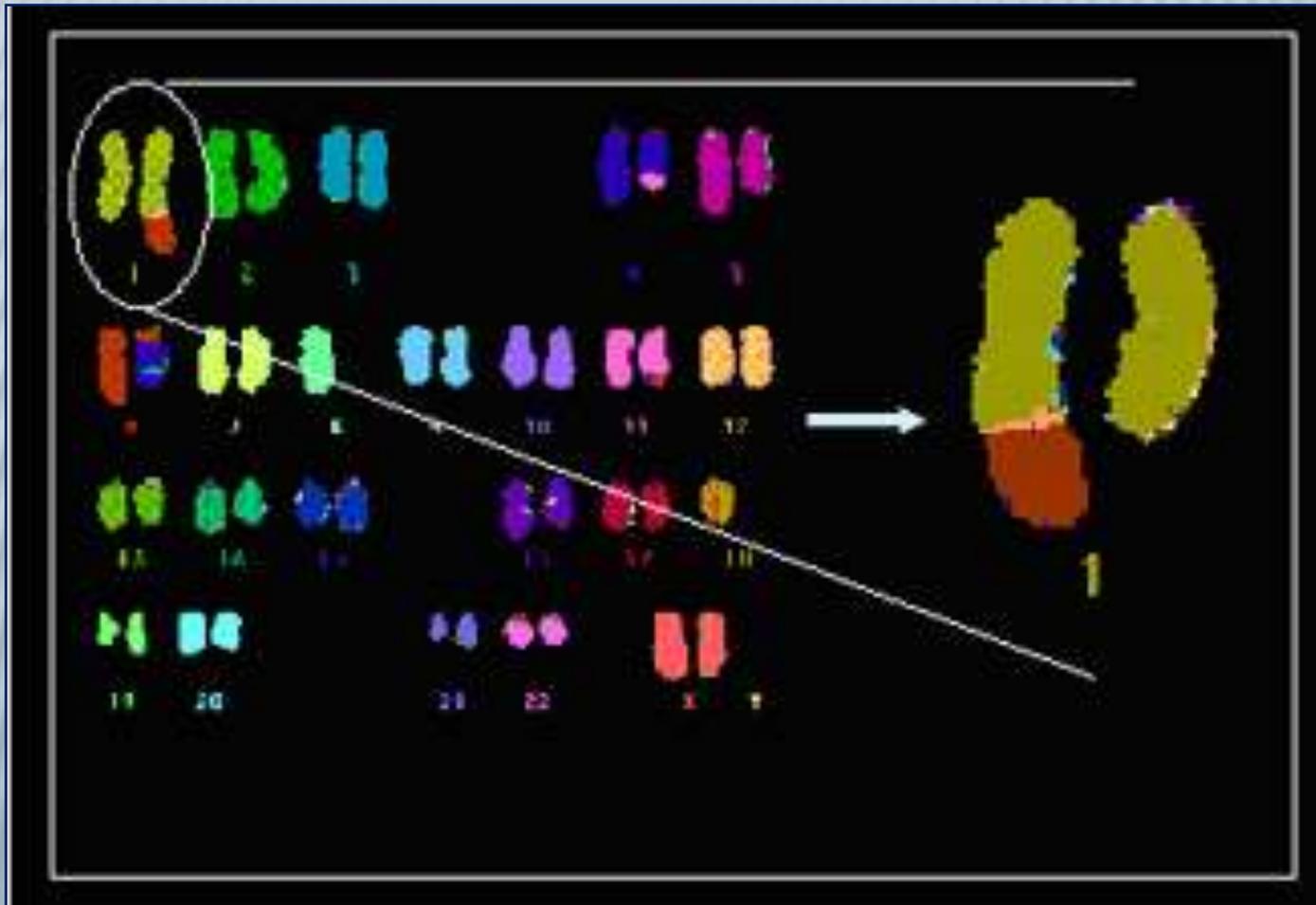
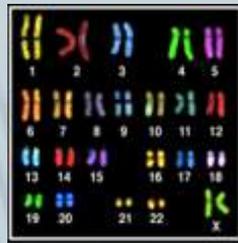
# Período Citogenética Molecular:

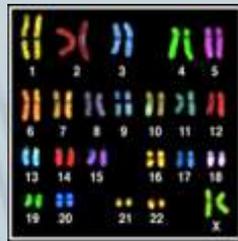


1977: Se introdujo la Hibridización in Situ Radioactiva (RISH)

1985: Introducción de la Hibridización in Situ Fluorescente (FISH)

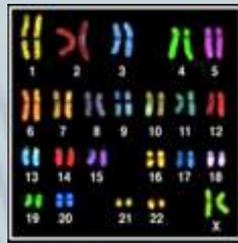
# Período Citogenética Molecular: 1987-actual





**Los cromosomas pueden estudiarse en diferentes etapas del ciclo de vida celular:**

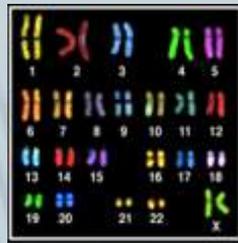
- **En interfase**: Período que media entre el final de una división celular y el comienzo de la siguiente.
- **Durante las divisiones celulares**:  
**mitosis o meiosis**



# Existen diferentes métodos de estudio de los cromosomas en INTERFASE CELULAR:

- Cromatina sexual o Cuerpo de Barr
- Cromatina Y o Cuerpo Y Fluorescente
- Citogenética Molecular

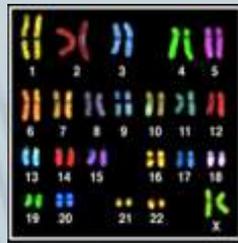
# CROMATINA SEXUAL O CUERPO DE BARR



Barr y Bertram en 1948 descubren en células interfásicas de mamíferos hembras (gatas) un corpúsculo de cromatina en el núcleo en interfase. Estos se teñían intensamente y se ubicaba en la proximidad de la membrana celular.

Actualmente se conoce que en las células de los individuos femeninos, un cromosoma X de replicación tardía se inactiva en etapa temprana embrionaria y se observa como una masa de cromatina sexual en la interfase celular:  
**HIPÓTESIS DE MARY LYON**

# CORPÚSCULO O CUERPO BARR:

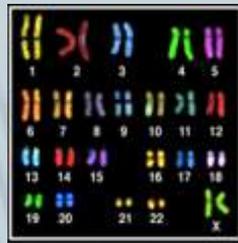


Uno de los cromosomas X, el que completa su replicación más tarde que su homólogo, queda condensado e inactivo durante la interfase de células somáticas.

**No. Cuerpos Barr = No. Cromos. X – 1**

Se analizan entre 100 y 200 células y el conteo de las células cromatin positivas se expresa en %, en caso de mujeres normales se observa una cromatina sexual en el 40 al 60% de los núcleos analizados.

