



CITOGENÉTICA HUMANA y ANÁLISIS CROMOSÓMICO

CITOGENÉTICA HUMANA y ANÁLISIS CROMOSÓMICO

Se emplea para el diagnóstico de enfermedades con base genética

- utiliza el **análisis cromosómico** de preparaciones metafásicas de las **células de un individuo** para obtener su cariotipo
- El **cariotipo** se define como el **conjunto de cromosomas de una especie, un individuo o una célula ordenados de acuerdo a su tamaño y morfología**
- Para obtener los cromosomas metafásicos ponemos en marcha un cultivo de células → realizamos el sacrificio celular → hacemos las extensiones cromosómicas
- Finalmente, las técnicas de tinción y bandeo cromosómico permitirán su visualización y análisis lo que nos permitirá obtener el cariotipo

CITOGENÉTICA HUMANA y ANÁLISIS CROMOSÓMICO

➤ El término cariotipo puede aplicarse a tres niveles:

➤ **Cariotipo de especie.**

- Está constituido por el conjunto «normal» de cromosomas que caracteriza a una especie determinada
- Es el patrón con el que hay que comparar los cariotipos individuales y celulares para detectar mutaciones y anomalías.

➤ **Cariotipo de individuo o cariotipo constitucional** (o constitutivo).

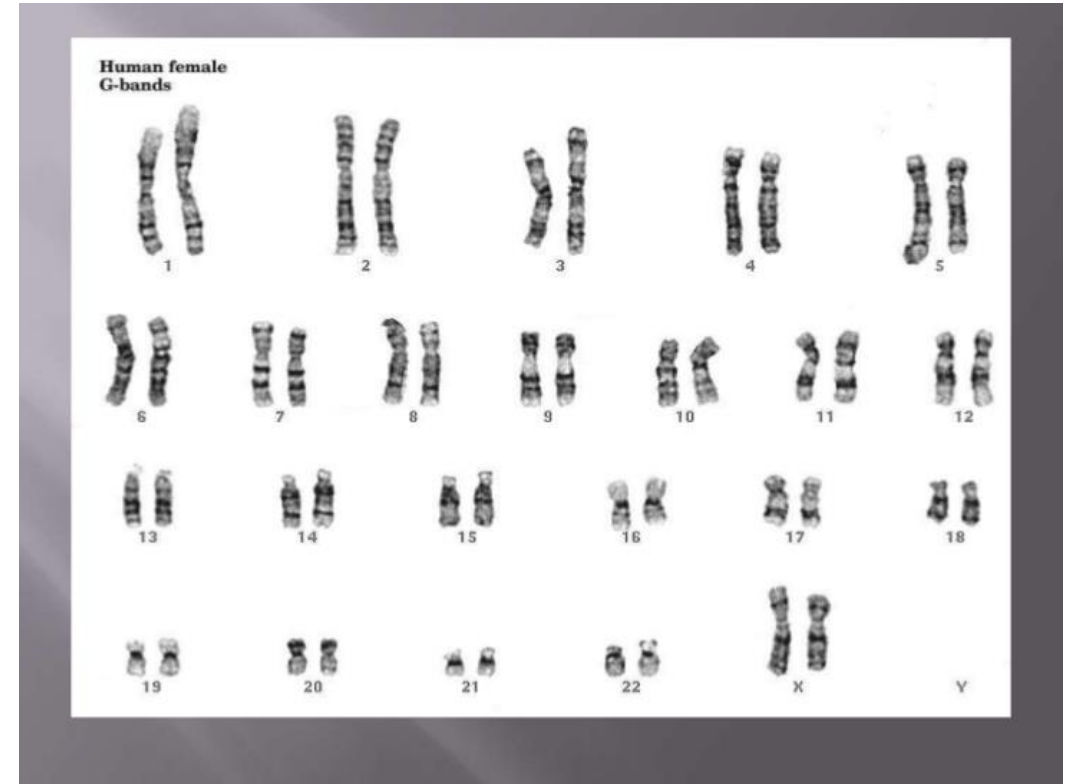
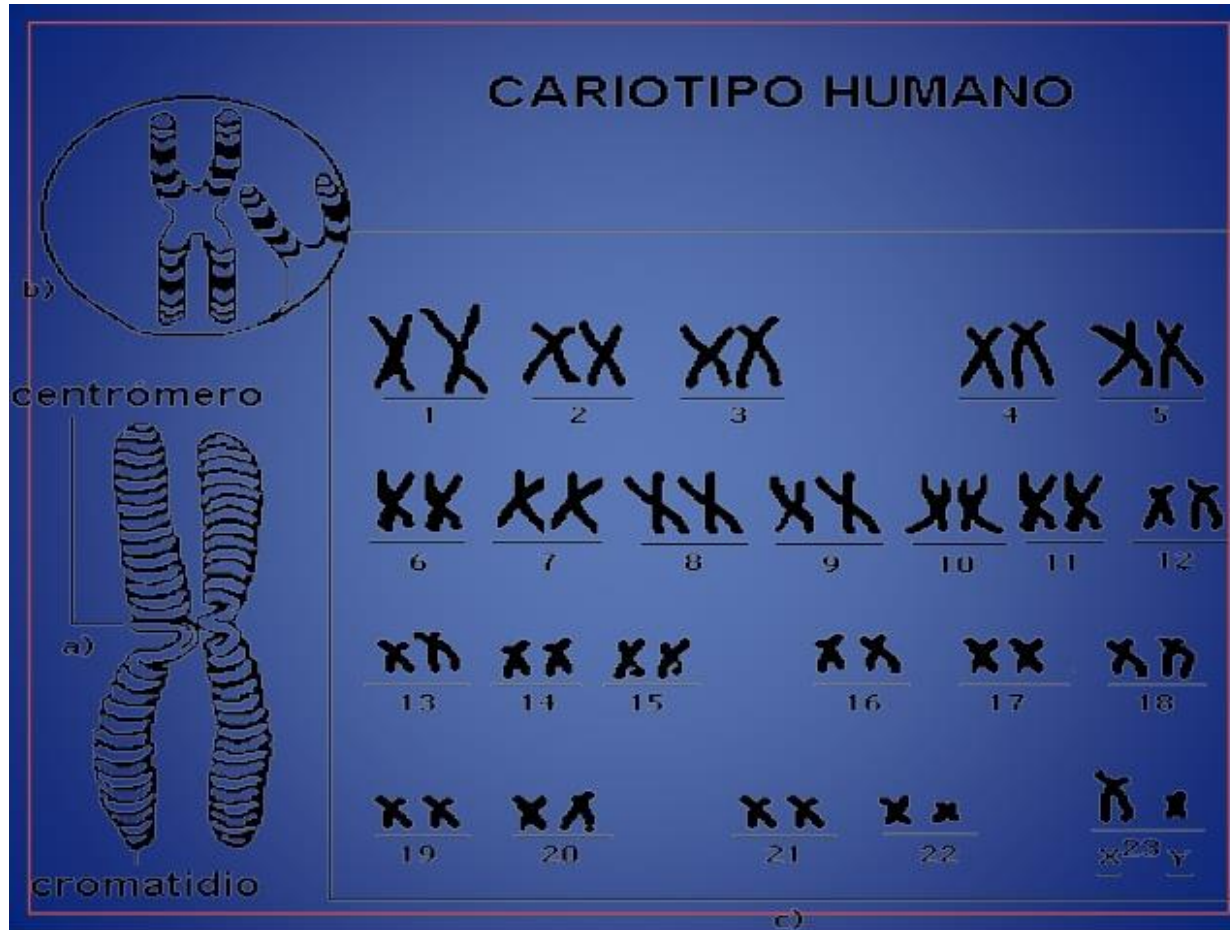
- Es el conjunto de cromosomas representativo del individuo → es el que contiene la mayor parte de las células de su organismo

➤ **Cariotipo de célula.**

- Es el conjunto de cromosomas que contiene una célula.
- Puede diferir del cariotipo del individuo del que procede, como ocurre, por ejemplo, con muchas células tumorales.

INDICACIONES DE ESTUDIO CITOGENÉTICO*

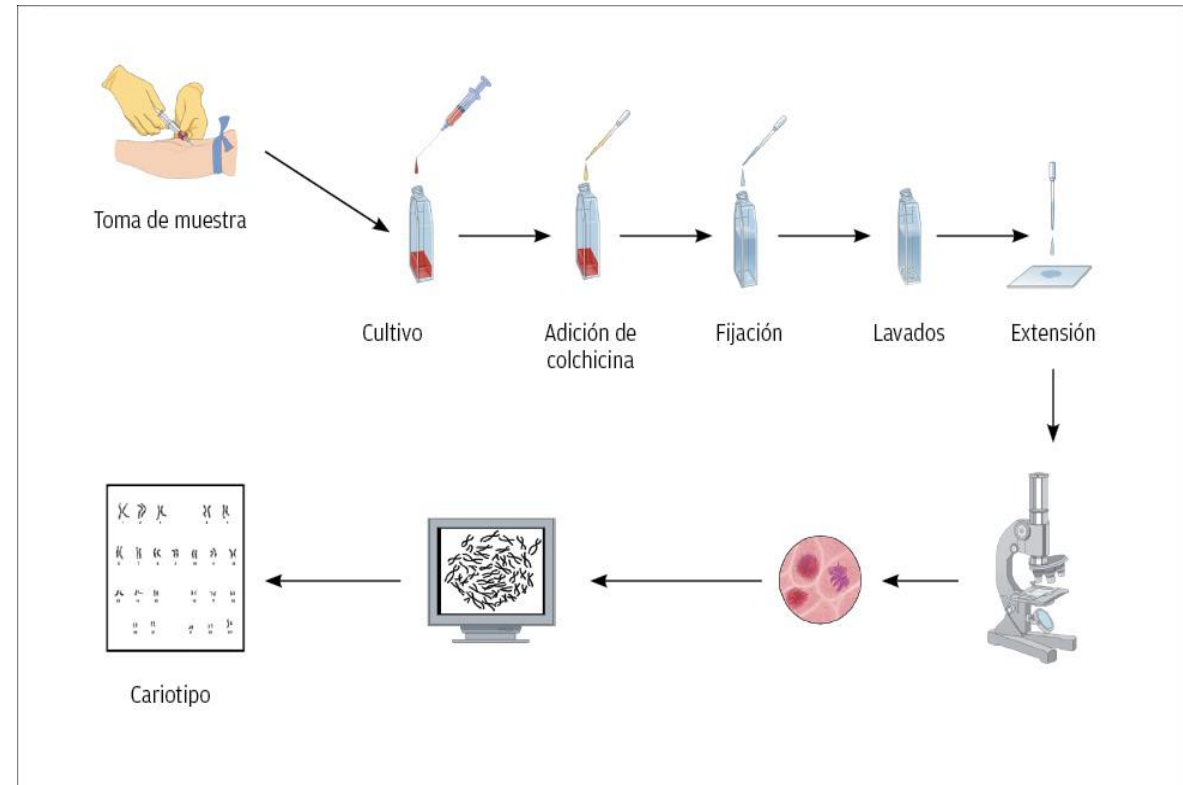
Periodo	Indicación
Neonatal	Presencia de defectos congénitos, malformaciones o rasgos dismórficos (rasgos físicos que no están dentro del rango de lo «normal»).
	Genitales ambiguos.
Escolar pre-adolescente	Retraso psicomotor.
	Retraso mental.
	Dificultad para el aprendizaje.
Adoles-cencia	Falta de desarrollo puberal.
	Ginecomastia.
	Amenorrea.
Adulto	Infertilidad inexplicable.
	Abortos de repetición.
	Padres de hijos con alteraciones genéticas.



CARIOTIPO ESTÁNDAR DE SANGRE PERIFÉRICA

CARIOTIPO ESTÁNDAR DE SANGRE PERIFÉRICA

- El cariotipo constitucional estándar de un individuo se obtiene a partir de una **muestra de sangre periférica**.
- El **procedimiento** se desarrolla en cuatro fases:
 - Cultivo de linfocitos
 - Obtención de extensiones cromosómicas en metafase
 - Tinción de cromosomas con técnicas de bandeo
 - Análisis de los cromosomas teñidos.



CULTIVO DE LINFOCITOS

Se utilizan los siguientes componentes:

➤ Muestra.

