

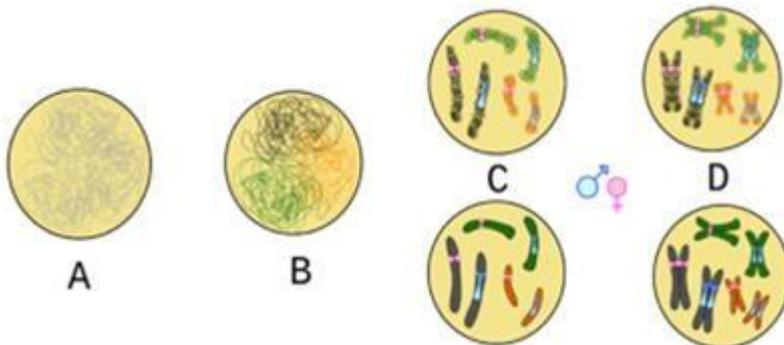
CITOGENETICA – BASI TEORICHE

Cos'è lo studio citogenetico?

L'**analisi citogenetica** (o mappa cromosomica o cariotipo) è lo studio dei cromosomi delle cellule. I cromosomi contengono i geni che sono costituiti da DNA, la molecola che contiene tutte le informazioni necessarie per la "costruzione" dell'individuo e il funzionamento dell'organismo.

Normalmente al microscopio il DNA non si vede poiché è tutto srotolato sotto forma di cromatina, ma essendo un filamento molto lungo sarebbe molto complicato per la cellula gestirlo se fosse un unico filamento. È perciò suddiviso in pezzi e associato a proteine formando i cosiddetti cromosomi.

Cromatina e cromosomi



L'insieme completo di tutti i cromosomi metafasici di una cellula è definito cariotipo: solo nel 1956 fu accertata la stabilità del cariotipo, ossia del numero e della struttura dei cromosomi.

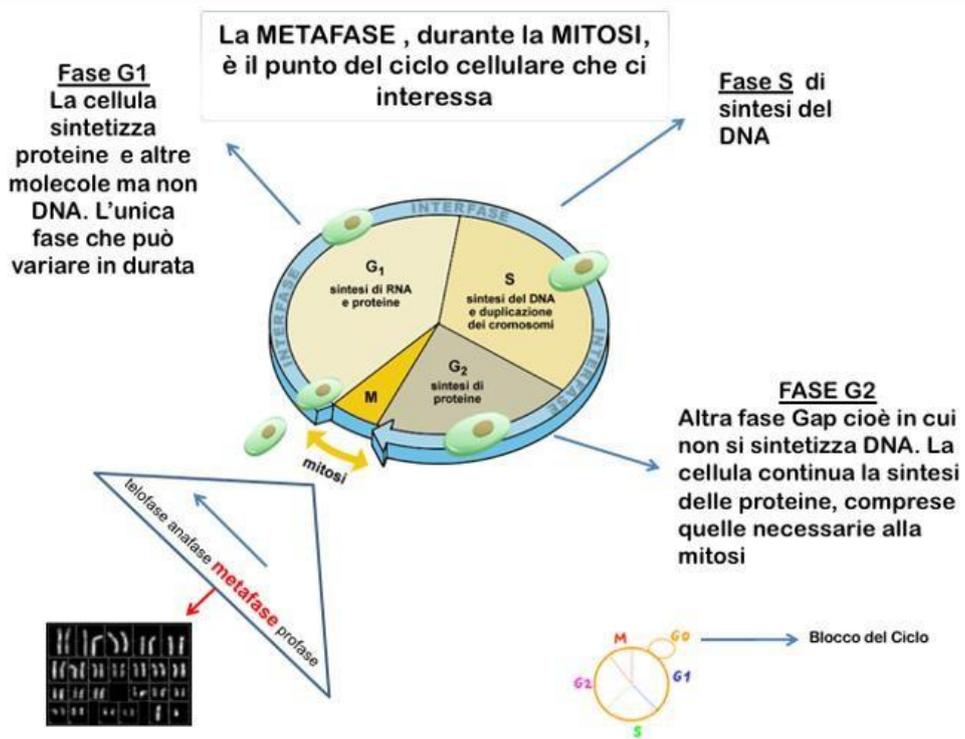
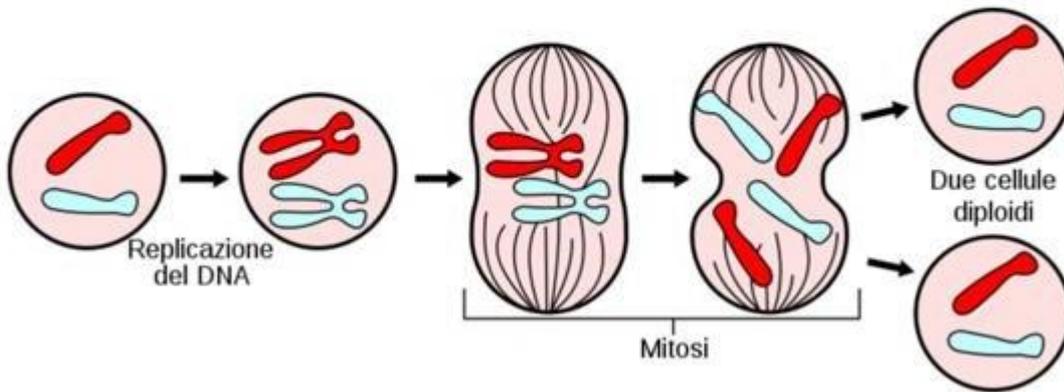
Il cariotipo è infatti specie-specifico e quello umano normale diploide è costituito da 46 cromosomi (23 coppie): 23 cromosomi provengono dal padre con lo spermatozoo e 23 dalla madre con la cellula uovo. Spermatozoi e cellule uovo sono cellule germinali e sono le uniche a contenere solo 23 cromosomi. Se lo spermatozoo porta il cromosoma X nascerà una femmina, se porta il cromosoma Y nascerà un maschio.

Il cariotipo di una femmina normale sarà quindi 46,XX mentre quello di un maschio 46,XY.

Per studiare i cromosomi è necessario utilizzare tecniche di coltura in quanto solo durante la divisione cellulare è possibile visualizzarli ed in particolare durante la metafase che è la fase del ciclo in cui i cromosomi sono maggiormente condensati.

Mitosi

La mitosi (detta anche cariocinesi) è un processo di riproduzione asessuata delle cellule eucariote grazie al quale da una singola cellula si formano 2 cellule figlie geneticamente identiche alla progenitrice e fra loro.



A cosa serve la citogenetica?

Lo studio citogenetico serve a **determinare il numero e la struttura dei cromosomi**.

Permette quindi di verificare che non ci siano alterazioni del numero e/o della struttura dei cromosomi che possono essere responsabili di malattie caratterizzate da ritardo mentale (es: Sindrome di Down), infertilità/sterilità (es: Sindromi di Turner e Klinefelter), ritardo psicomotorio e del linguaggio, della crescita e dello sviluppo.

Le cellule germinali vengono prodotte a partire da cellule con 46 cromosomi attraverso una divisione cellulare molto complicata (**meiosi**) durante la quale possono avvenire errori di distribuzione dei cromosomi nelle cellule germinali (non disgiunzione).

L'**età materna** è uno dei principali fattori che aumenta la probabilità della non disgiunzione e l'unico fattore dimostrato realmente importante nella Sindrome di Down o trisomia 21 (caratterizzata dalla presenza di tre cromosomi 21 e quindi 47 cromosomi totali). Il rischio di avere un figlio affetto da Sindrome di Down per una donna di 25 anni è 0.8% mentre per una donna di 35 è 2.7%, a 40 anni il rischio raggiunge il 9.2%.

La frequenza di anomalie cromosomiche tra neonati è di circa 0.5%; queste anomalie rendono conto di circa 100 condizioni cliniche differenti tra cui le più conosciute sono: Sindrome di Down (trisomia 21), Sindrome di Edwards (trisomia 18), Sindrome di Patau (trisomia 13), Sindrome di Klinefelter (un cromosoma X in eccesso in un soggetto di sesso maschile), Sindrome di Turner (mancanza di un cromosoma X in un soggetto di sesso femminile).

Anche l'abortività precoce ripetuta può essere conseguenza di un errore cromosomico in uno dei genitori (3-5% dei casi).

Quando è opportuno eseguire lo studio citogenetico?

Lo studio citogenetico può essere eseguito in epoca **prenatale** (in corso di gravidanza) e **postnatale** (su campioni ottenuti da soggetti nati vivi e per convenzione anche sui nati morti, su cellule del sangue o frammento di tessuto) che include la **Citogenetica dei tumori** e la **Citogenetica su materiale abortivo**

Citogenetica prenatale

L'analisi cromosomica prenatale può essere eseguita su villi coriali, liquido amniotico e sangue fetale durante tutto l'arco della gravidanza. La scelta del tessuto da indagare è condizionata dal periodo di gravidanza, dall'indicazione clinica e dallo specifico rischio riproduttivo. È indicata nelle gravidanze che presentano un aumento del rischio di anomalie cromosomiche nel feto rispetto alla popolazione generale. In particolare:

- età materna ≥ 35 anni (compiuti prima della nascita del figlio)
- precedenti gravidanze con anomalia cromosomica
- genitore portatore di un'anomalia cromosomica strutturale bilanciata
- genitore con mosaicismo cromosomico
- genitore portatore di un marcatore cromosomico sopranumerario
- genitori con errori di numero dei cromosomi del sesso (es: 47,XXX; 47,XXY)
- anomalie fetali e/o segni predittivi evidenziati ecograficamente
- screening prenatale (biochimico con o senza translucenza nucale) a rischio aumentato per patologia cromosomica nel feto
- test del DNA fetale (NIPT) con risultato ad alto rischio, risultato inconclusivo o sesso discordante con l'ecografia
- rischio di malattie mendeliane da instabilità cromosomica
- anomalia a mosaico riscontrata in diagnosi prenatale su altro tessuto (es.: villi coriali)
- aborti spontanei ripetuti

Per i casi di NIPT ad alto rischio, in linea generale, il tessuto di elezione per le conferme è il liquido amniotico, salvo alcune situazioni specifiche

Le tecniche di prelievo possono essere:

-villocentesi durante il primo trimestre di gravidanza (9a-12a settimana di gestazione) mediante prelievo transaddominale: vengono prelevate cellule della placenta (villi coriali) che hanno la stessa origine, e quindi lo stesso patrimonio genetico, di quelle fetali.

