

TEMA 37

El Cariotipo Humano

37.1.-Introducción.

A mediados del siglo pasado, gracias al avance de la biología, de la genética, y de la citología, surgió una nueva ciencia, la llamada **citogenética**, que tiene como objetivo el estudio de los cromosomas y el de sus alteraciones, así como el estudio de la relación de estas alteraciones y la sintomatología que presentan los pacientes. Es por tanto una ciencia de gran aplicación en biología y medicina, ya que muchas enfermedades tienen un origen citogenética, igual que muchos abortos espontáneos, o malformaciones fetales.

Desde mediados del siglo XIX hasta mediados del siglo XX no se supo el número de cromosomas del ser humano. ¿Por qué fue así? Porque entre otras cosas, no se sabía si el número de cromosomas era constante. El problema era que en la placa metafásica los cromosomas están muy juntos y es difícil verlos separados. En diversos recuentos se obtuvieron números muy dispares: 29, 80, 48... Hoy en día sabemos que el número de cromosomas es característico de cada especie –y que además, hay genotipos muy variados-:

- Gusano Ascaris, que solo presenta un cromosoma.
- Mamíferos: entre 40 y 50 cromosomas.
 - o Humanos: 46 cromosomas.
 - o Rata: 40 cromosomas.

Pero no fue hasta 1956, cuando fue establecido por los investigadores Levan y Tjio, que la especie humana tenía 46 cromosomas. Este descubrimiento fue posible gracias a diversos avances técnicos y metodológicos:

- Técnicas de cultivo de tejidos. Primero se realizaron con células de pollo, y posteriormente de mamífero. Con estas técnicas, desarrolladas ya en 1930 y 1940, se permitió cultivar células vivas in vitro.
- La técnica del choque hipotónico, que fue la más importante. Esta técnica consiste en suspender las células en una suspensión hipotónica, con la que se hinchan las células consiguiendo la separación de los cromosomas. Aprovecharon además la colchicina para inhibir la polimerización de microtúbulos y por tanto, destruir el huso mitótico.

Este trabajo se basó en la utilización de células embrionarias humanas obtenidas de fetos cuyas madres habían abortado espontáneamente. Este hecho propició las críticas de la comunidad científica porque se pensó que esas células podían presentar anomalías cromosómicas.

En ese mismo año (1956), Ford y Hamerton publicaron un trabajo realizado con biopsias testiculares en el que explicaban que las espermatogonias tenían 46 cromosomas, y que los espermatoцитos primarios tenían 23 cromosomas bivalentes. Con este estudio se confirmó el número característico de cromosomas de la especie humana, que es 46 cromosomas, y además, se estableció que había dos gonosomas diferentes –X e Y–.

TEMA 37: El Cariotipo Humano

Una vez se supo el número de cromosomas de la especie humana, no se avanzó nada en los 3 años siguientes.

El verdadero empuje de la citogenética ocurrió en 1959, cuando tuvo lugar la primera publicación en que se demostró una anomalía cromosómica como causa de una enfermedad humana, gracias a las investigaciones de Lejeune. Se demostró que los niños con Síndrome de Down tenían un cromosoma supernumerario (3 en lugar de 2), el 21, que además era de pequeño tamaño. Este investigador hasta la muerte intentó buscar un tratamiento para la trisomía del 21, nombre con el que se designa al síndrome que descubrió.

Desde esta época muchos laboratorios han trabajado con la citogenética, pero siempre con el mismo problema: se necesitaban células, y las de sangre periférica no servían ya que los linfocitos no se dividen una vez diferenciados. Por ello se intentó utilizar otras células:

- Mucosa bucal, pero no conseguían que se desarrollaran mucho (malvivían).
- Células de la raíz del pelo.
- Células de la médula ósea, pero su extracción duele.
- Células de biopsia testicular, pero no hay muchos donantes.