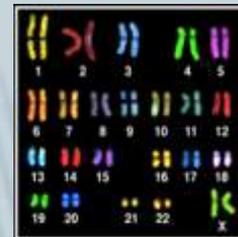
## Cromatina Sexual:



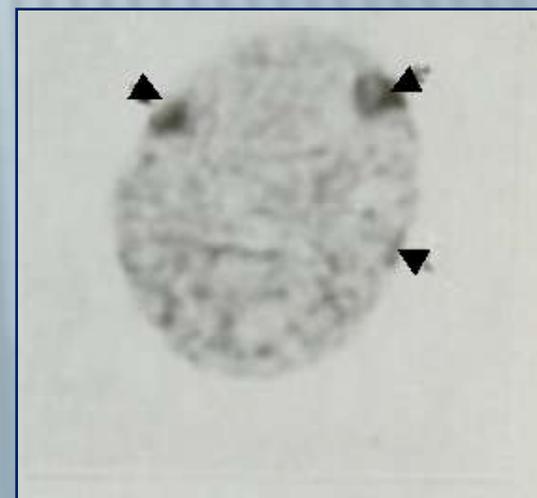
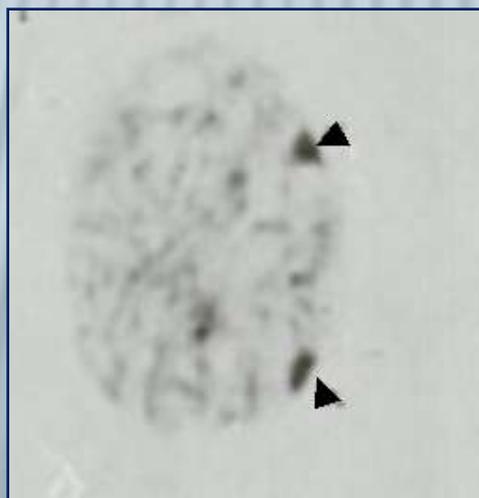
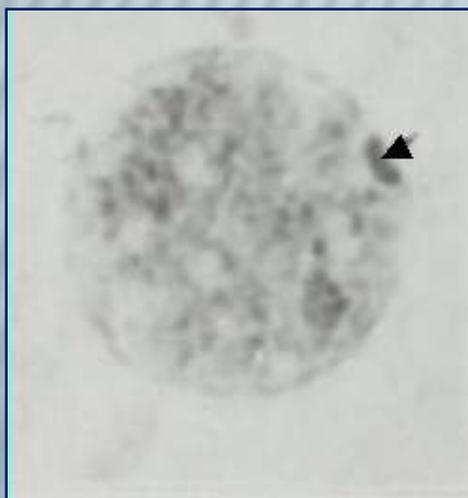
**Para la toma de la muestra:**

- 1. Limpieza y raspado de la mucosa oral**
- 2. Extensión en láminas portaobjetos.**
- 3. Coloración con colorantes nucleofílicos (aceto-orceína o fuscina)**
- 4. Extensión en lámina cubreobjeto**
- 5. Observación en microscopio óptico con campo brillante.**

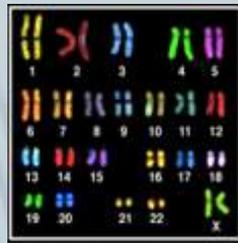
# TÉCNICA DE CUERPO DE BARR O TÉCNICA DE ACETO-ORCEÍNA



# cuerpo Barr	Hembra	Varón
0	45,X	46,XY
1	46,XX	47,XXY
2	47,XXX	48,XXXY
3	48,XXXX	49,XXXXY

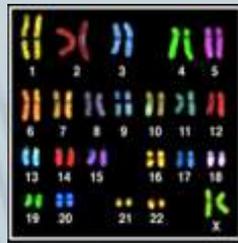


## Ventajas de la técnica de Cromatina Sexual:



- 1- Rápida y sencilla.**
- 2- Puede realizarse en núcleos interfásicos.**
- 3- No requiere de cultivo de células.**
- 4- Ofrece el estado de los cromosomas sexuales de forma inmediata.**

# Estudio de la Cromatina Y o Cuerpo Y Fluorescente:

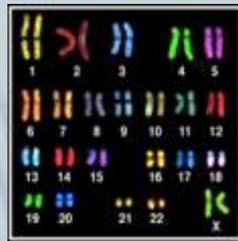


1. Obtención de la muestra (igual a la cromatina sexual)
2. Coloración con quinacrina o sus derivados.
3. Observación y análisis al microscopio fluorescente con luz ultravioleta.

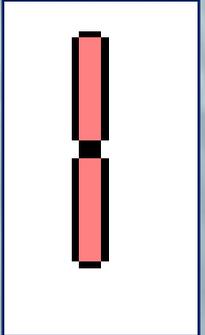
Se visualiza un punto fluorescente dentro de la célula debido a la tinción de la heterocromatina del cromosoma Y

**No. Cuerpos Y observados = No. cromosomas Y del individuo**

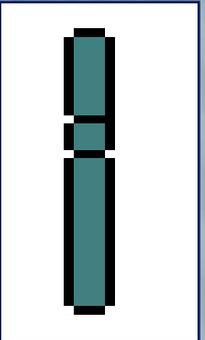
# CLASIFICACIÓN DE LOS CROMOSOMAS HUMANOS



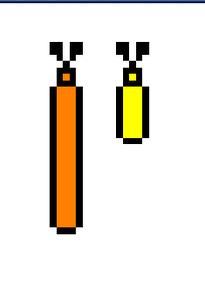
**METACÉNTRICOS**: Centrómeros en posición mediana del cromosoma y brazos de igual longitud.

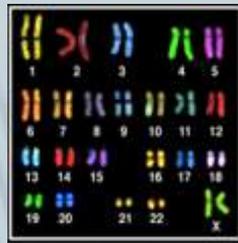


**SUBMETACÉNTRICOS**: Centrómeros ubicados algo desplazado hacia un extremo y da lugar a la formación de brazo corto y brazo largo.



**ACROCÉNTRICOS**: Centrómeros casi terminales o en posición distal y se definen en el brazo corto tallos y satélites



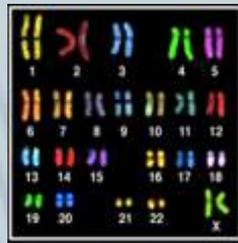


## Obtención de cromosomas:

**Cultivo de tejidos: sangre periférica, médula ósea, piel, líquido amniótico, vellosidades coriales.**

## Cultivo de sangre periférica:

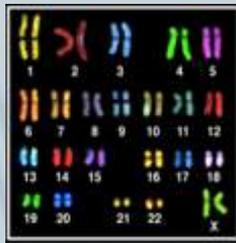
- Medio de cultivo
- Fitoematoglutinina
- Colchicina o colcemid
- Solución Hipotónica
- Fijación



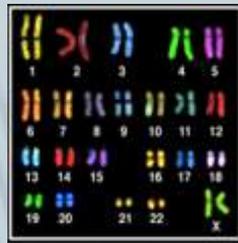
## Metodología empleada para la obtención y análisis de los cromosomas humanos:

1. Extracción de sangre 2-10 ml en jeringuillas conteniendo anticoagulante (heparina sódica)
2. Colocación de la muestra (sangre total o plasma con leucocitos) en frasco de cultivo estéril con medio de cultivo al cual se le adiciona fitohemaglutinina(FHA)
3. Colocar en incubadora a 37°C durante 72 horas.
4. Se le añade colchicina o sus derivados y se deja en reposo durante unos minutos.