-amniocentesi durante il secondo trimestre (15a-18a settimana di gestazione): si studiano cellule fetali che si trovano nel liquido amniotico (amniociti)

Tra le tecniche di prelievo di materiale fetale è di gran lunga la più praticata. Si esegue di norma tra la 15a e la 18a settimana di gestazione. Consiste nel prelievo ecoguidato di circa 15-20 ml di liquido amniotico che si riformerà dopo alcune ore. Immediatamente prima dell'amniocentesi, deve essere eseguita un'ecografia in tempo reale per valutare l'attività cardiaca fetale, l'epoca gestazionale, la posizione della placenta, la localizzazione del liquido amniotico e il numero dei feti.

La tecnica è molto affidabile con rischio di abortività, in seguito alla pratica, dello 0,1%.

Citogenetica post-natale

Lo studio del cariotipo si esegue nei seguenti casi:

- soggetti con sospetta sindrome cromosomica (es. neonato con tratti corrispondenti alla Sindrome di Down quali: caratteristico aspetto del viso, anomalie cardiache, piega palmare trasversale ecc.)
- genitori e familiari di soggetti con anomalie cromosomiche
- genitori di soggetti malformati o con sospetta sindrome cromosomica deceduti senza diagnosi
- ritardo mentale e/o difetti congeniti
- ritardo dell'accrescimento
- neonati nati morti
- coppie con aborti spontanei ripetuti
- infertilità maschile
- femmine con amenorrea primaria o secondaria (assenza o interruzione del ciclo mestruale)
- sindromi mendeliane (sindromi da geni contigui o sindromi da instabilità cromosomica).

Citogenetica su materiale abortivo

Circa il 15-20% di tutte le gravidanze riconosciute esita in un aborto spontaneo

Si definisce una condizione di aborto spontaneo ricorrente o abituale quando una donna va incontro a 2 o più aborti consecutivi.

In questi casi di abortività ripetuta non si deve più considerare l'aborto come un evento casuale (come si può considerare il singolo episodio abortivo nella vita riproduttiva di una coppia che ottiene anche gravidanze che vanno a buon fine).

Tra le gravidanze che esitano in un aborto spontaneo, si stima che più del 50% abbia un alterato numero e/o struttura dei cromosomi e che questa sia la causa, appunto, dell'interruzione della gravidanza. Lo studio citogenetico dei tessuti abortivi è quindi di fondamentale importanza per comprendere la causa dell'interruzione della gravidanza, e risulta di fondamentale supporto alla coppia (nella maggior parte dei casi l'anomalia cromosomica è de novo, cioè puramente casuale e non comporta un rischio aumentato che l'evento si ripeta in gravidanze future della coppia).

Prima di effettuare l'analisi citogenetica si consiglia la consulenza genetica, durante la quale il genetista spiega l'utilità, ma anche i limiti del test.

E' inoltre fondamentale eseguire una consulenza genetica con l'esito del test citogenetico su materiale fetale per valutare l'impatto del risultato nella storia riproduttiva di coppia.

I soggetti portatori di traslocazioni bilanciate hanno il rischio di sbilanciamento nella prole. Tale sbilanciamento può essere responsabile di abortività spontanea o di patologie fetali. Vi è pertanto indicazione all'esecuzione di diagnosi prenatale invasiva con la valutazione del cariotipo fetale in presenza di genitori con tale anomalia cromosomica.

In presenza di un assetto cromosomico normale su materiale fetale si dovrà indirizzare la coppia all'esecuzione di un percorso di indagini per valutare le cause non fetali di abortività spontanea.

Citogenetica dei tumori

Le anomalie cromosomiche possono insorgere anche dopo la nascita, in cellule inizialmente normali (**anomalie cromosomiche acquisite**) e restare confinate ad un particolare tipo di tessuto, come, ad esempio, il **tessuto tumorale**.

Lo studio citogenetico su colture cellulari di tumori solidi ha lo scopo di identificare anomalie cromosomiche specifiche dei vari tipi istologici di tumore ed è utile per la diagnosi, prognosi e scelta della terapia più adeguata.

L'analisi citogenetica quindi può essere eseguita anche per studiare i tumori, sia ematologici (es. leucemie) che solidi (carcinoma mammario, carcinoma ovarico, carcinoma uterino, carcinoma della vescica, carcinoma prostatico ecc.). Certi riarrangiamenti cromosomici sono "tumore specifici" e permettono quindi una diagnosi corretta a fronte di un sospetto o dubbio clinico. Per esempio il riscontro del cromosoma Philadelphia in un aspirato midollare di un paziente con sospetta leucemia, permette di diagnosticare una leucemia mieloide cronica; oppure la presenza della traslocazione $t(X;18)$ in una coltura cellulare allestita da biopsia di tumore solido, permette di diagnosticare un Sarcoma Sinoviale.

La migliore **prevenzione** in genetica è l'**informazione**. La figura del **Genetista** nell'ambito della consulenza genetica è indispensabile nello spiegare ed interpretare un problema cromosomico al paziente e/o ai familiari.

Classificazione dei cromosomi

Nella specie umana i cromosomi sono 46: 22 coppie di autosomi (dall'1 al 22) e un coppia di cromosomi sessuali (XX o XY).

I cromosomi sono stati divisi in 7 gruppi in ordine decrescente di lunghezza e in base alla posizione del centromero. Ci sono cromosomi metacentrici in cui il centromero divide il cromosoma in 2 bracci uguali (per es. i crom 1,3,19,20), i submetacentrici in cui il centromero divide il cromosoma in un braccio più corto e uno più lungo (per es. i crom 4,5,6,7..) e acrocentrici in cui il centromero è all'estremità del cromosoma (per es. i crom 13,14,15,21,22)

Gruppo A (coppie 1, 2 e 3)

Gruppo B (coppie 4 e 5)

Gruppo C (coppie da 6 a 12 e cromosoma X)

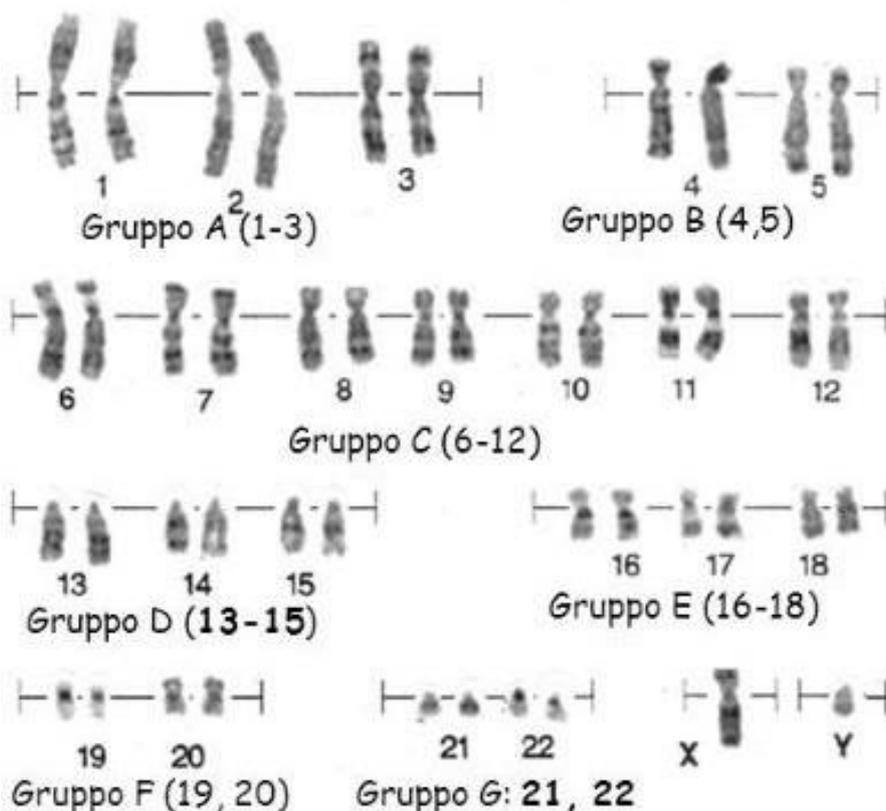
Gruppo D (coppie 13, 14 e 15)

Gruppo E (coppie 16, 17 e 18)

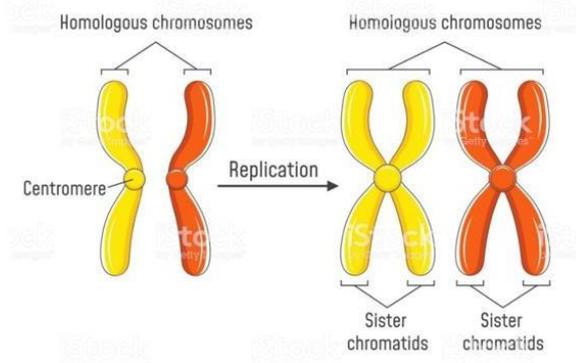
Gruppo F (coppie 19 e 20)

Gruppo G (coppie 21 e 22)

Cromosoma Y



CROMATIDI FRATELLI



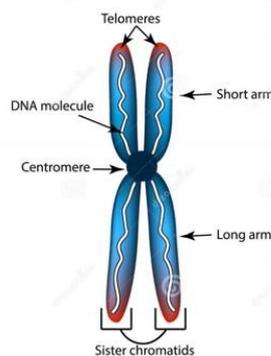
CENTROMERO

- è il punto di collegamento tra i due cromatidi fratelli
- si associa al cinetocoro, formazione alla quale si attaccano le fibre del fuso durante la divisione
- divide il cromosoma in 2 bracci (p e q)

Funzione:

assicurare la corretta migrazione dei cromosomi e dei cromatidi alla meiosi e alla mitosi.