En 1960 Moorhead describió que los linfocitos se diferenciaban en la sangre periférica, pero que podían entrar en mitosis en condiciones *in vitro*. Con este descubrimiento, se pudo realizar el cariotipo a partir de sangre periférica, lo que tuvo varias ventajas:

- Es un tejido fácil de obtener.
- Permite la obtención de un gran número de células con lo que se obtienen abundantes metafases.

Este tipo de análisis citogenética es mucho más común, y se utiliza para conocer las anomalías cromosómicas. Por estos motivos se utiliza la sangre periférica para el estudio del cariotipo humano, pero además, se suele estudiar otros tejidos de forma complementaria:

- Piel.
- Células testiculares, en el caso de que nos interese el estudio de la meiosis.
- Células del líquido amniótico o de las vellosidades coriales, si lo que queremos es realizar un diagnóstico prenatal.

37.2.- Metodología.

Para comenzar, se realiza una extracción de sangre periférica en condiciones de máxima esterilidad, que posteriormente se someterá a cultivo durante 72 horas.

A esa sangre se le añade heparina para evitar que coagule. La sangre se introduce en un medio de cultivo RPMI, al que se añade un extracto embrionario (suero bovino fetal), y antibióticos para prevenir la contaminación. Además, se añade fitohemaglutinina, que es una lecitina que se une a la membrana plasmática de los linfocitos y hace que estos se conviertan en linfoblastos, es decir, se desdiferencian. Esto se consigue en 24 horas.

Posteriormente los linfoblastos se dividen y se estimulan segregando interleuquina 2. Se mantendrá el cultivo 48 horas más con el objetivo de tener para estudiar más mitosis.

TEMA 37: El Cariotipo Humano

A las 72 horas de cultivo procederemos a la extracción de las células en metafase, llamada sacrificio. Este proceso se inicia con colchicina, que hace que el huso acromático desaparezca, es decir, no tendrá lugar la anafase. Posteriormente, las células se someten a la técnica del choque hipotónico con KCl –cloruro potásico–, para que aumente el volumen celular y los cromosomas se separen. A continuación fijamos los cromosomas con fijador de Carnoy, y realizaremos las extensiones. Con esta técnica se obtienen un gran número de metafases.

A continuación, contamos el número de cromosomas, los ordenamos – actualmente tenemos programas informáticos que lo hacen–, y obtenemos el **cariotipo**, que es la imagen que se obtiene cuando los cromosomas en metafase se ordenan por parejas de homólogos. Actualmente se ha llegado a un acuerdo mundial para ordenarlos de determinada manera y siempre igual. Los parámetros utilizados son:

- Tamaño: de mayor tamaño a menor tamaño.
- Posición del centrómero: primero los metacéntricos, luego los submetacéntricos, y posteriormente los acrocéntricos.
- Presencia o no, de constricciones secundarias.

37.3.- Clasificación de los cromosomas.

En el cariotipo humano se han establecido los siguientes grupos de cromosomas: A, B, C, D, E, F y G.

Cromosomas del grupo A:

En este grupo aparecen los cromosomas más grandes del cariotipo humano. Pertenecen a él los pares de cromosomas 1, 2 y 3.

- Cromosoma 1: es el más grande de todos y es metacéntrico.
- Cromosoma 2: es submetacéntrico.
- Cromosoma 3: es metacéntrico.

Cromosomas del grupo B:

En este grupo incluimos los pares de cromosomas 4 y 5. Son cromosomas muy submetacéntricos y de tamaño muy similar. Alteraciones en estos cromosomas se ha demostrado que provocan grandes síndromes citogenéticas.

Cromosomas del grupo C:

A este grupo pertenecen los cromosomas 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y el gonosoma X. Es el grupo más complejo de todos. La mayoría de los cromosomas son bastante submetacéntricos:

- Cromosoma 6: submetacéntrico.
- Cromosoma 7: menos submetacéntrico.
- Cromosoma 8: muy submetacéntrico.
- Cromosoma 9: menos submetacéntrico.
- Cromosoma 10: muy submetacéntrico.
- Cromosoma 11: menos submetacéntrico.
- Cromosoma 12: muy submetacéntrico.
- Cromosoma X: es submetacéntrico y tiene un tamaño medio entre el cromosoma 6 y el 7.