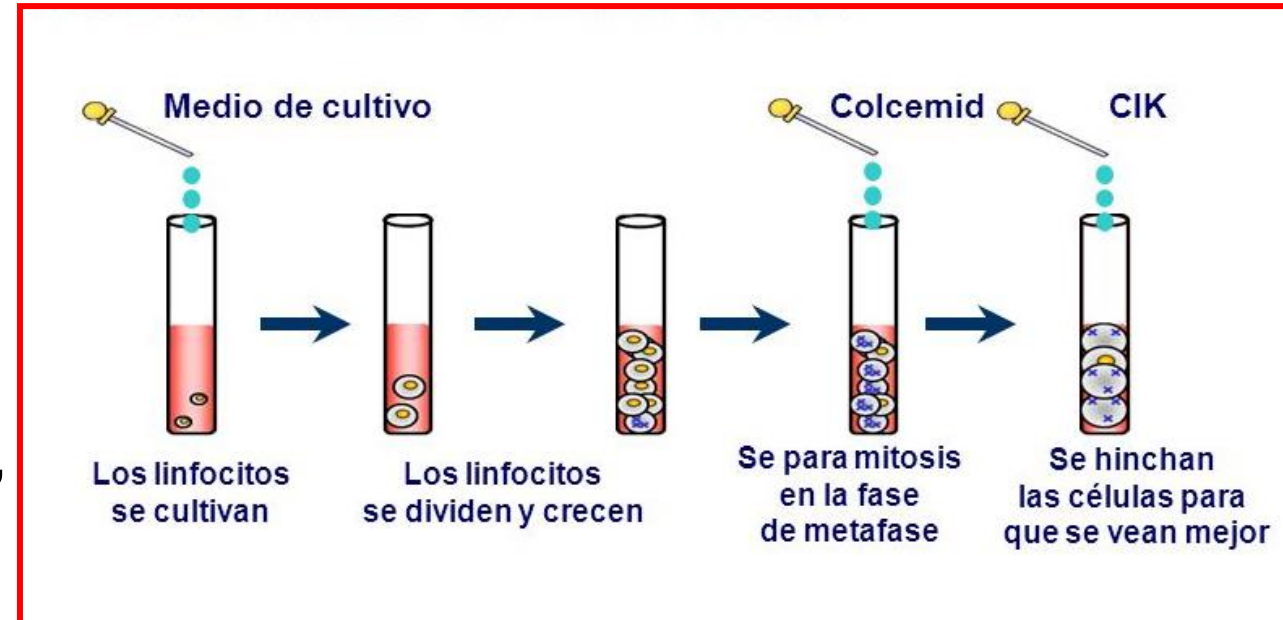
- sangre periférica anticoagulada con heparina. (No se debe usar EDTA).

➤ Medio de cultivo.

- Los más utilizados son RPMI 1640, DMEM y Ham F10.
- Se añade suero bovino fetal (10-20%), L-glutamina y antibióticos (penicilina/estreptomicina).

➤ Recipiente.

- Frasco roux
- Tubo para cultivo



CULTIVO DE LINFOCITOS

Pasos del cultivo :

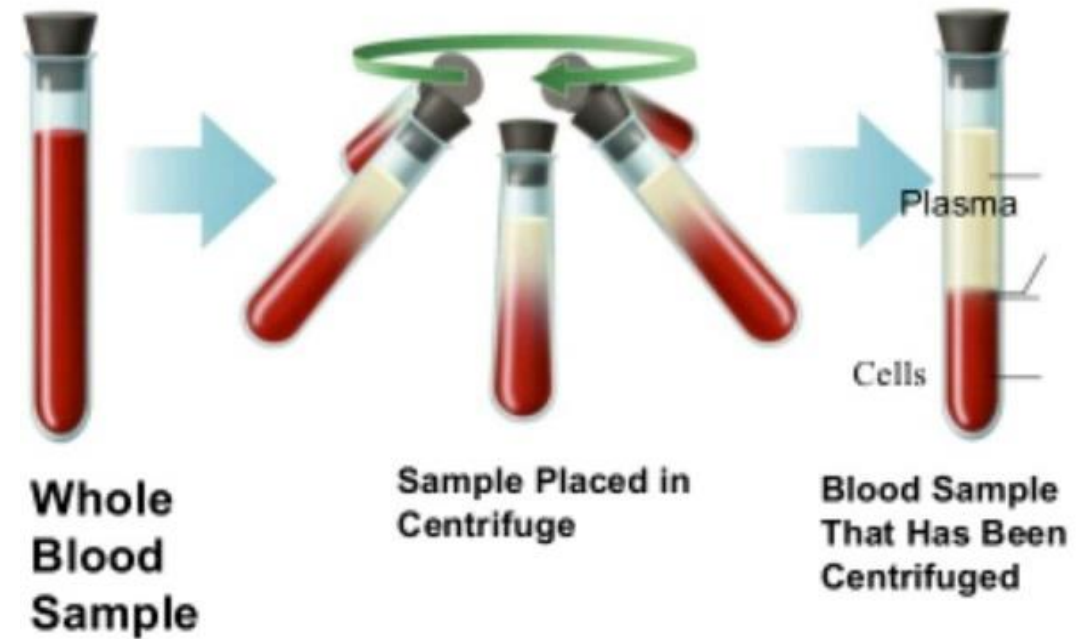
- **Siembra** → Se hace añadiendo sangre heparinizada al medio de cultivo en proporción 1/5-1/10
- **Adición de fitohemaglutinina** → Se une a los linfocitos T y provoca su desdiferenciación a linfoblastos, los cuales empezarán a proliferar
- **Incubación** → A 37 °C e 5% de CO₂ durante 72 horas. Si usamos tubos de cultivo, hay que inclinarlos 45° en gradillas inclinadas.
- **Detención de la mitosis en metafase** → Entre 90 y 120 minutos antes de finalizar el periodo de incubación, se añade colchicina(para detener las mitosis en metafase)

OBTENCIÓN DE EXTENSIONES DE METAFASES

Las extensiones se realizan sobre un portaobjetos.

➤ **Sacrificio del cultivo.**

- El contenido del frasco de cultivo se trasvasa a un tubo falcon cónico de 15 ml y se centrifuga a 1500 rpm durante 5-10 minutos.
- Se elimina el sobrenadante, dejando una pequeña cantidad (0,5 ml) en la que se resuspende el botón celular.



OBTENCIÓN DE EXTENSIONES DE METAFASES

Las extensiones se realizan sobre un portaobjetos.

➤ **Choque hipotónico e incubación.**

- Se añaden al tubo 5 ml de cloruro potásico 0,075M, se mezcla el contenido y se lleva a incubación.
- El periodo y la temperatura de incubación oscilan en los diferentes protocolos entre los 5 y los 20 minutos, a temperatura ambiente o a 37 °C.
- En esta fase, las células se cargan de agua y se hinchan.
- En las células en las que se ha detenido la división en metafase, los cromosomas se distribuyen por todo el volumen de la célula, separándose.
- Al finalizar la incubación, se centrifuga a 1500 rpm durante 5-10 minutos y se elimina el sobrenadante, dejando un pequeño volumen para resuspender el botón celular.

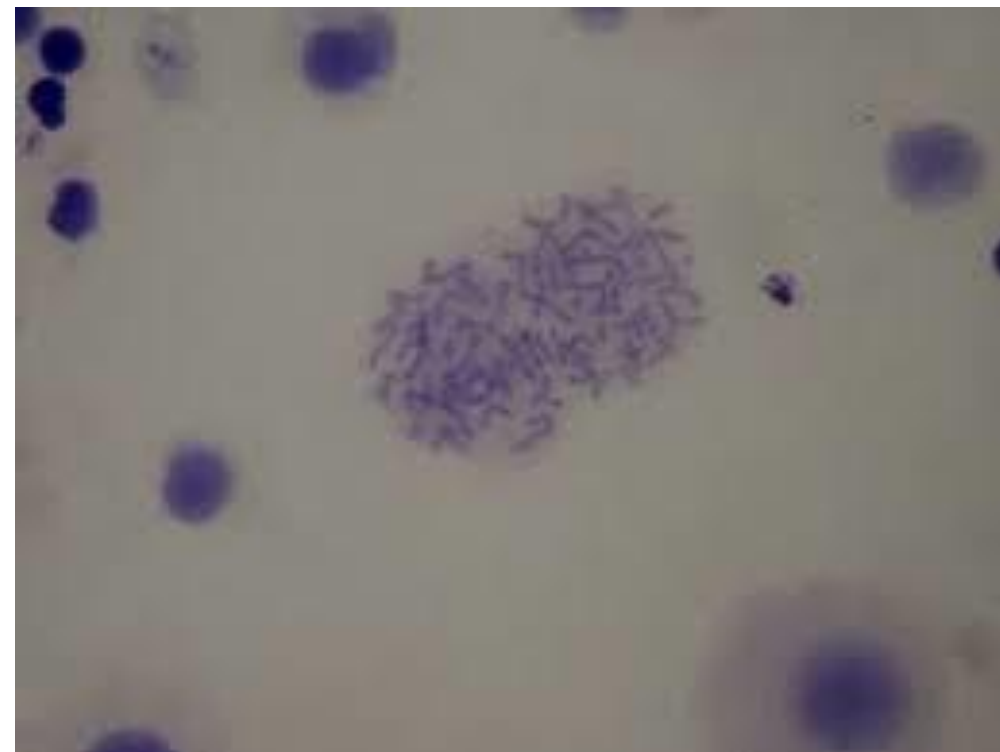
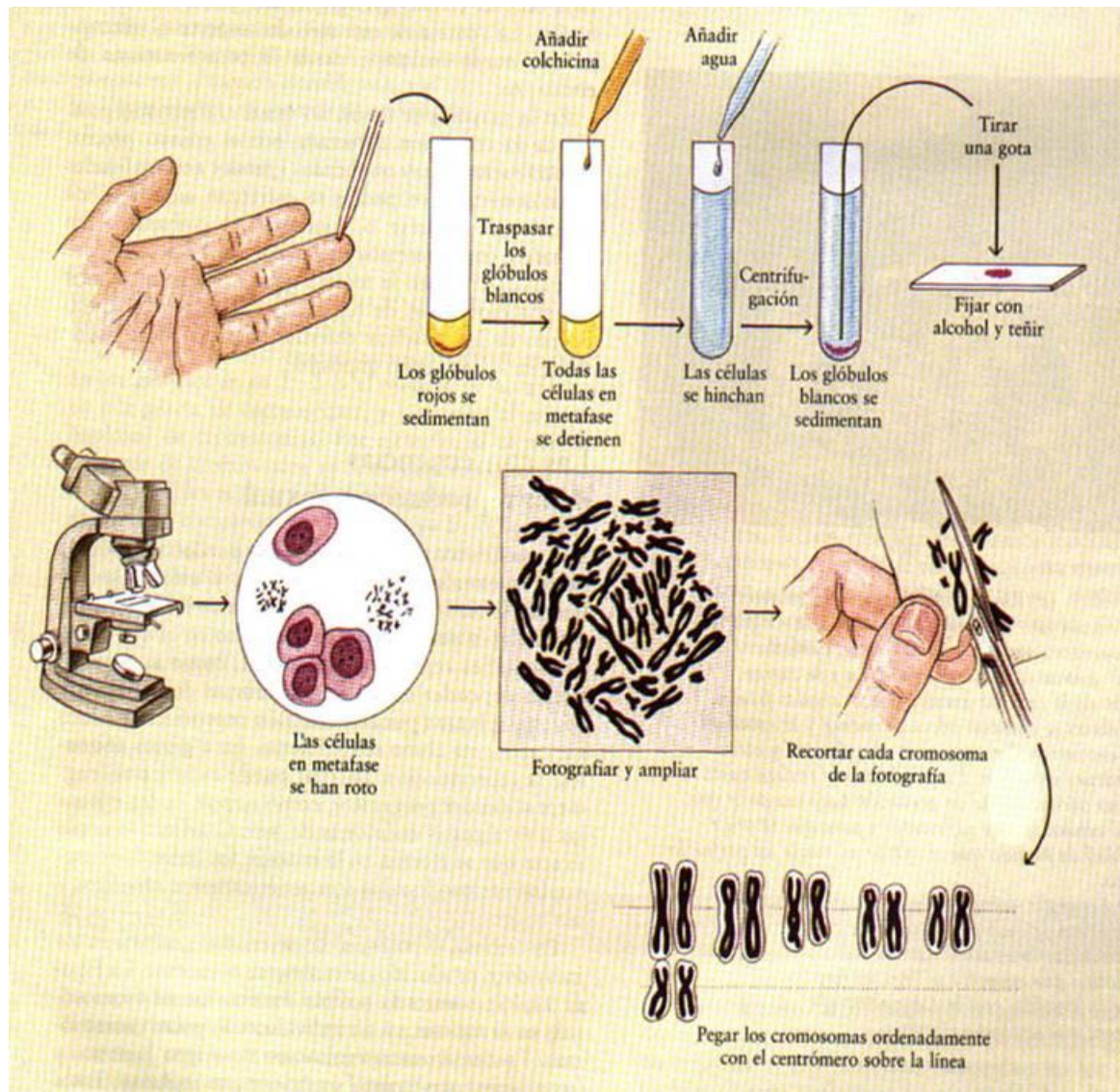
OBTENCIÓN DE EXTENSIONES DE METAFASES

➤ Fijación y lavado.

