

CARÁTULA DE TRABAJO

OBTENCIÓN DE CROMOSOMAS A PARTIR DEL CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS

Título del trabajo

LAS AMIBAS

Pseudónimo de integrantes

BIOLOGÍA

Área

LOCAL

Categoría

INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

Modalidad

4596187

Folio de Inscripción

Obtención de cromosomas a partir del cultivo de linfocitos humanos.

Resumen.

La citogenética es el campo de la genética que comprende el estudio de la estructura, función y comportamiento de los cromosomas. En este trabajo se estandarizó una técnica para el cultivo de linfocitos humanos y la obtención de cariotipos. La cual consistió en: primero, la toma de muestras sanguíneas; después, el cultivo de sangre periférica; posteriormente, la cosecha de linfocitos y por último, la elaboración de laminillas para visualizar los cromosomas. Se tomaron de fotografías de los cariotipos para cuantificar el número de cromosomas presentes. La técnica empleada resulto ser eficiente, sin embargo, hay algunas variables por mejorar para aumentar la eficiencia.

1. Introducción.

La citogenética es la parte de la genética que se encarga del estudio de los cariotipos de los sistemas vivos (es el estudio minucioso de los cromosomas) a través de varios aspectos como: la composición, estructura, función, comportamiento y de qué manera se transmiten a la descendencia y su correlación con enfermedades las cromosómicas (Galan, 2002). Todas las técnicas implicadas en el estudio de la citogenética han estado constantemente en cambio; desde el mejoramiento del microscopio óptico, (ya que este no permitía la visualización exacta de regiones cromosómicas) hasta la aparición de las técnicas de tinción diferencial, las cuales hicieron posible la caracterización de cada par cromosómico con mayor precisión, permitiendo la evaluación de la integridad microscópica de cada estructura. Aunque se trata de una ciencia relativamente joven la citogenética ha atravesado por una gran cantidad de avances y aportaciones tan importantes que han permitido el desarrollo de la citogenética humana, lo cual ha derivado en la detección de alteraciones numéricas y estructurales de los cromosomas.

1.1 Marco Teórico.

1.1.1 Desarrollo histórico de la Citogenética.

La citogenética clínica es la rama de la genética médica que tiene por objeto el estudio del número, la estructura y la función de los cromosomas en humano.

En 1921 Theophilus S. Painter demostró la presencia del cromosoma. Y en preparaciones obtenidas a partir de testículo y determinó que el total de cromosomas eran 48. Luego, en 1956, Tijo de Indonesia y Albert Levan de Suecia determinan que en realidad el número de cromosomas en la especie humana no eran 48, sino 46. Mas adelante, Ford y Hamerton confirmaron esta tesis.

A partir del gran desarrollo de los diferentes métodos de bandedo el progreso de la citogenética fue imparable en todos los campos: animal, vegetal y humano. Esto llevó a la necesidad de estandarizar la información citogenética obtenida. En 1971 se realiza la Conferencia de París donde se establece un Sistema Internacional de Nomenclatura para los cromosomas humanos en base a su patrón de bandas G. Estas normas, hoy conocidas como ISCN (*International System of Chromosome Nomenclature*) se han ido actualizando en los años sucesivos: 1975, 1978, 1981, 1985, 1991, 1995, 2005 siendo la última en el 2009.

A partir de la década del 80, comienza a desarrollarse la técnica de hibridización insitu no radioactiva, denominada FISH (fluorescente in situ hybridization). Esta nueva metodología utiliza sondas genómicas marcadas directa o indirectamente con fluorocromos (Langer, 1981) (Cremer, 1986). Este nuevo abordaje aumenta la sensibilidad y especificidad de detección, respecto a la marcación con timidina H o P, pues permite visualizar una o más sondas marcadas con diferentes fluorocromos simultáneamente. Además evita el uso de material radioactivo y posterior revelado autorradiográfico, simplificando el estudio. El desarrollo del FISH dio lugar al origen de la denominada citogenética molecular, esta metodología permite conseguir información citogenética aun con bajo índice mitótico, mala morfología cromosómica y en cualquier etapa del ciclo celular.

