

EL CROMOSOMA EUCARIOTICO: BREVE DESCRIPCION DE LOS CROMOSOMAS HUMANOS.

Los primeros trabajos de citogenética humana datan de 1956 y se deben a Tjio y Levan que desarrollaron las técnicas de análisis cromosómico y determinaron que el número de cromosomas en la especie humana es, normalmente, de 46. Dos de estos cromosomas son los implicados en la determinación del sexo siendo iguales en la mujer (XX) y diferentes en el hombre (XY); se les llamó cromosomas sexuales o gonosomas mientras que a los 22 pares restantes se les denominó autosomas.

En el congreso de citogenética de Denver (1960), se propuso ordenar los cromosomas de acuerdo con su longitud numerando los pares del 1 al 23. Patau se opuso a esta simple clasificación demostrando que algunos cromosomas no se podían clasificar inequívocamente sólo por su longitud y posición del centrómero. Por ello propuso, y posteriormente se aprobó, subdividir los pares de cromosomas en grupos (grupos que nombró de la A a la G) incluyendo en cada grupo aquellos pares más parecidos morfológicamente y cuya clasificación en pares específicos era más problemática.

Con la puesta a punto de las técnicas de bandeo son perfectamente identificables todos y cada uno de los pares cromosómicos, y en las conferencias de París de 1971 y 1975 se propuso numerar los cromosomas humanos por pares, del 1 al 22, más dos cromosomas sexuales. Además se mantienen para los autosomas los grupos postulados por Patau e identificados con letras mayúsculas de la A a la G y se propone un grupo aparte para los cromosomas sexuales.

En 1976 se crea el Comité Permanente para la Nomenclatura de la Citogenética Humana (fue en el 5º Congreso Internacional de Genética Humana de Ciudad de Méjico) y desde entonces funciona publicando periódicamente recomendaciones para la nomenclatura, la última de las cuales es de 1995.

Mediante bandeo G los cromosomas metafásicos presentan en sucesión una serie de bandas e interbandas, algunas de las cuales son muy conspicuas y permiten, junto a la morfología general de cada cromosoma, su rápida identificación.

Grupo A.- Pares 1, 2 y 3 de cromosomas grandes y metacéntricos o ligeramente submetacéntricos.

El **par 1** es el mayor de los metacéntricos con un índice centromérico $lc = 48-49$. El bandeo C muestra una banda de heterocromatina constitutiva en el brazo largo, al lado del centrómero (al igual que en las otras bandas C que se describirán, existe polimorfismo para su tamaño). El brazo largo presenta una serie de bandas oscuras distribuidas en toda su longitud. *En el brazo corto tiene 2 bandas bien proximales bien marcadas y la mitad distal de aspecto más claro.*

El **par 2** es el submetacéntrico más grande, $lc = 38-40$, por su tamaño es fácilmente identificable.

El **par 3**, metacéntrico, es un 20% menor que el par 1; su índice centromérico es $lc = 45-46$ y sus brazos se pueden distinguir por tener: *el corto una banda doble muy marcada cerca del telómero mientras en brazo largo tiene dos bandas dobles aproximadamente en la misma posición.*

Grupo B.- Comprende los **pares 4 y 5** que son cromosomas grandes y claramente submetacéntricos. Tienen una morfología muy parecida ($lc = 24-30$); *el par 4 tiene un lc más pequeño que el par 5*. Es necesario el bandeo G, Q o R para su clasificación por pares. El bandeo G muestra en el *brazo largo del cromosoma 4 cuatro grupos de bandas dobles casi regularmente distribuidas; por su parte, el brazo largo del cromosoma 5, con idéntico tratamiento muestra también cuatro grupos de bandas muy marcadas pero irregularmente distribuidas, con los dos grupos centrales próximos entre sí y dejando zonas claras entre ellos y los grupos de bandas centromérico y telomérico* (estos dos grupos son además mucho más tenues que los dos grupos centrales).

Grupo C.- Está formado por los pares del 6 al 12, son cromosomas submetacéntricos de tamaño mediano y su lc está entre 27 y 35.