Chromosome X

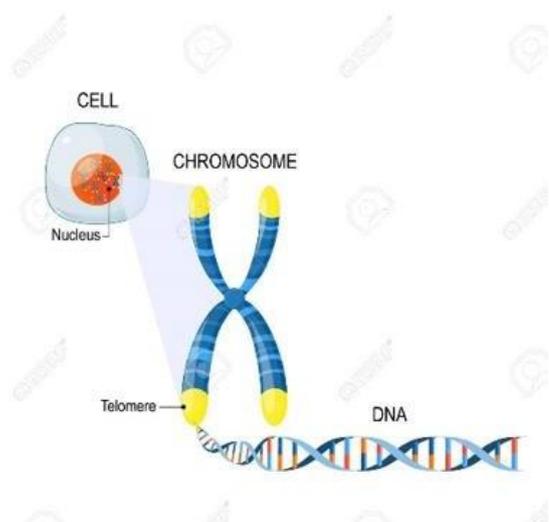


TELOMERI

Alle estremità dei cromatidi si trovano delle speciali regioni dette telomeri, costituite da una sequenza di nucleotidi ripetuta migliaia di volte.

Nell'uomo la sequenza è 5'GGGTTA3'.

- funzione di protezione delle estremità dei cromosomi
- Si accorciano costantemente a ogni duplicazione.
- Determinano la durata della vita di ciascuna cellula, portando all'apoptosi, o morte cellulare programmata



Bandeggio cromosomico

Un'identificazione inequivocabile di ogni cromosoma del cariotipo umano è stata possibile grazie a tecniche di trattamento e colorazione dei cromosomi denominate bandeggi. Intorno al 1970, infatti, sono state introdotte metodiche di colorazione dei cromosomi che utilizzano sostanze in grado di colorare specifiche regioni (bande) in modo più evidente di altre. Il bandeggio che ne deriva è specifico e costante per ogni coppia di cromosomi omologhi e permette di ricostruire il cariotipo, evidenziando anche eventuali anomalie cromosomiche sia di numero sia di struttura.

Ogni regione cromosomica viene identificata utilizzando un numero o una lettera corrispondente al cromosoma stesso (per es., 5, X o Y) seguito dal simbolo del braccio corto (p) o di quello lungo (q).

Le bande citogenetiche sono poi numerate dal centromero al telomero.

Il cromosoma 22q11.2, per es., identifica il braccio lungo del cromosoma 22, banda 1, sottobanda 1, sotto-sottobanda 2.

Esistono differenti metodiche di bandeggio cromosomico e il tipo ottenuto dipende dal trattamento chimico usato.

Le più utilizzate sono:

- **Bandeggio G** (da Giemsa): i cromosomi vengono pretrattati, generalmente con tripsina, e poi colorati con il colorante Giemsa (soluzione in metanolo di azzurro A e B, blu di metilene e eosina)

La colorazione con Giemsa si basa sulla differenziazione dei costituenti cellulari che hanno reazione basica, i quali legano l'**eosina** (colorante acido) colorandosi in rosso-arancio. Gli altri componenti cellulari aventi reazione acida si colorano in blu, con i prodotti di ossidazione del **blu di metilene** azzurri (colorante basico).

In tutti i cromosomi si produce un'alternanza specifica di bande scure e bande chiare.

L'osservazione del vetrino viene fatta al microscopio ottico con visione alla luce normale.

- **Bandeggio Q** (da quinacrina): dopo colorazione con mostarda di quinacrina (colorante fluorescente che si intercala tra le basi azotate del DNA), i cromosomi osservati al microscopio ottico a fluorescenza presentano una successione caratteristica di bande fluorescenti luminose e di bande non fluorescenti (osservazione con microscopio a fluorescenza, bandeggio più rapido).

Le bande prodotte dalla quinacrina sono costanti e riproducibili per ogni cromosoma

Il fenomeno del bandeggiamento è in relazione alla composizione in basi del DNA e alla struttura della regione cromosomica che comprende il grado di condensazione e il tipo di proteine associate.

Il bandeggio riflette l'ultrastruttura del cromosoma, quindi la differente distribuzione di regioni ricche in AT (adenina-timina) e in GC (guanina, citosina).

Nel bandeggio GTG troviamo le bande scure, mentre nel QFQ le chiare, nelle zone che presentano un sito ricco in basi azotate AT, che presentano pochi geni, che si condensano precocemente ma si replicano tardivamente.

Al contrario le bande chiare nel GTG e le scure QFQ sono regioni ricche in nucleotidi GC, ricche in geni, che si condensano tardi ma replicano precocemente.

La banda citogenetica ha una dimensione media di circa 5 Mb (5 milioni di basi) e può contenere centinaia di geni.

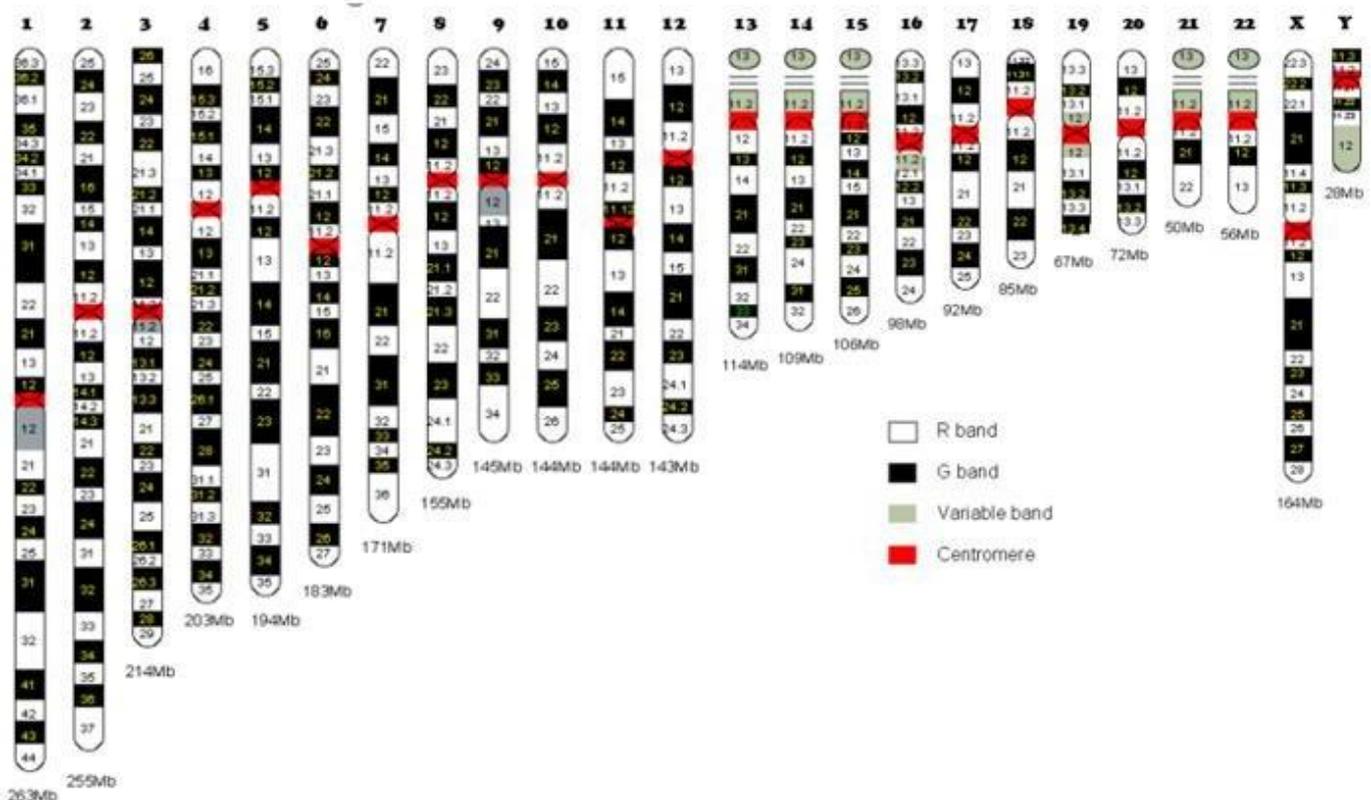
In un cariotipo bandeggiato oltre al riconoscimento dell'identità dei singoli cromosomi è possibile rilevare riarrangiamenti cromosomici come traslocazioni, inversioni e delezioni che risultano più grandi della lunghezza tipica della singola banda.