1.1.2 Análisis de los cromosomas.

El cariotipo es el término usado para describir el complemento cromosómico de una célula (Puerto, 2001). El cariotipo humano consta de 22 pares de cromosomas autosómicos y 1 par sexual. Un cariograma es la representación gráfica del cariotipo.

El análisis cromosómico consiste en contar el número de cromosomas presentes en un número especificado de células, seguido de un análisis cuidadoso en el patrón de bandeo de cada cromosoma de las células seleccionadas. Analizando entre 20 y 25 metafases para la obtención de un diagnóstico confiable (Swansbury, 2003).

1.1.3 Tipos de cromosomas.

Los cromosomas son estructuras complejas ubicadas en el núcleo de las células, compuestos por cromatina. La cromatina es el conjunto de ADN (35 %), histonas (35 %), otras proteínas no histónicas (20 %) y ARN (10 %) (<http://geneticabioterio.wordpress.com/cromosomas/>).

Un cromosoma es la estructura que resulta del empaquetamiento del ADN y las proteínas previo a la división celular para su segregación posterior en las células hijas. Por lo que es posible observar distintas formas de los cromosomas dependiendo de la fase de la mitosis en las que se encuentren.

Los cromosomas utilizados para estudios de citogenética son los ubicados en la metafase. Los cuales constan de un brazo corto y otro largo, el brazo corto se designa como **p** y el largo como **q**, separados por un estrechamiento o constricción primaria, llamada centrómero (Figura 1).

El centrómero es el punto de unión del huso mitótico y es parte integral del cromosoma. Es esencial para el movimiento y segregación normales del cromosoma durante la división celular

Con frecuencia tienen constricciones secundarias (**NOR**) en los brazos cortos, conectando trozos muy pequeños de ADN llamados **satélites**, que contienen genes que codifican el RNA ribosómico.

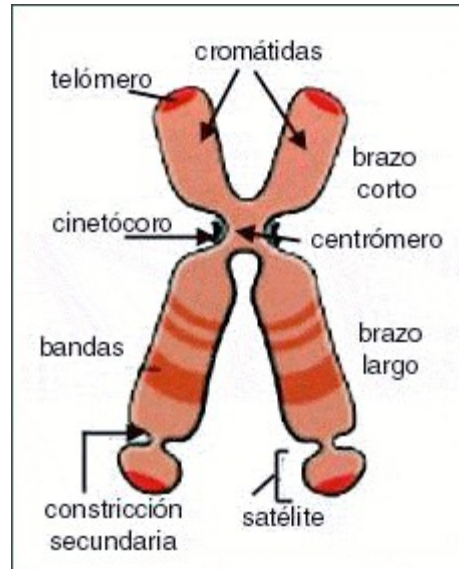


Figura 1. Estructura de un cromosoma metafásico. Tomado de <http://geneticabioterio.wordpress.com/cromosomas/>

Los cromosomas metafásicos presentan cuatro formas básicas (Figura 2) y se clasifican de acuerdo con la longitud de los brazos **p** y **q**, así como por la posición del centrómero en: cromosomas **metacéntricos**, tienen los brazos corto y largo de aproximadamente la misma longitud, y con el centrómero en el punto medio; cromosomas **submetacéntricos**, tienen los brazos corto y largo de longitudes desiguales, y con el centrómero más próximo a uno de los extremos; cromosomas **acrocéntricos**, tienen el centrómero muy cerca de un extremo, y con un brazo corto muy pequeño; los **telocéntricos**, el centrómero está en un extremo del cromosoma y éste tiene un solo brazo.