El **par 6** tiene un brazo largo con varias bandas oscuras regularmente distribuidas y un *brazo corto muy característico con una zona muy clara entre dos bandas oscuras casi en los extremos.*

El **par 7** tiene en el *brazo largo 2 bandas oscuras* y una distal más tenue; en el *brazo corto presenta una banda oscura en el extremo telomérico.*

El **par 8** tiene dos bandas oscuras en el *brazo largo, la más distal es más marcada y el aspecto general del brazo es oscuro.*

El **par 9** tiene una banda oscura en su mitad del brazo corto. Además, el par 9 con bandeo C muestra una banda de heterocromatina constitutiva en la zona proximal del brazo largo, al lado del centrómero, para la que existe polimorfismo; esta heterocromatina hace que la zona proximal del brazo sea estrecha. *El brazo largo tiene dos bandas oscuras regularmente separadas entre sí.*

El **par 10** tiene una morfología bastante conspicua, con un ensanchamiento del brazo largo justo al lado del centrómero y coincidiendo con una banda oscura. *Tres bandas oscuras en el brazo largo.*

Los **pares 11 y 12** son de morfología muy similar. Se diferencian principalmente en: *Índice centromérico mayor en par 11 que en 12; banda doble del brazo largo más distal en 11 que en 12.*

Grupo D.- Pares 13, 14 y 15, son los mayores de los acrocéntricos, todos con satélite cuyo tamaño puede ser variable, y sus lc son los más bajos del cariotipo (aproximadamente 15).

Se pueden diferenciar por el patrón de bandas G del brazo largo; el **13** tiene dos bandas muy marcadas en la mitad distal, el **14** una proximal y otra distal y el **15** dos en la mitad proximal si bien sólo suele verse bien la más distal.

Grupo E.- Pares 16, 17 y 18, son cromosomas metacéntricos o submetacéntricos relativamente cortos.

El **par 16** (lc=40) tiene una *banda de heterocromatina constitutiva en el brazo largo, al lado del centrómero cuyo tamaño puede variar.* El **17**, más submetacéntrico que el anterior (lc=31), tiene en el brazo largo una *banda doble en posición distal.* El **18**, más submetacéntrico todavía (lc=26), tiene una *banda proximal y una distal en el brazo largo.*

Grupo F.- Pares 19 y 20 son los más pequeños de los metacéntricos, con lc entre 36 y 46. También son llamados cruces por el aspecto que presentan en metafases avanzadas.

El **par 19** es de aspecto general *más claro* que el 20 y presenta una *banda centromérica muy intensa.*

El **par 20** es de aspecto *más oscuro* y presenta en el brazo corto una *banda oscura.*

Grupo G.- Pares 21 y 22 son los más pequeños de los acrocéntricos, con lc entre 13 y 33. Esta variación tan amplia se debe al polimorfismo que pueden presentar para el tamaño de los satélites.

Por razones históricas se clasifican en este orden aunque el par 22 es ligeramente mayor que el 21.

El **par 21** tiene una *fuerte banda ligeramente separada del centrómero en el brazo largo.* El **par 22** tiene una *pequeña banda oscura prácticamente pegada al centrómero.*

Cromosomas sexuales.- El cromosoma X es submetacéntrico mediano, con silueta similar a la de los primeros pares del grupo C. Tiene una *banda muy marcada en la mitad del brazo corto y otra también intensa aproximadamente en la mitad de la mitad proximal del brazo largo.*

El **cromosoma Y** es usualmente, pero no siempre, ligeramente *más largo* que los cromosomas del grupo G, siendo fácil su identificación por el paralelismo que suelen presentar las cromátidas del brazo largo le da un *aspecto más estrecho que el resto de los cromosomas.* Es acrocéntrico, su lc varía entre 0 y 26 y tiene un segmento de heterocromatina constitutiva de tamaño variable en el extremo telomérico del brazo largo.

NOMENCLATURA DE LOS CROMOSOMAS

Al igual que la ordenación del cariotipo, la nomenclatura de los cromosomas humanos se estableció en una serie de conferencias de citogenética humana la última de las cuales (París 1971) se completó con un suplemento del año 1975.

