

LABORATORIO DI CITOGENETICA MEDICA

Vincenzo Aiello

Ferrara, 2020

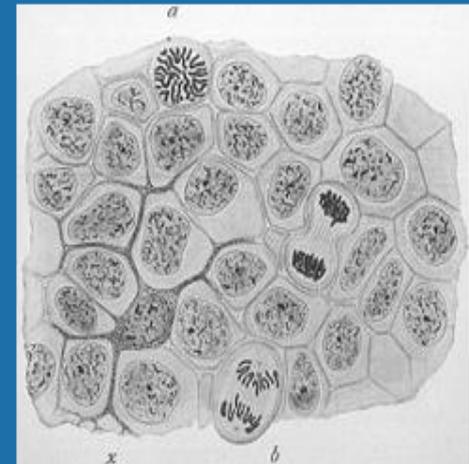


Storia della citogenetica



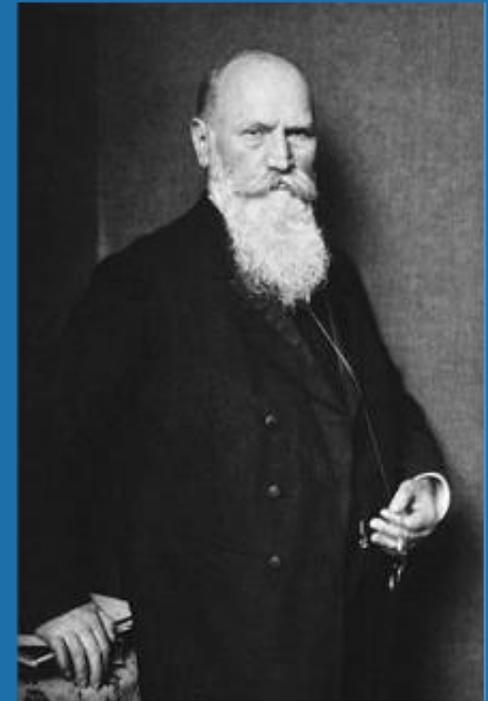
Walther Flemming

Nel 1882, Flemming descrive la divisione cellulare. Si rende conto della presenza di corpicioli a forma di bastoncino (chiamati successivamente cromosomi da Waldeyer nel 1888), introducendo il termine mitosi. E per la prima volta (grazie a particolari tecniche di colorazione) evidenzia nel nucleo delle cellule la presenza di una massa filamentosa, detta cromatina.



Wilhelm Waldeyer

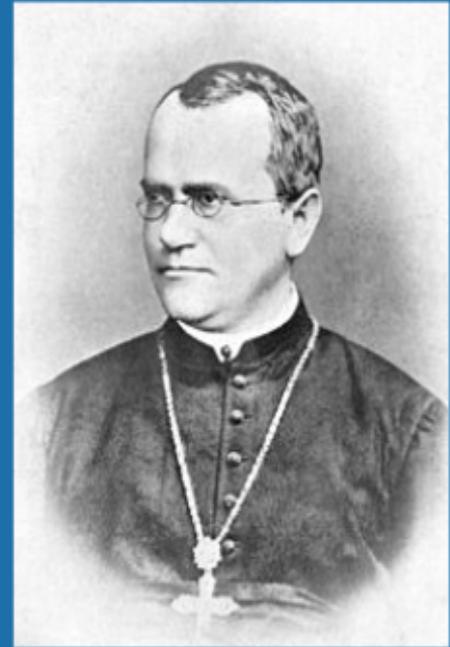
Docente di anatomia all'università di Strasburgo e poi all'università di Berlino, è noto per aver coniato i termini *cromosoma* (1888) e *neurone* (1891). Il suo nome è inoltre legato all'anello linfatico che da lui prende il nome. Inoltre, prende il suo nome anche la linea di Farre-Waldeyer che segna la fine del mesovario a favore della tonaca propria dell'ovario. Fu professore all'Università di Berlino di Friedrich Wilhelm Kopsch.



Gregor Johann Mendel

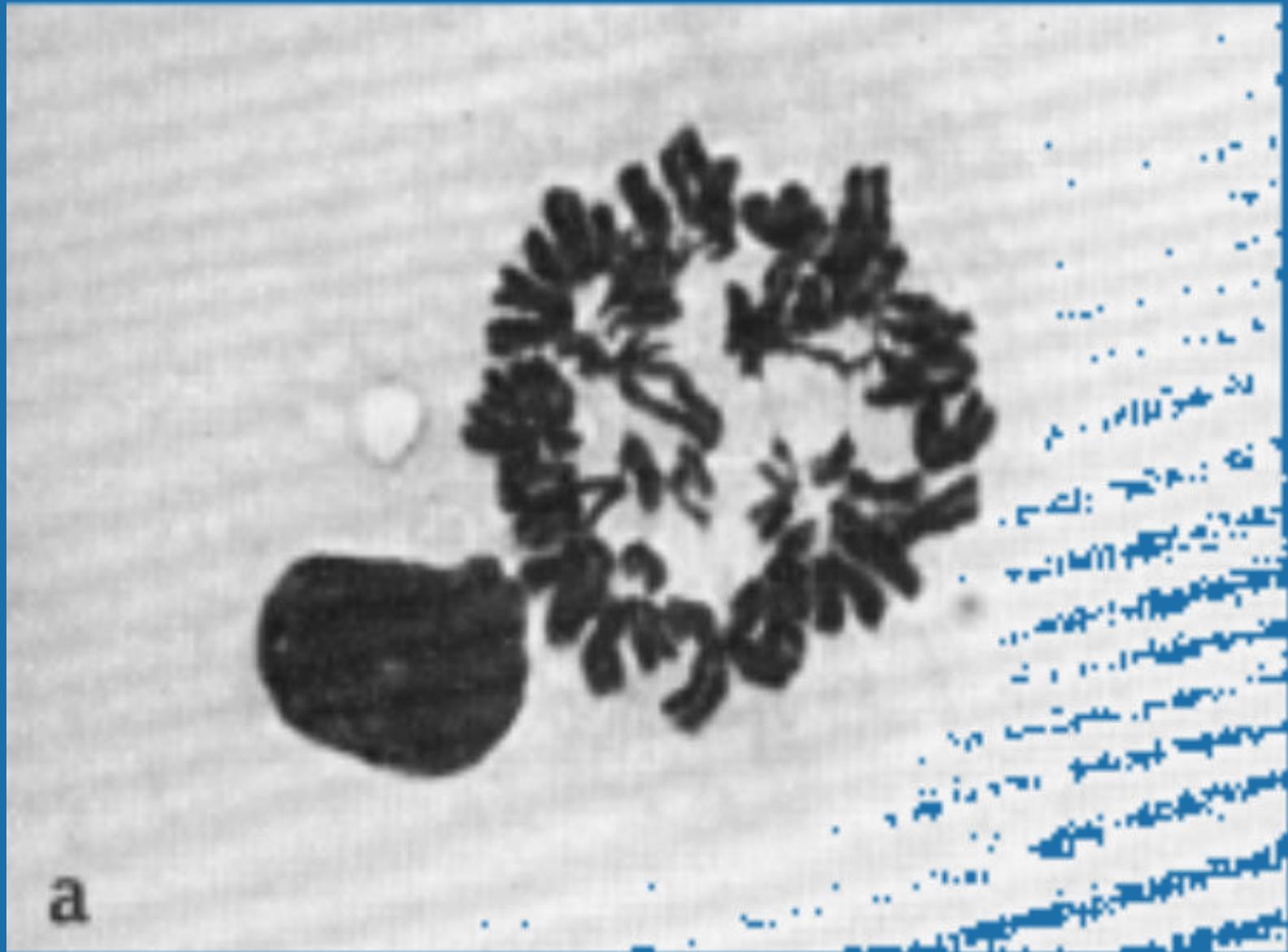
Riscoperta di Mendel. Sutton e Boveri:
teoria cromosomica dell'ereditarietà.

Nel 1902 l'americano Walter Sutton (1877-1916) e il tedesco Theodor Boveri (1862-1915) evidenziando con opportune colorazioni dei corpuscoli intracellulari osservano che questi, chiamati poi cromosomi, si comportano in accordo con gli ipotetici agenti ereditari proposti da Mendel.



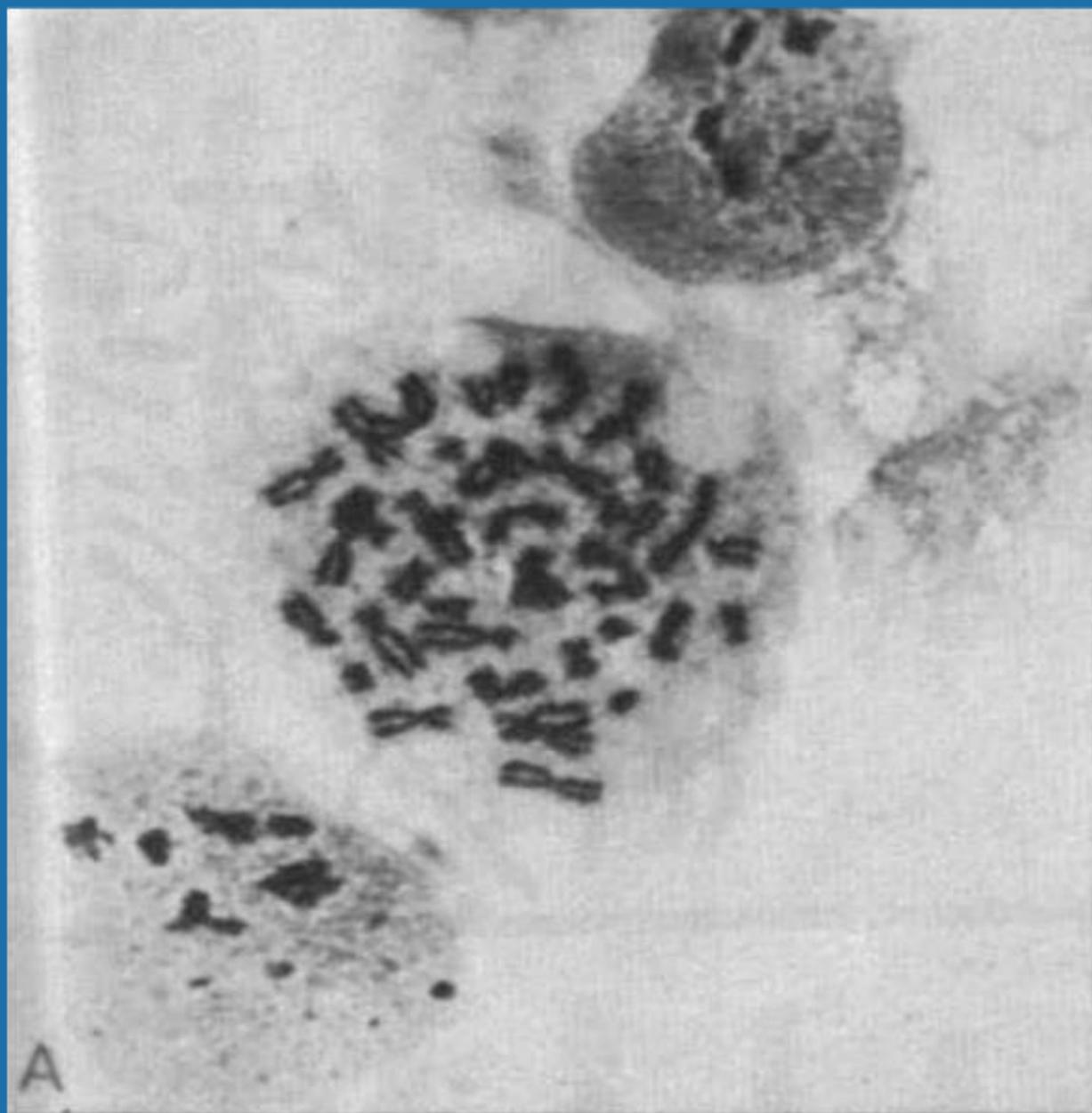
Hynčice, 22 luglio 1822[1] – Bmo, 6
gennaio 1884

1950- Studi su sezioni di testicoli
(48 cromosomi)



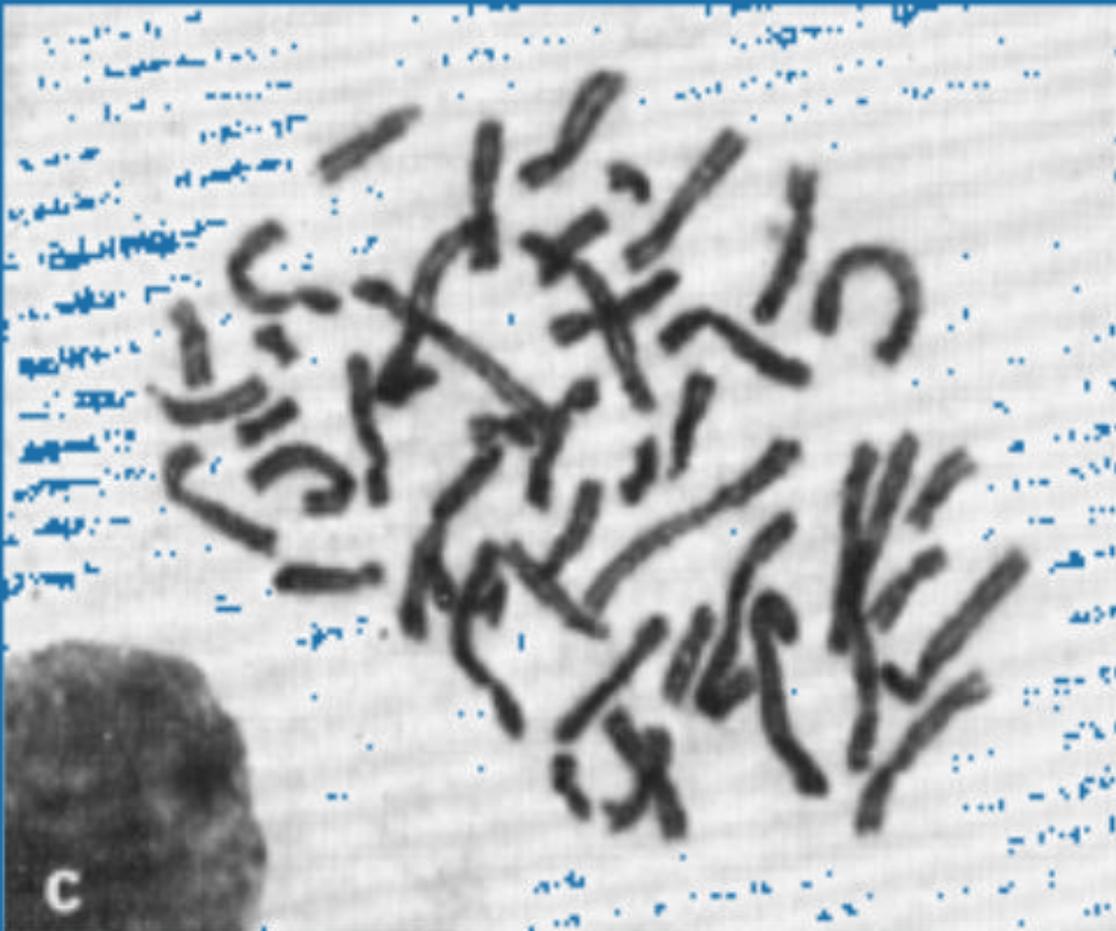
...il cariotipo dell'uomo è di 48
cromosomi...?!