## Metodología empleada (continuación)



5. Añadir solución hipotónica (KCl 0.56%) que provoca la hinchazón de la célula y ruptura de sus membrana dispersándose los cromosomas.
6. Posteriormente se añades solución fijador de Carnoy (3metanol:1 ácido acético)
7. Extensión por goteo en láminas portaobjetos y secar al aire.
8. Coloración para obtener las bandas.
9. Observación y análisis al microscopio óptico para confirmar cariotipo.



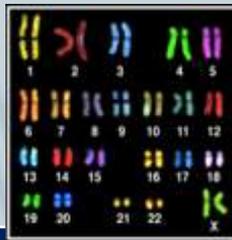
## ¿Qué es una banda cromosómica?

Es una parte del cromosoma que se distingue claramente de su segmento adyacente mediante apariencia más oscura o más clara.

Es importante señalar que:

UNA BANDA CROMOSÓMICA NO  
ES UN GEN.

## Definición de marca región cromosómica:

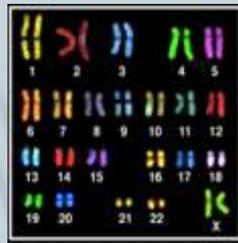


Las bandas están localizadas en regiones de los cromosomas las cuales están delimitadas por marcas (“Landmarks”).

Una Región se define como un área del cromosoma comprendida entre 2 marcas adyacentes y puede contener varias bandas.

Las marcas son características morfológicas importantes en la identificación de los cromosomas, delimitan las regiones cromosómicas.

Una región del cromosoma puede contener varias bandas localizadas en los brazos del cromosoma.

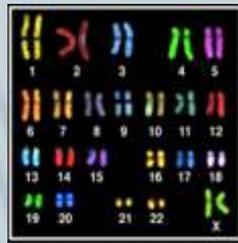


## Técnicas de Bandas:

Se nombran de acuerdo con las iniciales del método empleado en las mismas y con ellas se logra el reconocimiento individual de los cromosomas o regiones dentro de la estructura de estos.

**Ej: Bandas G, Bandas Q, Bandas R,  
Bandas C, Bandas NOR**

# Tipos de Técnicas de Bandas:



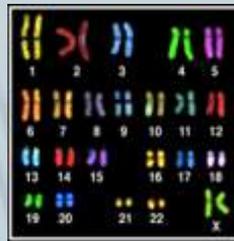
**Bandas Q** : Colorante fluorescente.( Mostaza de Quinacrina) Bandas brillantes y opacas.

**Bandas G**: Se emplea una enzima proteolítica (Tripsina) , seguido de colorante (Giemsa), es la más utilizada en los laboratorios. Bandas oscuras y claras. Más usado en Cuba.

**Bandas R**: (reverse) Se utiliza calor, el patrón de bandas es inverso al patrón de bandas G.

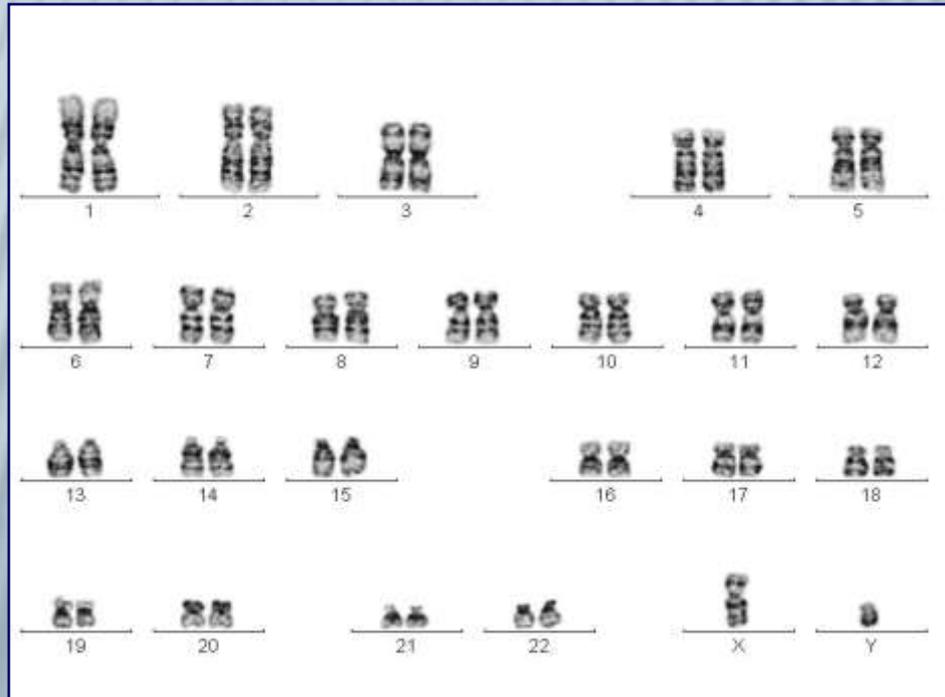
**Bandas C**: Desnaturalización con álcalis y tinción con Giemsa, tinción de la heterocromatina centromérica y las regiones polimórficas de los cromosomas 1, 9, 16 y Y

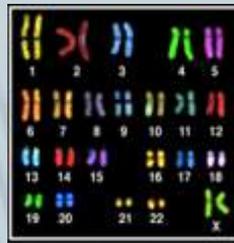
**Bandas NOR**: Se utiliza el nitrato de plata y se tiñen las regiones del organizador nucleolar (tallos y satélites de acrocéntricos).



# CARIOTIPO:

Ordenamiento de los cromosomas de acuerdo a sus características morfológicas y estructurales (tamaño, posición del centrómero y patrón de bandas específico)  
Este se corresponde con el resultado final de los análisis cromosómicos.





**Existen 23 pares de cromosomas, de ellos 22 pares son autosómicos que determinan las características no relacionadas con el sexo, y 1 par de cromosomas sexuales (X y Y)**

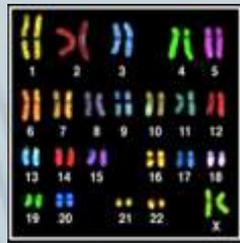
**Se encuentran por pares de homólogos y se enumeran del 1 al 22, en orden decreciente de tamaño y el par de cromosomas sexuales.**

