

Práctica 5. Cariotipado de células humanas

Esta práctica de identificación y evaluación de cromosomas humanos se puede dividir en 4 etapas que corresponden a 4 manipulaciones consecutivas para elaborar el cariotipo:

A. Cultivo de muestras de sangre periférica (pág. 3).

B. Extensión de las muestras en portas (pág. 5).

C. Tinción de las preparaciones con bandas G (pág. 7).

D. Identificación y emparejamiento de los cromosomas individuales (p.9)

Cada etapa de la práctica se puede parar (indicado con STOP) y continuar otro día apropiado.

En cada etapa se indica la infraestructura, el material y los reactivos necesarios que deben estar preparados antes de iniciar la práctica.

Fundamento

El cariotipo es el conjunto de cromosomas de una célula de un individuo ordenados por tamaño y morfología. Uno de los objetivos del análisis de los cromosomas de preparaciones metafásicas es el diagnóstico de enfermedades con base genética. En esta práctica, estimularemos la división celular de linfocitos de sangre periférica con fitohemaglutinina durante 3 días y después pararemos las mitosis con Colcemid para obtener los cromosomas metafásicos. Estos cromosomas se fijaran con Carnoy para posteriormente realizar la tinción de bandas G con el colorante Wrigth. Finalmente se realizara la identificación y emparejamiento de cromosomas y el análisis de los cromosomas teñidos.

La especie humana, diploide, tiene 23 pares de cromosomas ($n=23$), en total 46 cromosomas; de ellos 22 parejas de autosomas homólogos y 2 cromosomas sexuales X e Y (XX en mujeres y XY en hombres). La comparación entre el idiograma humano nos permite la identificación de los cromosomas y posibles alteraciones tanto numéricas como estructurales.

Relator:

Dr. José Ramón Vidal Juvino, profesor de las especialidades de Procesos y Procedimientos de la Familia Sanitaria y Ex-Profesor-Investigador Ramón y Cajal.

Agradecimientos:

Protocolo elaborado con la supervisión de la Dra. Luz Míguez Álvarez de la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica.

Infraestructura general de laboratorio

1. Campana de flujo laminar
2. Citocentrífuga
3. Incubador a 37°C (mejor con CO₂)
4. Vortex
5. Baño de agua (37°C, 65°C)
6. Balanza
7. Nevera
8. Peachímetro
9. Placa calefactora
10. Microscopio invertido
11. Microscopio óptico
12. Sistema de captación de imágenes

Muestra

Aproximadamente, 3 mL de Sangre Periférica (SP) en tubo con **heparina sódica** como anticoagulante.

A. Cultivo de muestras de sangre periférica

Procedimiento (duración -3d + 2 h)

1. Sembrar por duplicado 0,8 mL de SP en un frasco de cultivo con 5 mL de medio completo **RPMI-1640** y 0,5 mL de fitohemaglutinina en condiciones estériles dentro de la cámara de flujo. Etiquetar los frascos.

2. Incubar los frascos con la muestra de sangre a 37°C durante 72 h agitando brevemente horizontalmente cada 8-12 horas (ej. mañanas y tardes).

Ojo: La incubación dura 3 días, por lo tanto, se debe programar la práctica para continuar después de la incubación en un día laborable.

3. Añadir 0,2 mL del antimetabólico "COLCEMID" e incubar a 37°C durante 30 min.

4. Transferir a un tubo de centrifuga estéril de 10 mL y centrifugar a 1.800 rpm durante 8 min.

5. Eliminar el sobrenadante con cuidado (verter en un recipiente o usar una pipeta Pasteur) y resuspender el botón celular vigorosamente con un vortex hasta obtener una suspensión homogénea.

6. Añadir al botón celular 8 mL de una solución hipotónica (CIK 0,075M a 37°C), gota a gota con una pipeta Pasteur para evitar un choque hipotónico agresivo.

Ojo: Para evitar un choque hipotónico agresivo se debe añadir gota a gota la primera pipeta sobre la pared interior del tubo ligeramente inclinado y en continua agitación con vortex. Luego se añade la solución hipotónica a chorro directamente sobre la muestra pero siempre en agitación con vortex.

7. Cerrar los tubos e introducirlos en un baño a 37°C durante 20 min.

8. Repetir paso 4 (centrifugación) y 5.

9. Añadir 8 mL solución de fijación CARNOY (3:1 metanol:ácido acético glacial) recién preparado. La primera pipeta se añade gota a gota y las siguientes a chorro.

10. Realizar un total de 3 lavados con CARNOY, repitiendo los pasos 4 (centrifugación) y 5. Se puede mejorar el resultado dejando actuar la solución de fijación a 4°C durante toda la noche antes de la extensión de la muestra.

STOP (Se puede continuar con la siguiente etapa de la práctica otro día).