Sono presenti e utilizzate anche altre tecniche di bandeggio alternative:

- **Bandeggio R** (da reverse): i cromosomi denaturati con il calore e poi colorati con Giemsa presentano anche in questo caso un'alternanza di bande scure e bande chiare, ma esattamente inversa rispetto alle bande G (lo scuro al posto del chiaro e viceversa).
- **Bandeggio C** (da eterocromatina costitutiva): dopo un pre-trattamento con alcali e con una soluzione salina ad alta temperatura, la colorazione con Giemsa evidenzia in modo specifico le regioni centromeriche e tutte le regioni costituite da eterocromatina costitutiva.
- **Da-Dapi**: colorazione di una parte del cromosoma 1, 16, 9, Y, 15 (per definire meglio alcune alterazioni).

Lo studio del cariotipo tramite bandeggio permette, oltre al riconoscimento dell'identità dei singoli cromosomi, di rilevare riarrangiamenti cromosomici come traslocazioni, inversioni e delezioni che risultano più grandi della lunghezza tipica della singola banda.

Bandeggio dei cromosomi umani



Le anomalie cromosomiche

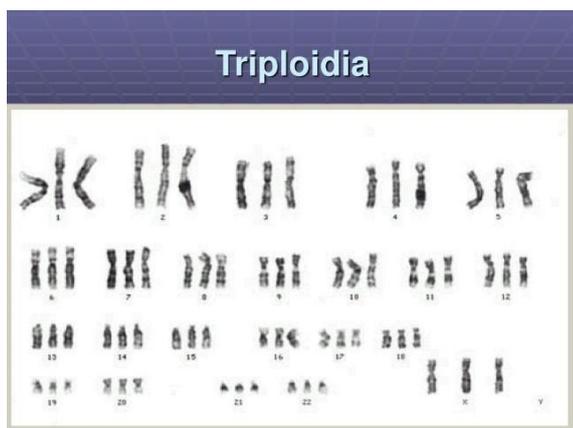
Le patologie cromosomiche sono causate da una ampia gamma di alterazioni a carico dei cromosomi.

E' possibile suddividere le anomalie in **numeriche** (euploidie, aneuploidie) e **strutturali** (delezioni, duplicazioni, inversioni, traslocazioni).

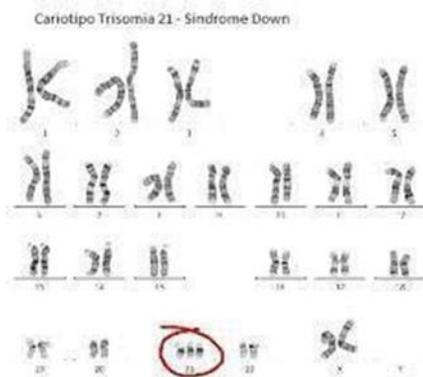
ANOMALIE NUMERICHE

L'**euploidia** è una condizione in cui il numero dei cromosomi di una cellula è quello aploide (n) o un multiplo intero di questo ($2n$, $3n$, $4n$, ecc.). L'essere umano ha un assetto cromosomico $2n$ quindi diploide, ad eccezione dei gameti che sono pari a n cioè aploidi. Gli assetti superiori a $2n$ sono detti poliploidi (triploidi $3n$, tetraploidi $4n$, ecc.)

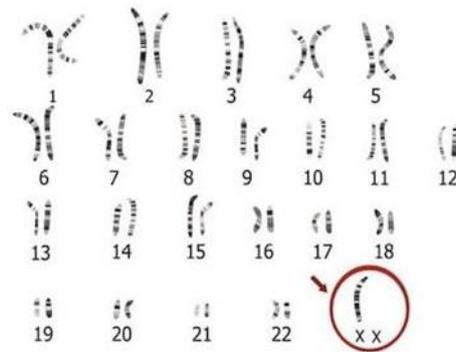
Nell'uomo la presenza di una triploidia è di fatto incompatibile con la vita, in quanto determina nel 99% dei casi un aborto spontaneo, e nell'1% dei casi la morte precoce dei neonati entro il primo mese di vita (l'incidenza della triploidia nei nati vivi è di 1:10.000 diagnosi).



Le **aneuploidie** sono anomalie cromosomiche caratterizzate da alterazioni del numero dei cromosomi, cioè da un numero maggiore o minore di cromosomi rispetto al numero standard: i casi più comuni sono rappresentati dalle trisomie, con presenza di un cromosoma soprannumerario, vale a dire un corredo cromosomico $2n + 1$ (es. trisomie del cromosoma 13, 18, 21), e dalle monosomie, mancanti di un cromosoma, vale a dire un assetto cromosomico $2n - 1$ (es. sindrome di Turner: $45, X$).



Sindrome di Down (47,XX,+21)



Sindrome di Turner (45,X)

Le monosomie complete sono incompatibili con la vita postnatale e si riscontrano pertanto esclusivamente nell'esame citogenetico del materiale fetale.

L'eccezione è rappresentata dalla monosomia del cromosoma X, che in una parte dei casi può proseguire sino alla nascita associandosi alla sindrome di Turner (45,X).

Le trisomie complete di alcuni cromosomi, come la trisomia 21 o sindrome di Down, la trisomia 18 o sindrome di Edwards e la trisomia 13 o sindrome di Patau sono invece compatibili con la vita postnatale, così come le aneuploidie dei cromosomi sessuali.

L'aneuploidia è causata, nella maggior parte dei casi, da errori di non-disgiunzione alla meiosi che causano la formazione di due cellule (gameti) che contengono rispettivamente un cromosoma in più oppure uno in meno. La causa della non-disgiunzione non è nota ma si verifica con maggior frequenza nella meiosi femminile ed aumenta, in termini di probabilità, con l'aumentare dell'età.

La non disgiunzione si può verificare anche durante la divisione mitotica: in tal caso ci troveremo dinnanzi ad un cariotipo a mosaico per la presenza nello stesso soggetto di cellule a corredo cromosomico diverso.

ANOMALIE STRUTTURALI

I cambiamenti di struttura possono coinvolgere uno, due o più cromosomi e sono il risultato di rotture ed eventuali ricongiungimenti errati di porzioni cromosomiche. In alcuni casi le rotture sono ricomposte in modo da ripristinare la struttura originaria, ma nella maggior parte dei casi sono alla base di un riarrangiamento cromosomico anomalo.

I riarrangiamenti strutturali si dividono in due grandi gruppi: **bilanciati** e **sbilanciati**.

Le alterazioni cromosomiche strutturali bilanciate non danno luogo né a perdita né a guadagno di materiale genetico e le persone portatrici sono generalmente fenotipicamente normali. Possono essere sia ereditate da un genitore (portatore sano) o possono verificarsi "de novo" e quindi essere riscontrate solo nelle cellule fetali.

Le anomalie sbilanciate, invece, provocano perdita/guadano di materiale genetico, perciò vengono identificate in soggetti con fenotipo clinico.

I principali tipi di anomalie strutturali sono:

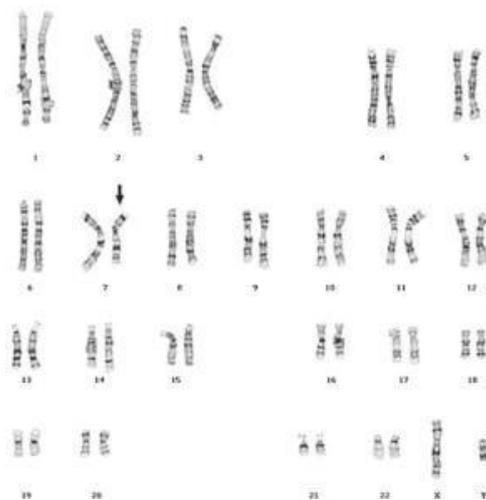
1) Delezioni

La delezione è la perdita di parte del cromosoma. Può essere **terminale**, causata da una singola rottura cromosomica all'estremità, più frequentemente **interstiziale**, come conseguenza di due rotture all'interno del cromosoma.

Di solito le sindromi da delezione interessano segmenti relativamente grandi di cromosoma (> 10 Mb = Megabasi). Delezioni di queste dimensioni possono essere identificate con tecniche di citogenetica tradizionale. Delezioni di dimensione inferiore, definite "microdelezioni" possono essere identificate solo con le più moderne tecniche di citogenetica molecolare (FISH) o di biologia molecolare (array-CGH)



Delezione

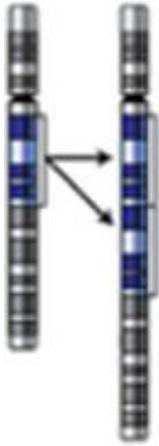


Delezione di porzione del braccio lungo del cromosoma 7

2) Duplicazioni

Le duplicazioni consistono nella presenza di due copie di un segmento di cromosoma, e pertanto costituiscono delle trisomie parziali.