- Se realiza con **fijador de Carnoy**(metanol-ácido acético 3:1)
- Se añaden 5 ml de fijador al tubo con las células, se mezcla y se deja reposar 5 minutos a tª ambiente.
- A continuación, se centrifuga a 1500 rpm 5 minutos, se descarta el sobrenadante y se realizan 2-3 lavados adicionales con el fijador hasta obtener un botón celular blanco y limpio.

➤ Obtención de extensiones por goteo.

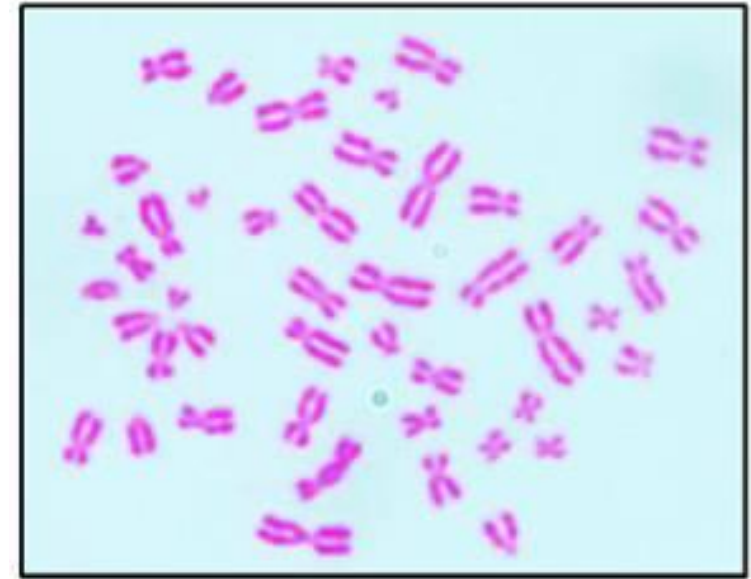
- Se centrifugan → se elimina el sobrenadante en la medida de lo posible → se añade una cantidad de fijador recién preparado suficiente para **resuspender el botón celular**
- Para hacer las extensiones, se carga la suspensión celular en una pipeta pasteur y se dejan caer una o dos gotas sobre un portaobjetos limpio (mantenido en metanol) y húmedo desde una altura aproximada de 30 cm.
- Al chocar la gota contra el cristal, las células se rompen y los cromosomas se dispersan sobre el cristal, lo que permitirá la observación de metafases con cromosomas separados.
- Los portaobjetos se dejan secar y están listos para su tinción.



TINCIÓN y BANDEO CROMOSÓMICOS

Tinción convencional

- La tinción convencional se realiza por inmersión de los portas en una **solución de giemsa al 3%** en **tampón fosfato a pH 6,7** durante 3-4 minutos
- Posterior lavado con agua.
- Los cromosomas se tiñen de manera uniforme, lo que permite controlar la calidad de las metafases antes de proceder a las técnicas de bandeo.

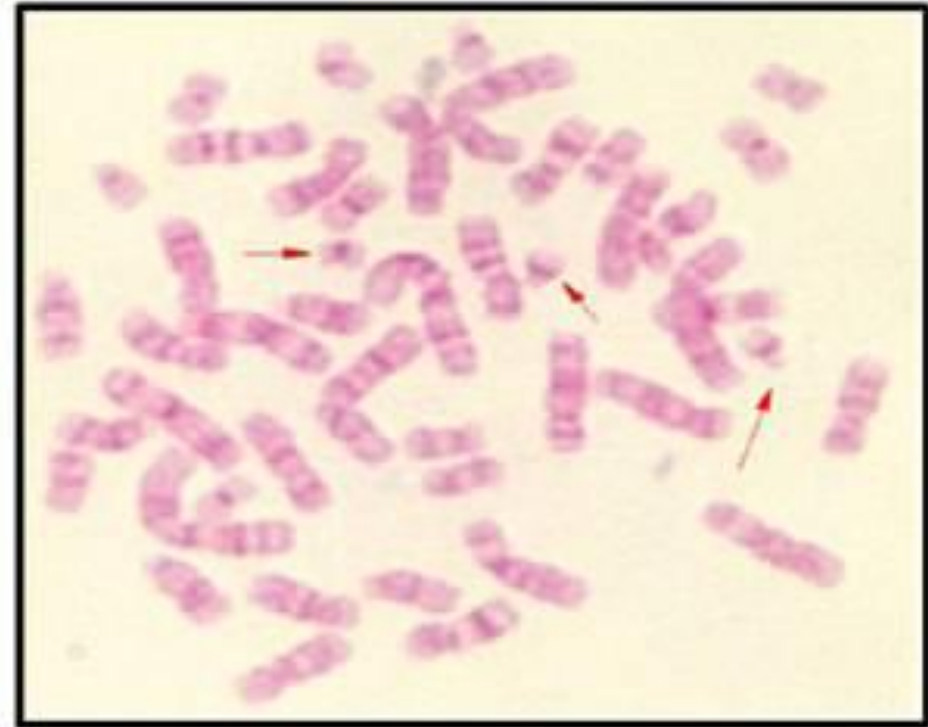
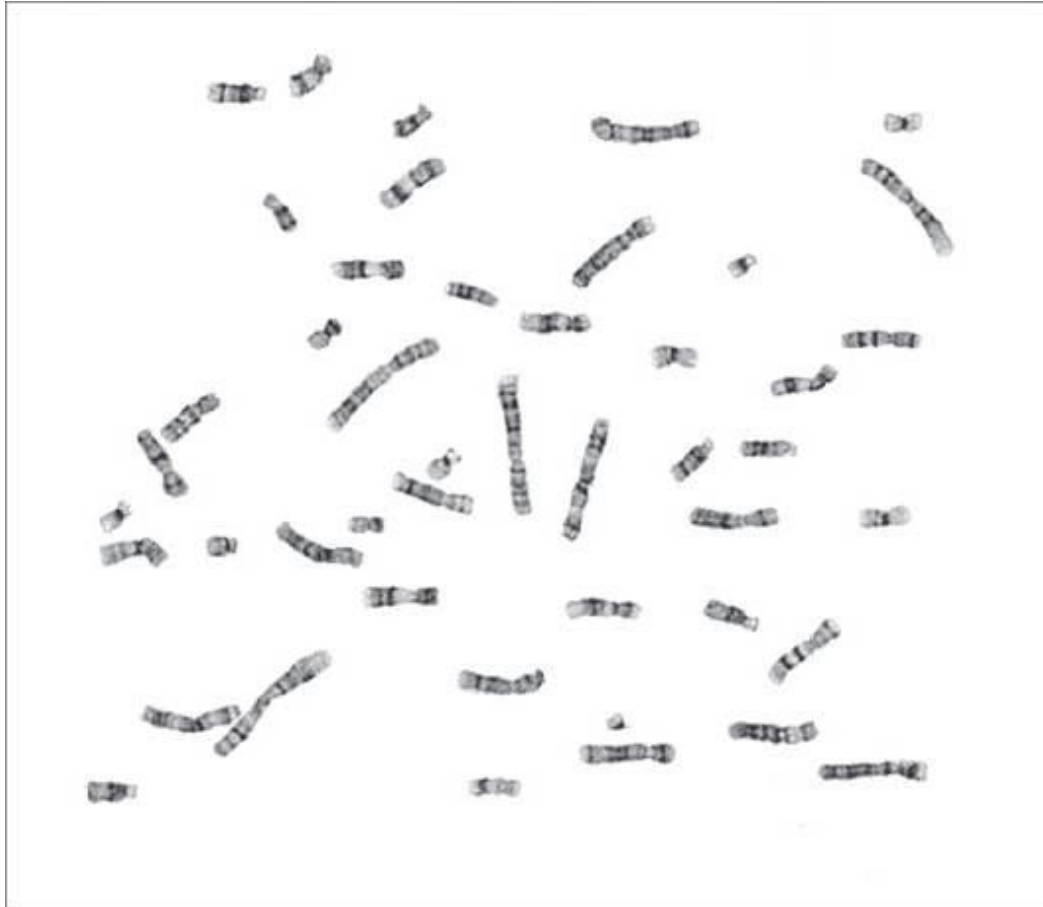


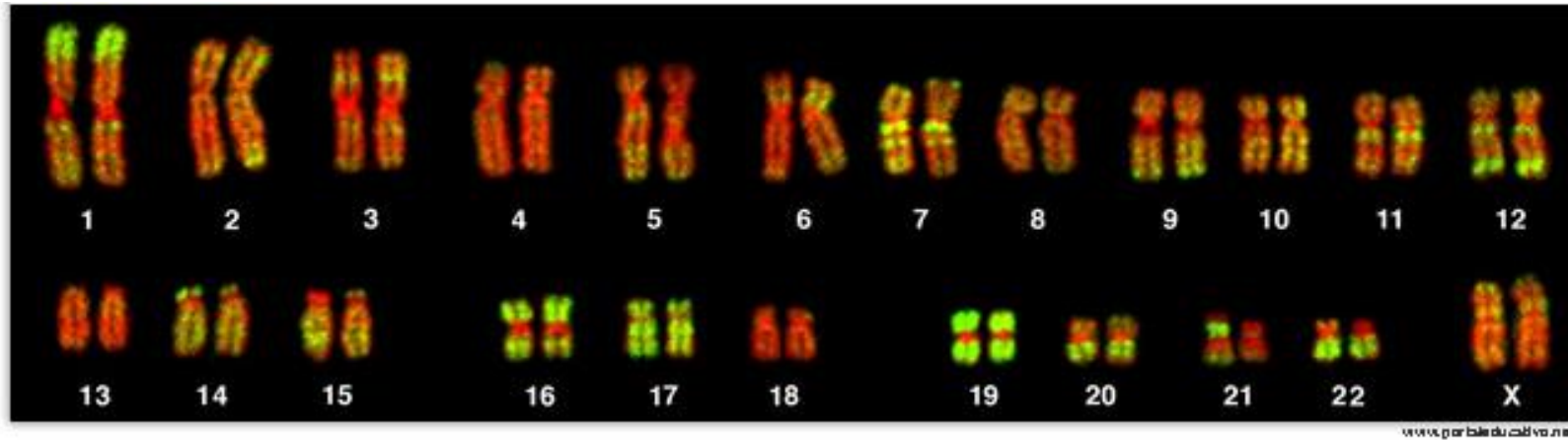
TINCIÓN y BANDEO CROMOSÓMICOS

Bandeo G

- Para obtener un buen resultado con la técnica de bandeo G, se deben utilizar **preparaciones envejecidas**.
- El **envejecimiento** se consigue:
 - Manteniendo las preparaciones en estufa a 60-65 °C durante 1-2 días
 - A 37 °C durante 3-4 días
 - A temperatura ambiente durante 7-10 días
- Los procedimientos de **tinción** varían según el laboratorio de citogenética que los realiza.
- Todos se basan en la realización de **dos pasos**:
 - 1.- **Digestión con tripsina**. Se realiza por inmersión de las preparaciones en una solución de tripsina durante un tiempo que dependerá de la concentración de la enzima, a temperatura de incubación y el grado de envejecimiento de la preparación. → La digestión se detiene mediante lavados con solución salina o PBS.
 - 2.- **Tinción con giemsa**. Se realiza por inmersión en una solución tamponada de giemsa.Finalmente, las preparaciones se lavan con agua y se dejan secar para su evaluación microscópica.

TINCIÓN y BANDEO CROMOSÓMICOS





ANÁLISIS CROMOSÓMICO

ANÁLISIS CROMOSÓMICO

- El análisis cromosómico de preparaciones metafásicas, nos permiten obtener el **cariotipo**
- Podemos detectar alteraciones cromosómicas tanto **numéricas** como **estructurales**
- La metodología que se sigue en el análisis cromosómico consiste en:
 - Recuento y análisis cromosómico de metafases completas
 - Ordenamiento y emparejamiento de una de ellas.