**En el hombre (1X y 1Y)**

**En la Mujer (2 X)**

**Se clasifican en 7 grupos que se designan por letras de la A a la G.**

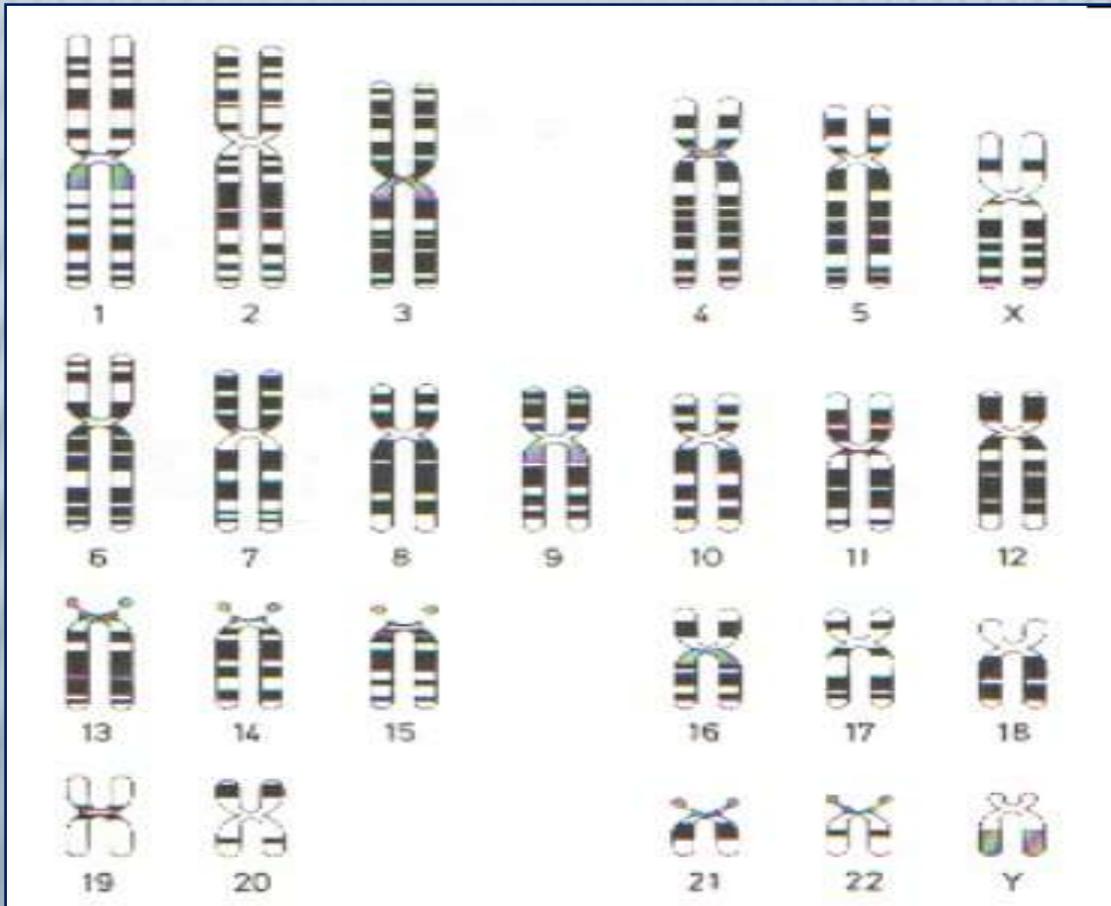
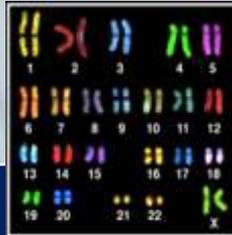
# ORDEN DE LOS CROMOSOMAS EN EL CARIOTIPO



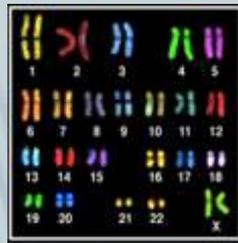
GRUPO	PARES	CARACTERÍSTICAS
A	1 al 3	Metacéntricos (1 y 3) Submetacéntrico grande (2)
B	4 y 5	Submetacéntricos grandes
C	6 al 12 y X	Submetacéntricos mediano tamaño
D	13 al 15	Acrocéntricos grandes
E	16 al 18	16 Metacéntrico, 17 y 18 Submetacéntricos pequeños
F	19 y 20	Metacéntricos pequeños
G	21, 22 y Y	21 y 22 Acrocéntricos pequeños. Y Acrocéntrico sin satélites

# Idiograma:

Representación esquemática de los 24 cromosomas humanos y su patrón de bandas a nivel de resolución de 450 bandas.

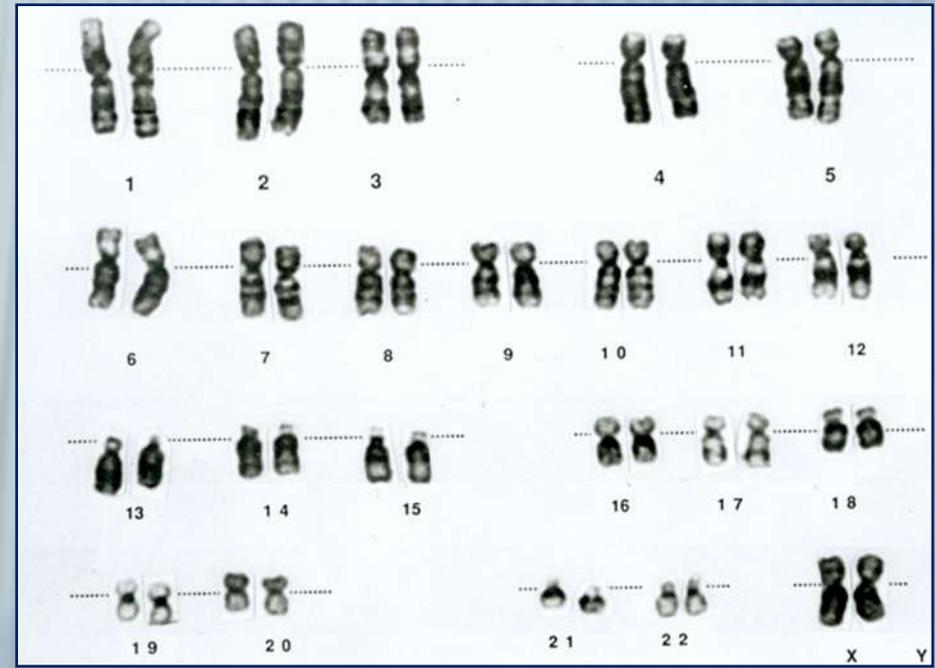
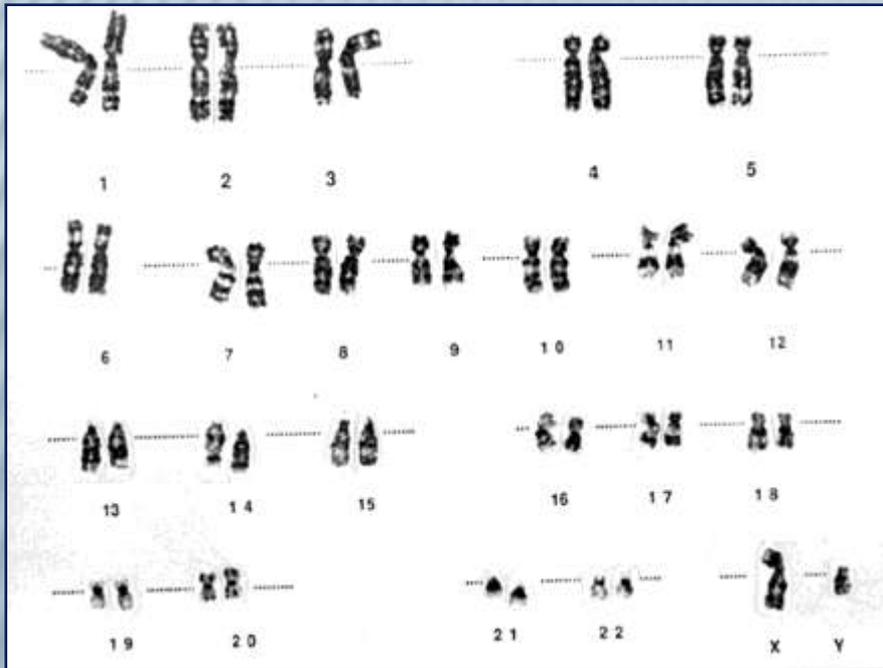