1952-Soluzione ipotonica (T.C.Hsu) (48 cromosomi)

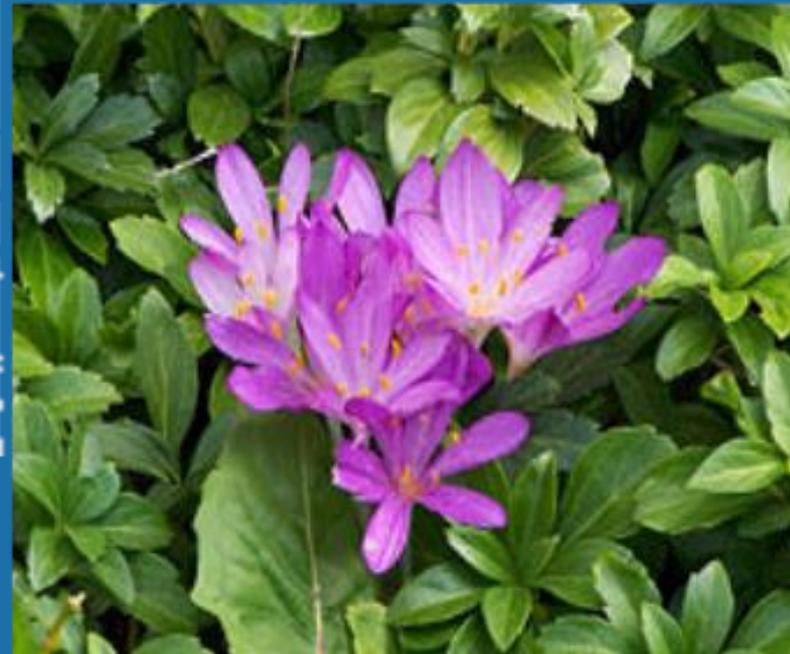


1955

Ford e Hamerton: colchicina



Colchicum autumnale

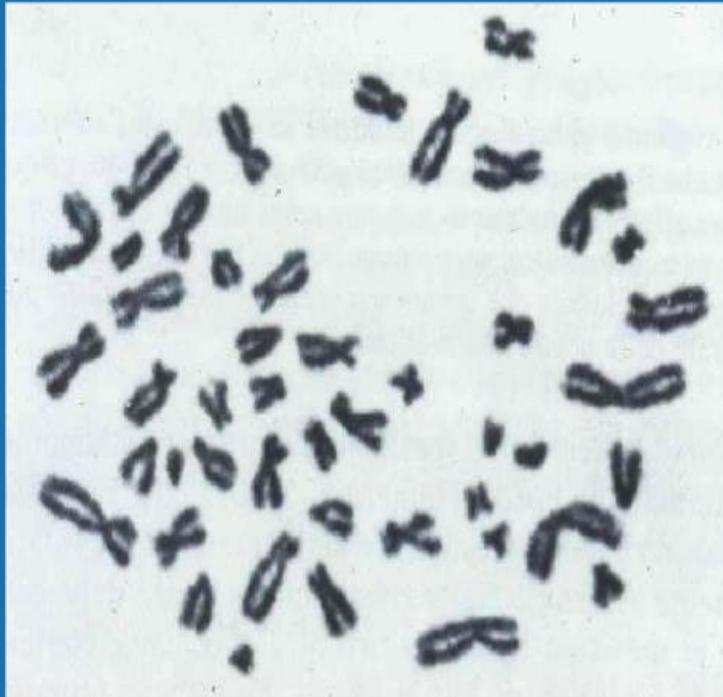


.....22 dicembre 1955



Università di Lund
Svezia

1956

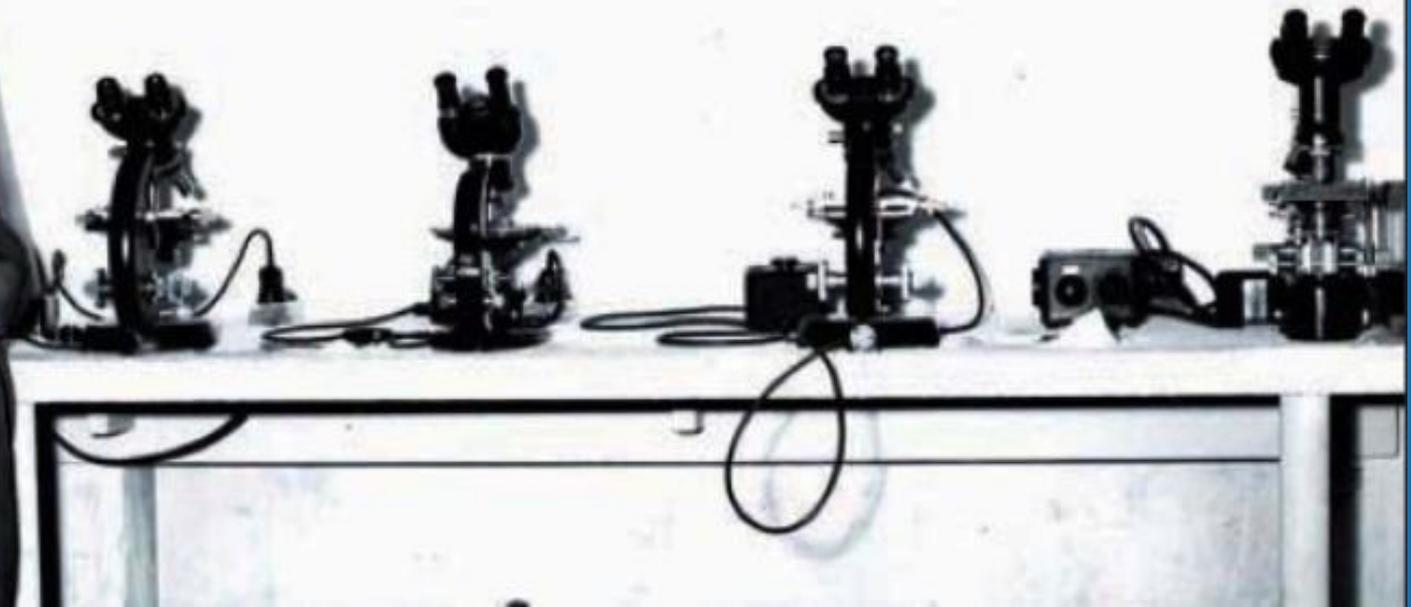


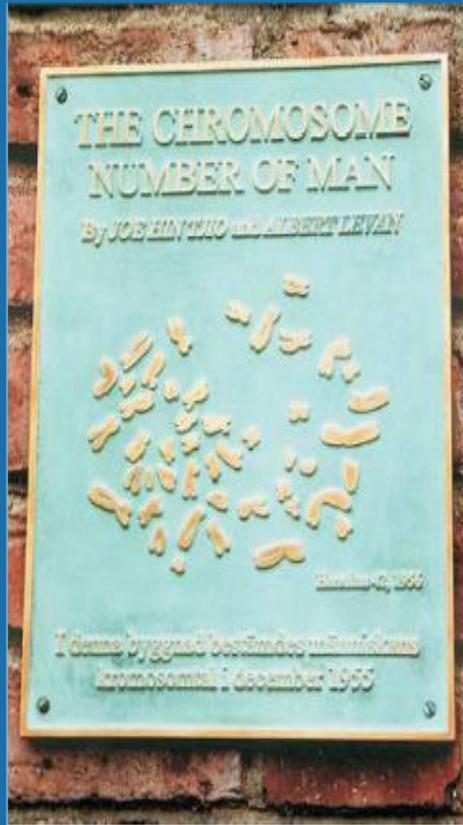
- Utilizzando tecniche di coltura *in vitro*, fu stabilito nel 1956 da Joe Hin Tjio e Albert Levan che il numero cromosomico dell'uomo è di 46, cioè 22 coppie, di cui ogni cromosoma è detto autosoma e 1 coppia di cromosomi sessuali.

- J. H. Tjio and A. Levan, *The chromosome number of man.* *Hereditas*, 42, 1-6, 1956

JOE HIN TJIO,
SPAIN.

JOE HIN TJIO, M.D., is a Senior Lecturer in the Department of Microbiology and Immunology, University of California, San Diego. He is also a Senior Lecturer in the Department of Pathology, University of California, San Diego. He is a member of the American Society for Microbiology and the American Society for Cell Biology. He is also a member of the American Society for Cell Biology. He is also a member of the American Society for Cell Biology.





I magici 46 cromosomi
immortalati su una targa
di bronzo all'Università di Lund



Tjio accepts a trophy from President JF Kennedy
on Dec. 6, 1962, honoring him as an International
Prize Award winner of the JP Kennedy, Jr.
Foundation.

THE CHROMOSOME NUMBER OF MAN.
By Joe Hin *Tjio* and Albert *Levan*, *Hereditas* 42, 1-6 (1956)

NEI LABORATORI SI APRE UN NUOVO
CAMPO D' INDAGINE:
LA CITOGENETICA DELL' UOMO

Lejeune J. et al. (1959):

E'tudes des chromosomes somatique de neuf enfants mongoliens.

C R Acad Sci (D) (Paris).248:1721-1722, 1959

Jacobs PA., Strong JA. (1959):

A case of human intersexuality having a possible XXY determining mechanism.

Nature 183:302-303, 1959

Ford et al. (1959):

A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome).

Lancet, Apr 4;1(7075):711-3,1959.







Storia della citogenetica

1959 Sindromi: +21; XO; XXY

1960 Denver Conference:

- J. Lejeune: trisomy 21 and Down syndrome
- P. Jacobs: XXY karyotype and Klinefelter syndrome
- C. Ford : XO karyotype and Turner syndrome

1960 P. Nowell: PHA per coltura linfociti

1960 Cromosoma Philadelphia

1966 Conferenza di Denver



1-3 gruppo A



4-5 gruppo B



X-6-12 gruppo C



13-15 gruppo D



16-18 gruppo E



19-20 gruppo F



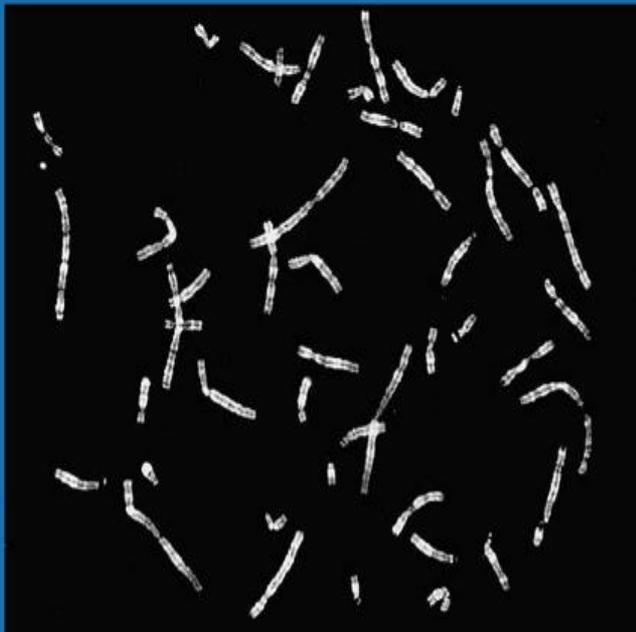
Y-21-22 gruppo G

STRUTTURA DEI CROMOSOMI DELL'UOMO



TECNICHE DI BANDEGGIO

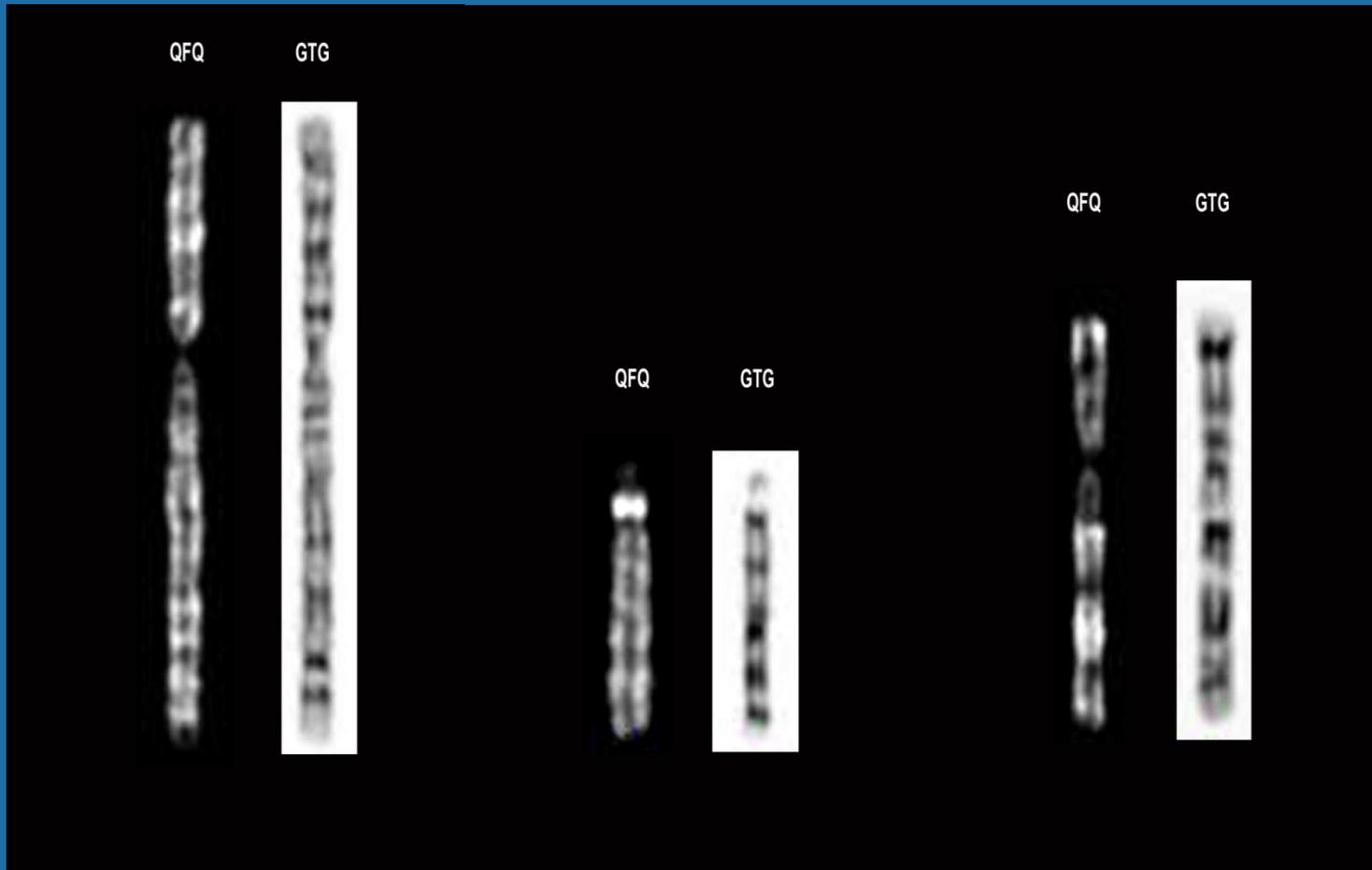
QFQ, Casperson (1970)



GTG, Seabright (1971)