RECuento y ANÁLISIS CROMOSÓMICO DE METAFASES COMPLETAS

- Para realizar un cariotipo se analizan un **mínimo de 20 metafases completas** visualizadas con objetivo 100x.
- Se observan y se cuentan los cromosomas y se fotografían las de mejor calidad → al menos cinco.
- Las metafases fotografiadas se someten a un análisis completo, comparando cada cromosoma con su homólogo banda a banda para detectar cualquier cambio en su estructura.



ORDENAMIENTO y EMPAREJAMIENTO

- Los cromosomas de una de las metafases fotografiadas **se ordenan por parejas de homólogos**, constituyendo un cariotipo.
- El ordenamiento y emparejamiento de los cromosomas se realiza en virtud de:
 - Las **características morfológicas**
 - El **patrón de bandas G** de los cromosomas metafásicos.

Human female
G-bands



ORDENAMIENTO y EMPAREJAMIENTO

Características morfológicas de los cromosomas humanos

- Por acuerdo internacional, los cromosomas se ordenan siguiendo **tres criterios**:
 - Por **tamaño**. Los cromosomas se ordenan de **mayor a menor**.
 - La **posición del centrómero**. Cuando hay varios cromosomas de tamaño similar, se colocan primero los **metacéntricos**, después los **submetacéntricos** y finalmente los **acrocéntricos** (en la especie humana no hay cromosomas telocéntricos).
 - La presencia de **constricciones secundarias**.

ORDENAMIENTO y EMPAREJAMIENTO

Características morfológicas de los cromosomas humanos

El cariotipo humano se ordena en ocho grupos de cromosomas:

➤ **Siete grupos de autosomas** denominados con las siete primeras letras del abecedario en mayúsculas (A-G)

➤ **Un grupo de cromosomas sexuales** que se sitúa al final del cariotipo

➤ GRUPOS

➤ **Grupo A.** Está constituido por los cromosomas **1, 2 y 3**, que son los más grandes del cariotipo humano.

Los cromosomas **1 y 3** son metacéntricos, el **2** es submetacéntrico.

➤ **Grupo B.** Lo integran los cromosomas **4 y 5**, grandes y submetacéntricos.

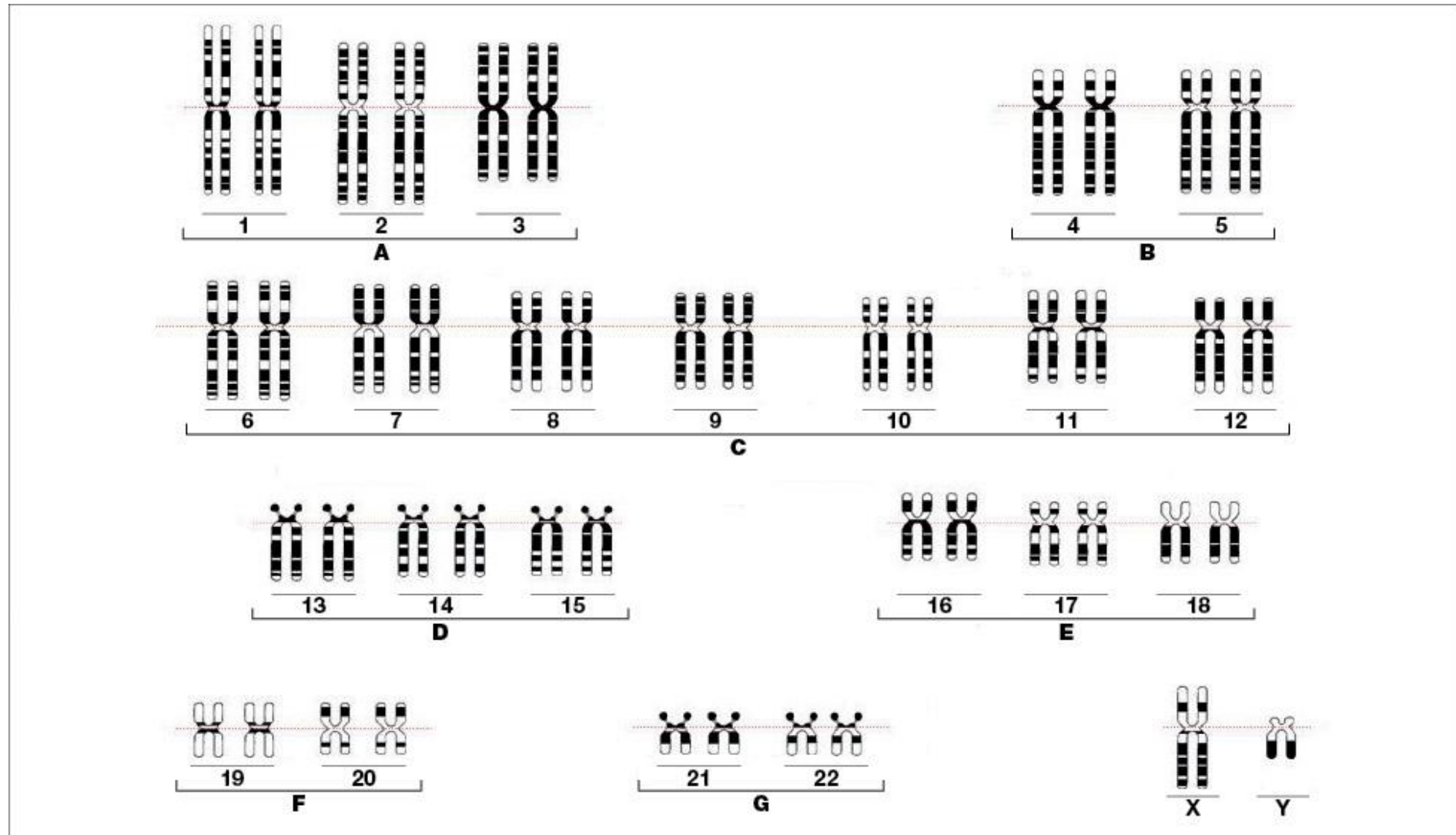
➤ **Grupo C.** Incluye los cromosomas **6 al 12**, submetacéntricos de tamaño mediano.

➤ A este grupo debería pertenecer el **cromosoma X**, que por su tamaño se sitúa entre los dos cromosomas 6 y 7, pero por convenio se coloca en un grupo final aparte de cromosomas sexuales.

ORDENAMIENTO y EMPAREJAMIENTO

- **Grupo D.** Está compuesto por los cromosomas 13, 14 y 15, que
 - Son los acrocéntricos de mayor tamaño.
 - Todos tienen constricción secundaria y satélite.
- **Grupo E.** Formado por los cromosomas 16, 17 y 18, submetacéntricos pequeños.
- **Grupo F.** Que consta dos cromosomas 19 y 20, los metacéntricos más pequeños.
- **Grupo G.** Constituido por los cromosomas 21 y 22,
 - Los acrocéntricos más pequeños del cariotipo humano,
 - Ambos con constricción secundaria y satélite.
- **Cromosomas sexuales.** Cromosomas X e Y.
 - El cromosoma X es submetacéntrico mediano
 - El cromosoma Y es acrocéntrico pequeño (por morfología debería estar en el grupo G)

ORDENAMIENTO y EMPAREJAMIENTO

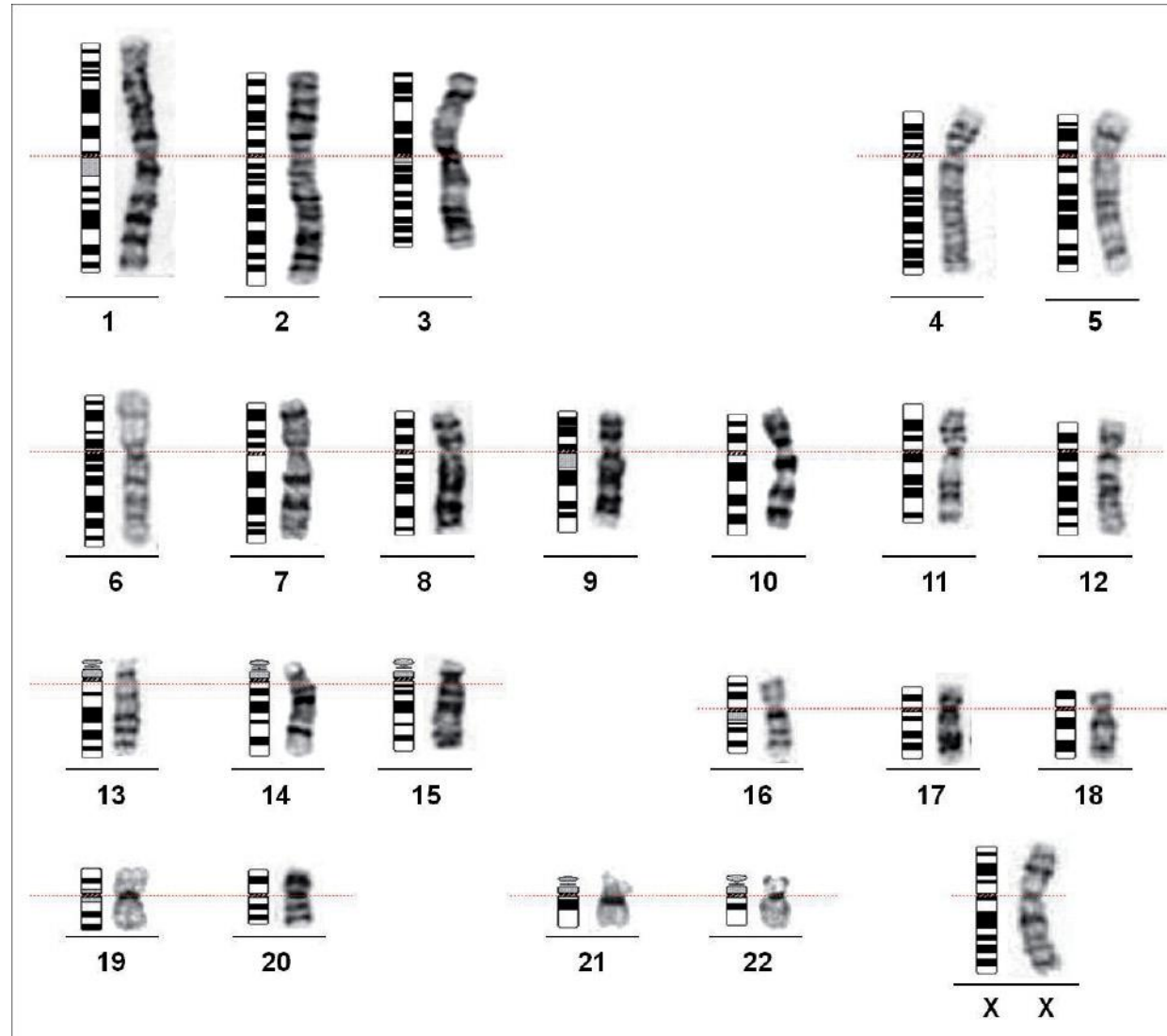


ORDENAMIENTO y EMPAREJAMIENTO

Patrón de bandas G

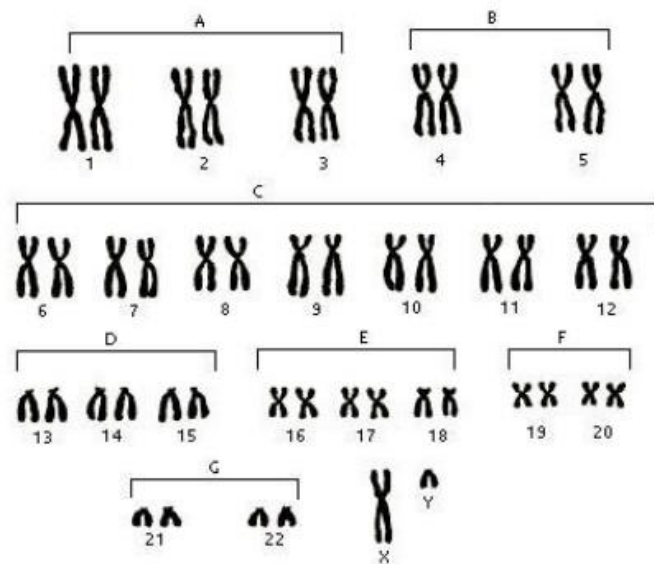
- Las bandas G son las más utilizadas en citogenética humana para analizar cromosomas.
- Permiten la **identificación inequívoca de todos los cromosomas**
- Es especialmente importante en el grupo C, por la gran similitud morfológica de varios cromosomas.
- **Facilitan** la **detección y el análisis de las alteraciones estructurales** de los cromosomas.
- El patrón de bandas va a depender del grado de condensación de los cromosomas teñidos.
- El patrón estándar es de 350-400 bandas, correspondiente a cromosomas metafásicos totalmente condensados.