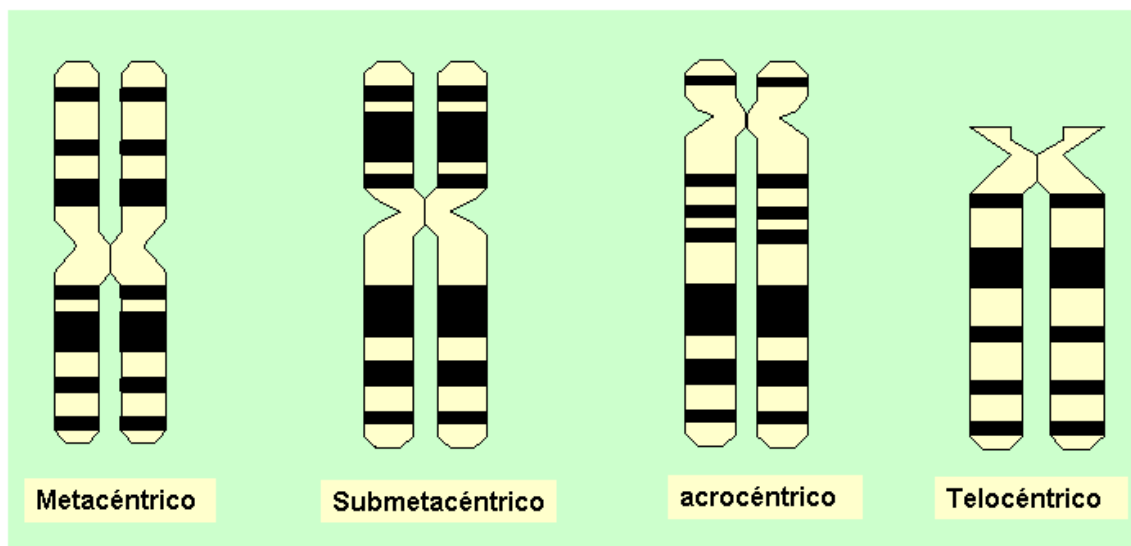


Figura 2. Tipos de cromosomas (metacéntricos) por la posición de los brazo *p* y *q*, y por la del centrómero. Tomado de http://web.educastur.princast.es/proyectos/biogeo_ov/2bch/B4_INFORMACION/T407_CROMOSO MAS/diapositivas/Diapositiva14.GIF

Para realizar un cariograma, los cromosomas se agrupan en 7 grupos (A-G) basados en el orden descendente por tamaños y posición del centrómero (Figura 3) (Shaffer, 2005).

GRUPO	DESCRIPCIÓN
Grupo A 1-3	Cromosomas largos en términos de longitud con centrómeros localizados aproximadamente en el centro. Basados en el tamaño estos 3 cromosomas son los más fáciles de distinguir.
Grupo B 4-5	Cromosomas largos submetacéntricos con un brazo corto más pequeño. Estos son difíciles de distinguir uno de otro sin una técnica de bandedo, pero el cromosoma 4 es ligeramente más largo que el cromosoma 5.
Grupo C 6-12	Es el grupo más difícil de distinguir. Todos los cromosomas son submetacéntricos, de longitud media. El cromosoma X está incluido en este grupo por su tamaño y estructura.
Grupo D 13-15	De tamaño medio con centrómeros en un extremo (acrocéntrico). Estos son fáciles de distinguir de otros grupos pero difíciles de distinguir dentro del mismo grupo. Todos ellos pueden mostrar satélites con considerable variación en longitud y tamaño.
Grupo E 16-18	Cromosomas cortos y un cromosoma metacéntrico (cromosoma 16) y también con cromosomas submetacéntricos (cromosomas 17 y 18).
Grupo F 19-20	Son cromosomas metacéntricos cortos. A menudo pueden ser confundidos con el cromosoma 16.
Grupo G 21-22	Son cromosomas acrocéntricos muy cortos, fáciles de reconocer por su tamaño, pero su distinción de uno de otro es difícil. El cromosoma Y se incluye en este grupo por que su morfología es similar a estos.

Figura 3. Clasificación de los cromosomas en un cariograma.

1.1.3 Obtención de cromosomas.

El análisis de cromosomas se puede realizar de una gran variedad de tejidos, siendo el cultivo de linfocitos un método rápido que provee el número adecuado de células en división (Solari, 2004). El método es relativamente simple, consiste en obtener una muestra de sangre con una jeringa heparinizada, para evitar la coagulación de la sangre. Este procedimiento se debe de hacer en condiciones de esterilidad.