La descripción detallada del cariotipo de un individuo comienza siempre indicando el número de cromosomas que posee, seguido de una coma y la especificación expresa de los cromosomas sexuales. Un *varón normal* será **46,XY**; una *mujer normal* será **46,XX**.

Si presenta alguna variación en el número de cromosomas se indicará directamente:

Síndrome de Turner: **45,X**.o **45,X0**.

Síndrome de Down (varón) con 21 libre: **47,XY,+21**

Monosomía del 21 (mujer): **45,XX,-21**.

En los mosaicos deben describirse todas las líneas celulares:

Mosaico varón-Turner: **mos 45,X/46,XY**.

Quimera varón-mujer: **chi 46,XX/46,XY**.

Símbolos y abreviaturas utilizadas en las descripciones cromosómicas:

p. - brazo corto	q. - brazo largo
s. - satélite	h. - heterocromatina constitutiva
cen. - centrómero (p10 ó q10)	ace. - acéntrico
dic. - dicéntrico	tric. - tricéntrico
mos. - mosaico	chi. - quimera
i. - isocromosoma	r. - cromosoma en anillo
pter. - telómero brazo corto	qter. - telómero brazo largo
: .- rotura	:: .- rotura y reunión
→ .- desde → hasta	del. - deleción
dup. - duplicación	dir dup. - duplicación directa
inv. - inversión	t. - translocación
rec. - cromosoma recombinante	rob. - trans. robertsoniana
ins. - inserción	inv ins. - inserción inversa
der. - cromosoma derivado	
+ - aumento en el número o en el tamaño de los cromosomas	
- - disminución en el número o en el tamaño de los cromosomas	
/ .- separación entre líneas celulares de mosaicos o quimeras	

Los cromosomas , se encuentran divididos por el centrómero en brazo corto y largo (p y q). Cada brazo para su estudio se divide en regiones (primer número después de p o q) y éstas en bandas (las de referencia son las G que tanto claras como oscuras son el segundo número después del indicativo del brazo). Así Las regiones se numeran por brazos desde centrómero a telómero y dentro cada una las bandas también se numeran desde las más centrales a las más terminales; la banda **8p21** será la banda primera de la región segunda del brazo corto del cromosoma 8.

Las bandas de cromosomas en profase temprana (que subdividen las bandas de profase tardía) obligan a añadir un nuevo número que, con la misma ordenación de los anteriores y separados de éstos por un punto, indicará la banda de profase temprana dentro de la zona-banda de profase tardía.

Para la descripción de los cromosomas pueden seguirse dos sistemas, el simplificado o el detallado. En el primero los cromosomas alterados se definen solamente por los puntos de rotura; en el detallado se describen los cromosomas afectados de manera completa.

En los siguientes ejemplos se describen algunas variaciones cromosómicas estructurales utilizando primero el sistema simplificado y después el detallado.

con **isocromosoma del brazo largo del cromosoma 13**

46,XY,i(13q)

46,XY,i(13)(13qter→cen→13qter)

46,XY,i(13)(qter→q10::q10→qter)

Si fuese dicéntrico isodicéntrico: 46,XY,dic(13)(qter→p11::p11→qter)

con **cromosoma 2 en anillo y rotura y reunión en los puntos p21 y q31**

46,XX,r(2)(p21q31)

46,XX,r(2)::p21→q31::)

con **deleción del brazo corto del cromosoma 5**

46,XY,del(5)(p11)

46,XY,del(5):(p11→qter)

con **delección del segmento p12 a p14 del cromosoma 10**

46,XX,del(10)(p12p14)

46,XX,del(10)(pter → p12::p14 → qter)

con **duplicación directa del segmento q12 a q14 del cromosoma 11 en el punto q12**

46,XY,dir dup(11)(q12q14)

46,XY,dir dup(11)(pterg q12::q12g q14::q12g qter)

o bien 46,XY,dir dup(11)(pter → q14::q12 → qter)

con **duplicación inversa del segmento q12 a q14 del crom. 11 en el punto q14**

46,XX,inv dup(11)(q12q14)