ORDENAMIENTO y EMPAREJAMIENTO

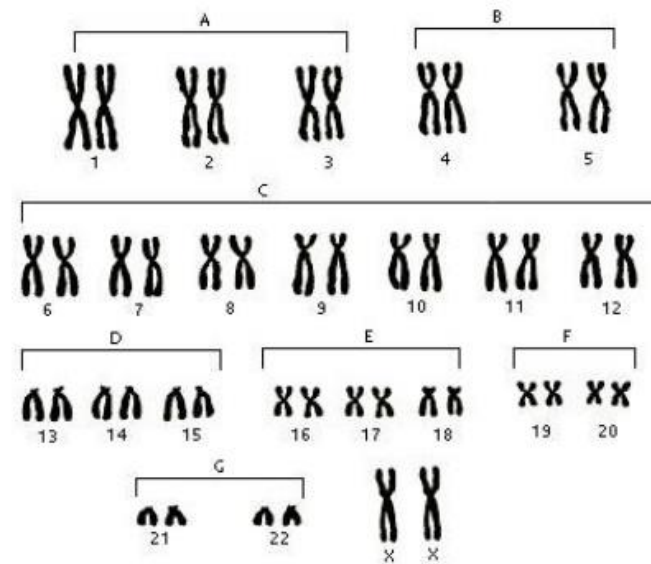


AUTOMATIZACIÓN DEL ANÁLISIS CROMOSÓMICO

- Cada vez es más habitual que el análisis cromosómico se realice de forma automatizada mediante plataformas de análisis de imagen, denominadas **cariotipadores**.
- Estas plataformas están dotadas de **microscopios motorizados, cámaras digitales y programas informáticos específicos** que automatizan el procedimiento de análisis cromosómico:
 - Capturan y analizan imágenes de metafases
 - Clasifican automáticamente los cromosomas según su morfología y patrón de bandas
 - Realizan el cariotipo
 - Generan un informe con los cromosomas ordenados y las alteraciones detectadas



Cariotipo masculino

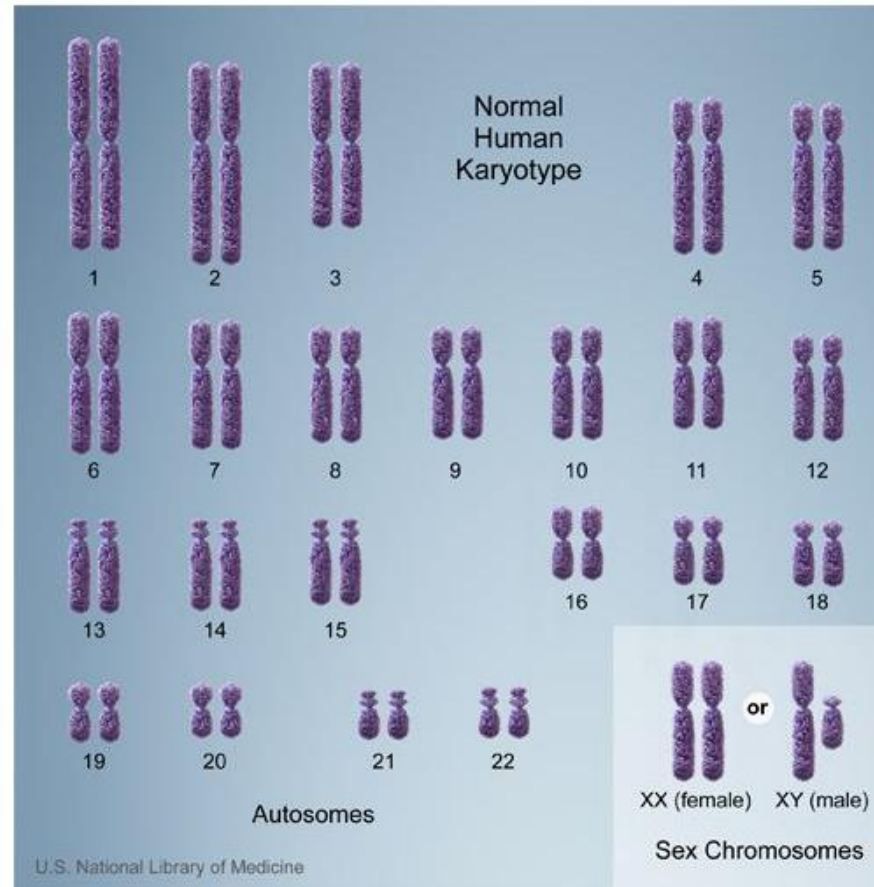
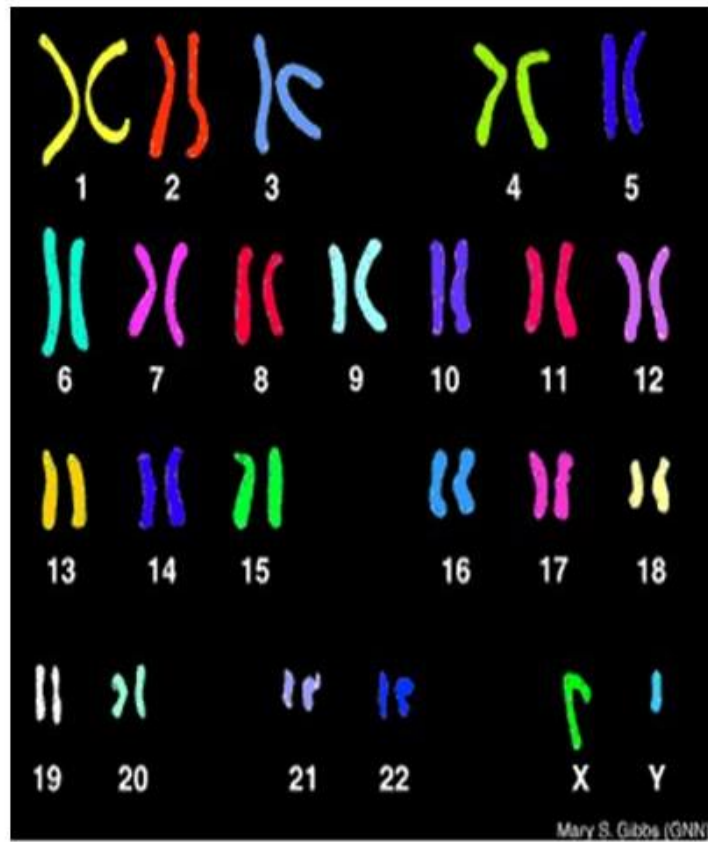


Cariotipo femenino

46 cromosomas

Célula somática

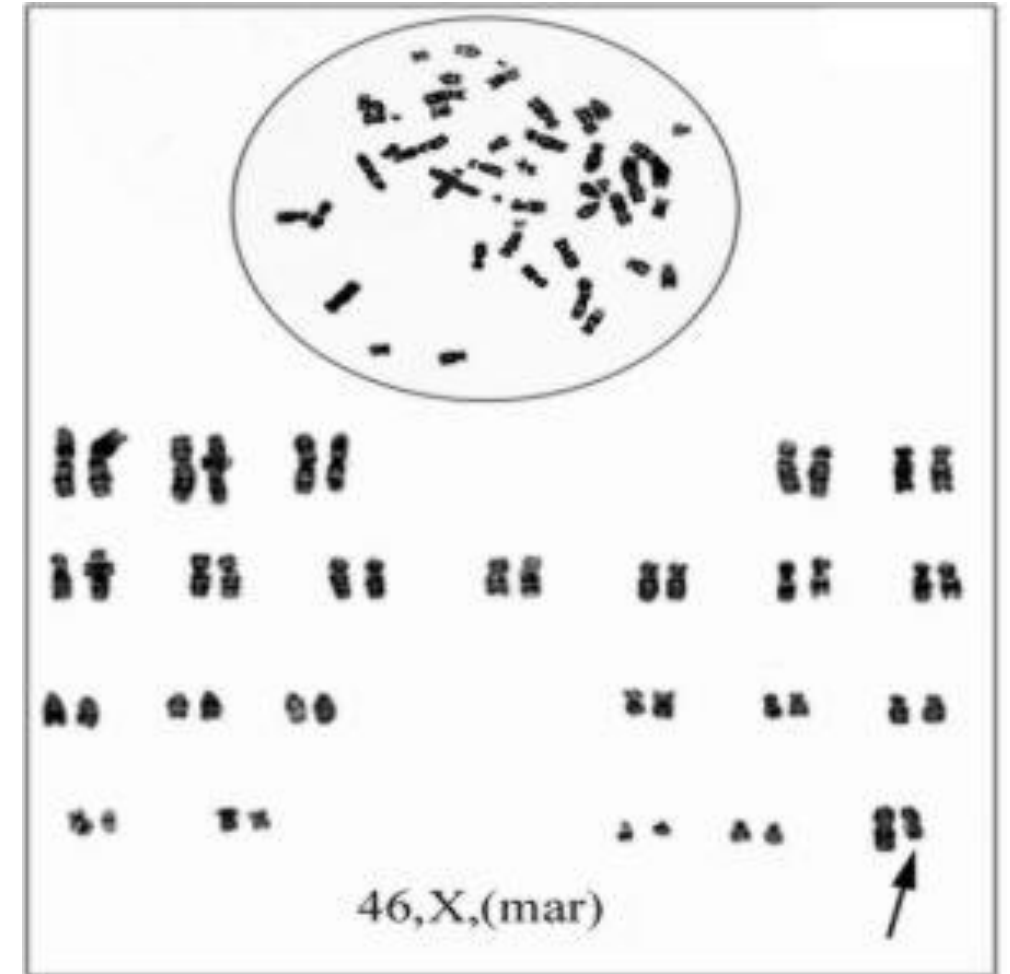
Diploide



NOMENCLATURA CITOGENÉTICA y FÓRMULA CROMOSÓMICA

NOMENCLATURA CITOGENÉTICA y FÓRMULA CROMOSÓMICA

- Los resultados obtenidos se describen mediante la llamada fórmula cromosómica
- La **fórmula cromosómica** proporciona la descripción detallada de cariotipo de un individuo
- La **nomenclatura** utilizada incluye:
 - Abreviaturas
 - Símbolos
 - Pautas para redactarla, se rigen por el consenso internacional del ISCN



NOMENCLATURA CITOGENÉTICA y FÓRMULA CROMOSÓMICA

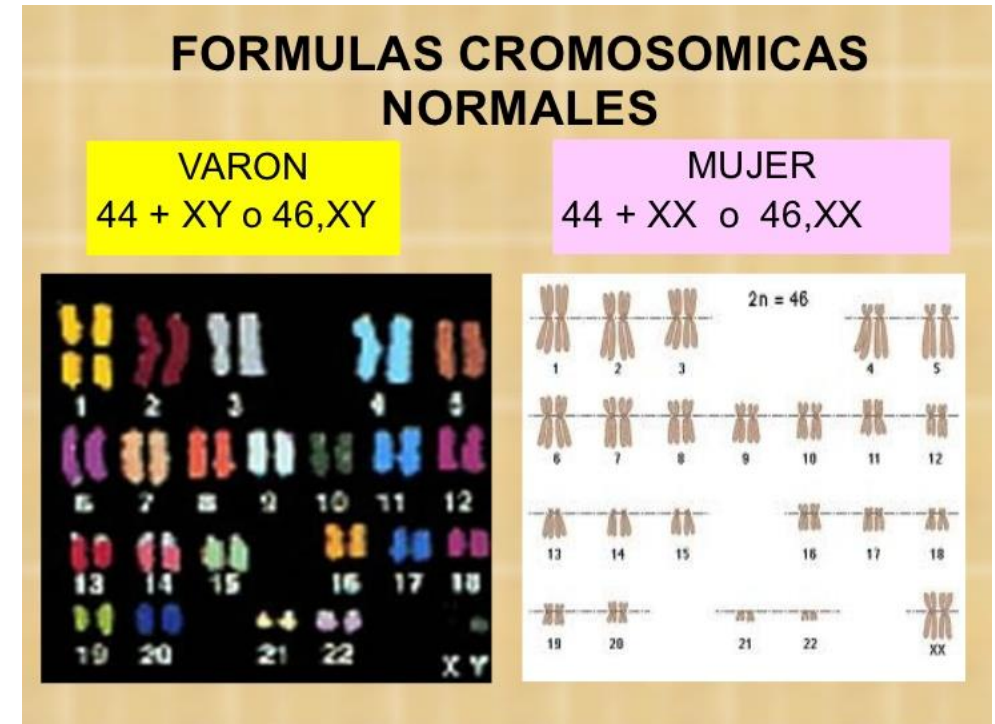
Para estructurar la información en la fórmula cromosómica seguimos unas pautas:

➤ Sin anomalías

- La fórmula se inicia con el número total de cromosomas que posee el individuo seguido de una coma
- A continuación, se especifican los cromosomas sexuales sin anomalías estructurales.