Le duplicazioni sono più frequenti e meno dannose delle delezioni

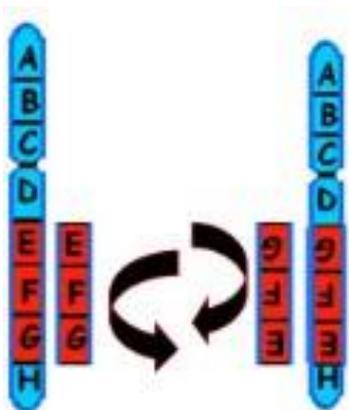


Duplicazione

3) Inversioni

L'inversione è la rottura di un frammento di cromosoma, che si inserisce di nuovo nello stesso punto ma invertito (180°)

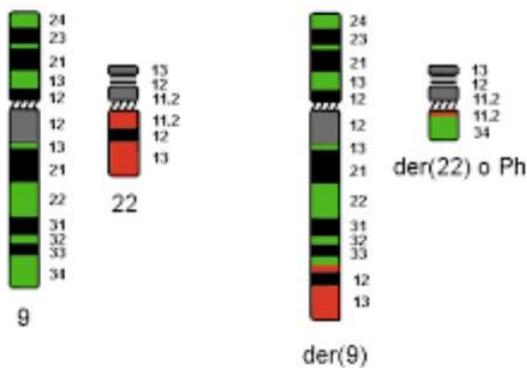
Le inversioni producono un nuovo allineamento dei geni lungo l'asse di un cromosoma e di solito non si associano ad alterazioni cliniche. I portatori di inversione sono però a rischio riproduttivo, in quanto possono produrre gameti sbilanciati.



Inversione

4) Traslocazioni

Le traslocazioni cromosomiche consistono nel trasferimento di un segmento cromosomico dalla sua posizione normale ad un'altra, differente, sia nell'ambito dello stesso cromosoma che su un cromosoma diverso. La traslocazione è detta bilanciata se non comporta alcuno squilibrio di materiale cromosomico. La traslocazione reciproca consiste nello scambio di segmenti tra due cromosomi non omologhi. Tali traslocazioni, se perfettamente bilanciate, non comportano generalmente alcun effetto sul piano clinico. Le traslocazioni possono però causare la produzione di gameti con corredo genico sbilanciato e quindi essere responsabili di gravi sindromi polimalformative nella prole.

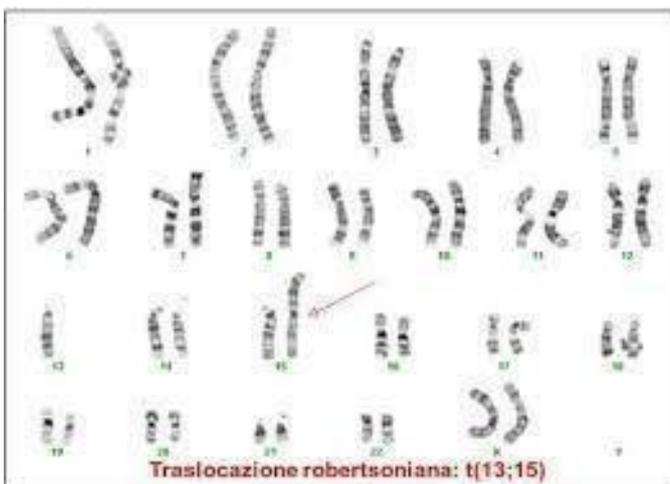


Traslocazione t(9;22)



Cariotipo 46,XY,t(9;22)

La traslocazione robertsoniana consiste nella fusione di due cromosomi acrocentrici a seguito di una rottura in prossimità del centromero, con la formazione di un nuovo cromosoma. Tale anomalia cromosomica, oltre che strutturale, è anche numerica, poiché comporta la riduzione del numero dei cromosomi da 46 a 45.



Nella prole dei soggetti con traslocazione robertsoniana possono segregare entrambi i cromosomi normali oppure esclusivamente il cromosoma traslocato: in questi casi i figli sono rispettivamente normali o portatori della traslocazione bilanciata come il genitore.

Quando in aggiunta al cromosoma derivativo di una traslocazione robertsoniana è presente anche uno degli omologhi normali il gamete, una volta avvenuta la fecondazione, produrrà uno zigote che pur avendo 46 cromosomi è sbilanciato e presenta una trisomia.

Nella foto sottostante sono presenti infatti 2 cromosomi 21 normali più un terzo cromosoma 21 traslocato su un cromosoma 14. Il risultato è la sindrome di Down, in cui il numero complessivo dei cromosomi è però 46, anziché 47.

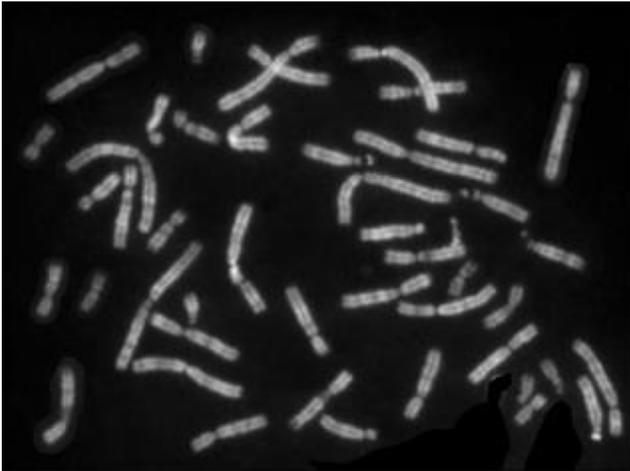


Sindrome di Down derivata da traslocazione robertsoniana t(14;21)

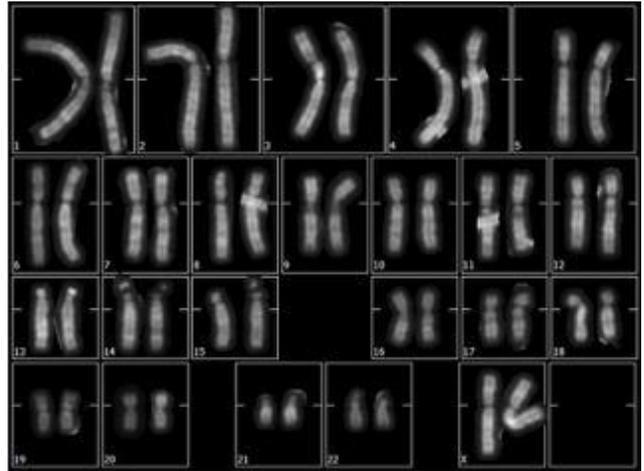
Cariotipo

L'analisi del cariotipo permette di costruire una rappresentazione grafica ordinata del corredo cromosomico di un individuo, detta cariogramma.

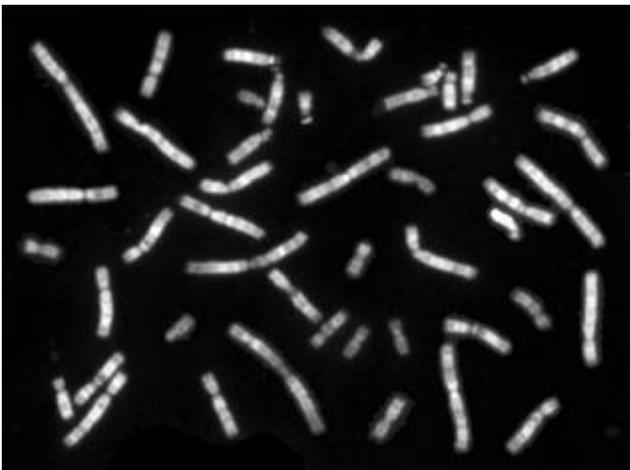
I cromosomi presenti in una metafase possono essere ordinati appaiando gli omologhi e suddividendoli in gruppi.



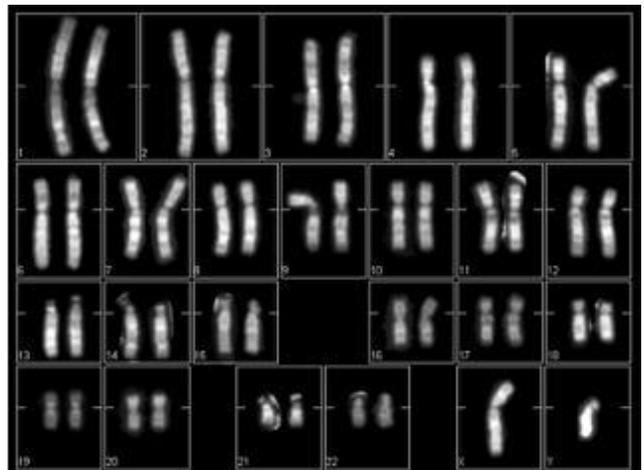
Metafase femminile



Cariotipo femminile



Metafase maschile



Cariotipo maschile

PROTOCOLLO SPERIMENTALE

PREPARAZIONE DELLA SOSPENSIONE CELLULARE (eseguita dai tutors UniBs)

La sospensione cellulare fornita è ottenuta da una coltura di linfociti, cellule del sangue della serie bianca, stimolati con fitoemoagglutina (PHA, dall'inglese phytohaemoagglutinin, una sostanza che induce i linfociti ad entrare in mitosi), messi in terreno in presenza di siero e mantenuti per 72 a 37°C. Raggiunta una fase di crescita, viene aggiunta per 1 ora e mezza la colchicina, una sostanza che inibisce la formazione del fuso mitotico bloccando le mitosi in metafase.

Le cellule vengono raccolte mediante centrifugazione (e scarto del surnatante) e trattate con una soluzione ipotonica per determinarne il rigonfiamento e la rottura della membrana cellulare.