46,XX,inv dup(11)(pter → q14::q14 → q12::q14 → qter)

con **inversión del segmento p12 a q23 del cromosoma 2**

46,XY, inv(2)(p12q23)

46,XY, inv(2)(pter → p12::q23 → p12::q23 → qter)

con **inversión del segmento q22 a q36 del cromosoma 2**

46,XX, inv(2)(q22q36)

46,XY, inv(2)(pter → q22::q36 → q22::q36 → qter)

con **translocación recíproca de los segmentos q21 a telómero del cromosoma 5 y q22 a telómero del cromosoma 12**

46,XY,t(5;12)(q21;q22)

46,XY,t(5;12)(5pter → 5q21::12q22 → 12qter;12pter → 12q22::5q21 → 5qter)

con **translocación robertsoniana entre los puntos p11 del crom. 13 y q11 del 21**

45,XX,rob(13;21)(p11;q11)

45,XX,rob(13;21)(13qter → 13p11::21q11 → 21qter)

puede sustituirse rob por t.

En la discusión sobre el origen de este tipo de cromosomas con 2 brazos largos, la tendencia actual es a describirlos como cromosomas derivados (der) con puntos de rotura q10 en los originales).

45,XX,der(13;21)(q10;q10)

45,XX,der(13;21)(13qter → 13q10::21q10 → 21qter)

con **inserción directa en el cromosoma 7 del segmento q21 a q22 en el punto p21**

46,XX,ins(7)(p21q21q22)

46,XX,ins(7)(pter → p21::q22 → q21::p21 → q21::q22 → qter)

con **inserción del segmento q22 a q12 del cromosoma 18 en la banda q21 del 7**

46,XY,inv ins(7;18)(q21;q22q12)

46,XY,inv ins(7;18)(7pter → 7q21::18q22 → 18q12::7q21 → 7qter;18pter → 18q12::18q22 → 18qter)

se puede sustituir inv ins por ins

CROMOSOMA DERIVADO: (der) es un cromosoma descompensado formado a partir de dos o más cromosomas o que tiene múltiples anomalías cromosómicas pero que, en todo caso, tiene un centrómero intacto.

CULTIVO DE LEUCOCITOS; PREPARACION DE CELULAS EN MITOSIS**Medio de cultivo:**

-Suero fetal de ternera	15 ml
-Medio RPMI 1640	100 ml
-L-glutamina 200mM	0.5 ml
-Penicilina-estreptomicina	2 ml
-Phytohemaglutinina	0.7 ml
-Hepes buffer	1.5 ml
-TOTAL	119.7 ml

(Si la sangre no se recoge en tubo heparinizado añadir a este total 0.5 ml de heparina sódica)

Bien mezclado se puede guardar en nevera hasta un máximo de 14 días.

Para su utilización se distribuye en tubos a razón de 8 ml. por tubo. (El total se distribuye en 15 tubos).

Extracción de sangre:

Si se trata de extracción por pinchazo en la yema del dedo, el medio de cultivo debe estar heparinizado y por cada 8 ml. deben añadirse no menos de 6 gotas de sangre.

Si se dispone de personal especializado se puede tomar la muestra en vena con recipiente Vacutainer PST gel and lithium heparin hasta 2.5 ml de sangre. En este caso luego se sembrarán 0.5 ml de sangre en 8 ml de medio de cultivo que no tiene que estar heparinizado.

Incubación:

La mezcla de medio y sangre se mantiene a 37° C durante 72 horas, removiendo cada 12 aproximadamente.

Una hora y media antes de hacer las preparaciones se añaden 100 microlitros (4 rayas de jeringa de insulina) de colchicina al 1% en cada tubo.

Obtención de un botón celular:

-Sacar los tubos de la estufa de cultivo y centrifugar a 1500 rpm durante 5-6 min. (*Así se separan las células del medio de cultivo*).

-Decantar con pipeta pasteur dejando aproximadamente 1 c.c. (*Así se elimina la mayoría del medio de cultivo*).