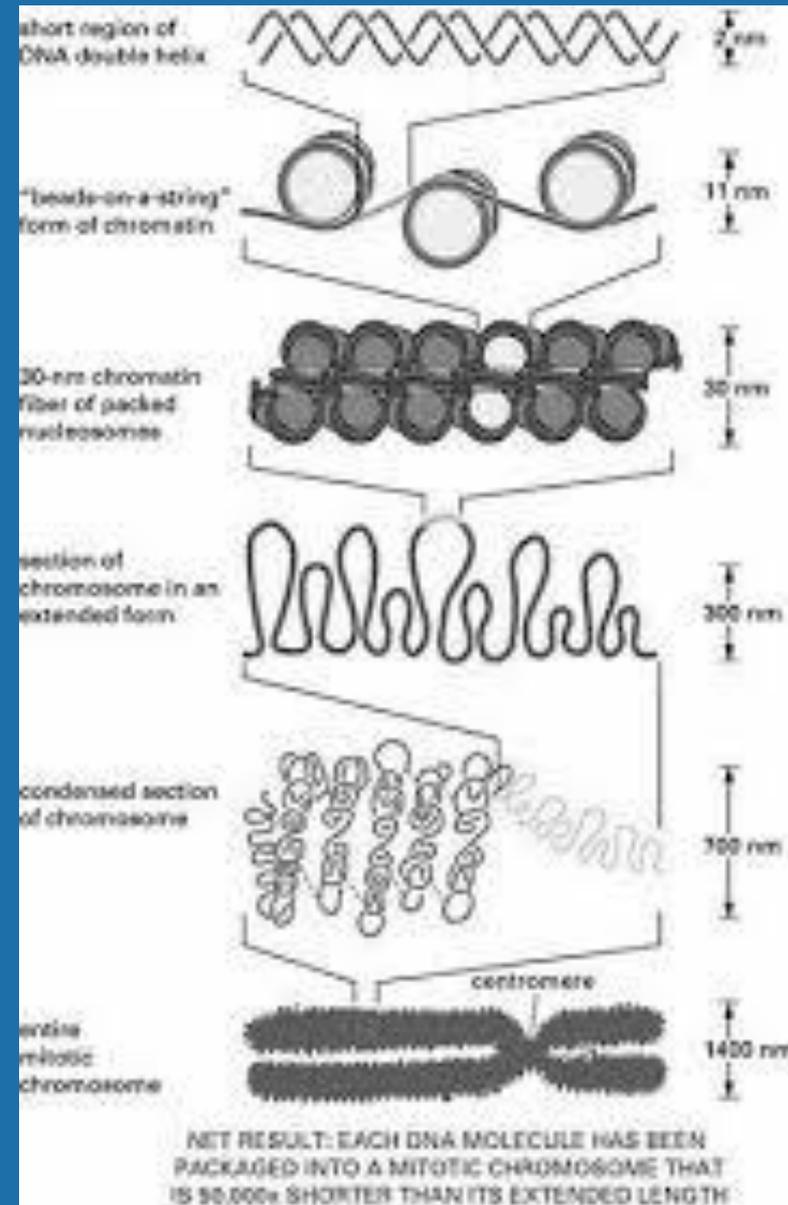


I cromosomi sono analizzabili banda per banda



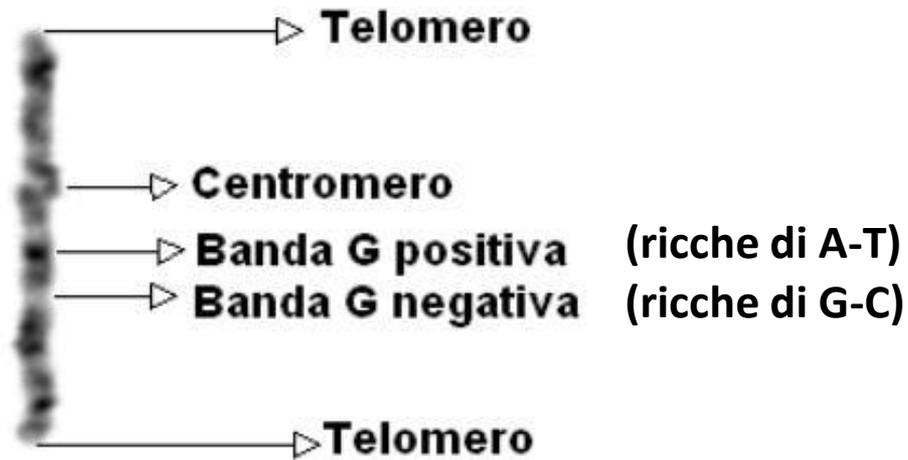
Cosa sono i cromosomi ?

- Portatori di informazioni.
- Ogni cromosoma deve contenere tre elementi essenziali: centromero, telomeri, origini di replicazione.
- Il DNA è ripiegato secondo un pattern preciso.
- Il cromosoma che analizziamo è quello metafasico.

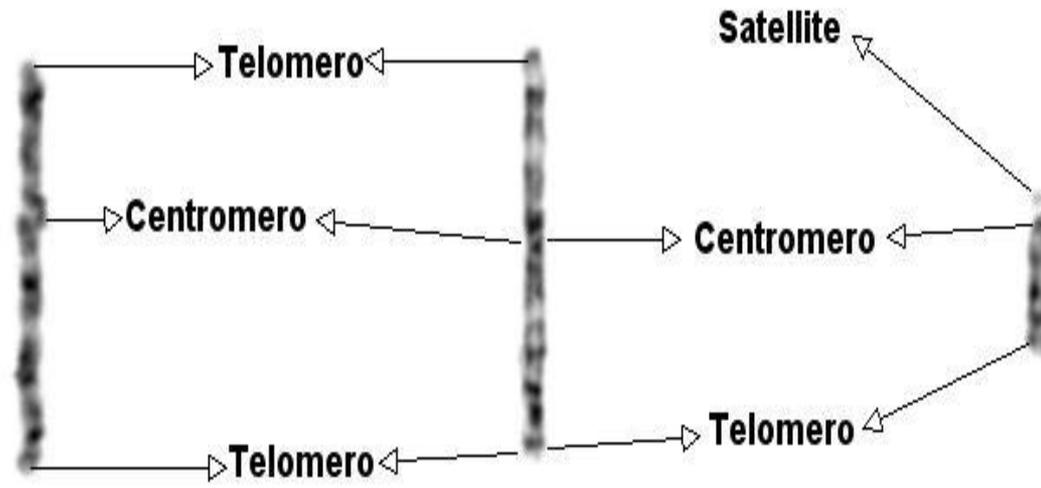




Anatomia del cromosoma



Rappresentazione di cromosomi in metafase

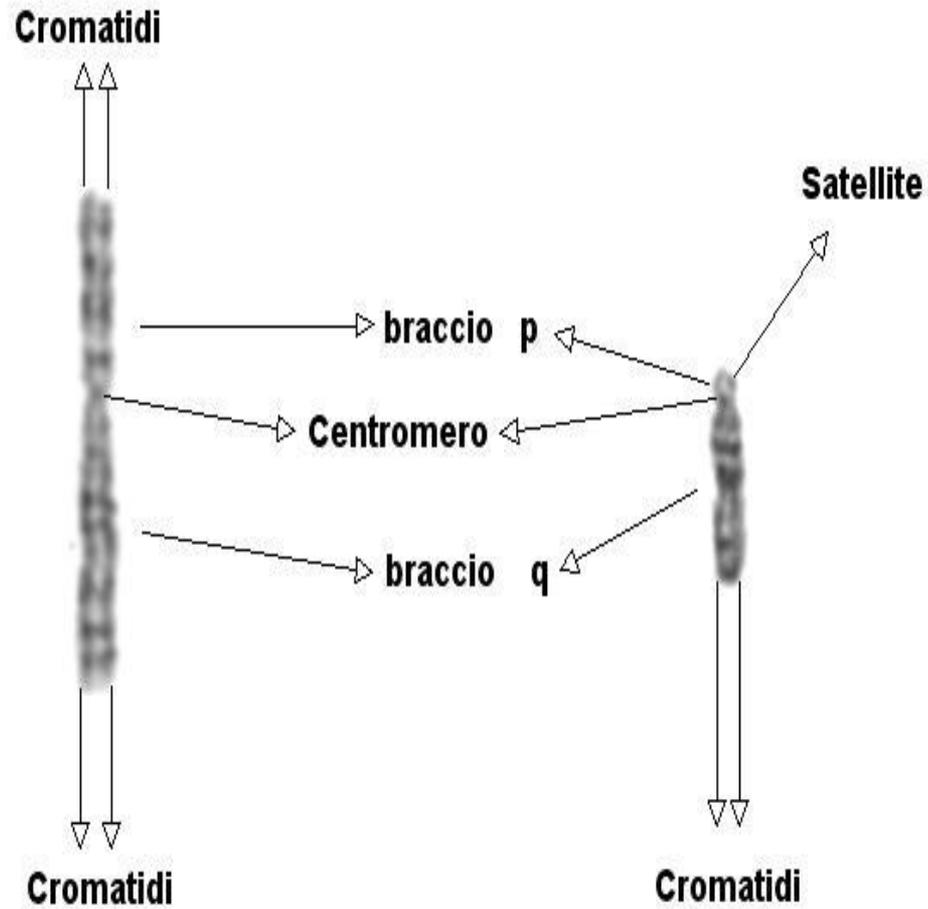


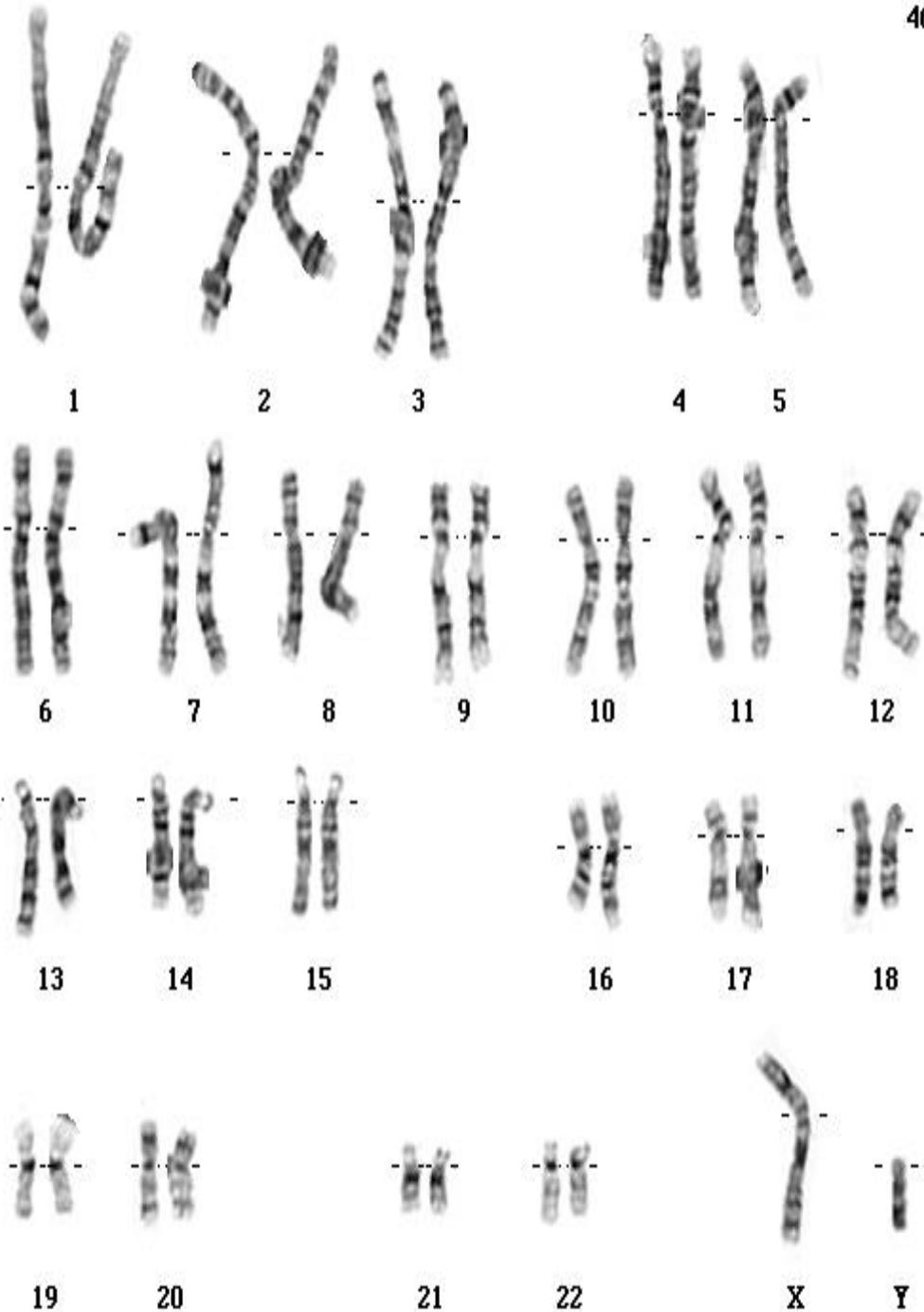
Submetacentrico

Metacentrico

Acrocentrico

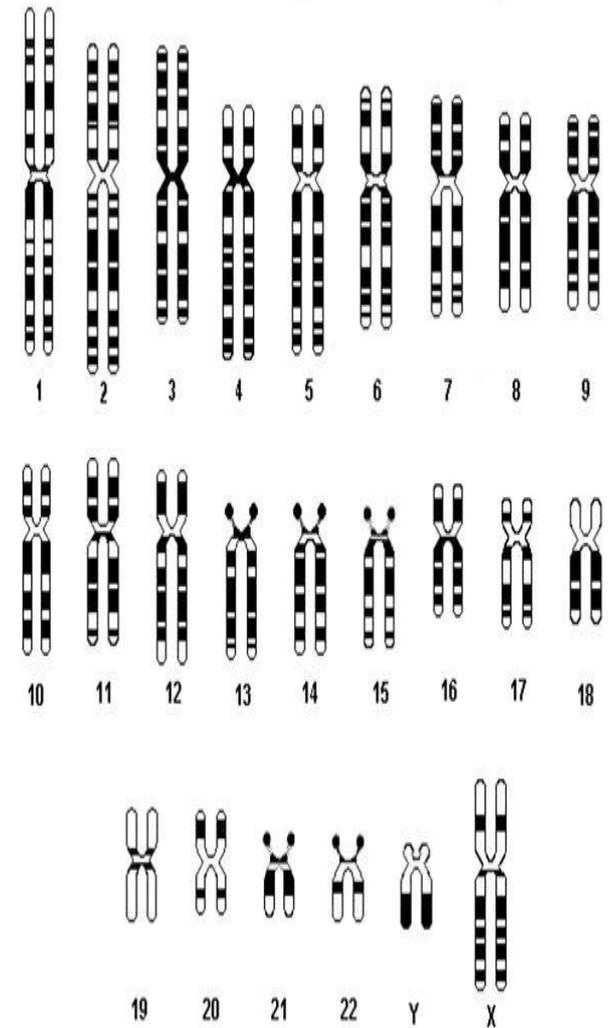
Rappresentazione cromosomi umani





Analisi convenzionale (microscopio ottico)

ideogrammi



p = braccio corto
q = braccio lungo

numerazione delle bande dal
centromero al telomero

L'OGGETTO DA OSSERVARE VIENE POSTO SU DI UN VETRINO (PORTAOGGETTO) ED EVENTUALMENTE COPERTO CON UN VETRINO PIU' SOTTILE (COPRIOGGETTO).

CULARI

OBIETTIVI

TAVOLINO DI APPPOGGIO DEL VETRINO:

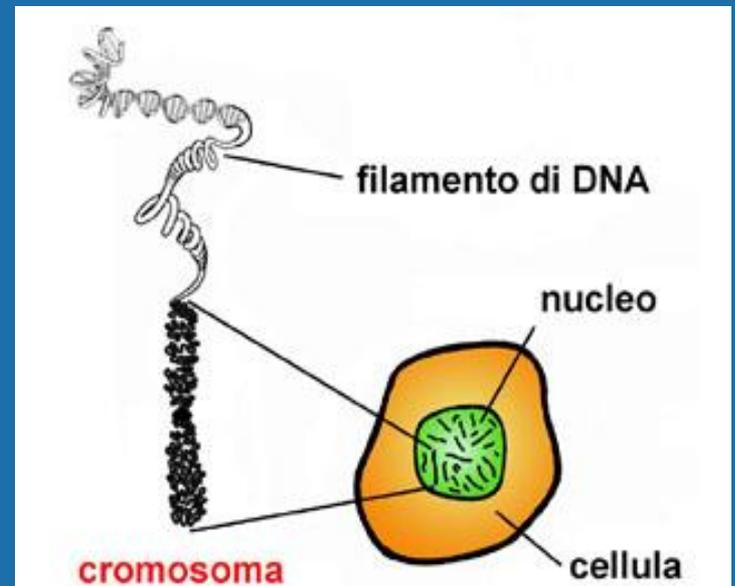
FONTE LUMINOSA

NOTA CHE IL PREPARATO VIENE ILLUMINATO DAL BASSO, CIOE' VIENE OSSERVATO PER TRASPARENZA ("CONTRO LUCE")

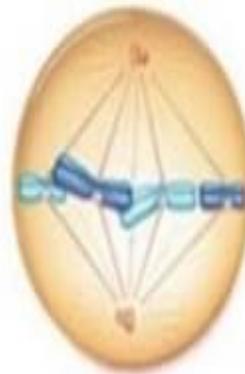
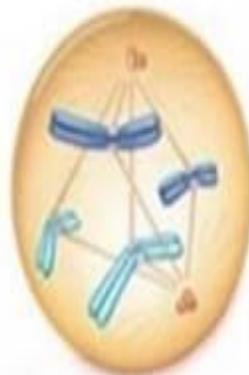
6:01PM

MICROSCOPIO

.....visualizzazione dei cromosomi in metafase.....