Segue un trattamento con fissativo (etanolo: acido acetico in rapporto 3:1) che stabilizza la struttura dei cromosomi, altrimenti fragili, e rende più duraturo il preparato, ritardando l'azione degli agenti ossidanti.

Il citoplasma, in cui sono immersi i cromosomi, risulta disidratato dall'alcool e ridotto dall'acido acetico; i cromosomi mantengono la medesima posizione che presentavano prima della fissazione nel citoplasma. Il passaggio in fissativo viene ripetuto almeno una seconda volta, dopo di che la sospensione cromosomica può essere conservata alla temperatura di -20°C anche per qualche anno, prima di venire strisciata su vetrino e osservata al microscopio

PROTOCOLLO DA ESEGUIRE A SCUOLA

Occorrente:

- ependorf da 1,5ml contenente la sospensione cellulare, ovvero preparati cromosomici fissati in metafase (da conservare in freezer)
- provetta contenente Colorante Blu di metilene 0,05% (da conservare a temperatura ambiente)
- vetrini portaoggetto con banda sabbata
- vetrini coprioggetto
- micropipette p10 e puntali
- matita

STRISCIO SU VETRINO

INDOSSARE GLI OCCHIALI DI SICUREZZA

- togliere dal freezer la sospensione cellulare
- prendere un vetrino portaoggetto e sulla banda sabbata del vetrino scrivere con una matita i dati utili per il riconoscimento (nome, data, tipo di materiale...). Pulire con un tovagliolino di carta inumidito il vetrino e asciugarlo bene.
- risospendere delicatamente la sospensione contenente nuclei e metafasi, prelevarne 5 ul e posizzarli al centro del vetrino
- fare asciugare all'aria per 30 secondi circa e quindi procedere con la colorazione

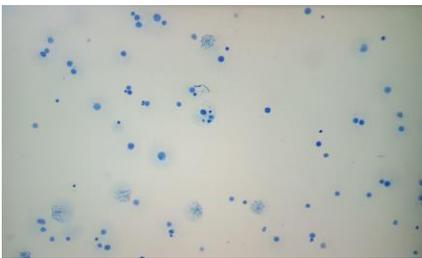
COLORAZIONE con BLU di METILENE

La soluzione di Blu di Metilene 0,05% permette la colorazione omogenea di tutti cromosomi, evidenziando la loro dimensione e morfologia.

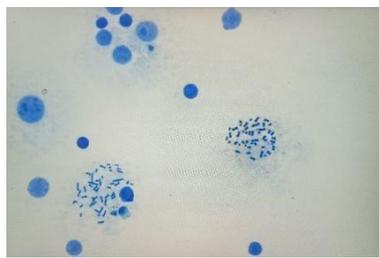
Si basa sull'affinità del colorante per i componenti aventi reazione acida, cioè i cromosomi, che quindi si colorano di blu.

La colorazione si effettua attraverso due passaggi:

- prelevare 10ul di Blu di Metilene 0,05% dalla provetta e rilasciarli al centro del vetrino portaoggetto, dove era stata deposta la sospensione cellulare
- posizionare un vetrino coprioggetto su quello portaoggetto, evitando la formazione di bolle
- osservare i vetrini al microscopio ottico ad un ingrandimento 40X e 100X



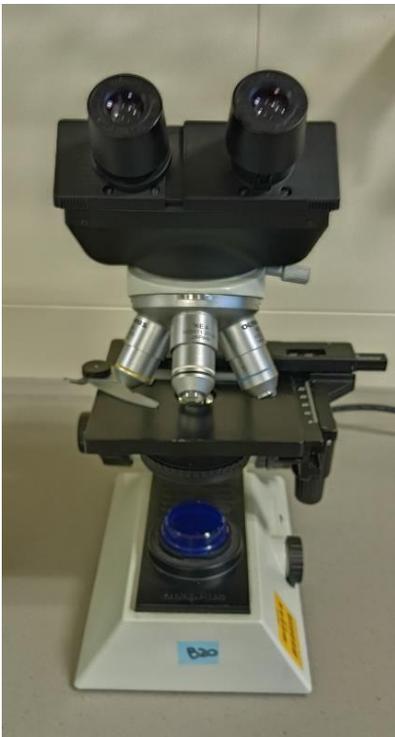
Nuclei e metafasi al 10X



Nuclei e metafasi al 40X



Metafase al 100X



Microscopio ottico

Microscopio ottico

Se si osserva la metafase con l'obiettivo a ingrandimento 100X è necessario utilizzare l'olio a immersione, per ottenere una nitidezza e una risoluzione migliore.

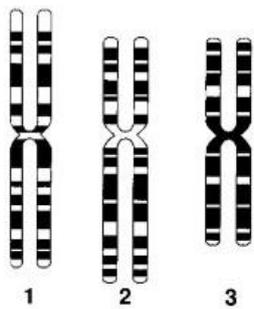
Una goccia d'olio deve essere posta sul vetrino in corrispondenza della zona di interesse. L'olio ha un indice di rifrazione simile a quello del vetro del vetrino e dell'obiettivo e permette quindi di creare una continuità con il vetro, consentendo così al fascio luminoso di passare in maniera lineare e omogenea senza subire deviazioni (cosa che non succederebbe se dovesse attraversare l'aria interposta tra il vetrino e l'obiettivo).

L'ingrandimento 100X permette di poter contare i cromosomi della metafase ed eventualmente anche di poterne distinguere alcuni in base a:

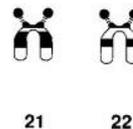
- **dimensione** (i cromosomi 1, 2, 3 sono i più lunghi, i cromosomi 21 e 22 quelli più corti)
- **posizione del centromero** (per es. si possono distinguere i cromosomi metacentrici 1 e 3, che sono più lunghi, dai cromosomi metacentrici 19 e 20, che sono più corti, o i cromosomi acrocentrici 13, 14, 15 (più grandi) e 21 e 22 (più piccoli), che hanno il centromero all'estremità).

I cromosomi del gruppo C (comprendente i cromosomi dal 6 al 12 più il cromosoma X) sono quelli distinguibili solo da un occhio esperto che li riconosce in base al differente bandeggio.

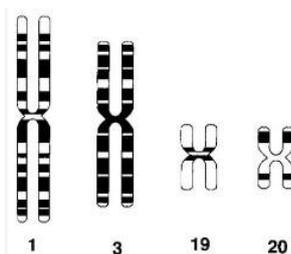
Cromosomi più lunghi



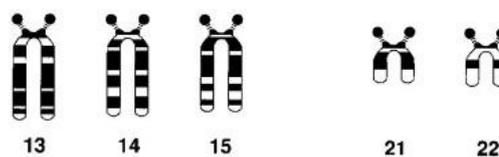
Cromosomi più corti



Cromosomi metacentrici



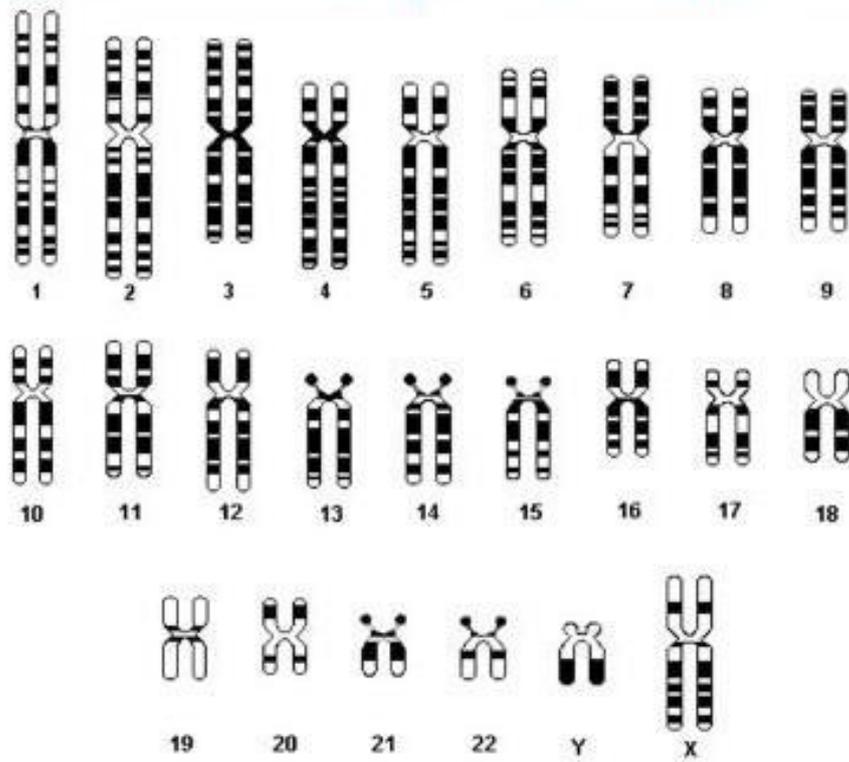
Cromosomi acrocentrici



Gli "ideogrammi" sono rappresentazioni schematiche del bandeggio di ciascun cromosoma

Analisi convenzionale (microscopio ottico)

ideogrammi



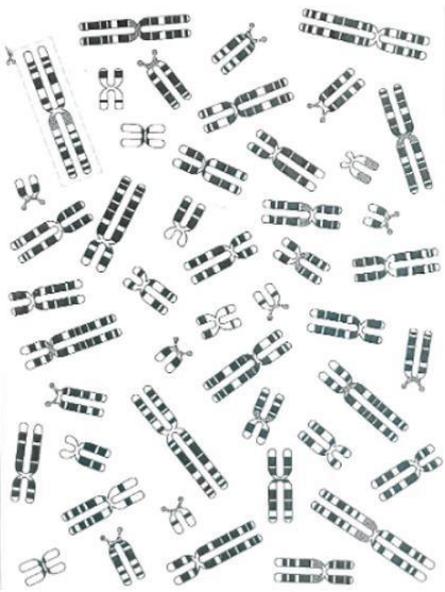
PROPOSTE DI LAVORO

1° PROPOSTA (lavoro eseguito singolarmente da ogni studente o in piccoli gruppi)

Per la ricostruzione del cariotipo si può seguire la seguente procedura:

Fase 1:

Stampare l'immagine (è riportata ingrandita in fondo alla dispensa)



Fase 2:

Tagliare ogni cromosoma con le forbici (Figura 1)

Per velocizzare il lavoro, piuttosto di tagliare lungo il margine di ciascun cromosoma, tagliare dei rettangoli intorno al cromosoma



Figura 1: cromosomi ritagliati

Fase 3:

Individuare le coppie di cromosomi omologhi in base alla dimensione e al numero e tipo di bande

Abbinare ciascun cromosoma con il suo omologo.