Ojo: El protocolo se puede parar durante los lavados 2º o 3º dejando la muestra en el fijador a 4°C hasta el momento de continuar con la siguiente etapa de la práctica. De hecho, se mejora el resultado dejando la fijación al menos una noche a 4°C.

Material e infraestructura necesaria:

1. Frascos de cultivo estéril de 25 mL.
2. Jeringas de 1-2 mL.
3. Pipetas Pasteur (no estériles).
4. Tubos de centrífuga graduados de 10 mL.
5. Micropipeta P200 de 20 a 200 µL.
6. Puntas de pipeta de 20 a 200 µL.
7. Citocentrífuga.
8. Campana de flujo laminar.
9. Agitador Vortex
10. Incubador (preferible de CO₂) a 37°C
11. Baño a 37°C
12. Botellas para Metanol y Acético con dosificadores o pipetas de 5 o 10 mL

Reactivos necesarios

1. Medio de cultivo completo: RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS, 1% de antibióticos Penicilina y Streptomycin y 1% de L-Glutamina.

Casa comercial: REACTIVA S.A. (Barcelona, tfno.: 933.292.595).

2. Phitohemaglutinina como estimulante de la división celular.
3. Colcemid 10 µg/mL (droga antimitótica).
4. Solución hipotónica de CIK 0,075M.
5. Solución de fijación CARNOY (3:1, metanol : ácido acético glacial)

Ojo: El fijador Carnoy se prepara en el momento y es muy conveniente tener dos botellas, una para el metanol y otra para el ácido acético, con sus respectivos dosificadores dentro de la campana de flujo.

B. Extensión de las muestras

La extensión de la muestra fijada se realiza sobre portas de vidrio previamente desengrasados para favorecer la extensión de las muestras.

Procedimiento (duración 1 hora)

- 1.** Centrifugar la muestra fijada a 1.800 rpm durante 10 min.
- 2.** Decantar el sobrenadante en un vaso de precipitados.
- 3.** Añadir al botón de células fijador Carnoy recién preparado (a ojo, aprox. 1:5 en función del volumen del botón) y resuspender el botón de células (up & down) con ayuda de una micropipeta P200.
- 4.** Extender de 3 a 4 gotas de muestra con la pipeta P200, desde una altura aproximada de 20 cm, sobre un porta desengrasado y con una película de agua uniforme ordenados en una cubeta de Kouplin.
- 5.** Sacudir el porta ligeramente con la mano para eliminar el exceso de muestra y colocarlo sobre una placa calefactora a 38-40°C durante 2-3 min.
- 6.** Rotular el porta con la numeración correspondiente.
- 7.** Mirar los portas con ayuda del microscopio invertido para asegurarnos de que las muestras están bien extendidas, relativamente limpias, con la concentración celular adecuada y donde aparecen bien definidos núcleos en interfase y cromosomas en metafase de la células que entraron en proceso de división.
- 8.** Dejar los portas toda la noche en estufa a 37°C antes de teñir.

STOP (Se puede continuar con la siguiente etapa de la práctica otro día).

Material, infraestructura y reactivos necesarios

1. Porta de vidrio con borde esmerilado.

Ojo: Los portas se deben tener previamente limpios y desengrasados. Para ello, usar una solución de etanol:éter etílico (50%) y guardarlos en el congelador durante varias horas. Luego limpiar a mano con papel de cocina sobre una superficie lisa para ayudar a desengrasar para favorecer la extensión de muestra.

2. Cubeta Kouplin con H₂O miliQ.

3. Micropipeta P200 de 20 a 200 µL.

4. Punta de micropipeta de 20 a 200 µL.

5. Placa calefactora a 38-40°C.

6. Microscopio invertido.

7. Gradillas para los porta de vidrio.

8. Estufa a 37°C.

9. Fijador CARNOY (siempre preparar en el momento)

C. Tinción de las preparaciones con Bandas G.

Ojo: Las condiciones de tinción varían en función de 2 factores: la temperatura y la humedad ambiental. Por ello, los tiempos deben ajustarse a la variación de las condiciones ambientales.

Procedimiento

- 1.** Pasar los portas con la muestra a una cubeta de Kouplin con la solución de 2XSSC a 65°C durante 3 min. (variable) en el interior de un baño.
- 2.** Lavar con agua bajo un chorro de agua de grifo y poner a escurrir vertical para favorecer el secado al aire.
- 3.** Secar al aire a temperatura ambiente (TA). El tiempo de secado es variable dependiendo de la TA.
- 4.** Añadir con una pipeta Pasteur aprox. 4 mL de la solución del colorante Wright por porta e incubar durante 2-3 min para teñir la muestra.

Ojo: Los portas se montan sobre una parrilla de tinción sobre el fregadero.