# Fórmulas cromosómicas normales en humanos:

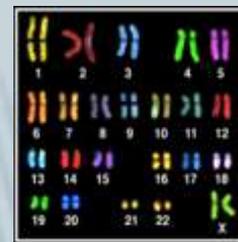


**Sexo masculino: 46,XY**

**Sexo femenino: 46,XX**

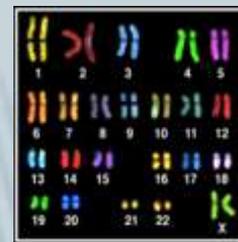


# Sistema Internacional para Citogenética Humana ISCN (1995)



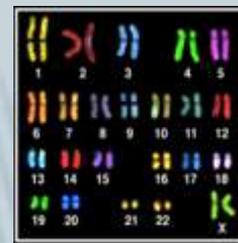
Símbolo	Representa	Ejemplo	Significado
<b>p</b>	Brazo corto	<b>5p</b>	Brazo corto del cromosoma 5
<b>q</b>	Brazo largo	<b>Xq</b>	Brazo largo del cromosoma X
<b>cen</b>	Centrómero		
<b>ter</b>	Hacia el telómero		
<b>+</b>	Ganancia de material hereditario	<b>46,XX+21</b>	Femenino, Trisomía 21
<b>-</b>	Pérdida de material hereditario	<b>46,XY,5p-</b>	Masculino deleción de brazos cortos del 5
<b>/</b>	Mosaicismo	<b>46,XX/ 45,X</b>	Existen 2 clones o líneas celulares con diferentes constitución genética

# Sistema Internacional para Citogenética Humana ISCN (1995)



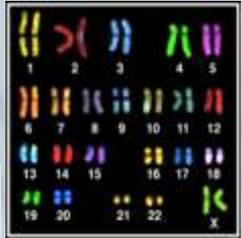
Símbolo	Representa	Ejemplo	Significado
<b>del</b>	Delección	46,XX,del(4p)	Femenino, delección de los brazos cortos del 4
<b>dup</b>	Duplicación	46,XY,dup(3p)	Masculino, duplicación de los brazos cortos del 3
<b>inv</b>	Inversión	46,XX,inv(9)	Femenino con inversión del cromosoma 9
<b>ins</b>	Inserción	46,XY,ins(2p3.2)	Masculino con inserción en la banda 3 del brazo corto del 2
<b>i</b>	Isocromosoma	46,X,i(Xq)	Femenino, isocromosoma de brazos largos del X
<b>t</b>	Translocación	45,XY,-14,-21,t(14;21)	Masculino con translocación balanceada entre el 14 y el 21
<b>rep</b>	Translocación recíproca		

# Sistema Internacional para Citogenética Humana ISCN (1995)



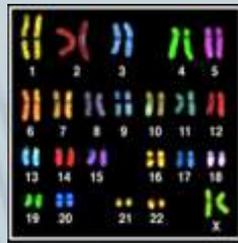
Símbolo	Representa	Ejemplo	Significado
<b>rob</b>	Translocación robersoniana o por fusión centrómerica		
<b>mar</b>	Marcador	<b>47,XY,+mar</b>	Masculino con cromosoma marcador extra.
<b>pat</b>	Paterno		
<b>mat</b>	Materno		
<b>r</b>	Anillo	<b>46,XX,r(13)</b>	Femenino con cromosoma 13 en anillo

# Anotaciones de regiones y bandas



P	1	3	
		2	
		1	
Q	1	1	
		1	
	2	1	
		2	
		2 3	

**21q21.2**

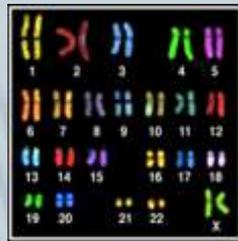


**Sitios frágiles: Roturas o vacíos de cromosomas que son visibles. Usualmente están comprometidas ambas cromátidas.**

**Existen tres grupos:**

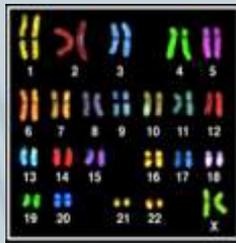
- 1. Susceptibles a folatos: Se expresan en medios deprimidos de ácido fólico. Ej: 6p23, 8p22 (S. Burti), 9p21 (S. Bloom) y cáncer, Xq27.3 (S. Frágil X).**
- 2. Sensibles a la distamina: Aditivos que se usan en los cultivos. Ej: La distamina: 16q22 y 17q12.**
- 3. Sensibles a la Bromodesoxiuridina: 10q25.**

# Técnica de Alta Resolución:



Se realiza en cromosomas prometafásicos y profásicos, no en metafásicos. Se obtienen cromosomas más largos, bandas que se desdoblán en subbandas. Se detectan alteraciones del orden de 3 Mb. Ejemplos:

Característica	Cromosoma Metafásico	Cromosoma Prometafásico	Cromosoma Profásico
Número bandas	400 bandas	550 bandas	850 bandas
Ejemplo	Banda 14q32	Subbanda 14q32.3	Subbanda 14q32.33



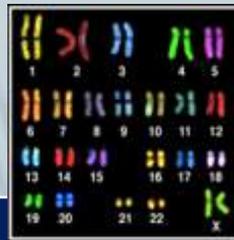
# CITOGENÉTICA MOLECULAR

## Hibridización in situ:

Es una técnica que permite la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos (ADN o ARN), en cromosomas o núcleos interfásicos utilizando sondas o probes marcados.

Puede ser FISH (fluorescente) o RISH (radioactiva).