MITOSI



Profase

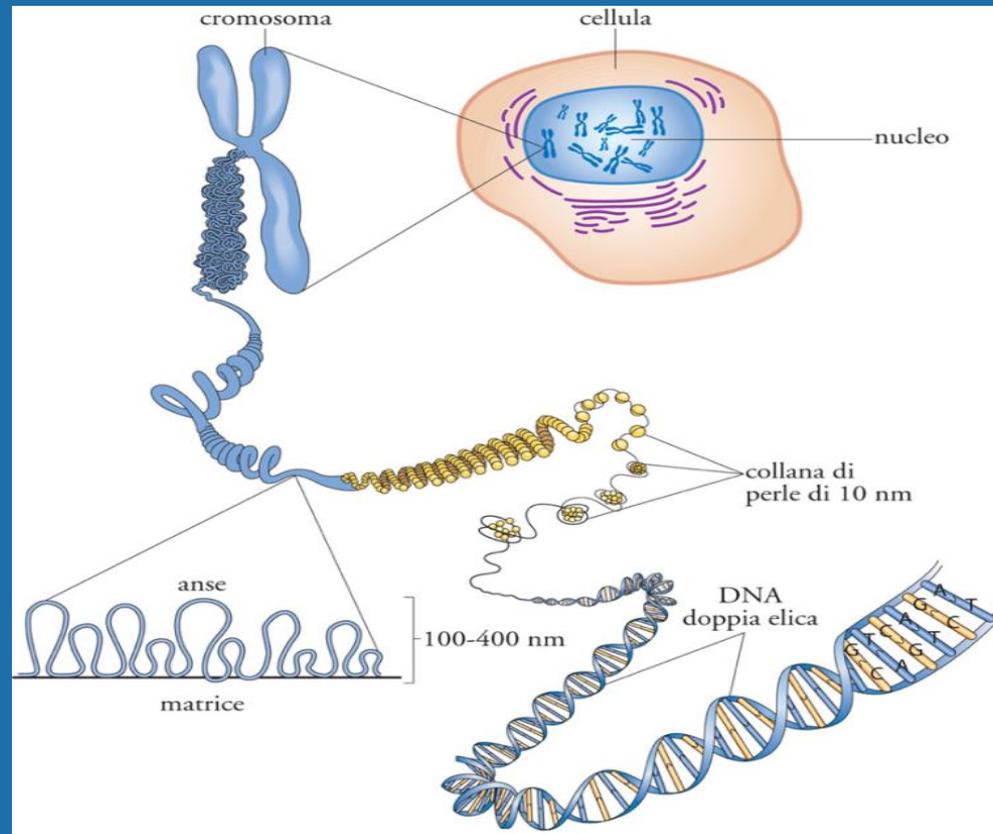
Prometafase

Metafase

Anafase

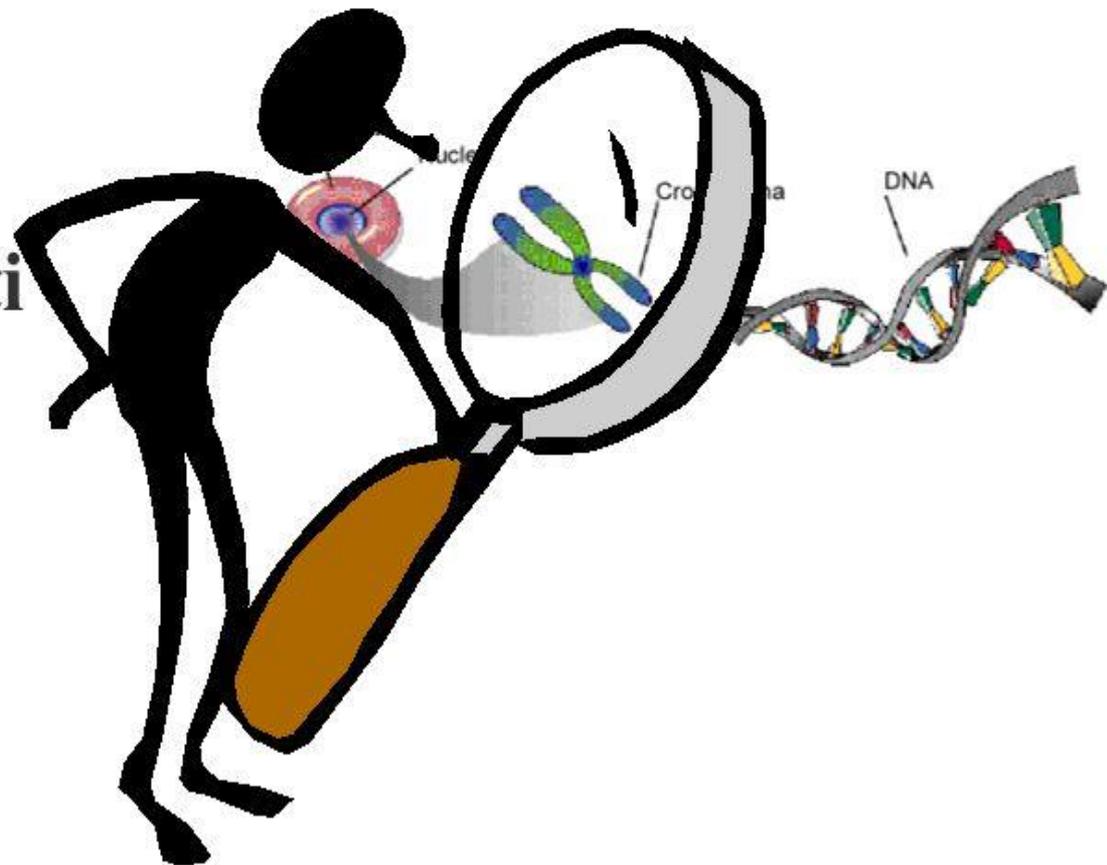
Telofase

Perché si studiano i cromosomi?

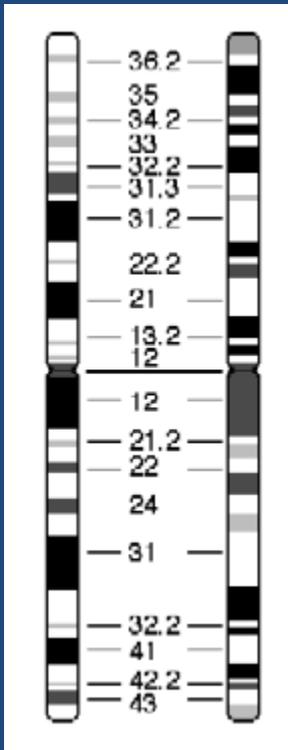


La Citogenetica Classica

- Permette di identificare riarrangiamenti cromosomici coinvolgenti non meno di 5 Mb.



Aspetti metodologici



Per indagini citogenetiche si intendono le analisi che consentono lo studio dell'assetto cromosomico delle cellule e quindi del ***cariotipo***.

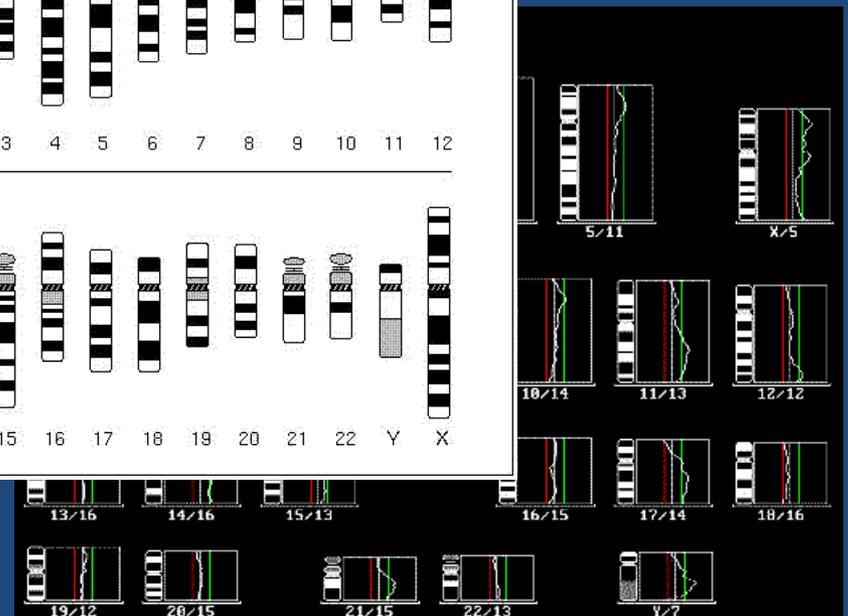
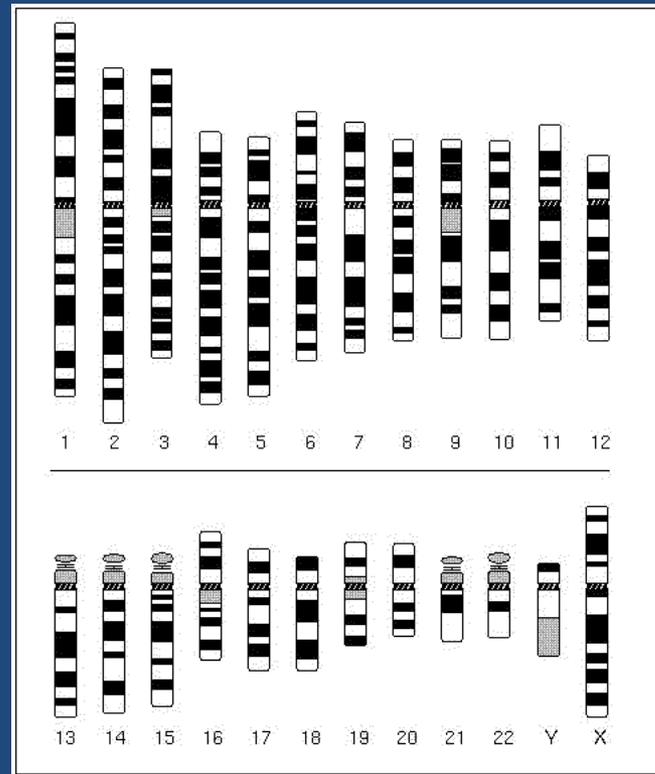
In seguito a mutazioni il cariotipo può modificarsi nel numero o nella morfologia dei cromosomi che lo costituiscono, dando così origine alle:

anomalie numeriche o aneuploidie;

anomalie strutturali.

Anomalie cromosomiche

- Quali e cosa sono
- la loro frequenza



Quali sono le anomalie cromosomiche

Di numero

trisomie

monosomie

Triploidie (69)

Tetraploidie (92)

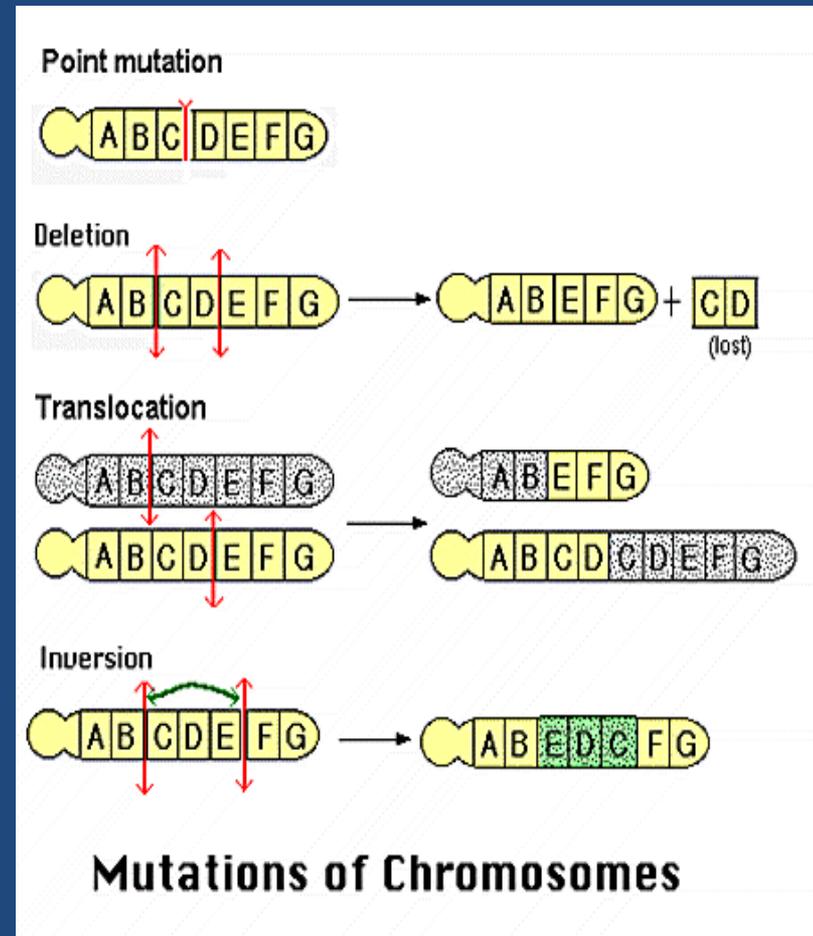
Di struttura

traslocazioni

inversioni

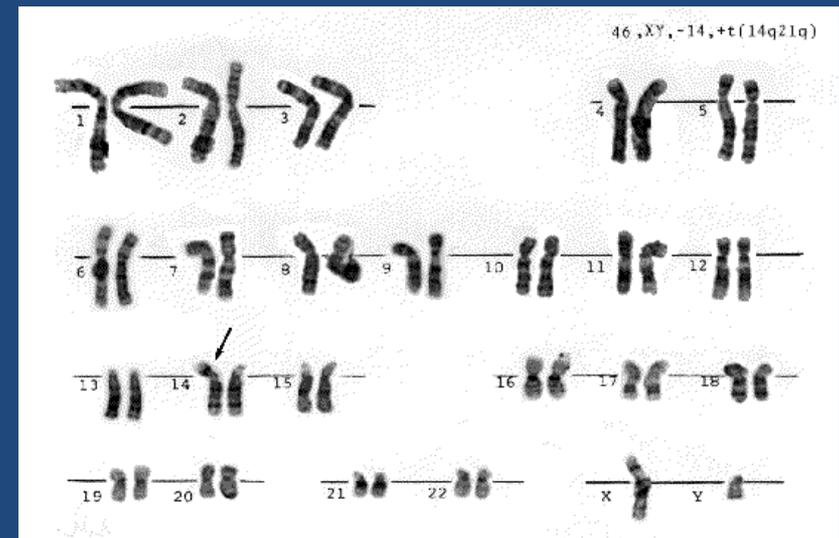
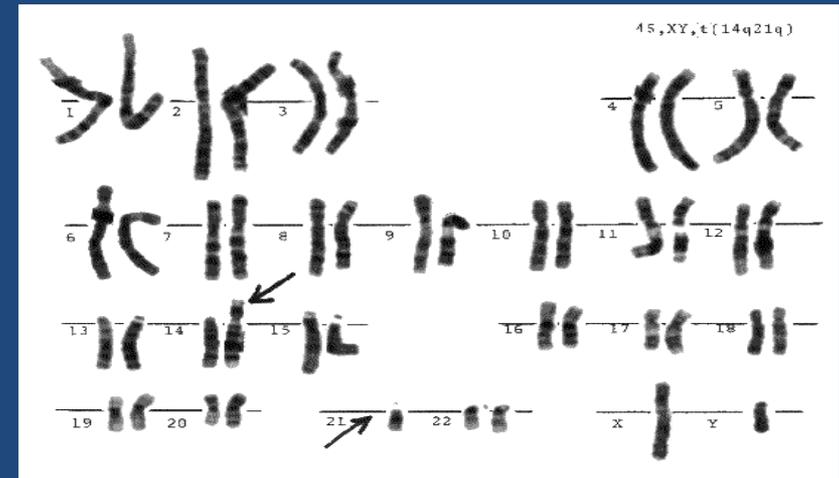
delezioni