Ojo: Preparar la solución colorante Wright justo en el momento antes de teñir. Ejemplo: mezclar en una botella, por cada porta, 3 mL de solución de Sörensen y 1 mL de colorante Wright. Mezclar bien.

5. Lavar con agua con ayuda de un frasco lavador y luego con agua de grifo. Agitar al aire manualmente para eliminar la mayor parte de agua.

6. Secar al aire a TA en posición vertical.

7. Observación con el microscopio óptico, primero a 10X, 40X y después a 100X (con este objetivo se debe añadir una gota de aceite), para localizar las metafases mas ilustrativas (cromosomas largos y bien teñidos donde se pongan de manifiesto las bandas G) para luego fotografiar las imágenes para identificar los cromosomas y estudiar posibles alteraciones.

Ojo: Una alternativa real pero cara (Ej. FPG de Medicina Xenómica) es utilizar un microscopio óptico mototizado que escanea varios portas, identifica las mejores metafases y captura las mismas de forma automática para realizar el estudio.

Ojo: Los portas se pueden guardar para futuras observaciones. El aceite de los portas se puede limpiar con del disolvente orgánico xilol dentro de una cabina.

STOP (Se puede continuar otro día con la siguiente práctica: CARIOTIPADO).

Materiales y reactivos necesarios

1. Cubeta de Kouplin.
2. Parrilla de tinción.
3. Pipeta Pasteur (no estéril)
4. Frasco lavador
5. Solución salina 2xSSC
6. Colorante Wright.
7. Buffer Sörensen (1:1 SoluciónA:SoluciónB).
8. Solución colorante Wright (1:3 Colorante Wright : Buffer Sörensen). Se debe preparar justo en el momento antes de utilizar.
9. Cubreobjetos

Infraestructura necesaria

1. Baño a 65°C
2. Microscopio óptico
3. Sistema de captación de imágenes acoplado al microscopio

Solución salina 2X SSC (1 Litro)

- 17,53 gr NaCl (0,3N)
- 8,82 gr Citrato trisódico-2H₂O
- Llevar a 1 Litro de H₂O.

Wright Stain NW 3000 Sigma (500 mL al 0,25% metanol)

- Pesar 1,25 gr colorante y añadir a 500 mL metanol en una botella protegida de la luz con papel de aluminio (albal).
- Agitar con ayuda de una mosca y un agitador magnético durante 1-2 horas (puede ser toda la noche para favorecer una buena dilución). Durante la agitación se debe proteger bien la boca de la botella con parafilm para evitar la evaporación del metanol.
- Filtrar a una nueva botella protegida de la luz. Para filtrar se puede hacer 2 veces a través de 2 capas de papel de filtro con ayuda de un embudo o utilizar los filtros comerciales con ayuda de una bomba de vacío.
- Dejar reposar protegido de la luz a 37°C durante 3-4 días antes de utilizar.
- Hacer alícuotas de 100-250 mL en botellas protegidas de la luz y guardar en nevera a 4°C. Para coger el colorante Wright no se debe pipetear desde el fondo ni desde la pared del frasco pues se forman precipitados. Cerrar rápido la botella pues el metanol se evapora rápidamente.

Ojo: Para teñir se mezcla con el Buffer de Sörensen (1:3).

Buffer de Sörensen pH 6,8

Preparar una solución 1:1 (SolA:SolB).

Solución A: 4,54 gr de KH₂PO₄ en 500 mL de H₂O.

Solución B: 5,94 gr de Na₂HPO₄-2H₂O en 500 mL de H₂O.

4. Identificación y emparejamiento de los cromosomas individuales.

Utilizar las fotos de las metafases con los cromosomas más alargados y con las bandas G bien definidas para ampliar y poder realizar el cariotipado.

Utilizar los **idiogramas** para identificar los 23 pares de cromosomas humanos siguiendo el Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenética Humana (ISCN 2013).

Realizar la identificación utilizando la fotocopia ampliada de las fotos realizadas (ver hoja adjunta, pág. 10) y realizar el emparejamiento de los cromosomas recortando la figura de estos en el papel.

Los 23 pares de cromosomas humanos se ordenan en 8 grupos:

Grupo A: Cromosomas grandes, 1 y 3 metacéntricos y cromosoma 2 submetacéntrico.

Grupo B: Cromosomas grandes, 4 y 5 submetacéntricos.

Grupo C: Cromosomas medios, del 6 al 12 submetacéntricos.

Grupo D: Cromosomas medios, del 13 al 15 acrocéntricos.

Grupo E: Cromosomas pequeños, del 16 al 18 submetacéntricos.

Grupo F: Cromosomas pequeños, 19 y 20 metacéntricos.

Grupo G: Cromosomas más pequeños, 21 y 22 acrocéntricos.

Cromosomas Sexuales: [X], mediano y metacéntrico e [Y], pequeño y acrocéntrico.