TEMA 37: El Cariotipo Humano

Cromosomas del grupo D:

Este grupo está compuesto por los cromosomas 13, 14 y 15. Son cromosomas acrocéntricos. Además, presentan constricciones secundarias, que dan lugar a pequeños satélites poco visibles a microscopía electrónica donde se encuentran los genes nucleolares.

Cromosomas del grupo E:

En este grupo incluimos a los cromosomas 16, 17 y 18. Los 3 presentan un tamaño similar:

- Cromosoma 16: metacéntrico prácticamente.
- Cromosoma 17: submetacéntrico.
- Cromosoma 18: muy submetacéntrico.

Cromosomas del grupo F:

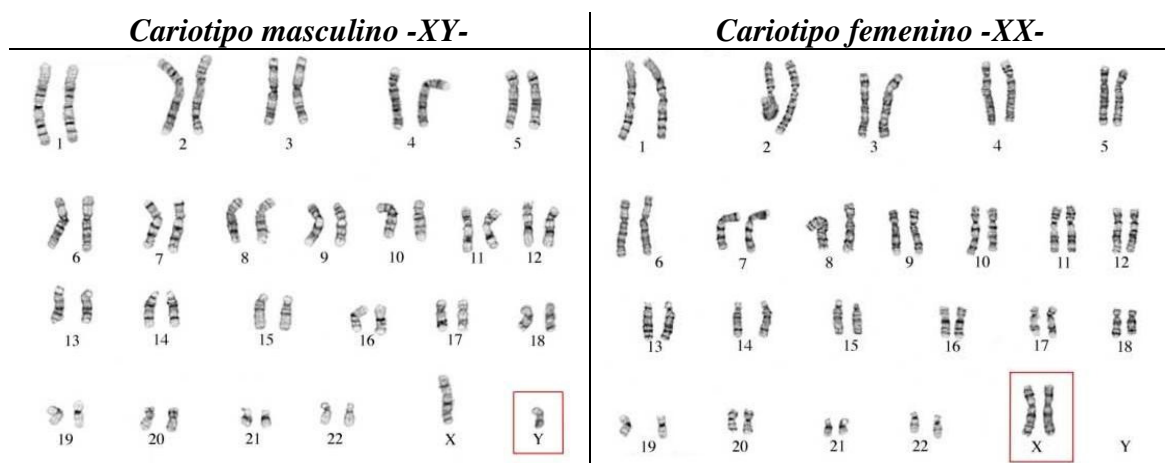
Este grupo está formado por los cromosomas 19 y 20. Entre ellos no se diferencian prácticamente. Por su tamaño, y por el hecho de que son metacéntricos se les denomina “pequeñas cruces”.

Cromosomas del grupo G:

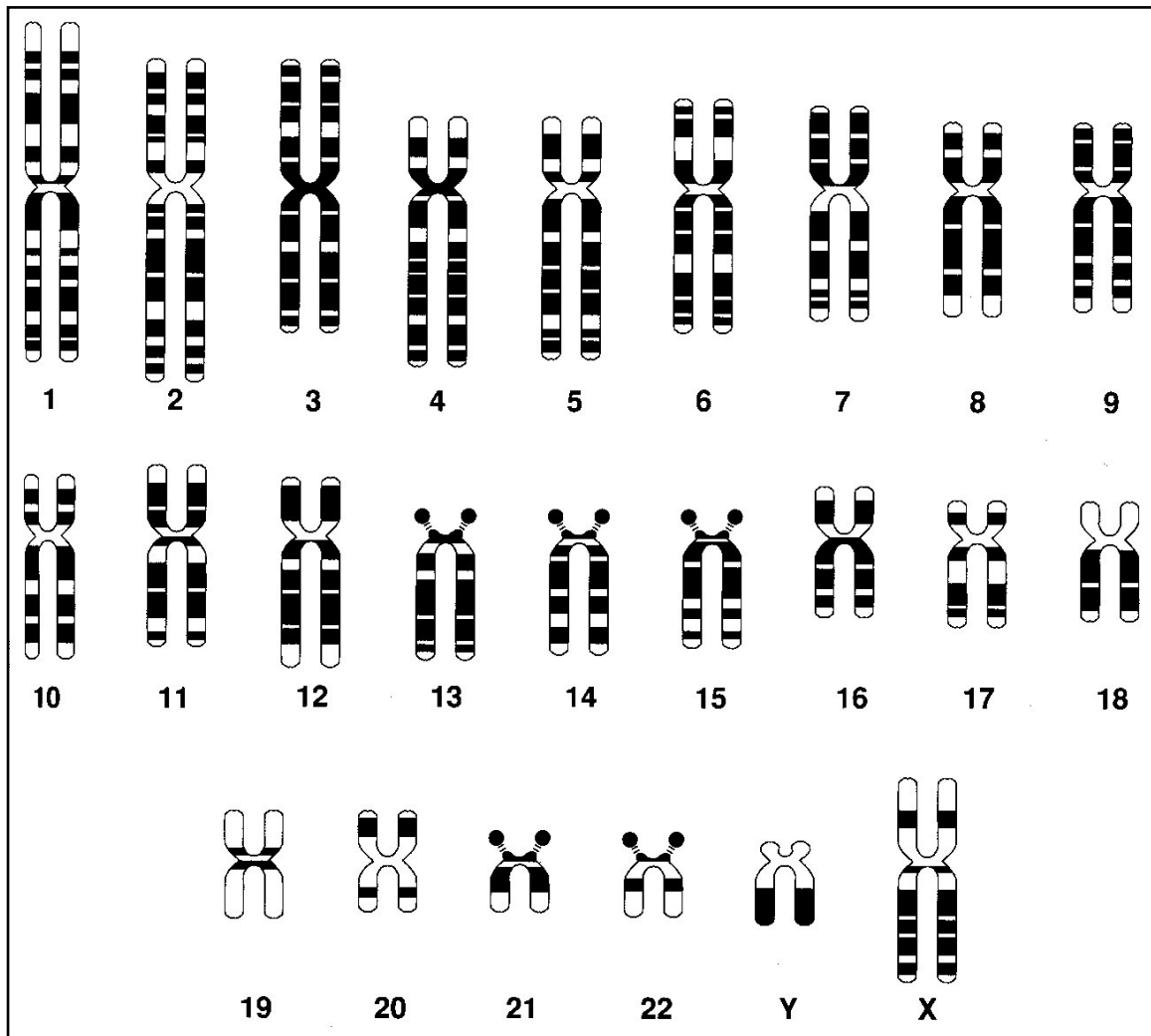
Los cromosomas 21 y 22, así como el gonosoma Y forman este grupo de cromosomas. Son los cromosomas más pequeños del cariotipo.

- Cromosomas 21 y 22: son acrocéntricos y tienen satélites con genes nucleolares.
 - El cromosoma 21 es realmente el cromosoma más pequeño del cariotipo, pero está colocado de esta manera por acuerdo internacional, ya que históricamente se colocó en esa posición, es el responsable de síndrome de Down, ayudó al despegue de la citogenética, etc.
- Cromosoma Y: es submetacéntrico y presenta un tamaño variable. Sus dos cromátidas se sitúan muy paralelas y no divergentes. Además, está formado por heterocromatina constitutiva porque no tiene genes.

La imagen del cariotipo la tenemos desde 1956, 1959... además, hay que decir que mediante microscopía electrónica la diferenciación de cromosomas es muy difícil, por lo que se van a llevar a cabo una serie de técnicas para identificarlos más fácilmente y sin equivocaciones.



TEMA 37: El Cariotipo Humano



37.4.- Técnicas de bandeado.