duplicazioni



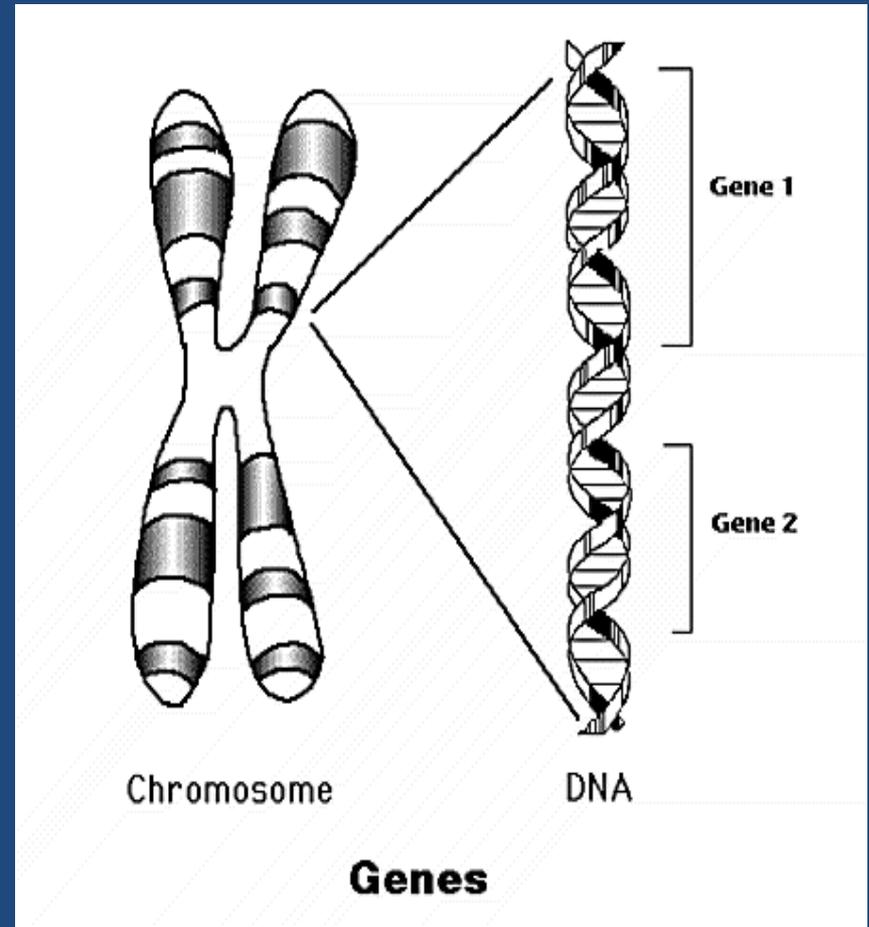
Anomalie cromosomiche

- **Bilanciate:**
- nella maggioranza dei casi non sono correlate ad un fenotipo anomalo
- **Sbilanciate:**
- sono correlate ad un fenotipo anomalo (malformazioni e/o ritardo mentale)

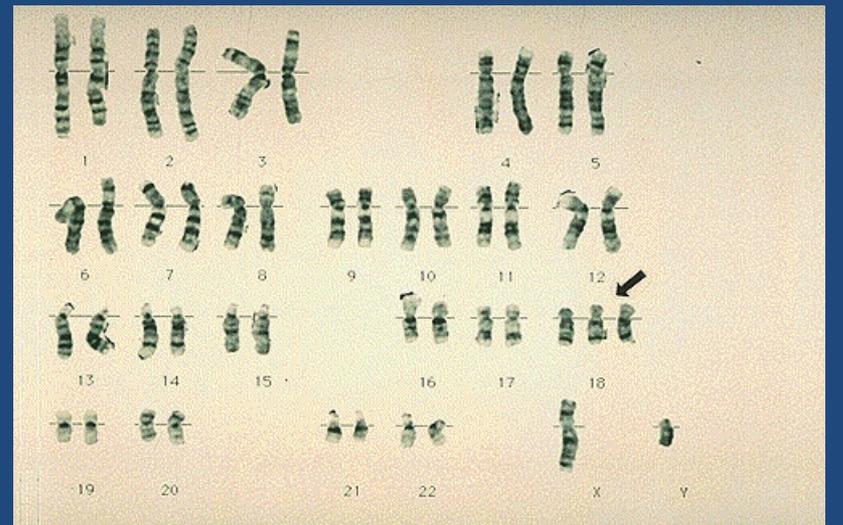
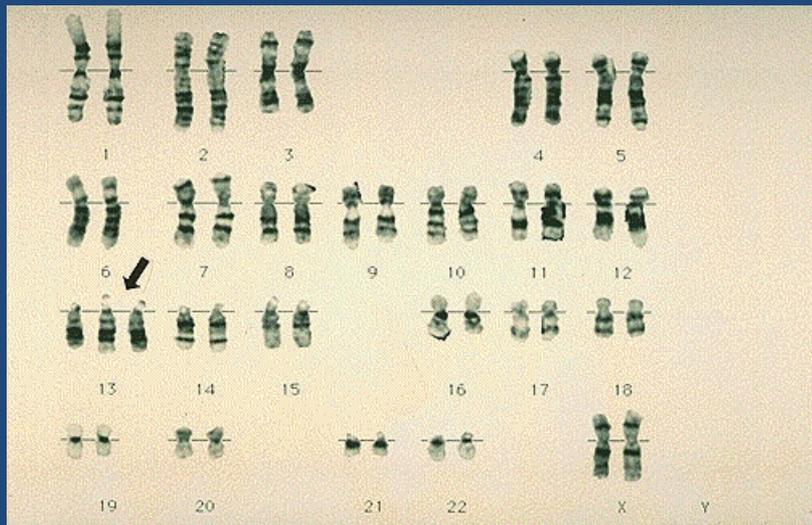
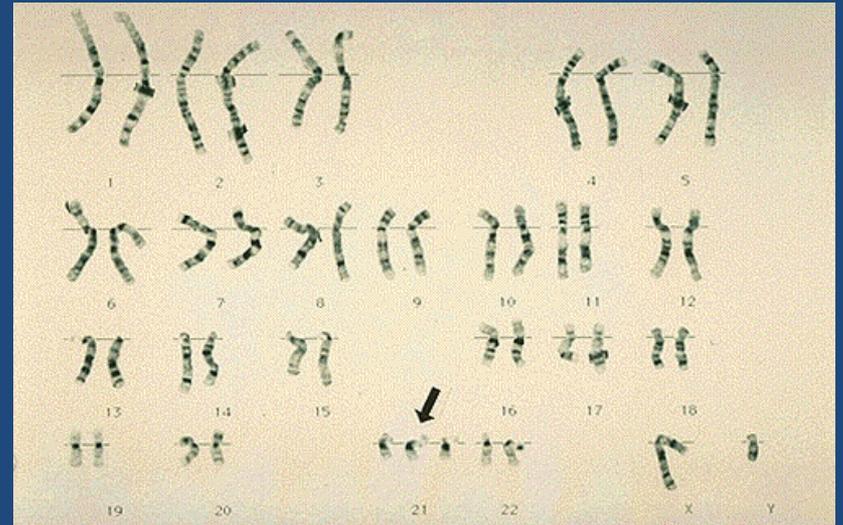
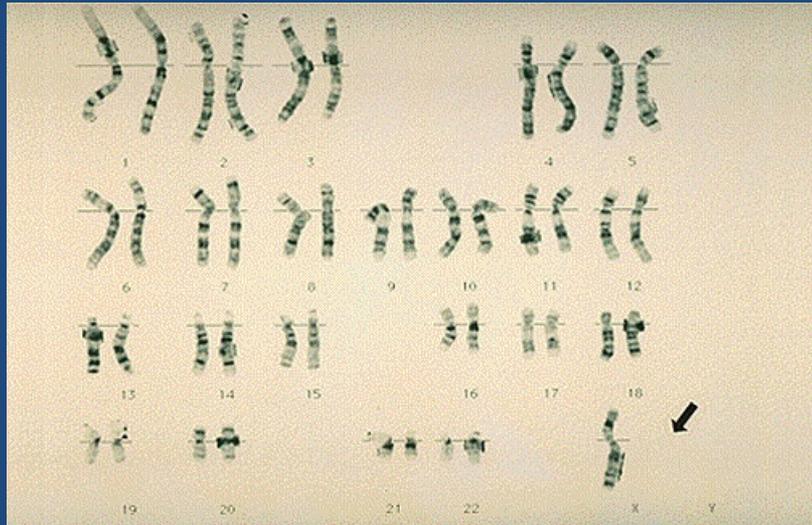


Gravità delle anomalie cromosomiche

- La gravità è correlata al tipo di cromosoma e alla quantità di geni interessati
- Tanto più grave è lo sbilanciamento cromosomico tanto più precoce sarà l'interruzione di gravidanza



Aneuploidie più frequenti alla nascita

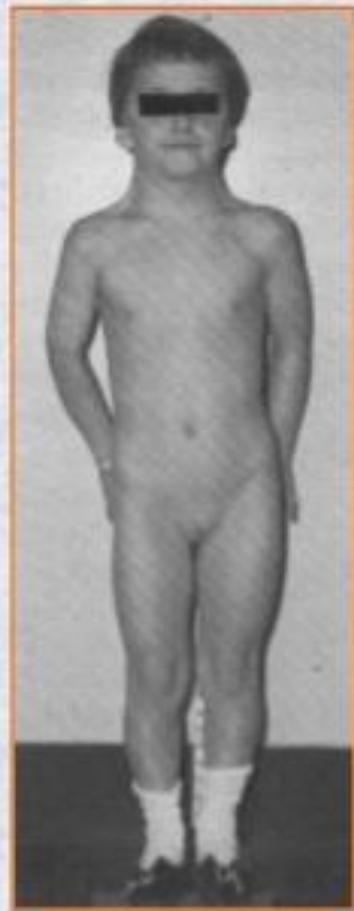


SINDROME di TURNER

Prevalenza: 1:2500 femmine nate vive

Caratteristiche cliniche:

- Pterigium colli
- Bassa statura
- Disgenesia gonadica
- Rene a ferro di cavallo
- Difetti cardiaci
(AoB, CoAo, RVPAP)
- Torace largo "a scudo"

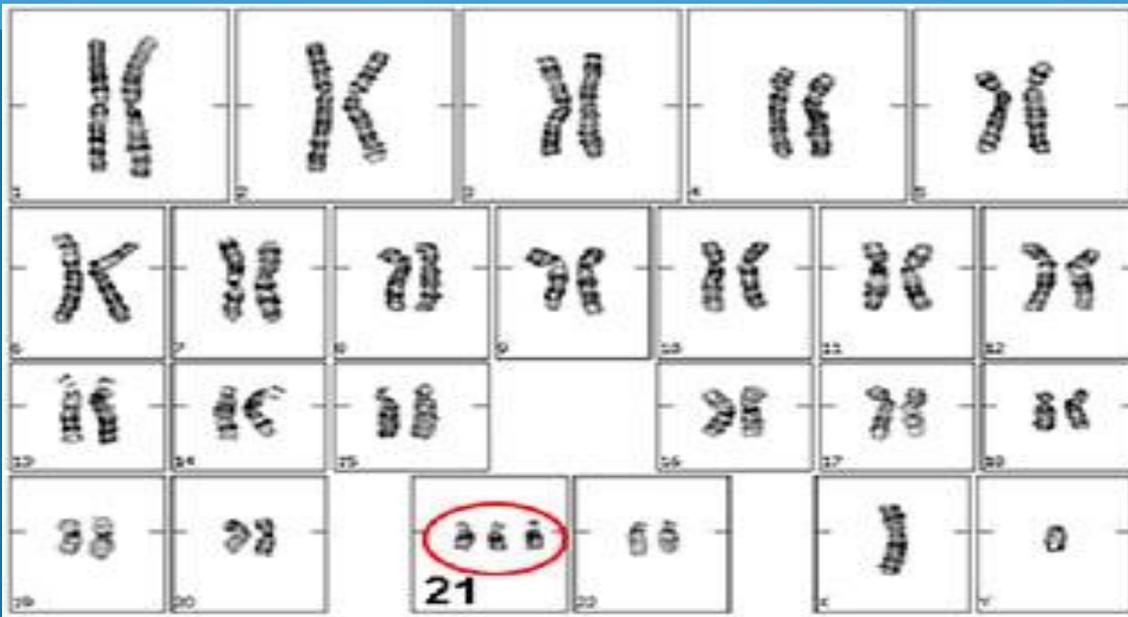
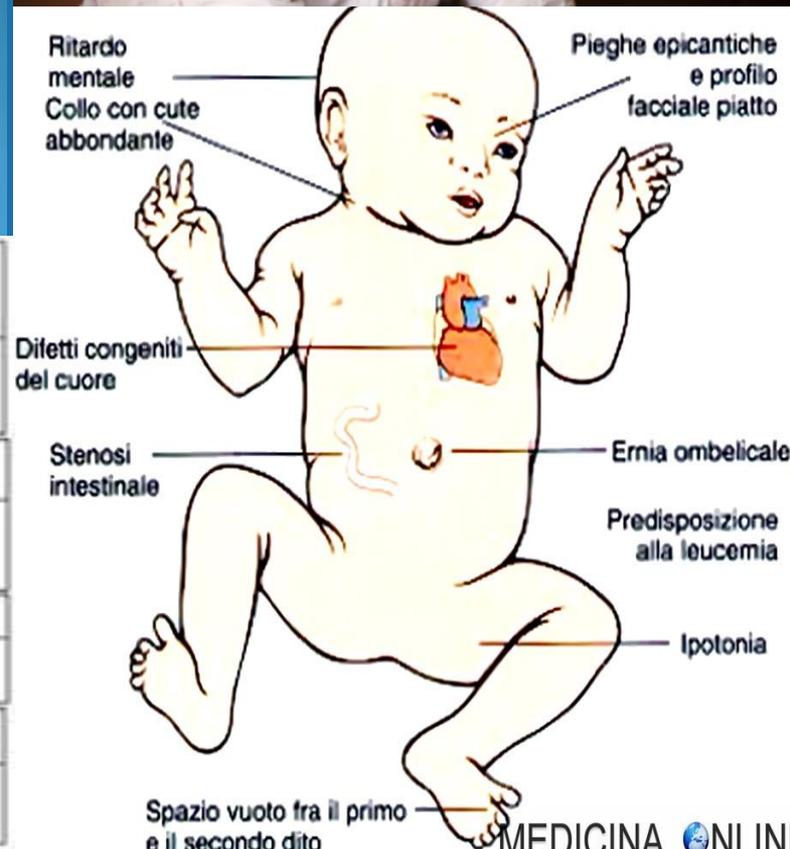


Difetto genetico: **monosomia X**

Sindrome di Down

• CLINICA:

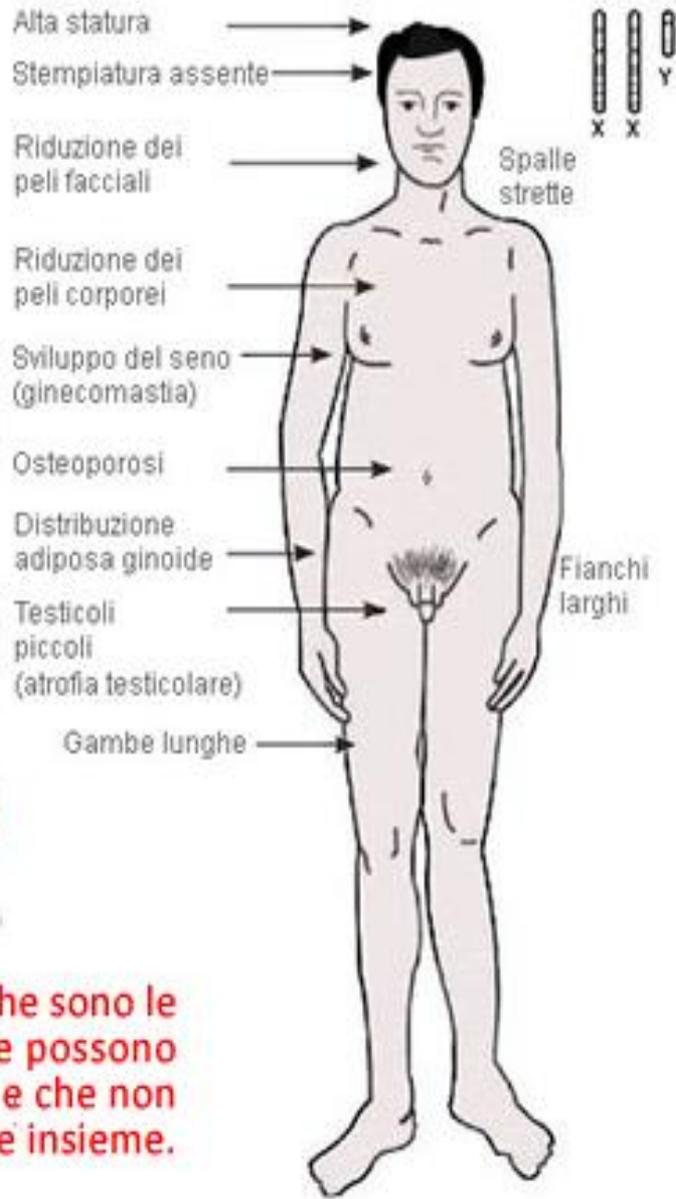
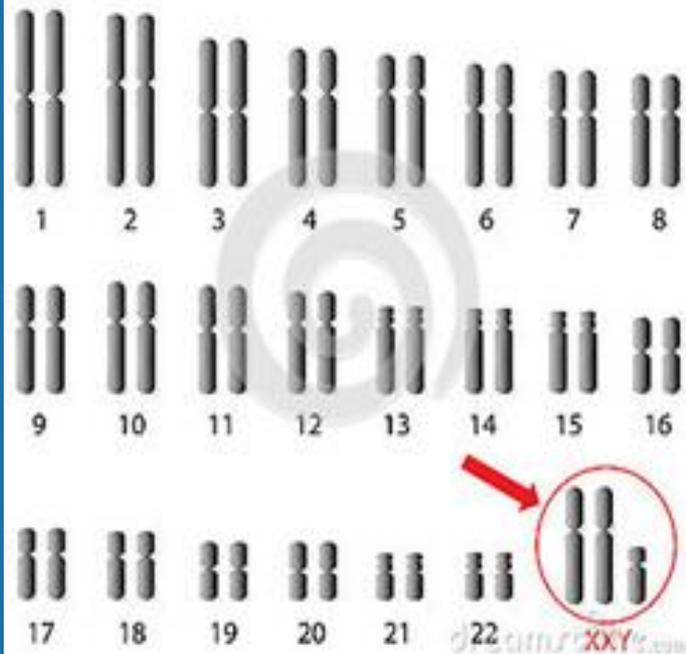
5. Volto piccolo, rotondeggiante con profilo piatto
6. Naso piccolo, con radice piatta e rivolto verso l'alto
7. Brachicefalia
8. Microcrania
9. Occipite piatto
10. Bocca piccola e lingua prominente



Sindrome di Down

- CAUSE:
- Nel 95% dei casi è dovuta a una non-disgiunzione cromosomica di un cromosoma 21 durante la gametogenesi (meiosi) che è quasi sempre quella materna
- Nel 4% dei casi è legata ad una traslocazione robertsoniana del cromosoma 21, che viene ad attaccarsi ad un altro cromosoma acrocentrico, per cui la conta totale dei cromosomi di questi pazienti è di 46, ma la massa cromatinica del cromosoma 21 è rappresentata per 3 volte. Spesso si verifica de novo ma può anche essere trasmessa da uno dei genitori nel quale è presente una traslocazione bilanciata.

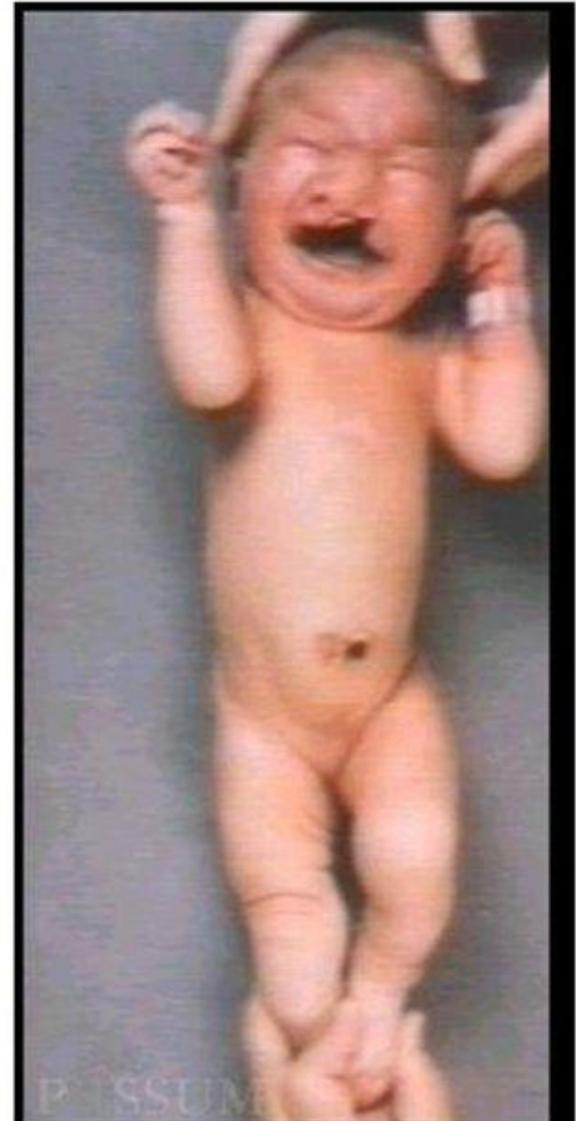
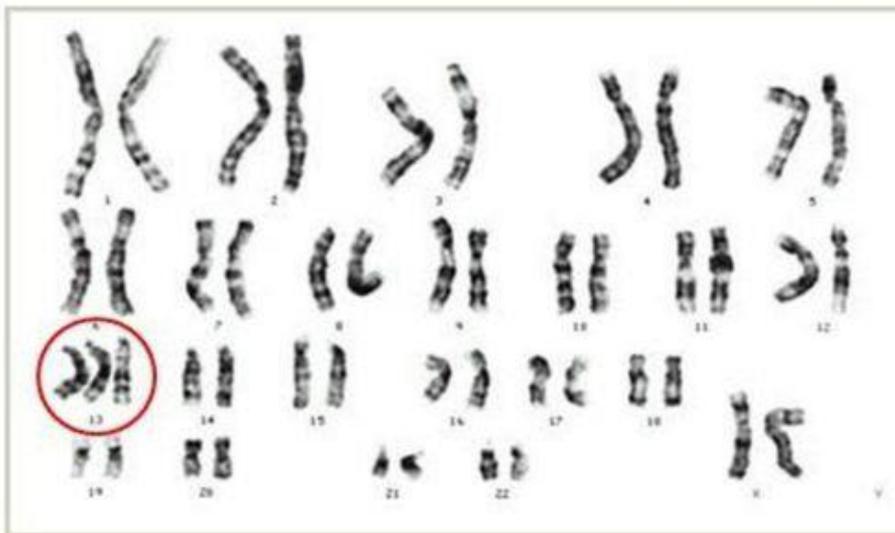
SINDROME DI KLINEFERTER



La figura a destra, definisce quelle che sono le caratteristiche fisiche principali che possono manifestarsi in un paziente con SK, e che non necessariamente si presentano tutte insieme.

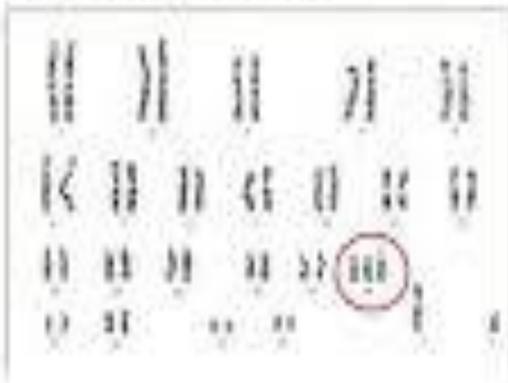
Trisomia 13 (Sindrome di Patau)

- 1:20.000 nati
- Grave ritardo mentale
- Cardiopatie
- Labiopalatoschisi
- Ciclopia
- polidattilia



Trisomia 18 (Sindrome di Edwards)

- 1:7500 nati
- Più colpito il sesso femminile (3:1)
- Ritardo di crescita
- Ritardo mentale
- Cardiopatie
- Sindattilia
- Morte nei primi mesi



Patologie congenite e problematiche gastro-intestinali

- Sindrome di Edwards -

- Trisomia cromosoma 18
- 1:7000 nati vivi
- Nel 90 % sopravvivenza < 6 mesi
- Esonfalo , RGE, deficit crescita
- Cardiopatie complesse



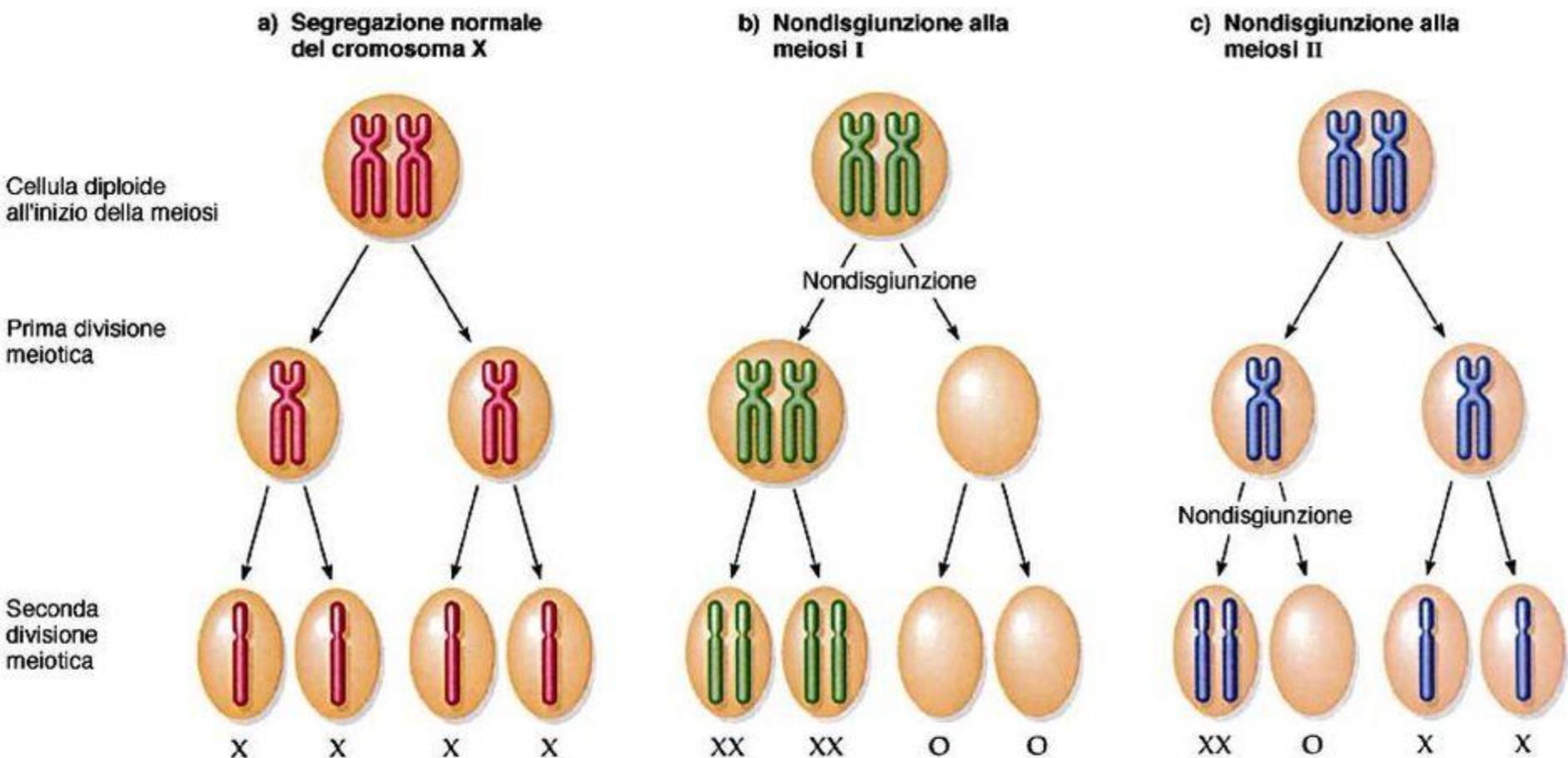
La frequenza delle anomalie cromosomiche alla nascita è 0.65%

Trisomie	+21	0.12%	1 su 833
	+18	0.013%	
	+13	0.004%	
Monosomie	45,X	0.024%	
Tr. bilanciate		0.2%	1 su 500
Tr. sbilanciate		0.05%	

Nielsen et al. Human Genet. 1982 ; 61 : 98

Figura 11.5

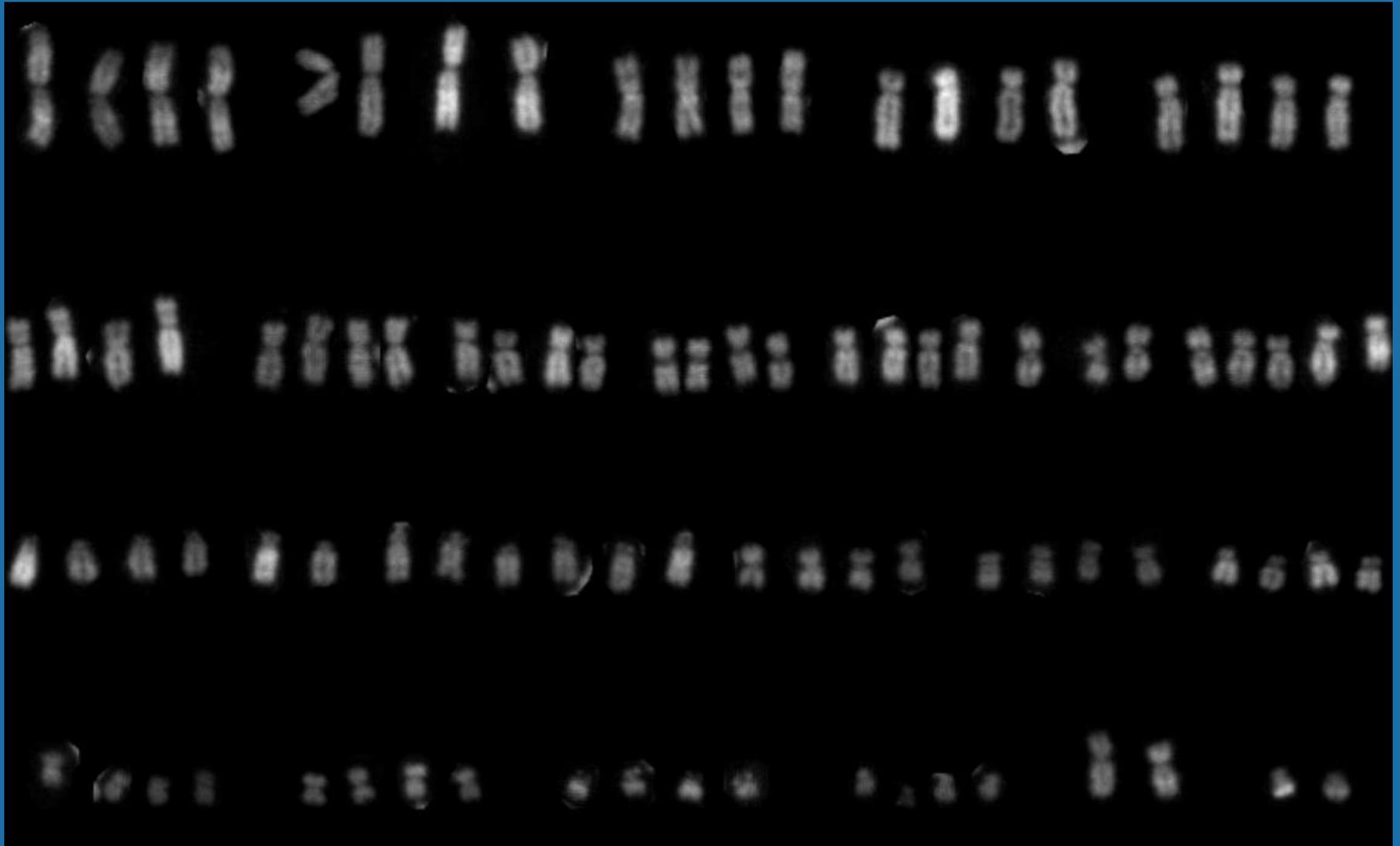
Nondisgiunzione meiotica a carico del cromosoma X. (La nondisgiunzione alla mitosi avviene nello stesso modo per gli autosomi e i cromosomi del sesso). **(a)** Segregazione normale del cromosoma X alla meiosi. **(b)** Nondisgiunzione dei cromosomi X alla meiosi I. **(c)** Nondisgiunzione dei cromosomi X alla meiosi II.