Ejemplo:

- 46,XX → cariotipo normal de una mujer.
- 46,XY → cariotipo normal de un varón.



NOMENCLATURA CITOGENÉTICA Y FÓRMULA CROMOSÓMICA

➤ Anomalías numéricas

- En el caso de anomalía numérica en los **cromosomas sexuales**, se refleja directamente en la fórmula.

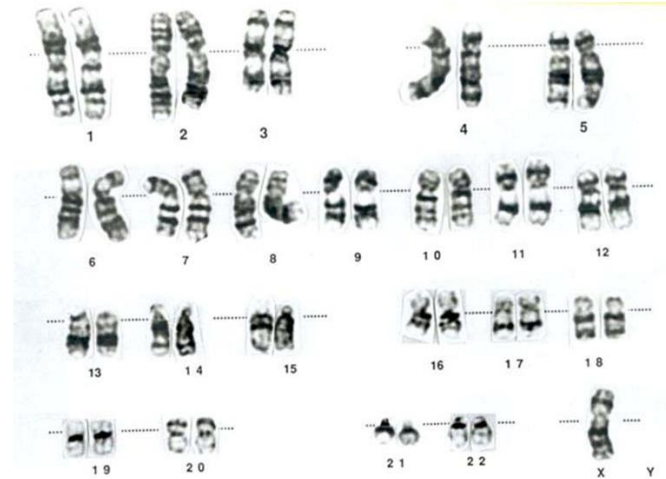
Ejemplo:

- 45,X0 → monosomía del cromosoma X.
- 47,XY → disomía del cromosoma Y.
- Si la anomalía numérica afecta a los **autosomas**, se **informa a continuación de los cromosomas sexuales**, separada de ellos por una coma:
 - Las **monosomías** se señalan con **signo –** seguido del número del cromosoma que falta.
 - Las **trisomías** se señalan con **signo +** seguido del número del cromosoma extra.

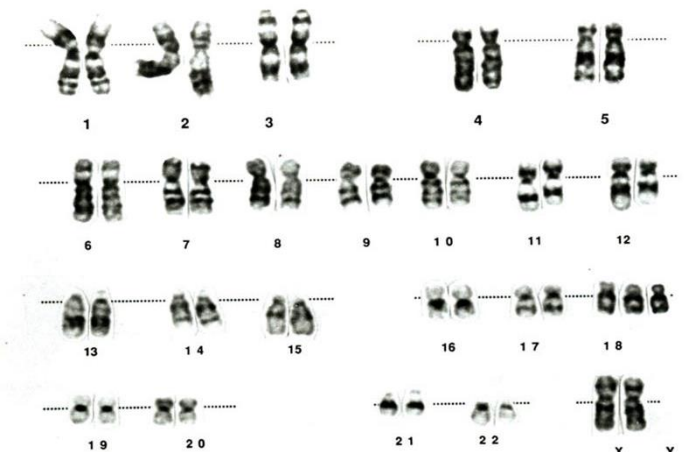
Ejemplo:

- 45,XX,-21 é a monosomía do cromosoma 21 (mujer).
- 47,XY,+21 é a trisomía do cromosoma 21 (varón).

Fórmula cromosómica: 45, X0



Fórmula cromosómica: 47, XY, +18



NOMENCLATURA CITOGENÉTICA y FÓRMULA CROMOSÓMICA

➤ Anomalías estructurales

- Si existen: se informan a continuación de las numéricas, o de los cromosomas sexuales, separadas por una coma.
- Las anomalías estructurales que afectan a un único cromosoma (deleción, duplicación, inversión, cromosoma en anillo)
- Se informan con la abreviatura de la alteración seguida del número de cromosoma afectado entre paréntesis y de la banda o bandas afectadas por la mutación (puntos de rotura y reunión) también entre paréntesis.

Ejemplo:

- 46,XX,del(9)(q22) → mujer con deleción terminal del brazo largo del cromosoma 9 con punto de rotura en la banda q22.
- 46,XY,del(2)(q21q32) → varón con deleción intersticial del brazo largo del cromosoma 2 con puntos de rotura y reunión en q21 y q32.
- 46,XX,dir dup(3)(p12p22) → mujer con duplicación directa en tándem desde p12 hasta p22 en cromosoma 3
- 46,XY,inv(4)(p22p28) → varón con inversión en cromosoma 4 con puntos de rotura y reunión en p22 y p28.
- 46,XX,r(10)(p14q25) → mujer con cromosoma 10 en anillo y puntos de rotura y reunión en p14 y q25.

NOMENCLATURA CITOXENÉTICA y FÓRMULA CROMOSÓMICA

➤ **Anomalías estructurales** que afectan a **dos cromosomas** (**translocaciones**)

- Se informan con la abreviatura de la alteración, seguida de los números de los cromosomas afectados entre paréntesis y separados por un punto y coma, seguidos de los puntos de rotura y reunión en cada cromosoma, también entre paréntesis y separadas por punto y coma los de cada cromosoma.
- Las **translocaciones no recíprocas**, para la fórmula cromosómica, se consideran como inserciones entre cromosomas no homólogos. → la abreviatura utilizada es «ins» y de los cromosomas implicados se coloca primero el aceptor y después el donante (separados por punto y coma).

Ejemplo:

- **46,XY,ins(10;3)(q22;p13p23)** → varón con inserción en el cromosoma 10 a nivel de la banda q22 del segmento comprendido entre p13 y p23 del cromosoma 3
- En las **translocaciones recíprocas**, el orden de los cromosomas es: primero los cromosomas sexuales (si están implicados) y los autosomas de menor a mayor

NOMENCLATURA CITOXENÉTICA y FÓRMULA CROMOSÓMICA

Mosaicismos

- La fórmula cromosómica se inicia con la abreviatura «**mos**» y a continuación se describen todas las líneas celulares, empezando por las anormales y terminando por la normal
- Las líneas celulares se separan entre sí por el signo **/**.
- Para conocer la proporción en la que se encuentra cada línea celular, después de su descripción se pone entre corchetes el número de metafases analizadas que presentan ese cariotipo.
- Cuando hay varias líneas celulares anormales, se ordenan de mayor a menor según el número de metafases en las que se detectaron

Ejemplo:

- **mos47,XYY[15]/46XY[30]** es la fórmula cromosómica de un individuo con mosaicismo en el que se analizaron 45 metafases.
- En 15 de ellas se detectaron una disomía del cromosoma Y, mientras que las 30 restantes son normales

FÓRMULAS DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

1.- Anomalías numéricas:

a) En cromosomas sexuales:

- Síndrome de Turner (monosomía del cromosoma X): 45,X
- Síndrome del duplo Y (disomía del cromosoma Y): 47,XYY
- Síndrome de Klinefelter: 47,XXY

b) En autosomas:

- Síndrome de Down (trisomía del cromosoma 21): 47,XX,+21
- Síndrome de Edwards (trisomía del cromosoma 18): 47,XX,+18
- Síndrome de Patau (trisomía del cromosoma 13): 47,XX,+13

2.- Anomalías estructurales:

a) Deleciones:

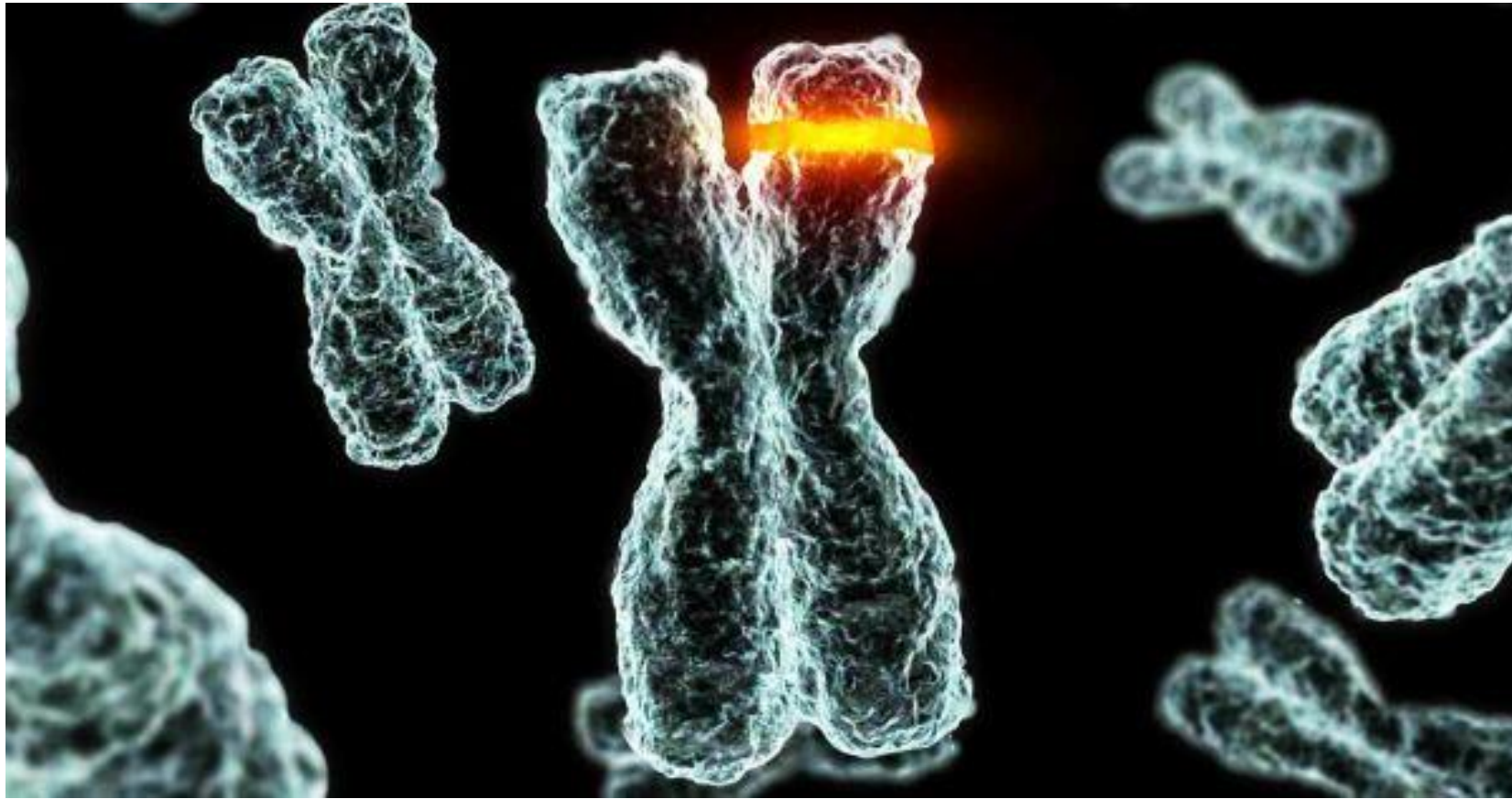
- Síndrome Cri du chat o síndrome del maullido de gato: 46,XX,del(5)(p14)
- Síndrome de Prader-Willi: 46,XX,del(15)(q11q13)
- Síndrome de DiGeorge: 46,XX,del(22)(q11.2)

b) Translocaciones:

- Leucemia mieloide crónica (cromosoma Philadelphia): 46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)

c) Duplicaciones:

- Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth: 46,XX,dup(17)(p12)