I cromosomi devono essere allineati rispetto al centromero e disposti col braccio corto rivolto verso l'alto e quello lungo verso il basso

Su un foglio bianco predisposto (si trova in fondo alla dispensa), disporre le coppie di cromosomi dal più grande (n°1) al più piccolo (n°22) (Figura 2)

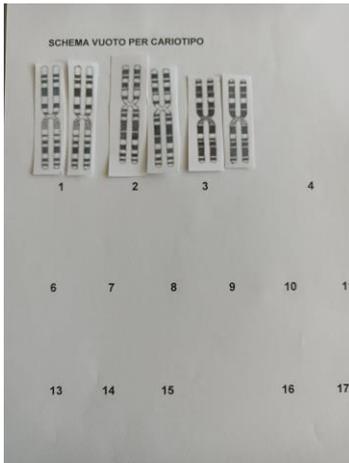
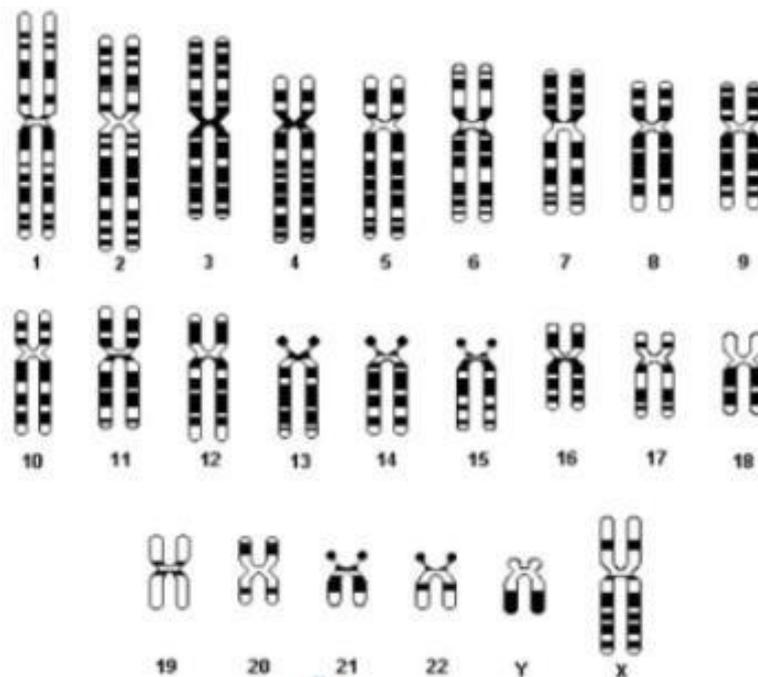


Figura 2

Per la ricostruzione del cariotipo e il riconoscimento dei cromosomi confrontare le bande con quelle degli ideogrammi sotto riportati



2° PROPOSTA (lavoro eseguito singolarmente da ogni studente o in piccoli gruppi)

Per la ricostruzione del cariotipo si può seguire la seguente procedura:

Fase 1:

Stampare l'immagine della metafase (Figura 1)

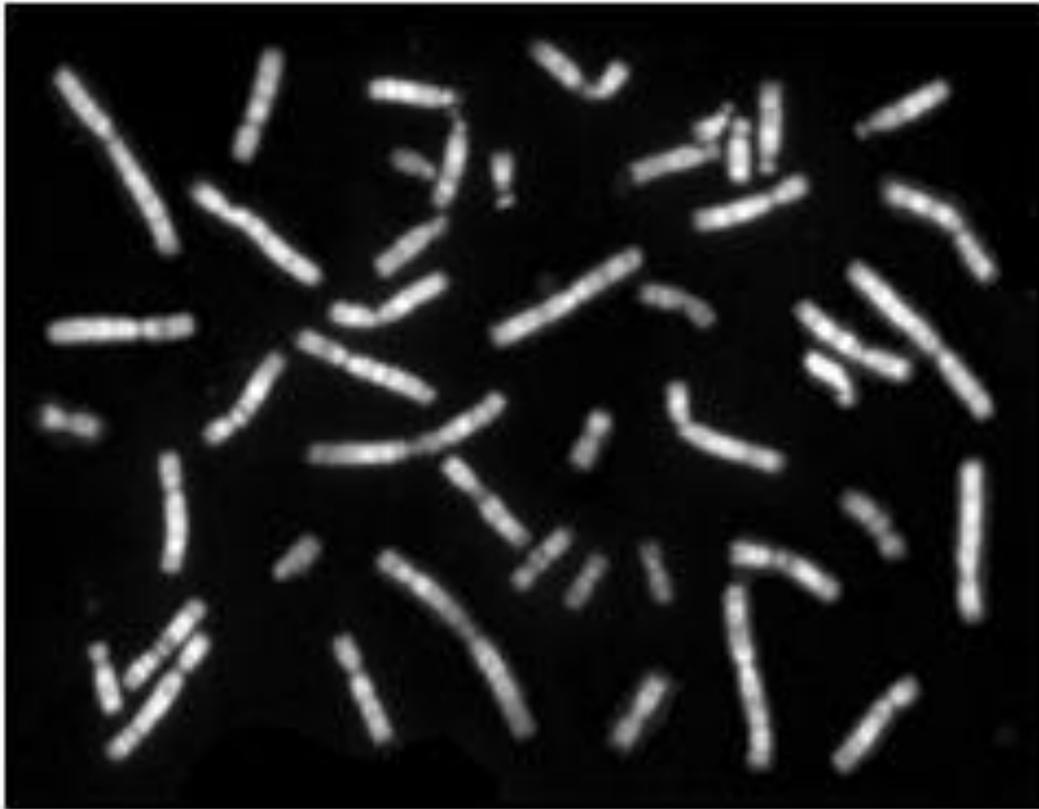


Figura 1: Metafase

Fase 2:

Tagliare ogni cromosoma con le forbici (Figura 2)

Per velocizzare il lavoro, piuttosto di tagliare lungo il margine di ciascun cromosoma, tagliare dei rettangoli intorno al cromosoma

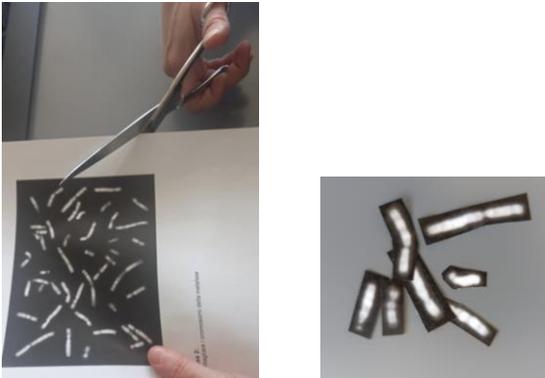


Figura 2: cromosomi ritagliati

Fase 3:

Provare a riconoscere e posizionare i cromosomi ritagliati come nello schema del cariotipo sotto riportato (Figura 4)

Individuare le coppie di cromosomi omologhi in base alla dimensione e al numero e tipo di bande

Abbinare ciascun cromosoma con il suo omologo.