Non disgiunzione in I divisione meiotica= tutti i gameti sono anomali e daranno origine per metà a zigoti trisomici (2/4) e per metà a zigoti monosomici (2/4)

Non disgiunzione in II divisione meiotica= metà dei gameti sono anomali e daranno origine a zigoti trisomici (1/4) e a zigoti monosomici (1/4)

Cariotipo tetraploide (4n) con 92 cromosomi



STUDIO DEL CARIOTIPO E TESSUTO

EPOCA PRENATALE

- Villi coriali
- Liquido amniotico
- Sangue fetale

EPOCA NEONATALE

- Sangue periferico

EPOCA POSTNATALE

- Sangue periferico
- Biopsia cutanea

STUDIO DEL CARIOTIPO ED EPOCHE DI VITA

EPOCA PRENATALE



- età avanzata (35 anni)
- malformazioni ecografiche
- precedente figlio con anomalia cromosomica
- anamnesi genetica familiare positiva
- tri-test positivo
- precedenti aborti ripetuti

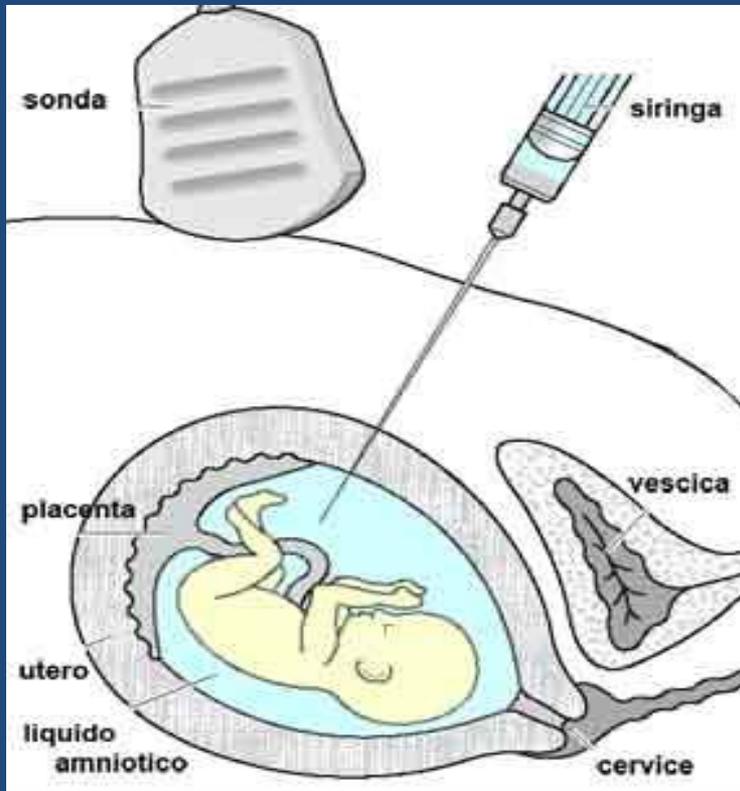
EPOCA NEONATALE

- segni clinici ben definiti
- fenotipo particolare

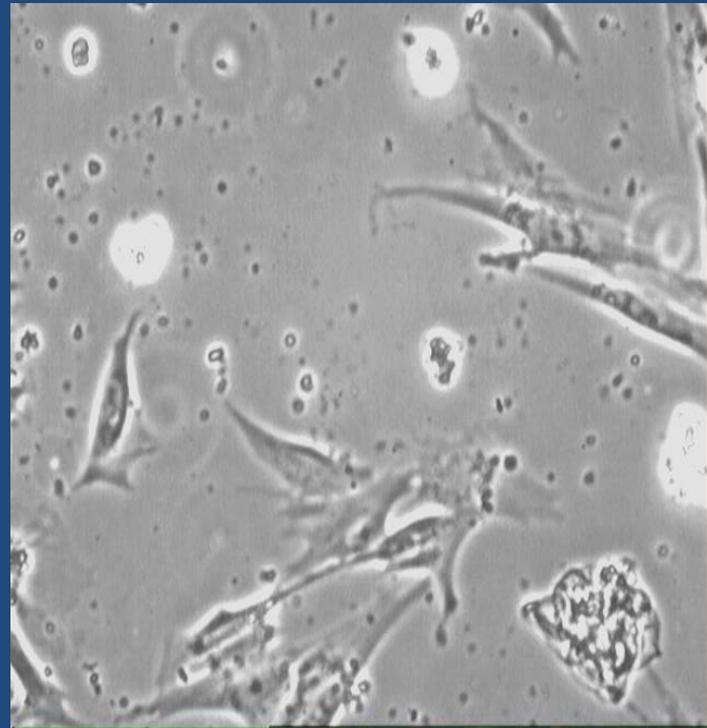
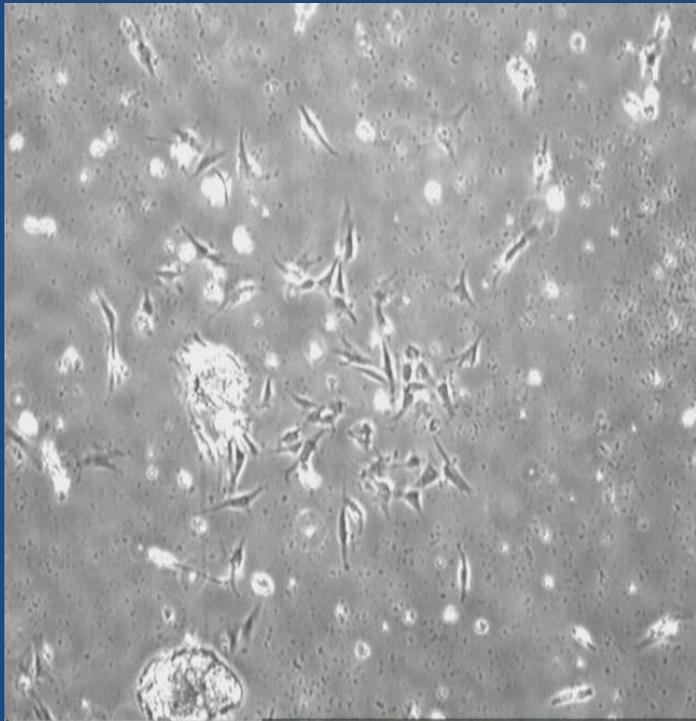
EPOCA POSTNATALE

- segni clinici precisi
- ritardo mentale e/o motorio
- amenorrea
- ipogonadismo
- infertilità o sterilità

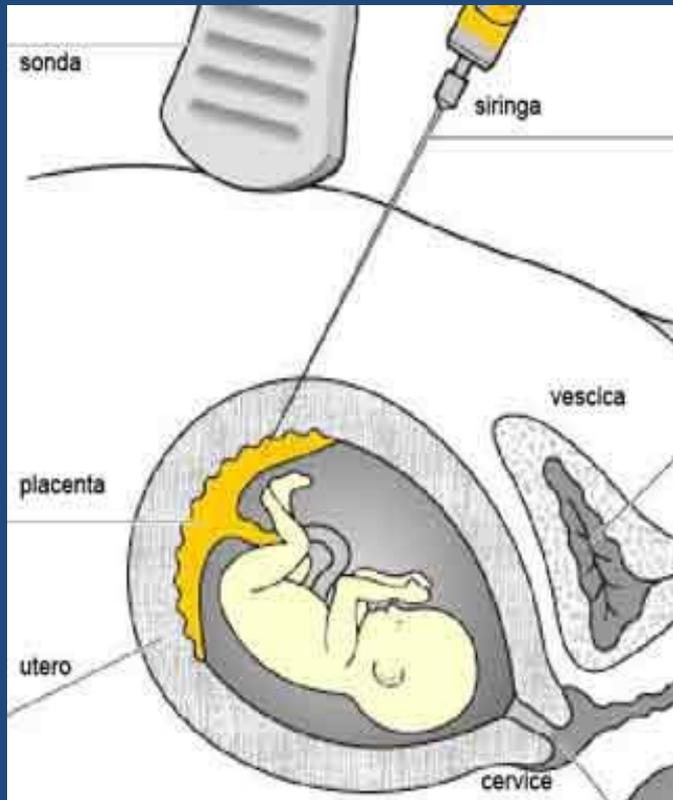
Amniocentesi



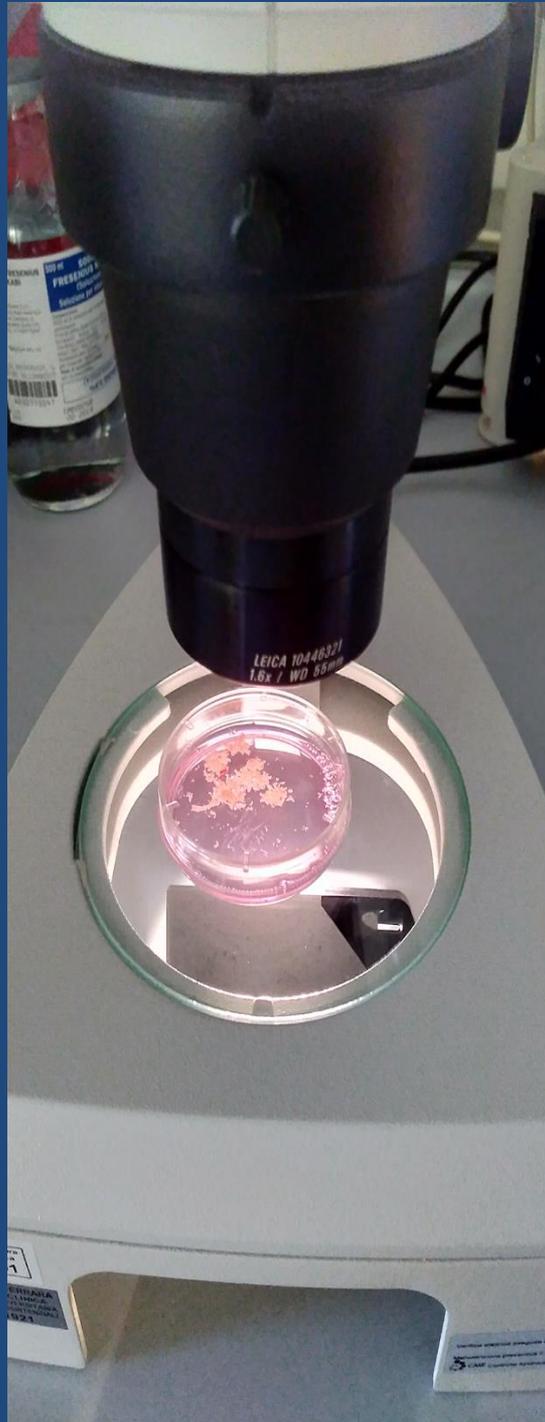
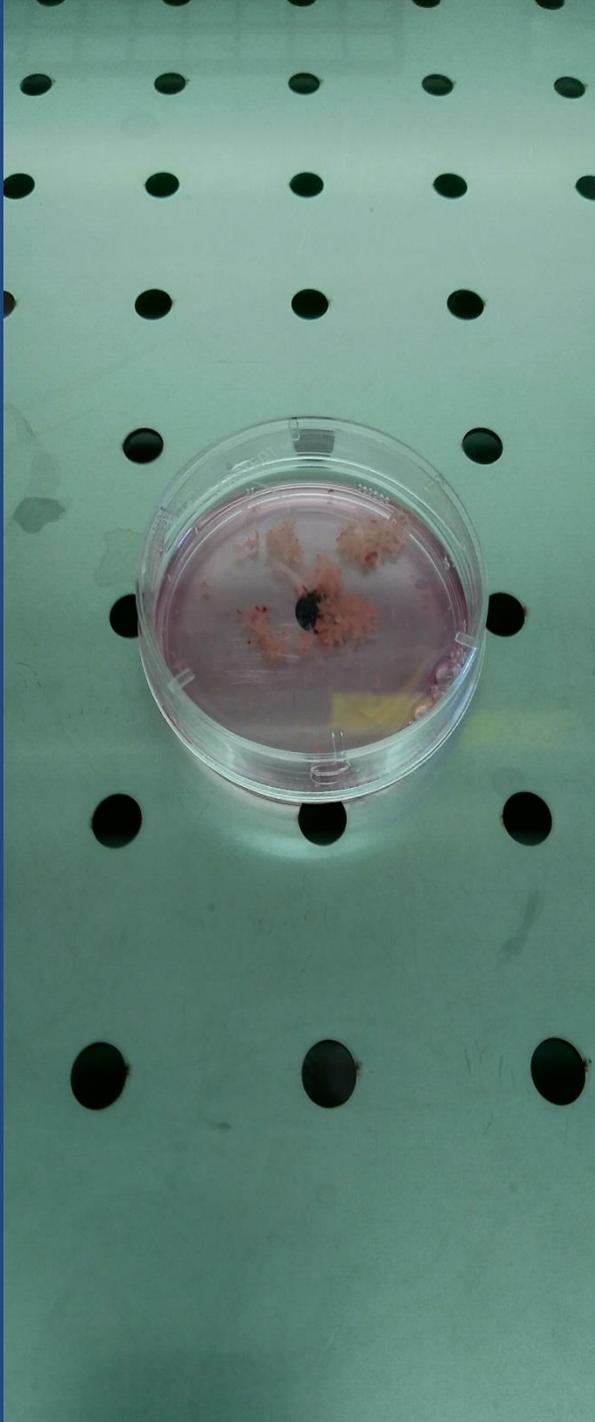
L'amniocentesi è un prelievo di liquido amniotico, che si esegue dopo la 16^a settimana di gestazione per via transaddominale, sotto controllo ecografico continuo. Il rischio di aborto è molto basso.



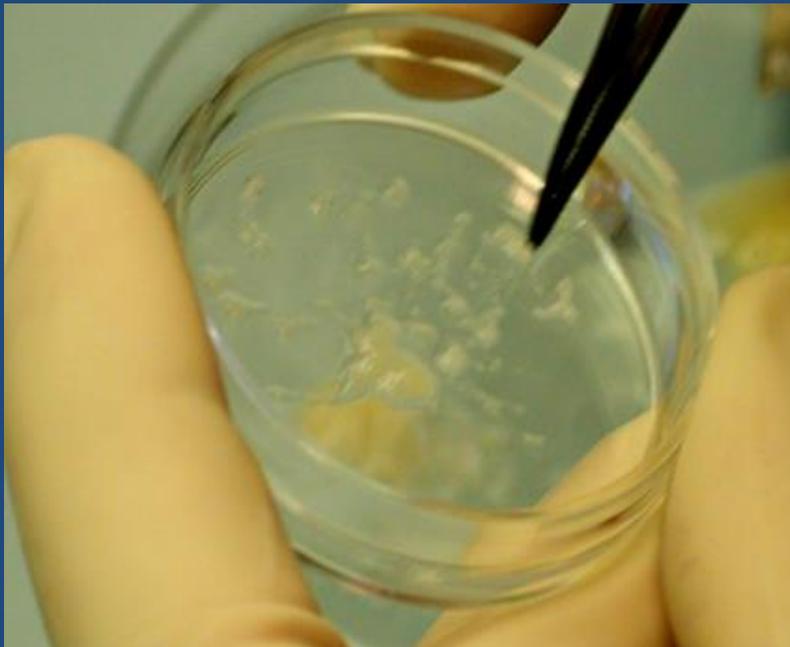
Villocentesi



La villocentesi è un prelievo dalla placenta, che si esegue dopo la 10^a settimana di gestazione per via transaddominale, sotto controllo ecografico continuo. Il rischio di aborto è 0,5-1%.