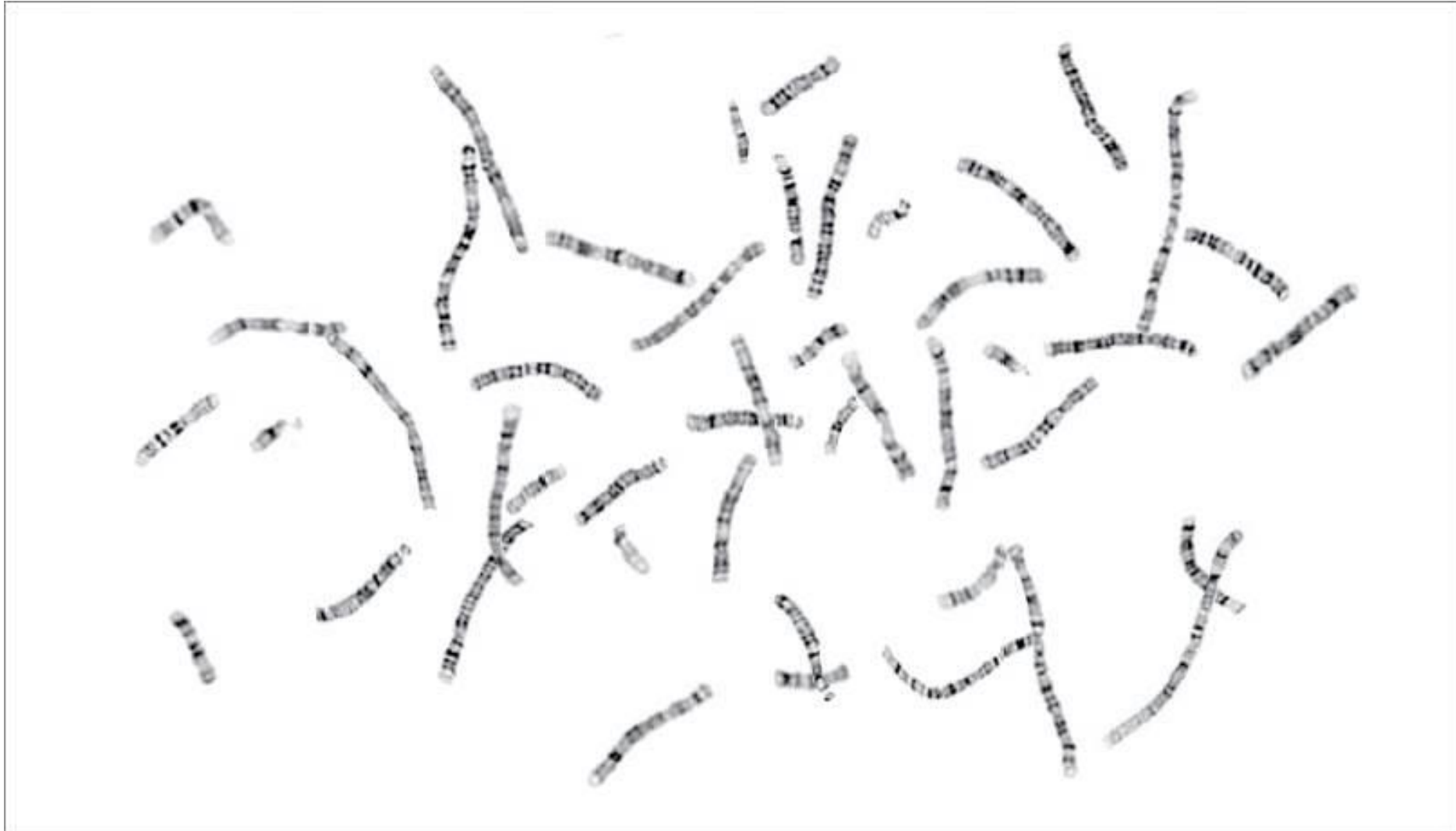
CARIOTIPO DE ALTA RESOLUCIÓN

CARIOTIPO DE ALTA RESOLUCIÓN

Es el que **se obtiene a partir de cromosomas en profase tardía o prometafase**

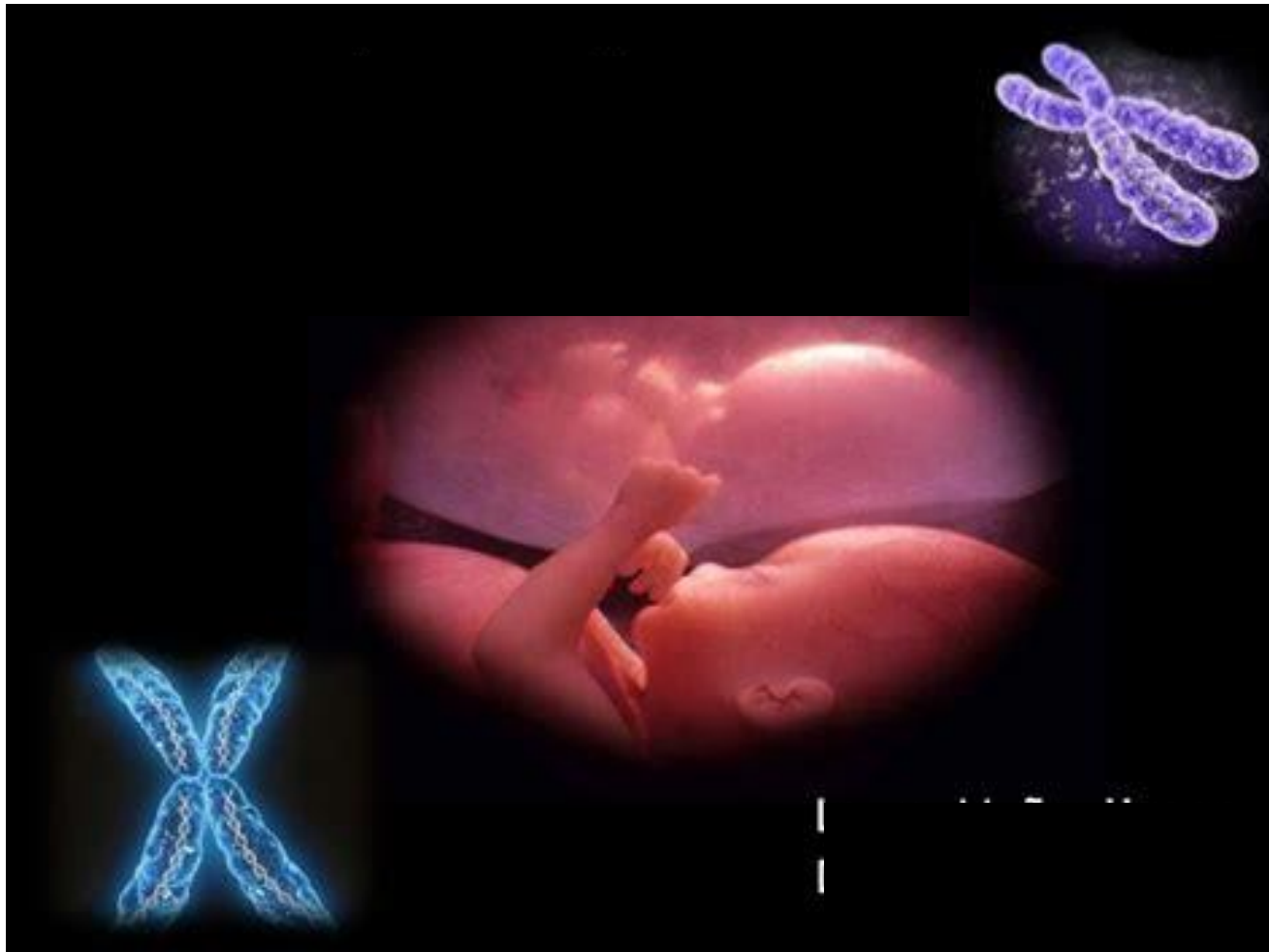
- En estos estadíos de la mitosis, el grado de condensación de los cromosomas es menor que en metafase
- Al aplicarles una técnica de **bando G** se obtiene un número mayor de **bandas** (entre 550 e 850, dependiendo del grado de condensación)
- Con esta estrategia **se aumenta la sensibilidad del cariotipo**
- **Permite detectar alteraciones cromosómicas estructurales de menor tamaño** (por encima de 5 Mb) respecto del cariotipo convencional

CARIOTIPO DE ALTA RESOLUCIÓN



CARIOTIPO DE ALTA RESOLUCIÓN

- Un paso clave para realizar un cariotipo de alta resolución consiste en sincronizar el cultivo de linfocitos.
- Añadimos al cultivo **metotrexato**, que **inhibe la dihidrofolato reductasa**, enzima necesaria para la síntesis de timidina.
- Así las **células proliferantes se bloquean en la fase S del ciclo celular** al no poder replicar el ADN.
- Tras un tiempo de incubación para que se acumule un gran número de células en fase S, **se añade al cultivo timidina** o un análogo sintético de la misma, la bromodesoxiuridina (BrdU), con lo que se reinicia la síntesis de ADN.
- De esta manera **todas las células que estaban bloqueadas en fase S evolucionan hacia mitosis de forma sincronizada**.
- Después de un tiempo prudencial para que las células alcancen la profase **se añade colchicina o colcemid** al medio de cultivo **para evitar la formación del huso acromático**.
- Una incubación corta con la colchicina garantiza la presencia de cromosomas en profase o prometafase en las preparaciones de citogenética



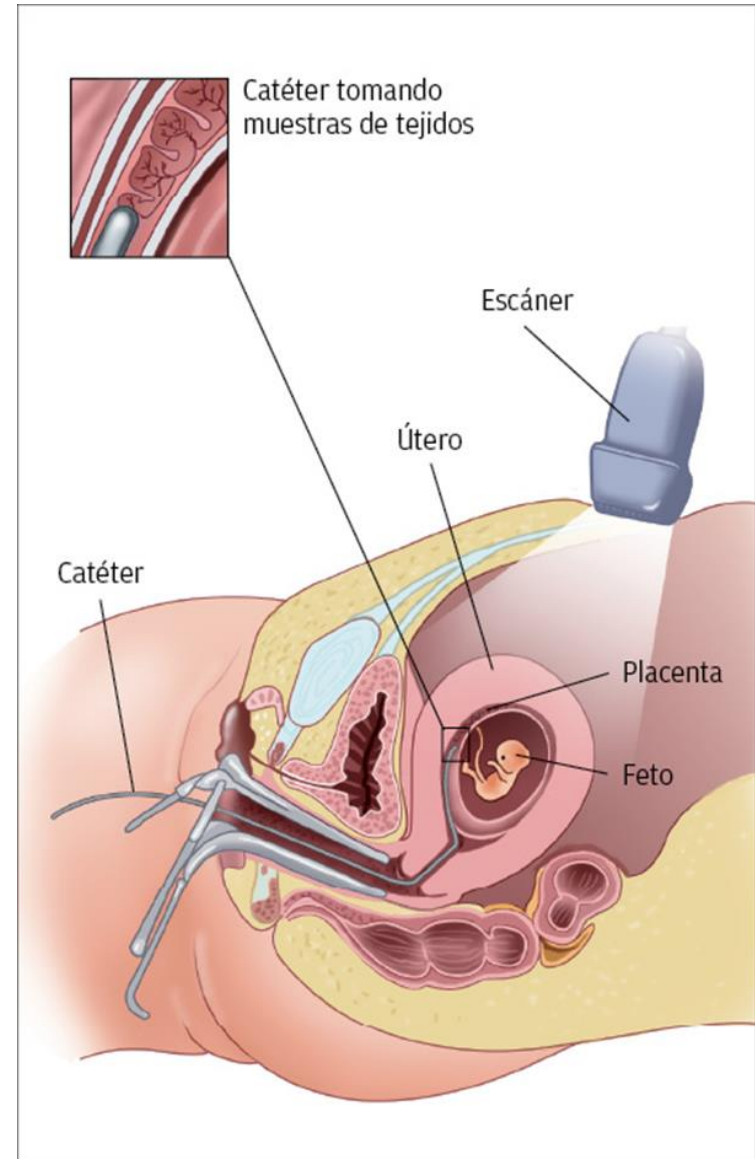
CITOGENÉTICA y DIAGNÓSTICO PRENATAL

CITOGENÉTICA y DIAGNÓSTICO PRENATAL

- La obtención del **cariotipo fetal** es una técnica incluida en el diagnóstico prenatal.
- Está **indicada** en las siguientes situaciones:
 - **Resultado alterado del triple cribado** o screening (bioquímico y ecográfico) en el primer trimestre de gestación
 - **Retraso en el crecimiento intrauterino**
 - Observación de **anomalías ecográficas en el feto**
 - **Antecedentes de cromosomopatía en un progenitor**
- Dependiendo de las semanas de embarazo, el cariotipo fetal puede realizarse a partir de:
 - Muestras de **vellosidad corial**
 - Muestras de **líquido amniótico**

CARIOTIPO DE VELLOSIDAD CORIÓNICA

- Las vellosidades coriónicas son proyecciones del corion, **cuyas células tienen la misma carga genética que el embrión.**
- Para su análisis citogenético, es necesario:
 - Hacer una biopsia
 - Lavar la muestra
 - Seleccionar la muestra
 - Realizar un cultivo
 - Preparar extensiones de metafases



CARIOTIPO DE VELLOSIDAD CORIÓNICA

Toma de la biopsia

- Se puede realizar por vía transcervical o por vía transabdominal, con control ecográfico, entre las **semanas 10 y 14 de gestación**
- En este periodo cuando las vellosidades tienen mayor diámetro (corion frondoso) y sus características citológicas resultan idóneas para la obtención de metafases.