-Añadir 5 c.c. de KCl 75 mM. previamente calentado a 37°C. (*Se trata de la solución hipotónica*).

-Resuspender suavemente con pipeta pasteur.

-Mantener en estufa durante 8 min. (*Se produce la rotura de las membranas plasmáticas por choque hipotónico*).

-Centrifugar a 1200-1500 rpm. durante 8 min. (*Se separan los núcleos de células en interfase y en profase del resto*).

-Decantar con pipeta pasteur dejando menos de 0.5 c.c.

-Añadir gota a gota, a la vez que se resuspende con ayuda de un agitador de tubos, 6 c.c. de solución CARNOY (metanol: acético 3:1) fría y recién preparada. Se puede añadir más rápidamente cuando el resuspendido vira al color marrón. (*De esta forma se fijan los núcleos anteriormente separados del resto*).

-Centrifugar a 1200-1500 rpm. durante 8 min. (*Se obtiene un botón celular con bastantes restos celulares*).

-Decantar con pipeta dejando 0.5 c.c.

-Añadir con agitación (o resuspender posteriormente) hasta 4 c.c. de CARNOY. (*Así se resuspenden los núcleos para obtener una mejor fijación y lavado con eliminación de restos celulares*).

-Resuspender con pipeta.

-Centrifugar a 1200-1500 rpm durante 8 minutos.

-Decantar de golpe sin sacudir.

-Añadir hasta 2 c.c. de CARNOY.

-Resuspender con pipeta.

-Centrifugar a 1200-1500 rpm. durante 5min. (*Se obtiene un botón celular suficientemente purificado y se puede conservar en nevera a 4°C tapado con parafilm durante varios días*).

Extensión en preparaciones:

-En primer lugar deben limpiarse escrupulosamente los portaobjetos frotando con alcohol etílico al 70%.

-A continuación (si se había dejado en la nevera durante un tiempo, se centrifuga de nuevo como en anteriores ocasiones) se decanta con pipeta el botón celular dejando la menor cantidad de fijador posible. Luego se resuspende el botón celular en 0.5 c.c. de CARNOY recién preparado.

-Saturar de vaho mediante el aliento la superficie del portaobjetos y, antes de la evaporación bombear dos o tres gotas del resuspendido celular.

-Dejar secar al aire y marcar con lápiz de diamante.

-*Las preparaciones pueden observarse mediante contraste de fases.*

-*La tinción para bandejo C debe hacerse no muchas horas después de hacer las preparaciones.*

-*La tinción para bandejo G debe hacerse después de dejar "envejecer" las preparaciones al menos 15 días.*

PROTOCOLOS DE TINCIONES DIFERENCIALES

Bandas G con tripsina

Las preparaciones deben llevarse hechas varios días (*más de 15 días a temperatura ambiente*).

La tinción se realiza a temperatura ambiente (20°C aprox.).

- a) Sumergir las preparaciones en una solución de tripsina al 0.1% en PBS durante unos segundos (*el tiempo depende del grado de envejecimiento de la preparación*).
- b) Lavar en PBS dos veces.
- c) Sumergir las preparaciones en solución GIEMSA al 3% en tampón fosfato a pH 6.7 durante 5 - 10 min. controlando la tinción al microscopio (*para que la preparación no se pegue a la platina debe secarse cuidadosamente la cara inferior, !OJO; no secar la cara donde está el material*). (*Si se utiliza el objetivo 40X, limpiarlo con papel suave inmediatamente después de cada uso; con este objetivo no se consiguen imágenes nítidas si se seca el área de observación*).
- d) Lavar con agua abundante y secar.
- e) Montar las preparaciones con ENTELLAN o similar.

Bandas C con (OH)2Ba

Como cuestiones previas, la solución de (OH)2Ba debe prepararse con varias horas de antelación y dejarla reposar; la temperatura de 60°C se consigue mediante baño termostático (baño maría).

Las preparaciones deben ser lo más recientes posible.