Para la proliferación de los linfocitos es necesario cultivarlos en un medio de cultivo especial a base de suero de ternera y estimuladas mediante la adición de un agente mitogénico como la fitohemaglutinina, la cual va inducir la división celular. Para detener la división celular y obtener la mayor cantidad de metafases, se utiliza colchicina, que es un agente que evita la polimerización del huso mitótico (Thompson, 2008).

Las preparaciones deben de tener una adecuada dispersión de los cromosomas, los cuales no deben de aparecer encimados, para esto, se agrega un solución hipotónica de Cloruro de Potasio (KCl) Esta solución hace que las células se expandan, de modo que los cromosomas se extiendan y puedan examinarse individualmente. El tiempo que se exponen las células a la solución hipotónica es crucial (Rodríguez, 2005).

Las muestras son fijadas con solución Carnoy (metanol-ácido acético, a una proporción de 3:1) para posteriormente la muestra sea goteada sobre un portaobjetos y se tiñen con Giemsa (Solari, 2004).

2. Objetivo.

Estandarizar una técnica para la obtención de cromosomas a partir del cultivo de linfocitos humanos de sangre donada por alumnos del CCH Naucalpan.

2.1 Objetivos particulares

- Determinar el número cromosómico de los cariotipos obtenidos.
- Observar los diferentes grados de compactación de presentan los cromosomas en las muestras obtenidas

3. Problema.

La obtención de cariotipos de cualquier organismo vivo, es fundamental como parte de su caracterización biológica, ya que nos permite conocer el número y el tipo de cromosomas que posee; en estudios de evolución, nos ayudan a entender la historia evolutiva –a nivel molecular– del organismo. En el caso del hombre, los cariotipos tienen una importancia médica ya que permiten hacer un diagnóstico referente a anomalías numéricas y estructurales sobre todo en estados prenatales. Sin embargo, en la actualidad este tipo de estudios son demasiados costosos por lo que la observación de cromosomas se reduce a otros tipos de organismos y no al de los humanos por lo que es prioritario mostrar la importancia y la utilidad de los cromosomas por lo que en el presente trabajo se da a conocer el método de cultivo de linfocitos humanos, para la obtención de cromosomas ajustados a las condiciones del SILADIN.

4. Desarrollo.

4.1 Toma de la muestra de sangre.

Se tomaron 5 muestras de sangre (de alumnos del CCH-Naucaupan) con jeringas de 5 ml. Cada jeringa contenía 0.3 ml de heparina (1000 U). Se obtuvieron 3 ml de sangre venosa de cada individuo. Este procedimiento se realizó en condiciones asépticas.

4.2 Siembra de las muestras de sangre.

Las muestras de sangre obtenidas fueron sembradas en tubos para centrifuga (15 ml) que contenía 5 ml de medio de cultivo PB-MAX: karyotyping médium (GIBCO). Se colocó 0.8 ml de sangre (13 gotas) en condiciones de esterilidad (con la ayuda de un par de mecheros). Los tubos se etiquetaron con el nombre del donante y se incubaron, en posición horizontal, por 72 horas a 37° C en una estufa bacteriológica.

4.3 Cosecha de linfocitos.

Pasadas las 72 horas, se sacaron los tubos de la estufa bacteriológica y a cada uno se le adiciono dos gotas de colchicina (1 ng/ml) y las muestras se volvieron a incubar por 30 minutos a 37° C para detener las células en metafase.

Transcurridos los 30 minutos se sacaron (de la estufa bacteriológica) los tubos y se centrifugaron a 2000 rpm por 10 minutos. Posteriormente se removió el sobrenadante y se agrego lentamente y con agitación 8 ml de una solución de Cloruro de Potasio (0.075M) y se volvieron a incubar por 20 minutos a 37° C.

Pasados los 20 minutos, a cada tubo se le agrego 1 ml del fijador Carnoy (metanol-ácido acético 3:1). Se resuspendieron las muestras con pipetas Pasteur para desintegrar los grumos; los tubos se incubaron por 20 minutos a 4° C. Después se centrifugaron por 10 minutos a 2000rpm para eliminar todos los eritrocitos. Este procedimiento se realizó las veces necesarias hasta que el botón celular sea blanco.