Ventaja: efectúa el diagnóstico prenatal en el primer trimestre de gestación

Inconvenientes:

- ❖ obtención de **mosaicismos** por contaminación materna
- ❖ en algunas ocasiones, una **escasa y mala calidad** de las metafases

CARIOTIPO DE VELLOSIDAD CORIÓNICA

Lavado y selección de la muestra

- Se hace para eliminar posibles restos y contaminaciones de tejido materno
- Se realiza colocando la biopsia en una placa de Petri con medio de cultivo o solución salina estéril y visualizándola con un esteromicroscopio
- Se revisan una a una todas las «ramas» de las vellosidades, eliminando con ayuda de agujas cualquier resto de coágulos o grumos de tejido denso, probablemente de origen materno
- Cualquier fragmento de vellosidad con posible contaminación de origen materno se debe eliminar
- Todo el material utilizado en esta fase debe ser estéril
- Todas las manipulaciones deben efectuarse en condiciones de esterilidad en cabina de seguridad biológica

ESTEROMICROSCOPIO

Microscopio de laboratorio que brinda una visión tridimensional de aquello que se quiere examinar



CARIOTIPO DE VELLOSIDAD CORIÓNICA

Cultivo y obtención de metafases

- El estudio citogenético puede realizarse de dos maneras diferentes, mediante cultivo corto o cultivo largo.
 - Cultivo corto
 - Cultivo largo

CARIOTIPO DE VELLOSIDAD CORIÓNICA

Cultivo corto

- Se basa en que en el tejido corial hay células que entran en mitosis de forma espontánea y que podrían ser analizadas directamente.
- Para mejorar la calidad y cantidad de estas divisiones espontáneas se cultiva la biopsia durante 24-48 horas → primero se hace el cultivo y después se disgrega.
- Los pasos a seguir son:
 1. Cultivo de las vellosidades en placa de Petri con medio de cultivo completo durante 24-48 horas a 37 °C y 5% de CO₂.
 2. Adición de colchicina o colcemid para detener las mitosis en metafase.
 3. Traspase a tubo cónico, eliminación del medio de cultivo y adición de solución hipotónica (choque hipotónico).
 4. Fijación y varios lavados con fijador basado en ácido acético y alcohol.
 5. Disgregación del tejido, por ejemplo, con ácido acético al 60% y agitación mecánica.
 6. Goteo de la suspensión celular sobre portaobjetos limpios.
- Las preparaciones así obtenidas pueden teñirse con bandeo G por métodos convencionales y quedar preparadas para su análisis cromosómico.

CARIOTIPO DE VELLOSIDAD CORIÓNICA

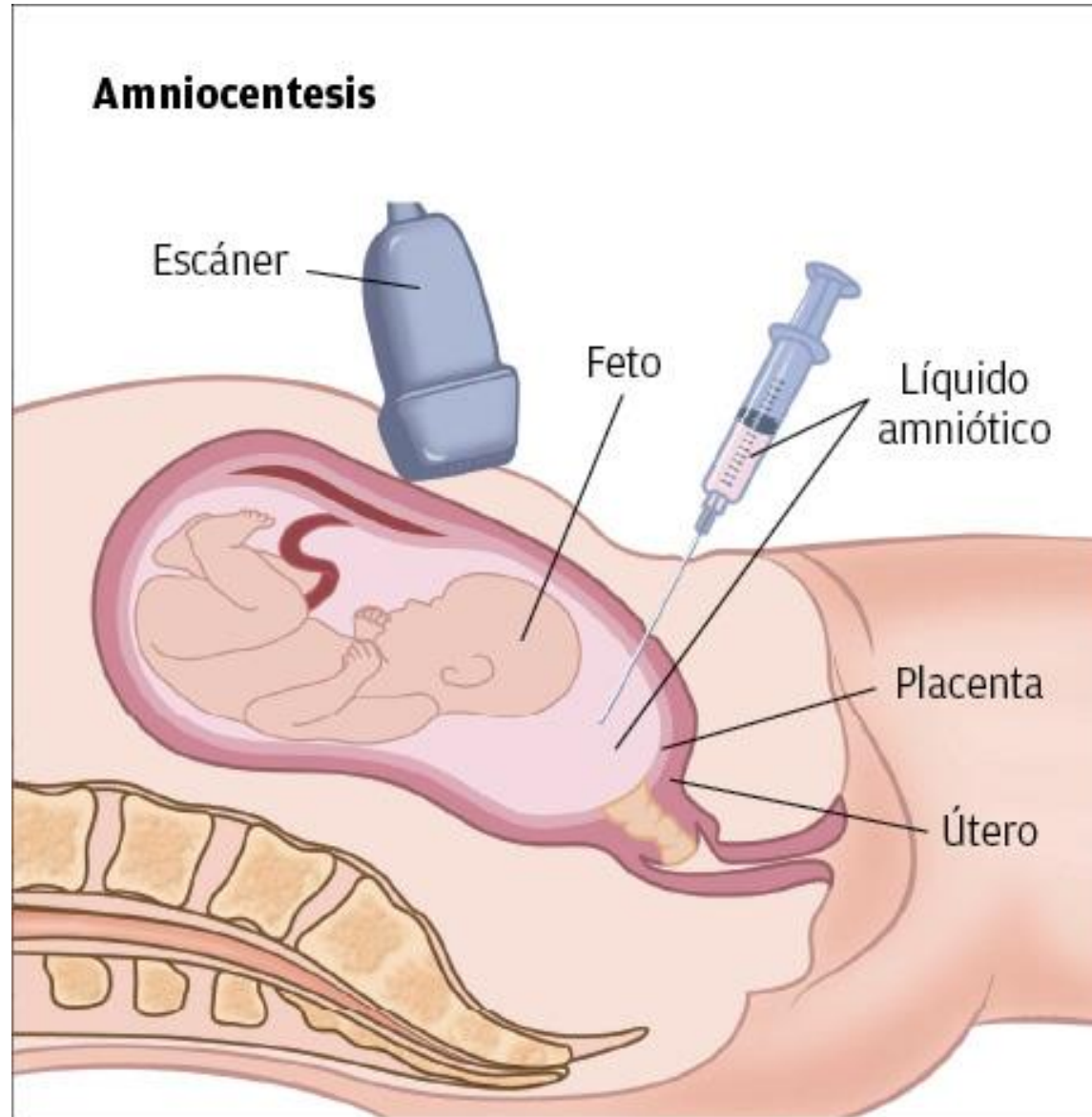
Cultivo largo

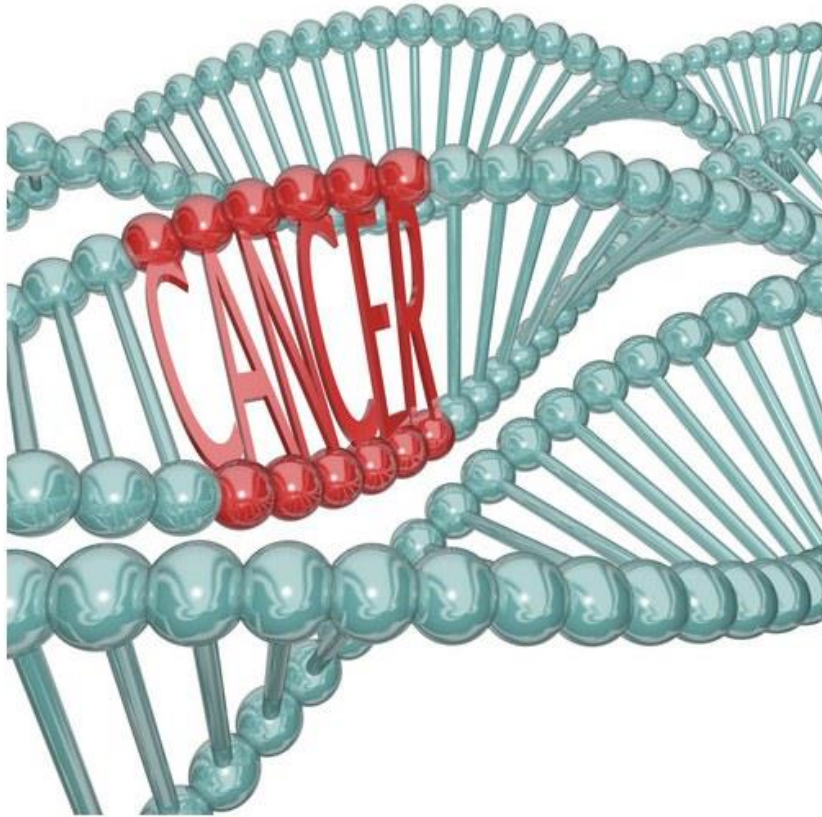
- Se basa en realizar un **cultivo primario de los fibroblastos** presentes en la vellosidad coriónica, por lo que en este caso se disgrega primero y se cultiva después
- Los pasos genéricos de este procedimiento son los siguientes:
 1. Disgregación enzimática de la vellosidad, primero con pronasa y posteriormente con colagenasa.
 2. Siembra de la suspensión celular en placas de Petri o frascos roux con medio de cultivo completo
 3. Incubación a 37 °C y 5% de CO₂ durante 4-5 días
 4. Control del crecimiento con microscopio invertido y cambios de medio hasta observar colonias celulares con un número aceptable de mitosis
 5. Detención de mitosis en metafase con colchicina o colcemid
 6. Tripsinización para despegar las células y trasvasarlas a un tubo falcon cónico
 7. Choque hipotónico
 8. Fijación y lavado
 9. Goteo sobre portaobjetos
- Las preparaciones obtenidas pueden teñirse con bandeo G y dejan listas para su análisis cromosómica

CARIOTIPO DE LÍQUIDO AMNIÓTICO

- La obtención del cariotipo fetal a partir de líquido amniótico **se basa en la presencia en este de células de descamación de las membranas que rodean al feto y del propio feto (amniocitos y fibroblastos)**
- Para su análisis citogenético se procede de forma análoga a la descrita en las vellosidades coriónicas:
 - El líquido amniótico se obtiene por punción transabdominal bajo control ecográfico, normalmente entre las semanas 16 y 18 de gestación.
 - En el procedimiento de cultivo hay que tener en cuenta que el líquido amniótico es una suspensión celular
 - Para iniciar el cultivo:
 - Centrifugar el líquido amniótico
 - Eliminar el sobrenadante
 - Resuspender el botón celular con medio de cultivo completo
 - Hacer la siembra en placas de Petri o frascos roux
 - Realizada la siembra, la continuación siguen los mismos pasos que en el procedimiento de cultivo largo de vellosidad coriónica

CARIOTIPO DE LÍQUIDO AMNIÓTICO





CITOGENÉTICA y CANCER

CITOGENÉTICA y CANCER

- Son dos conceptos íntimamente ligados → muchas neoplasias tienen su origen en alteraciones cromosómicas (numéricas o estructurales)
- Estas anomalías constituyen biomarcadores, aportando información sobre:
 - **Diagnóstico**
 - **Pronóstico**
 - **Evolución**
 - **Tratamiento** de enfermedades tumorales.
- Las alteraciones se detectan solo en las células tumorales, el resto de las células del individuo presentan un cariotipo normal
- Los mecanismos por los que distintas alteraciones cromosómicas desencadenan el cáncer son muy variadas

CITOGENÉTICA y CANCER

Las alteraciones estructurales, del tipo de translocaciones e inversiones, producen reordenamientos de genes que determinan activación o sobreexpresión de oncogenes:

- En muchos casos se producen proteínas quiméricas que inciden en el funcionamiento de genes implicados en el crecimiento y diferenciación celular
- Otras veces se producen los llamados genes de fusión, que producen expresiones aberrantes de un gen. → Un caso típico es el cromosoma Philadelphia
- Las deleciones y aneuploidías por pérdida de cromosomas pueden originar pérdidas de genes supresores de tumores, mientras que la ganancia de material genético puede provocar la sobreexpresión de oncogenes
- Es relativamente frecuente cuando se realiza un cariotipo tumoral encontrar un cariotipo compuesto → múltiples cariotipos diferentes, la mayor parte complejos (más de tres alteraciones)
- Esto se debe a que durante la evolución del tumor aparecen subclones celulares que van acumulando alteraciones genéticas