# Aplicaciones de la Citogenética Molecular



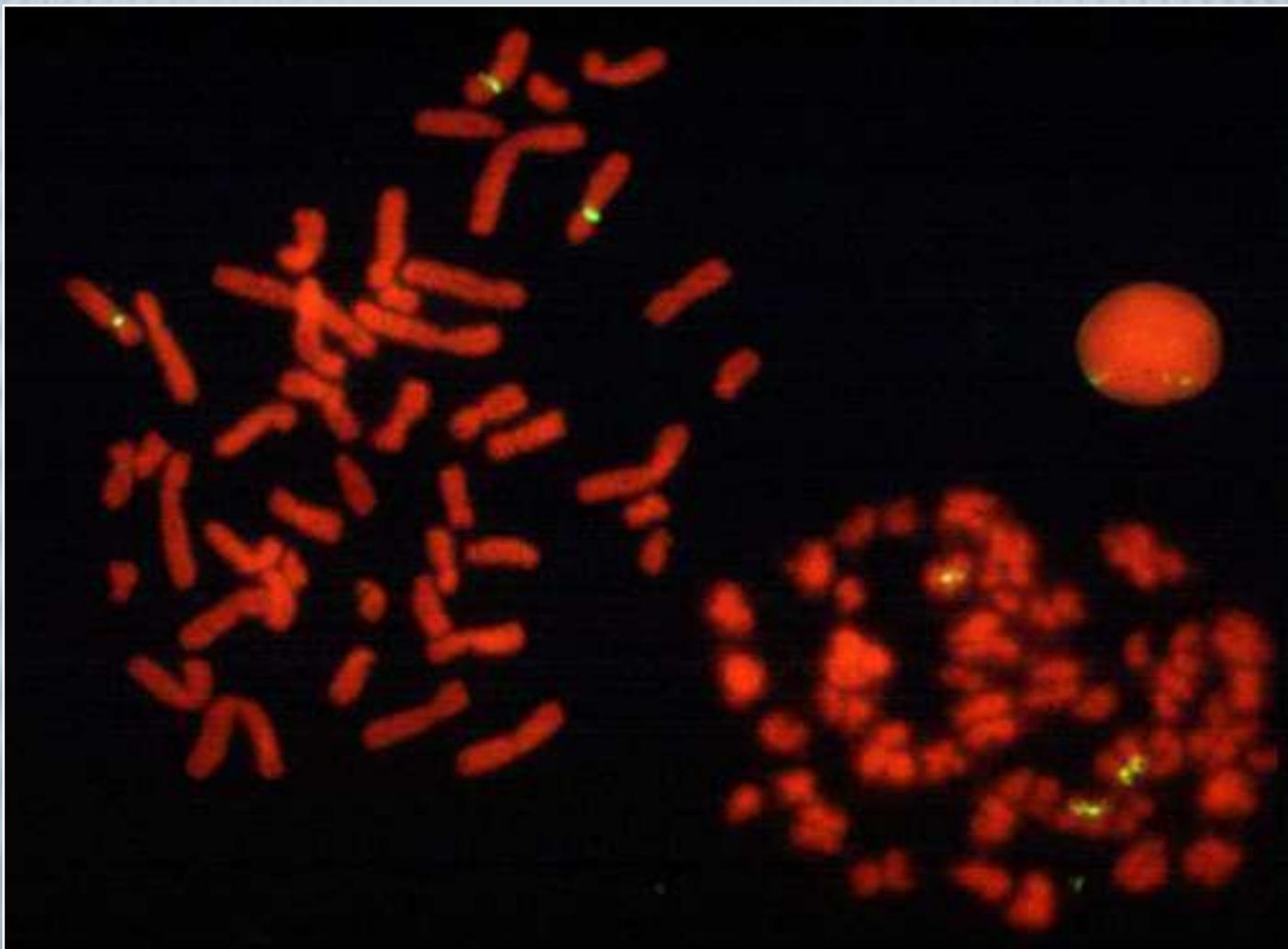
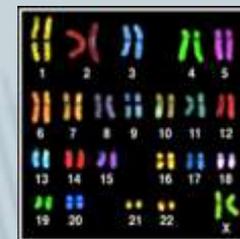
## Ventajas:

- Permite trabajar en núcleos interfásicos para diagnóstico del sexo y las trisomías más frecuentes Ej: Diagnóstico Prenatal.
- Detectar aberraciones cromosómicas (microdeleciones y pequeñas translocaciones) que no pueden ser vistas por técnicas tradicionales.
- Conocer la procedencia de minicromosomas o marcadores cromosómicos de origen desconocido.
- Completa las técnicas de citogenética convencional.

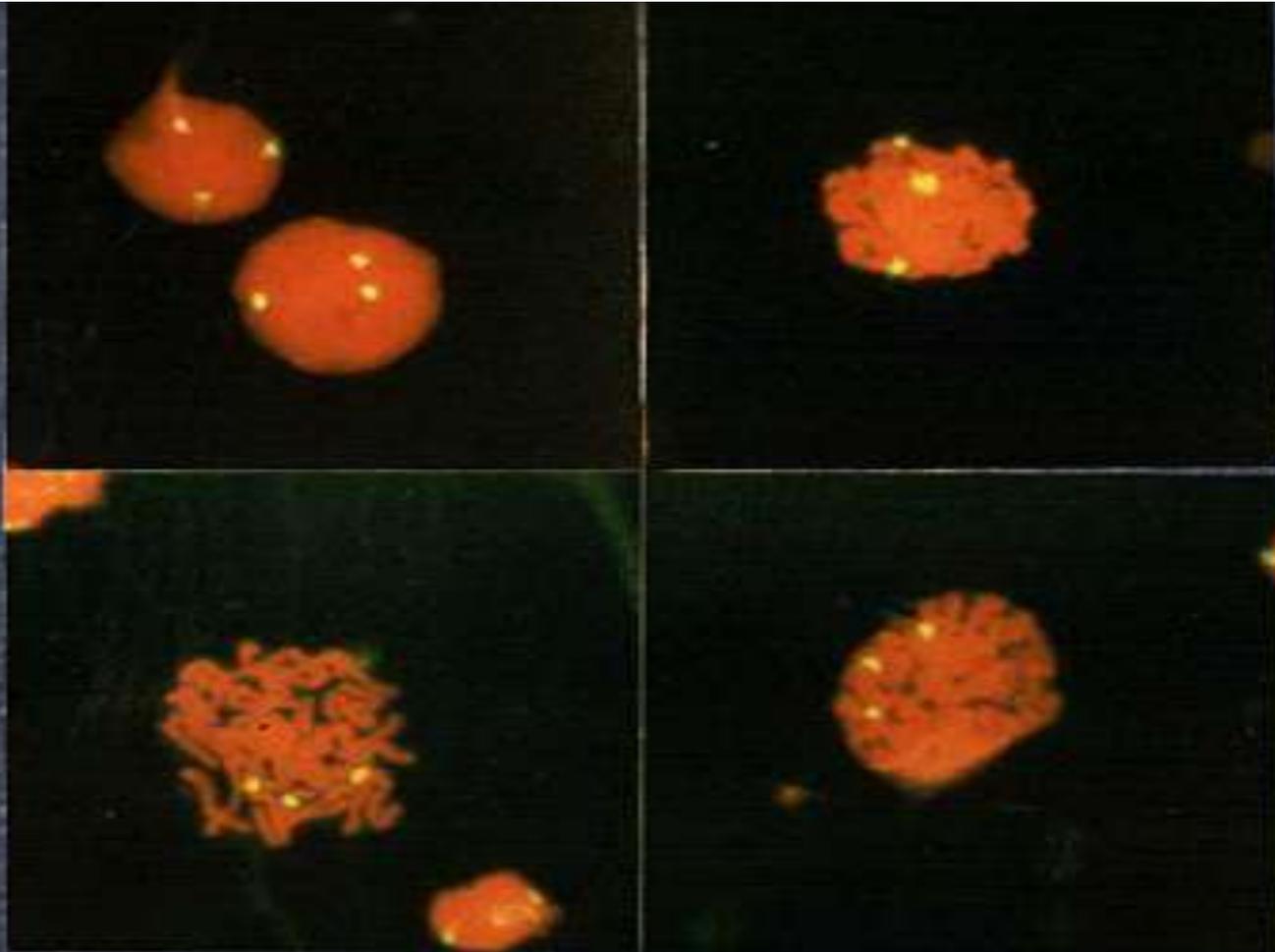
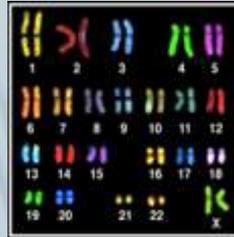
## Desventajas:

- La técnica resulta muy costosa.