A partir de 1970 se comenzaron a realizar una serie de tratamientos y tinciones a los cromosomas para identificarlos mejor, que fueron las técnicas de bandeado, que las hay de dos tipos:

- Bandas de todo el cromosoma.
- Bandas que tiñen solo determinados puntos del cromosoma.

Bandas de todo el cromosoma:

Este tipo de bandas se ha de realizar siempre que vayamos a hacer un cariotipo. El resultado de la técnica nos dará unos cromosomas con bandas alternantes (oscuras y claras) y además, una configuración o un patrón característico y estable de cada cromosoma. Estas bandas permiten:

- La identificación de los cromosomas, gracias a su patrón característico.
- La caracterización del cromosoma por regiones.
- Nos permite trazar o establecer relaciones más exactas entre las enfermedades y las anomalías cromosómicas.

TEMA 37: El Cariotipo Humano

La **obtención** de este tipo de bandas se realiza en cromosomas metafásicos, aunque también se puede realizar en cromosomas prometafásicos, o incluso en profásicos. El cromosoma metafásico está condensado y el cariotipo humano en haploide presenta unas 400 bandas, mientras que en prometafase podemos ver hasta 2.000 bandas porque es un cromosoma más largo.

Se trabaja con cromosomas metafásicos por comodidad, pero en caso de aparecer dudas, se realiza el cariotipo con cromosomas prometafásicos.

¿Qué diferentes bandas encontramos que tiñen o cubren todo el cromosoma?

- Bandas Q, de *quinacrina*:
 - Con esta tinción se obtienen unas bandas alternantes –más o menos fluorescentes–. Para verlas necesitas un microscopio de luz ultravioleta (microscopio de fluorescencia).
 - VENTAJA: es un método rápido.
 - DESVENTAJA: en un minuto se pierde el brillo.
- Bandas G, de *Giemsa*:
 - Se obtienen tratando los cromosomas con una solución proteolítica de tripsina, y posteriormente tiñendo con Giemsa.
 - Se obtiene un patrón de bandas que permite individualizar los cromosomas y reconocerlos. Las regiones oscuras son zonas de replicación tardía, por lo que ese ADN es rico en Adenina y Timina.
- Bandas R (muy utilizadas en Francia):
 - Tratan los cromosomas con una solución salina y posteriormente tiñen con Giemsa. El bandeo que se obtiene es al revés: las zonas claras antes eran oscuras, y las oscuras, antes eran claras, esto quiere decir, que las que más se tiñen son las zonas de replicación temprana, es decir, que son ricas en Guanina y Citosina.

Los cromosomas prometafásicos se bandean con bandas prometafásicas de tipo G o R, pero en cromosomas más largos.

Con estos tipos de bandas podemos reconocer fácilmente la falta de una región, algo útil para localizar anomalías cromosómicas y diagnosticarlas –relacionarlas con una patología–.

Bandas que tiñen solo determinados puntos del cromosoma:

- Bandas C: solo tiñen la heterocromatina:
 - Centrómeros.
 - Zonas heterocromatínicas de los cromosomas 1, 9, 16, de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15, 21 y 22), así como del gonosoma Y.
- Bandas NOR, que tiñen los satélites de los cromosomas acrocéntricos.
- Bandas T, que marcan los telómeros para ver si falta alguno.

Actualmente se utiliza mucho la técnica de FISH, que se utiliza para la localización de regiones concretas y de genes determinados.

TEMA 37: El Cariotipo Humano

37.5.- Nomenclatura.

La nomenclatura es un aspecto que todos los laboratorios tienen que hacer de la misma forma. Pero... ¿cómo se nombra el cariotipo? Se escribe el número de cromosomas totales, se pone una coma, y se escribe el genotipo sexual (XX, XY...).

- MUJER: **46,XX**.
- HOMBRE: **46,XY**

Para más información acerca de la nomenclatura del cariotipo, y de las anomalías, etc. revisar PRÁCTICA 9: CITOGENÉTICA.