- a) Sumergir las preparaciones en HCl 0.2 N previamente calentado a 60°C durante 2 min.
- b) Lavar enérgicamente en agua destilada (o del grifo si es buena).
- c) Sumergir las preparaciones en una solución saturada de (OH)2Ba durante 3-5 min. a temperatura ambiente.
- d) Lavar enérgicamente en agua.
- e) Sumergir las preparaciones en 2xSSC a 60°C durante una hora.
- f) Lavar con agua.
- g) Sumergir las preparaciones en una solución de GIEMSA al 3% en tampón fosfato a pH 6.7.
- h) Controlar la tinción al microscopio.
- i) Lavar con agua abundante y secar.
- j) Montar las preparaciones con ENTELLAN o similar

SOLUCIONES

20xSSC.- NaCl=175.5g; citrato sódico=88.2g; agua destilada hasta un litro.

PBS.- NaCl=16g.; KCl=0.4g.; KH₂PO₄=0.4g.; Na₂HPO₄=2.3g.; Agua destilada 1600c.c.

Tampón de fosfatos.-

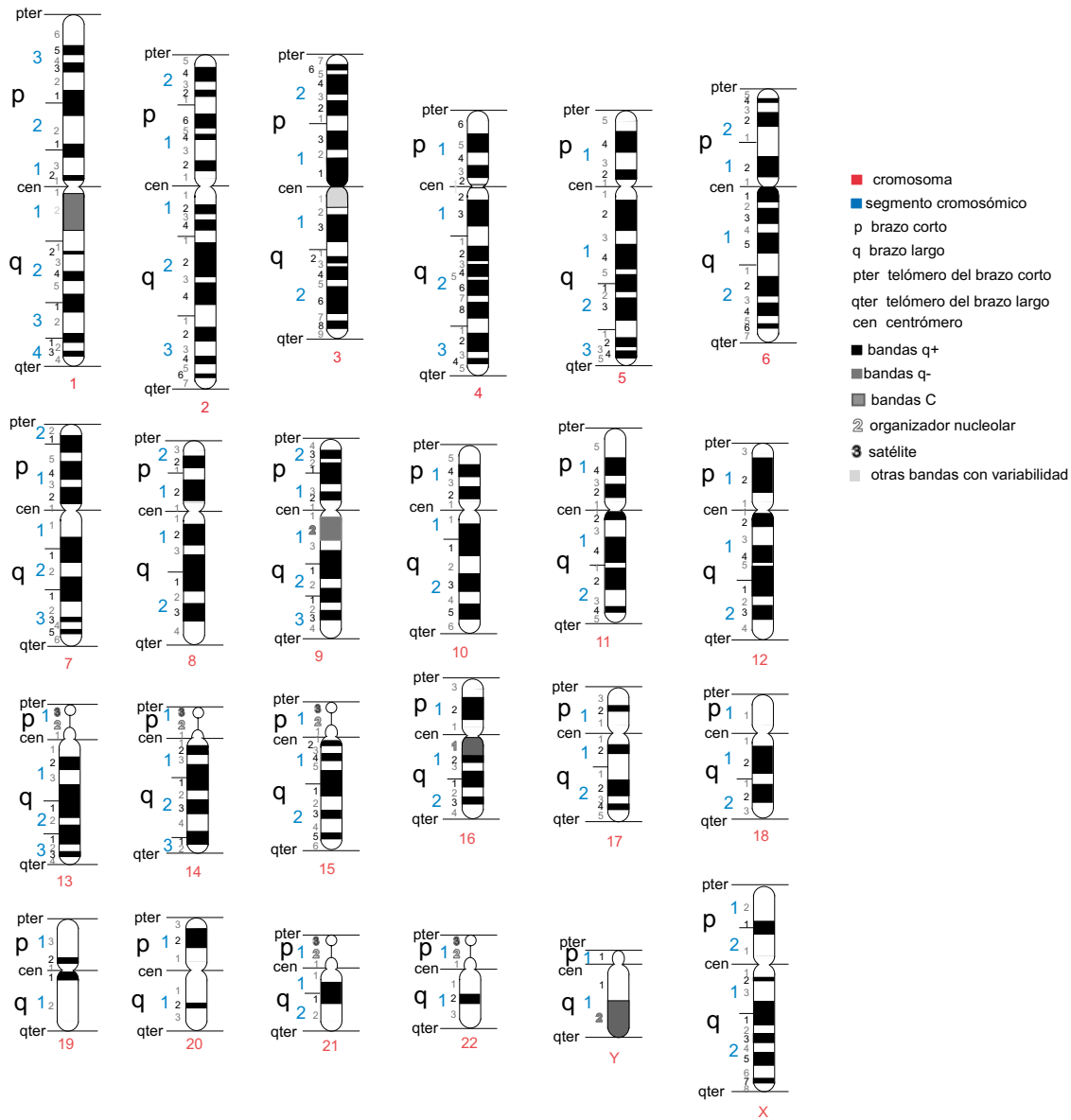
Solución PHOS 1.-9.46g. de Na₂HPO₄ en 1 litro de agua destilada.