# TRISOMÍA DEL CROMOSOMA 8 EN MÉDULA ÓSEA

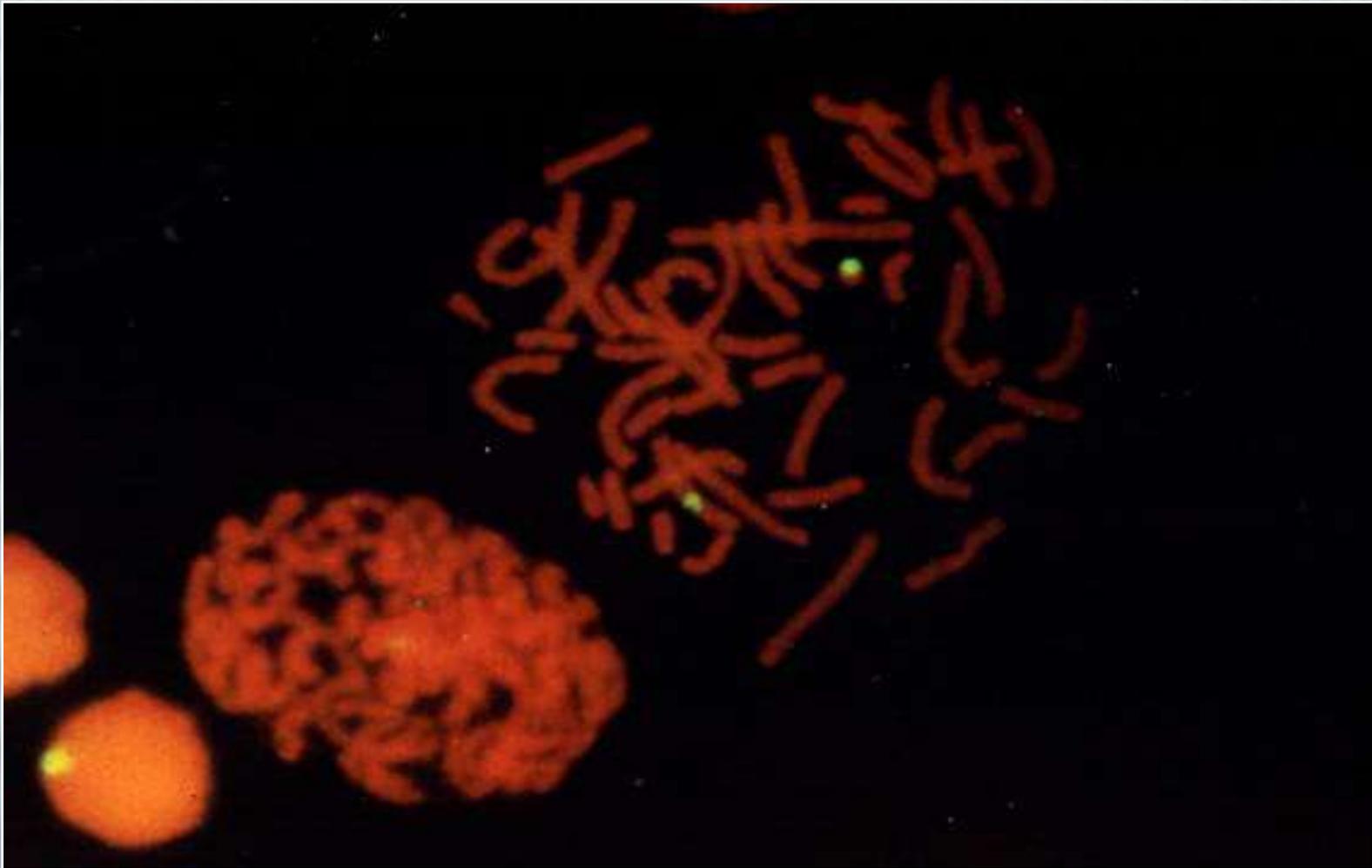
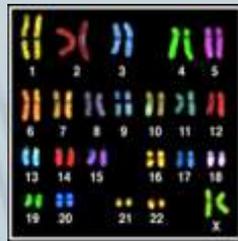


# TRISOMÍA 18 EN NÚCLEO EN INTERFASE



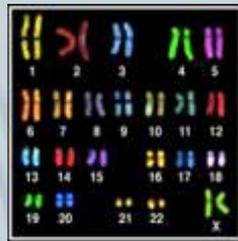
D18Z1 47,XX, +18

# IDENTIFICACIÓN DE ANILLOS, DE CROMOSOMAS MARCADORES Y CROMOSOMAS DERIVADOS



**CROMOSOMA EN ANILLO DERIVADO DEL X**

# DETECCIÓN DE MICRODELECCIONES USANDO SONDAS DE SECUENCIA ÚNICA



## Prader-Willi/Angelman Syndrome SNRPN (15q12q13)

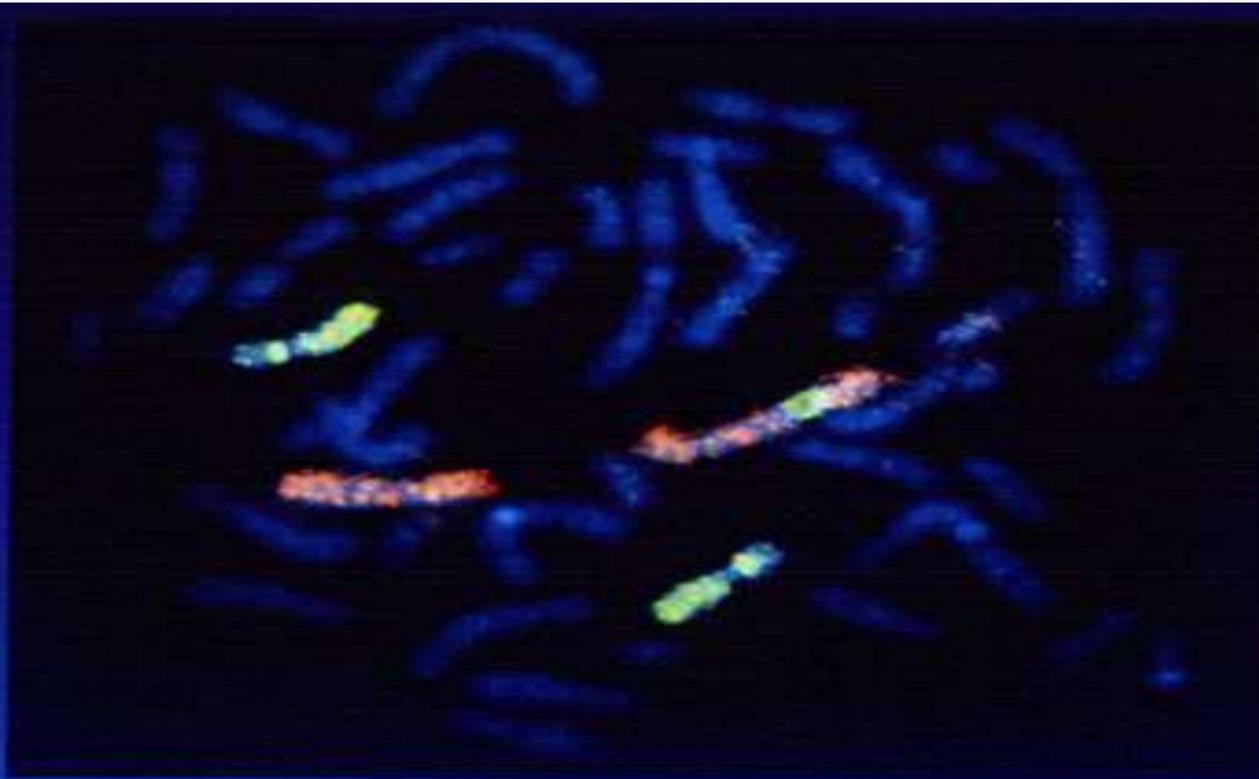
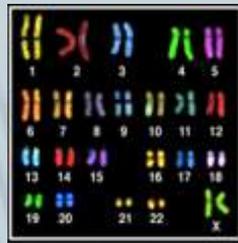