4.4 Elaboración de las laminillas de linfocitos.

Se elaboraron las preparaciones tomando una pequeña cantidad de material del tubo –previamente resuspendido con la pipeta–. Se dejaron caer tres o cuatro gotas del material celular sobre la superficie de un portaobjetos limpio con una capa de agua fría. Se sopló débilmente por uno de los extremos del portaobjetos e inmediatamente se pasó por la flama de un mechero. Las preparaciones se dejaron secar a temperatura ambiente en posición inclinada.

4.5 Tinción de las laminillas.

Las laminillas se tiñeron en un vaso coplin que contenía colorante Giemsa. Previamente se preparó el colorante añadiendo 48 ml de Buffer Gurr y 8 ml de Giemsa. Las preparaciones se tiñeron por 20 minutos, posteriormente se lavaron con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente.

4.5.1 Tren de bandeado para Bandas G.

Se preparó un tren de bandeado que consistió en:



- I. Un vaso coplin con 50 ml de solución salina (NaCl, 0.9%).
- II. Un vaso coplin con 50 ml de solución salina y 2ml de tripsina (pH=8). Para ajusta el pH se utilizó una solución de bicarbonato de sodio (7.5%).
- III. Un vaso coplin con agua destilada.
- IV. Un vaso coplin con colorante Giemsa preparado.
- V. Un vaso coplin con agua destilada.

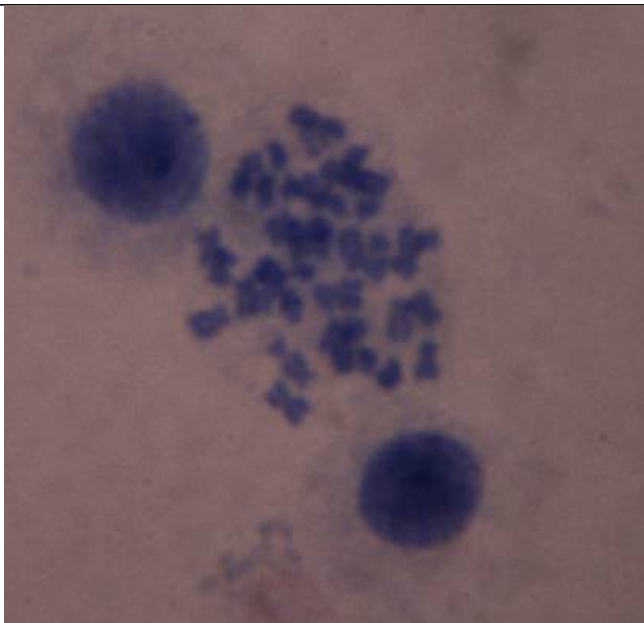


Las laminillas que fueron sometidas al tren de bandeado se maduraron previamente dejándolas deshidratar por 24 horas a 60° C. Se colocaron en el vaso coplin con solución salina por 1 minuto; después, se intrudujeron al vaso que contenía tripsina por 1:30 minutos; posteriormente, se enjuagaron en agua destilada y después se tiñeron en el colorante (Giemsa) por 20 minutos; finalmente se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar.