Solución PHOS 2.-9.07g. de KH₂PO₄ en 1 litro de agua destilada.

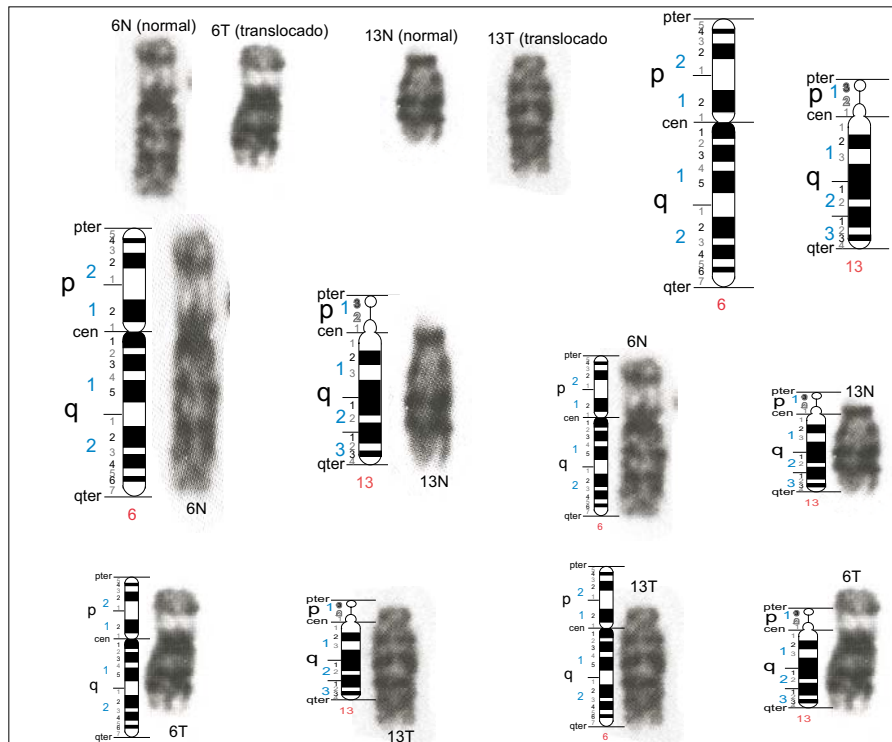
100c.c. de tampón con pH 6.7 = 43c.c. de PHOS 1 + 57c.c. de PHOS 2

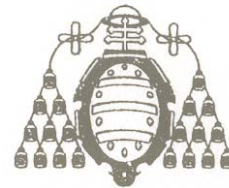
Ejemplo de fotografía de prometafase (metafase) con fórmula cromosómica: 46,XY.
Los números de los cromosomas están colocados a la altura del centrómero y paralelo al eje del cromosoma.
Los números de los cromosomas de cada grupo se representan con el mismo color.
Las flechas indican las bandas más características de cada par de cromosomas.





TRANSLOCACIÓN 6;13
(CARIOTIPO N° 2)





1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

Fórmula cromosómica:

19

20

21

22

X

Y