normal



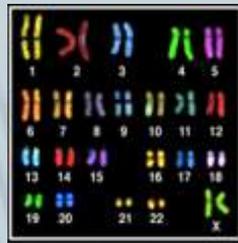
deletion

# DELINEACIÓN DE COMPLEJOS REARREGLOS USANDO SONDAS DE LA TOTALIDAD DEL CROMOSOMA



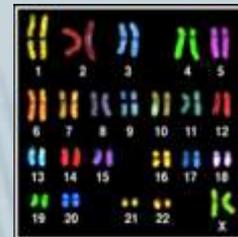
**46,XX,der(4)ins(4;?)(q31.1;?).  
ish der(4)ins(4;9)(q31.1;?)(wcp4+,wcp9+)**

# DELINEACIÓN DE TRANSLOCACIONES USANDO SONDAS DE LA TOTALIDAD DEL CROMOSOMA Y $\alpha$ SATÉLITES



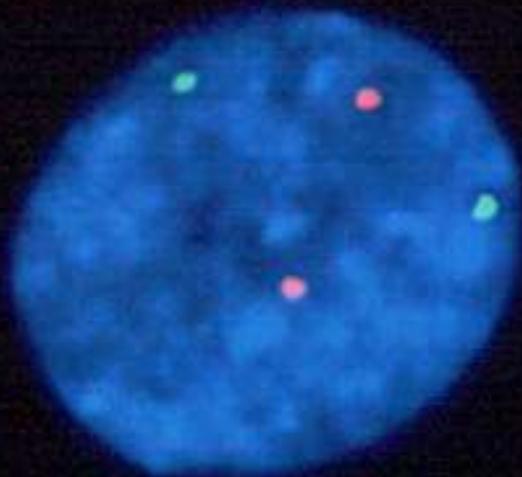
46,XY,t(6;21)(q25.3;q22.1).ish t(6;21)(D6Z1+,wcp21+;wcp21+)

# DIAGNÓSTICO PRENATAL DE UN FETO MASCULINO CON CÉLULAS EN INTERFASE



## Normal Hybridization Pattern

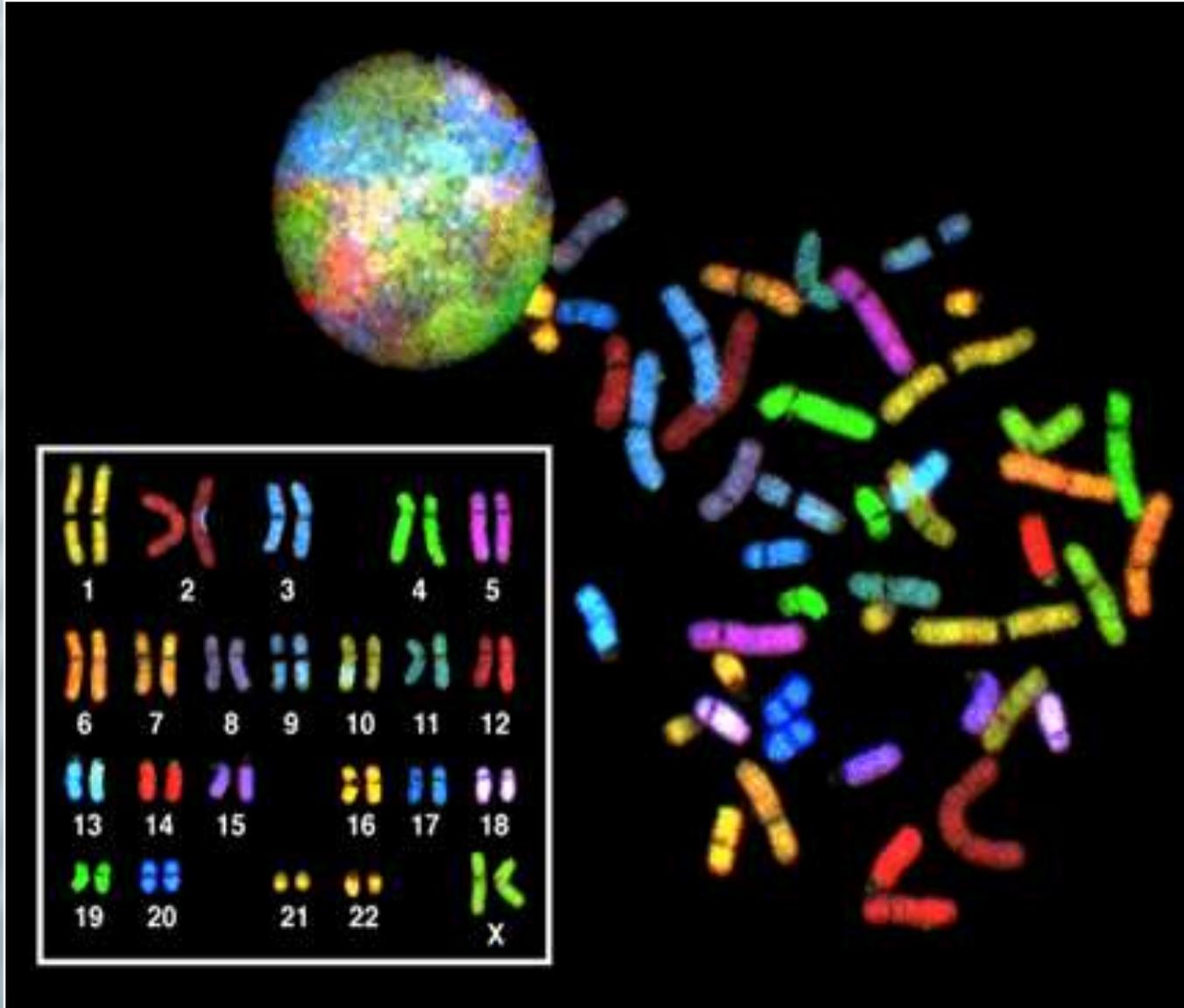
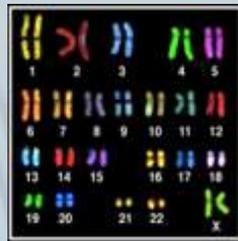
CVS-Direct:Probe-13/21



CVS-Direct:Probe-18,X,Y



# Metafase y cariotipo con painting o multifish



## BIBLIOGRAFÍA:

- 1. Introducción a la Genética Médica.  
Lantigua A. 1ra. Ed. 2011**
- 2. Introducción a la Genética Médica Guía  
de Clases Prácticas y seminarios.  
Colectivo autores. 2011**
- 3. Genética Médica. Emery's. Muller and  
Young, 10ma. Ed.**