I cromosomi devono essere allineati rispetto al centromero e disposti col braccio corto rivolto verso l'alto e quello lungo verso il basso

Su un foglio bianco predisposto (si trova in fondo alla dispensa), disporre le coppie di cromosomi dal più grande (n°1) al più piccolo (n°22) (Figura 3)

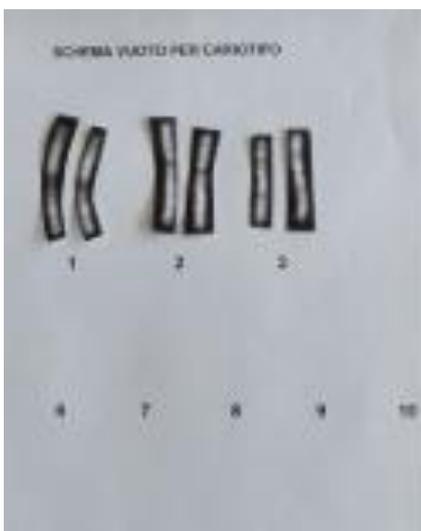


Figura 3

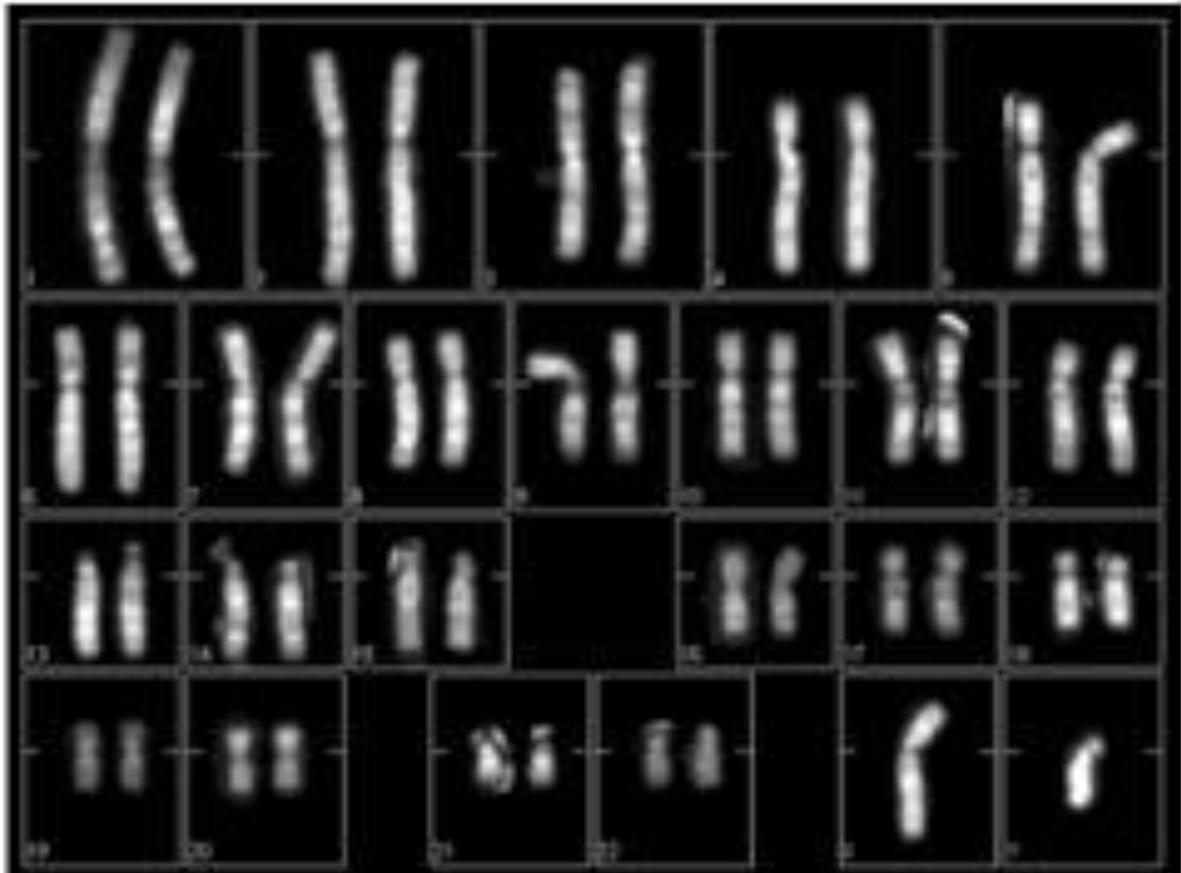


Figura 4: cariotipo

3° PROPOSTA (lavoro eseguito singolarmente da ogni studente o in piccoli gruppi)

Con questo tipo di lavoro sarà possibile riconoscere solo determinati cromosomi. Si potranno distinguere i cromosomi più grandi da quelli più piccoli o distinguere i cromosomi in base alla posizione del centromero (ad es. i metacentrici dagli acrocentrici).

Per la ricostruzione del cariotipo si può seguire la seguente procedura:

Fase 1:

Scegliere al microscopio ottico all'ingrandimento 100X la metafase (cercare una metafase dove i cromosomi siano il più possibile separati, distanziati e non sovrapposti) e fotografarla (Figura 1)



Figura 1: metafase

Fase 2:

Stampare l'immagine della metafase

Fase 3:

Ritagliare con le forbici i singoli cromosomi (per velocizzare, piuttosto che cercare di tagliare lungo il margine di ciascun cromosoma, tagliare dei rettangolini intorno al cromosoma) (Figura 2)



Figura 2: cromosomi ritagliati

Fase 4:

Individuare le coppie di cromosomi omologhi in base alla dimensione e al numero e tipo di bande

Abbinare ciascun cromosoma con il suo omologo.

I cromosomi devono essere allineati rispetto al centromero e disposti col braccio corto rivolto verso l'alto e quello lungo verso il basso

Su un foglio bianco predisposto (si trova in fondo alla dispensa), disporre le coppie di cromosomi dal più grande (n°1) al più piccolo (n°22) (Figura 3)

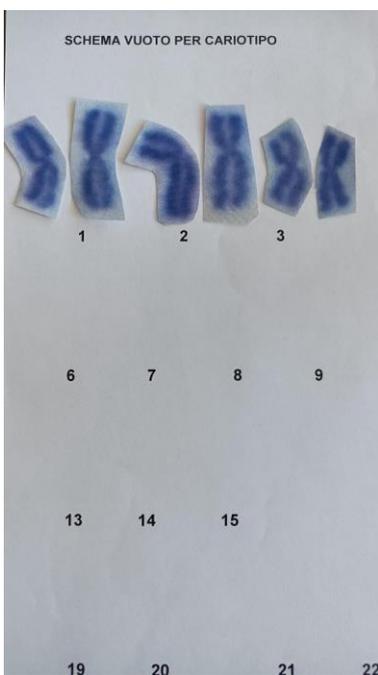
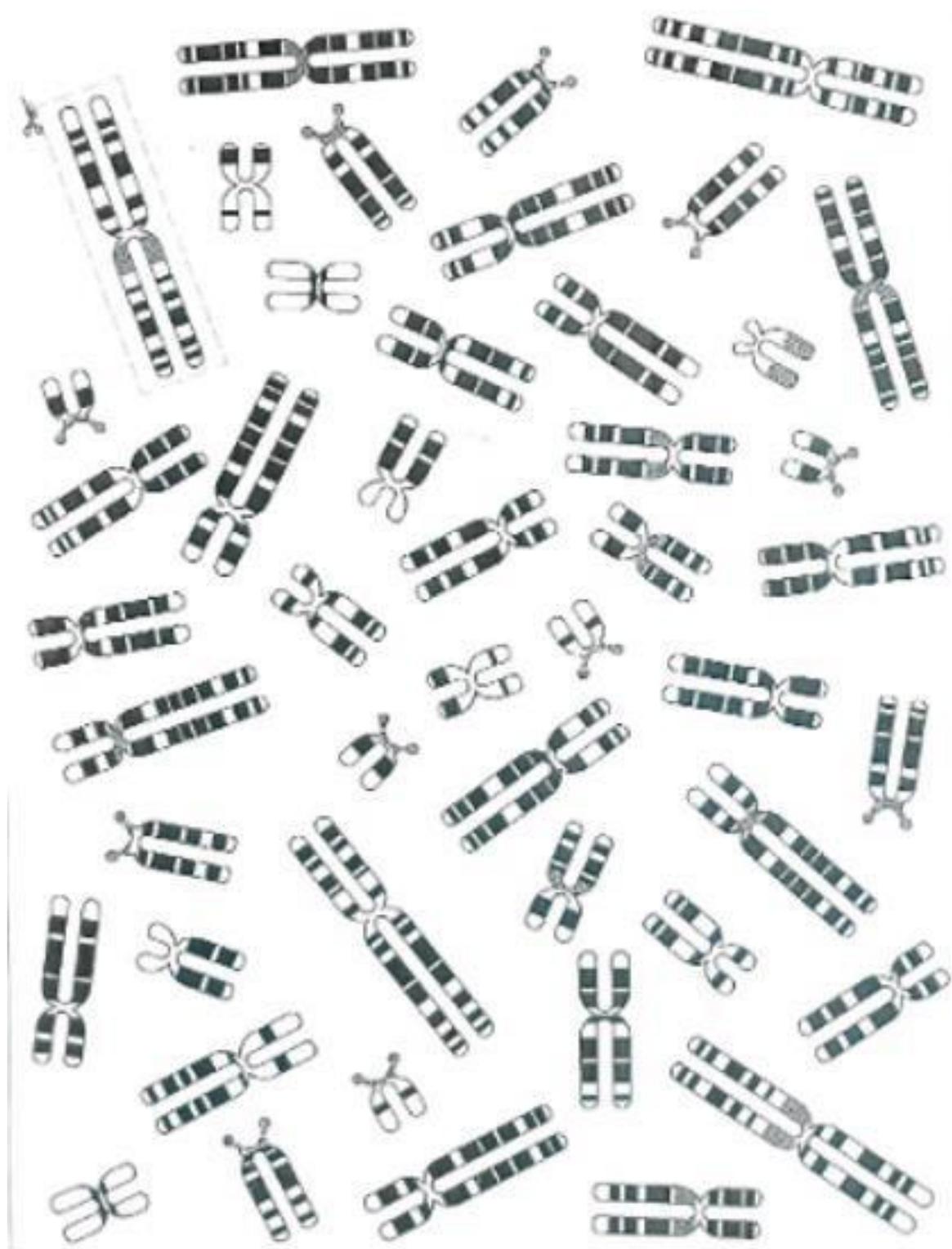


Figura 3



SCHEMA VUOTO PER CARIOTIPO