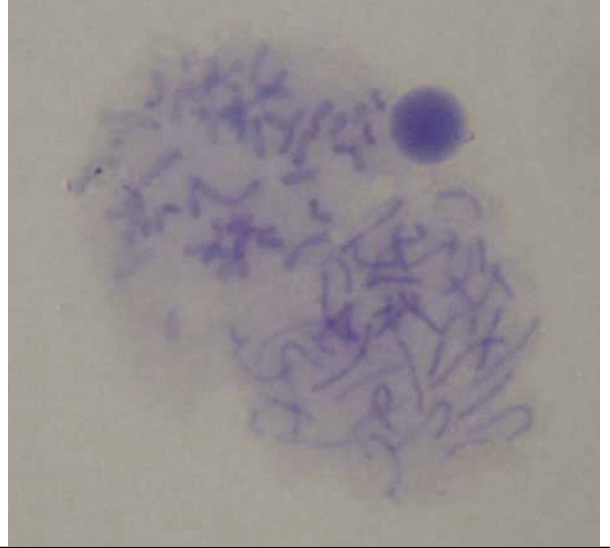
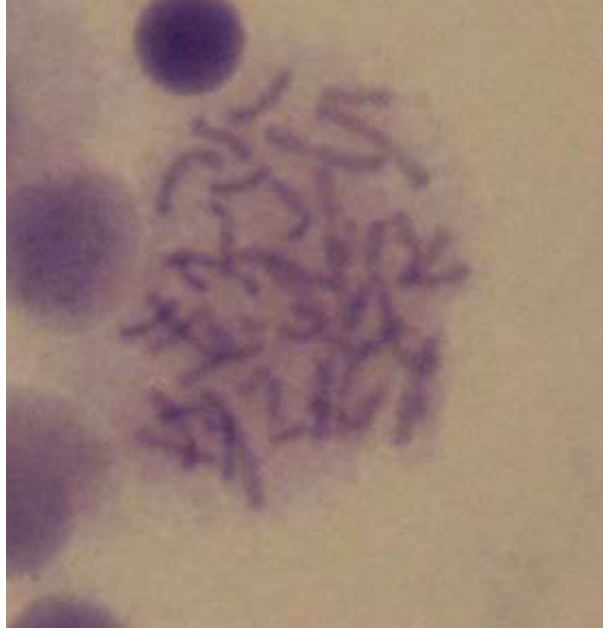
5. Resultados.

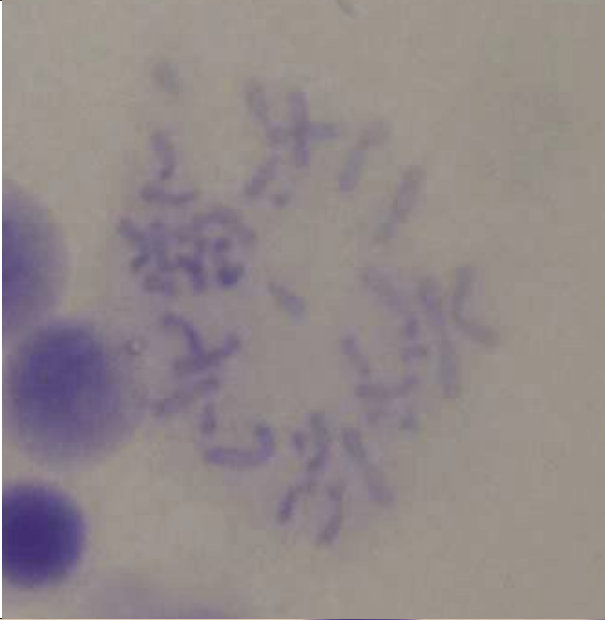

La técnica utilizada en este trabajo fue estandarizada bajo las condiciones del SILADIN. Lo más importante del trabajo fue tratar de obtener preparaciones de buena calidad, donde los cromosomas se encuentren extendidos y sea fácil su observación. Cabe hacer notar que en algunas preparaciones no se contabiliza el número correcto de cromosomas debido a que algunos de ellos se superponen y esto dificulta el conteo.


A continuación se muestra los cariotipos obtenidos de los 5 donantes de sangre.

Nombre	Sexo	Tinción	No. de cromosomas	Cariotipo
Sujeto 1	Masculino	Bandas G	45	
Sujeto 1	Masculino	Bandas G	41	

Sujeto 2	Femenino	Giemsa	46	
Sujeto 2	Femenino	Giemsa	46	
Sujeto 3	Femenino	Giemsa	40	

Sujeto 3	Femenino	Giemsa	40	
Sujeto 4	Femenino	Giemsa	46. Se observan cromosomas metafásicos y profásicos.	
Sujeto 4	Femenino	Giemsa	46	

Sujeto 5	Femenino	Giemsa	38	
Sujeto 5	Femenino	Giemsa	34	

Sujeto 5	Femenino	Giemsa	40 y 44 Se observan dos cariotipos.	
----------	----------	--------	-------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------

6. Discusión.

En este trabajo, se obtuvieron distintos cariotipos de los diferentes donantes de sangre, en los que se observan distintos grados de compactación de los cromosomas, así como un número variable de estructuras cromosómicas en cada organismo; esto se debe a los tiempos de exposición de la solución de colchicina y de la solución hipotónica (Thompson, 2008). La primera solución sirve para detener la división mitótica en metafase, sin embargo, la solución no detuvo a todas las células por igual y se observan cromosomas profásicos y metafásicos como en el cariotipo del sujeto 4, en el cual se observan dos cariotipos de distinto tamaño. El tiempo de exposición a esta sustancia fue de 30 minutos pero para garantizar un mayor número de células en metafase algunos autores como Solari AJ. (2004) señalan que es conveniente exponer a los linfocitos por más tiempo a la colchicina.

Por otra parte, el tiempo de exposición de la solución hipotónica, la cual se utilizó para hinchar a las células del cultivo, es crucial para la correcta expansión de los cromosomas (Rodríguez, 2005). El tiempo de exposición de la solución hipotónica fue de 20 minutos y en algunos cariotipos, los cromosomas no se extienden tanto, ocasionando que algunos cromosomas se encuentren encimados y no fueran completamente visibles

El conteo de cromosomas de cada uno de los cariotipos muestra una variación en el número de ellos. Esto no quiere decir que los sujetos presenten una pérdida de cromosomas o algún tipo de trastorno cromosómico, ya que los donantes de sangre presentan un fenotipo promedio y un buen estado de salud, así que las variaciones se debe al tiempo de exposición de las sustancias mencionadas. Por lo que se propone probar diferentes tiempos de exposición de la colchicina y de la solución hipotónica para obtener cromosomas metafásico y extendidos de fácil conteo.

7. Conclusión.

- Se estandarizo una técnica para el cultivo de linfocitos y la obtención de cariotipos humanos.
- Se logró cuantificar el número de cromosomas de los diferentes individuos, sin embargo, no en todos los cariotipos se pudo contar el número completo de cromosomas.
- Se lograron observar diferentes grados de compactación de cromosomas.
-

8. Fuentes de información.

- 1) Cremer T, Landegent J, Bruckner A, et. al. Detection of chromosome aberrations in the human intherphase nucleus by visualization of specific target DNAs whit radioactive and non-radioactive insitu hybridization techniques: detection of trisomy 18 whit probe L1.84. **Human Genetics**, 74, 346-352, 1986.
- 2) Galan GE. (2002) **Aplicaciones de laboratorio de citogenetica a la clinica. Pediatrica Integral**; 6(9): 820-830
- 3) Langer PR, Waldrop AA, Ward DC. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. **Proc Natl Acad Sci USA**. 78: 6633-6637, 1981.

- 4) Puerto NS. (2001). **Relación entre heterogeneidad intragenómica y formación de aberraciones cromosómicas**. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, España.
- 5) Rodríguez AR. (2005). **“Manual de prácticas de genética y cuaderno de trabajo”**. 1ª Edición. UNAM. México. pp. 80,155.
- 6) Shaffer LG. (2005). **“ISCN 2005: An international system for human cytogenetic nomenclature (2005): recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature”**. Editorial Karger Publisher. pp. 6,7,13.
- 7) Solari AJ. (2004). **“Genética Humana: Fundamentos y Aplicaciones en Medicina”**. 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. pp. 376.
- 8) Swansbury J. (2003). **Cáncer Cytogenetics Methods and protocols**. Volumen 220. Editorial Human Press. USA. pp. 152-154,260.
- 9) Thompson y Thompson (2008) **Genética en medicina**. Editorial Saunders. 584 pp.

Cibergrafía.

- Cromosomas en:
<http://geneticabioterio.wordpress.com/cromosomas/>
Consultado el 20 de marzo de 2014.
- Estructura de un cromosoma metafásico en:
<http://geneticabioterio.wordpress.com/cromosomas/>
Consultado el 20 de marzo de 2014
- Tipos de cromosomas (metacéntricos) por la posición de los brazos **p** y **q**, y por la del centrómero en:
http://web.educastur.princast.es/proyectos/biogeo_ov/2bch/B4_INFORMACION/T407_CROMOSOMAS/diapositivas/Diapositiva14.GIF
Consultado el 20 de marzo de 2014.