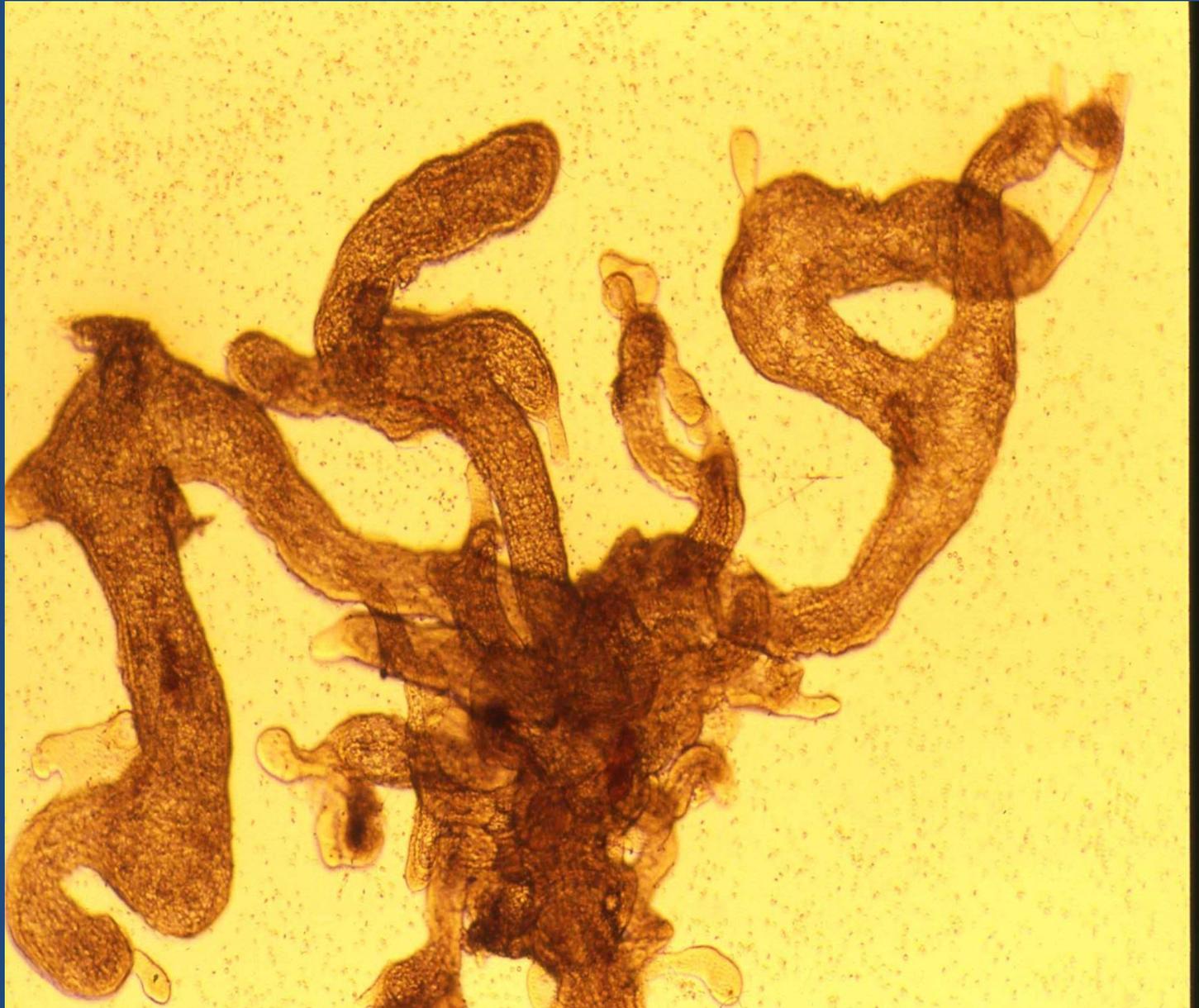
SEPARAZIONE E SEMINA DEI VILLI

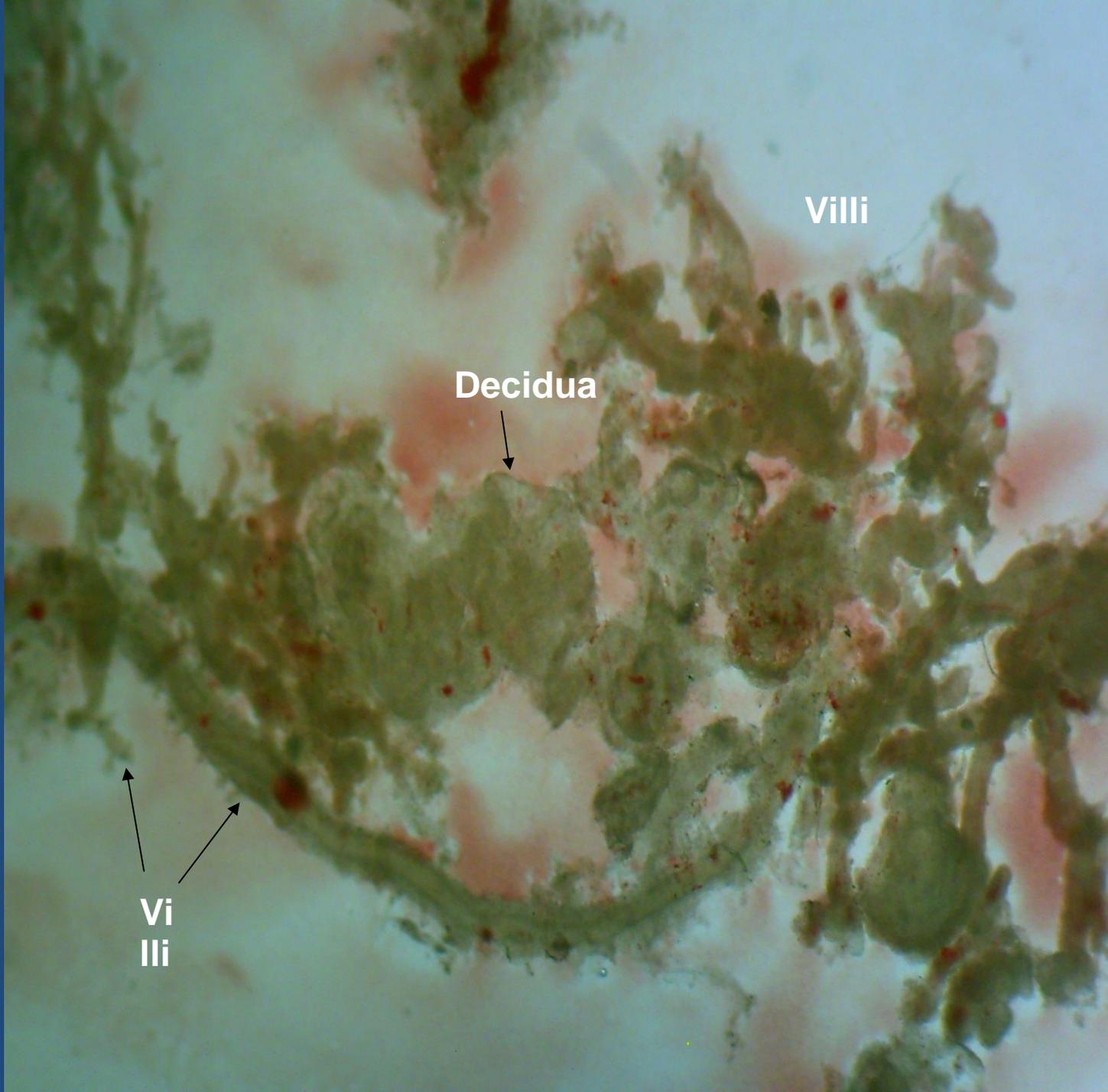


INCUBATORI



VILLO SEPARATO

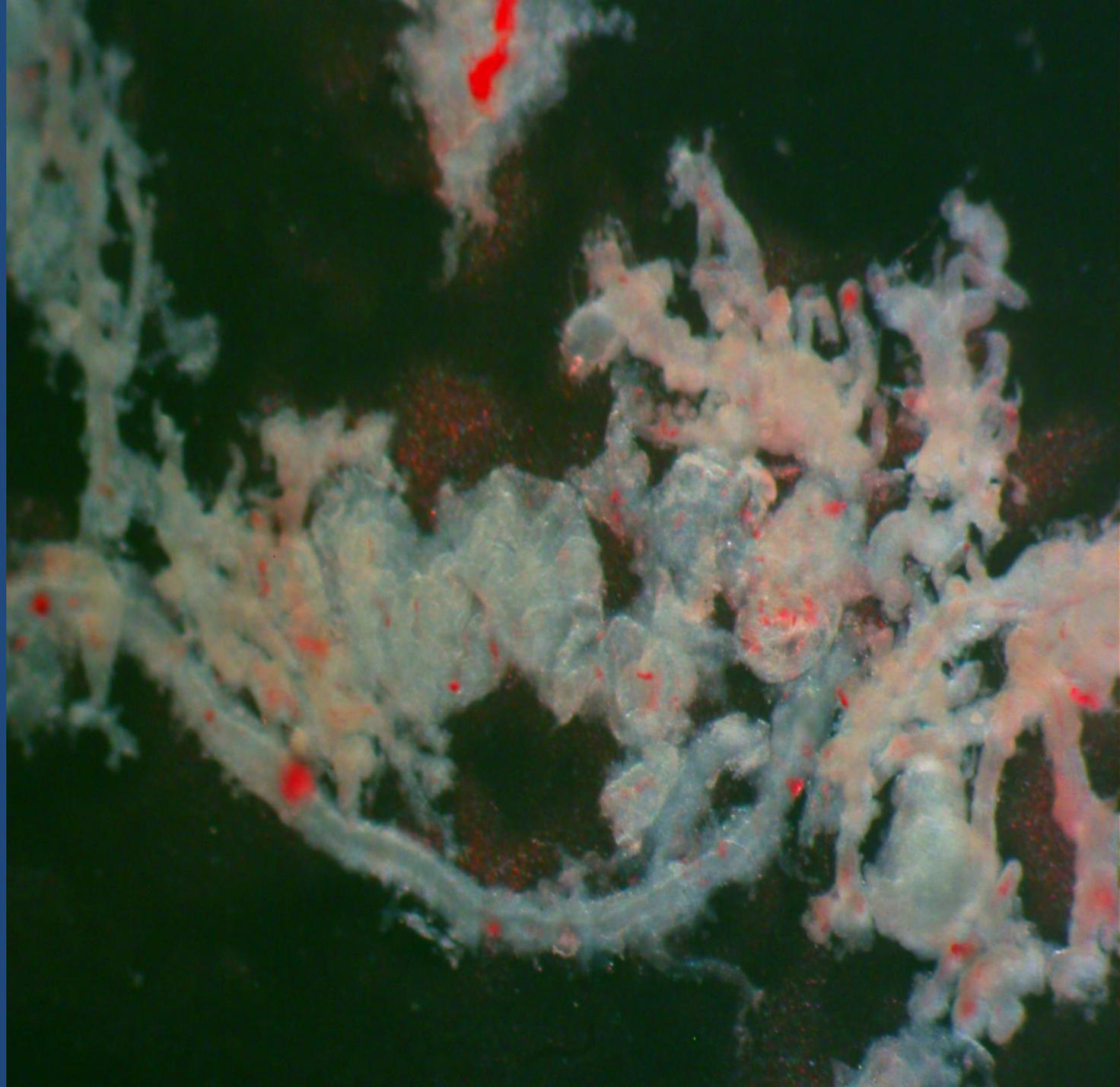




Villi

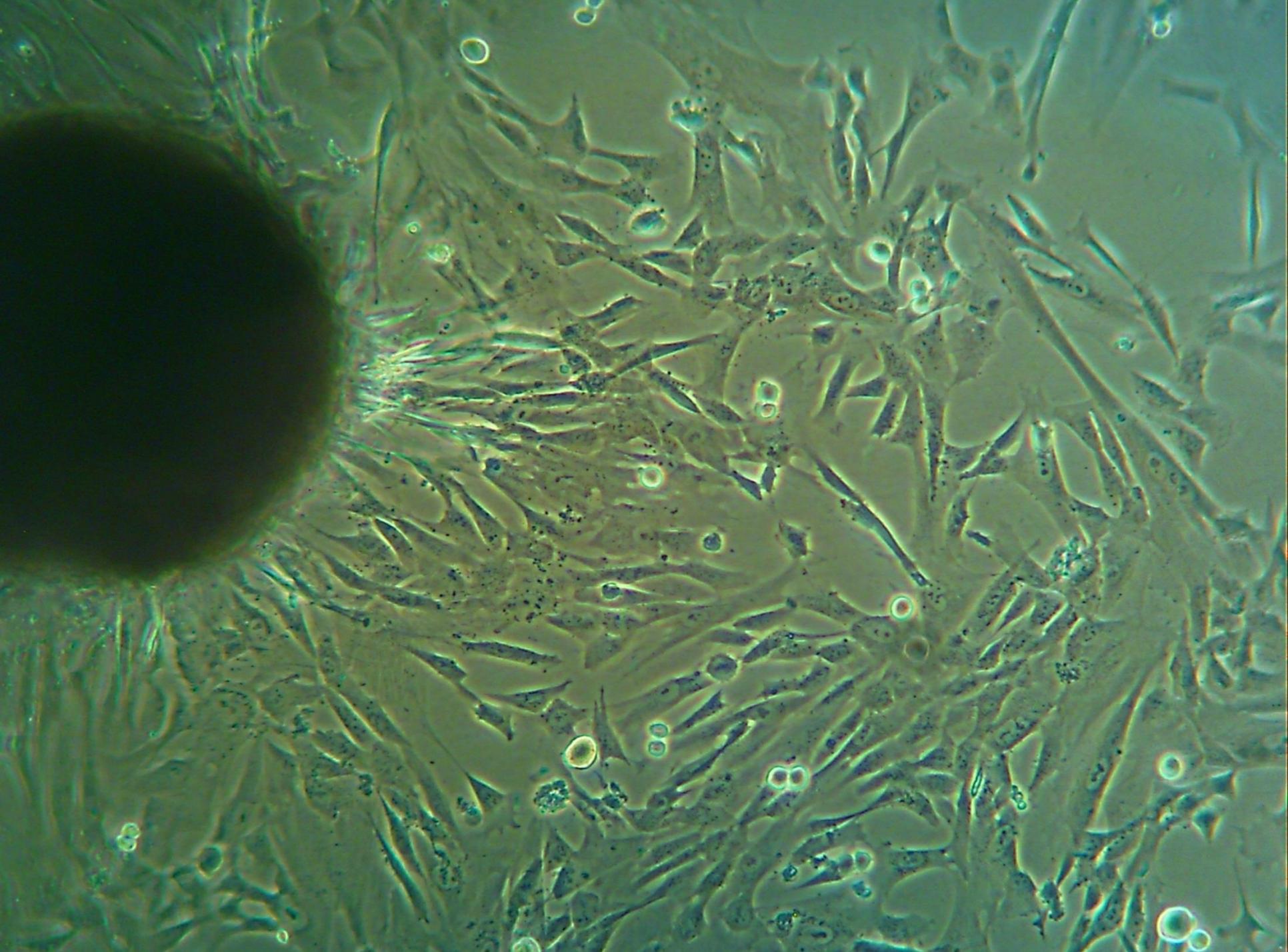
Decidua

Villi

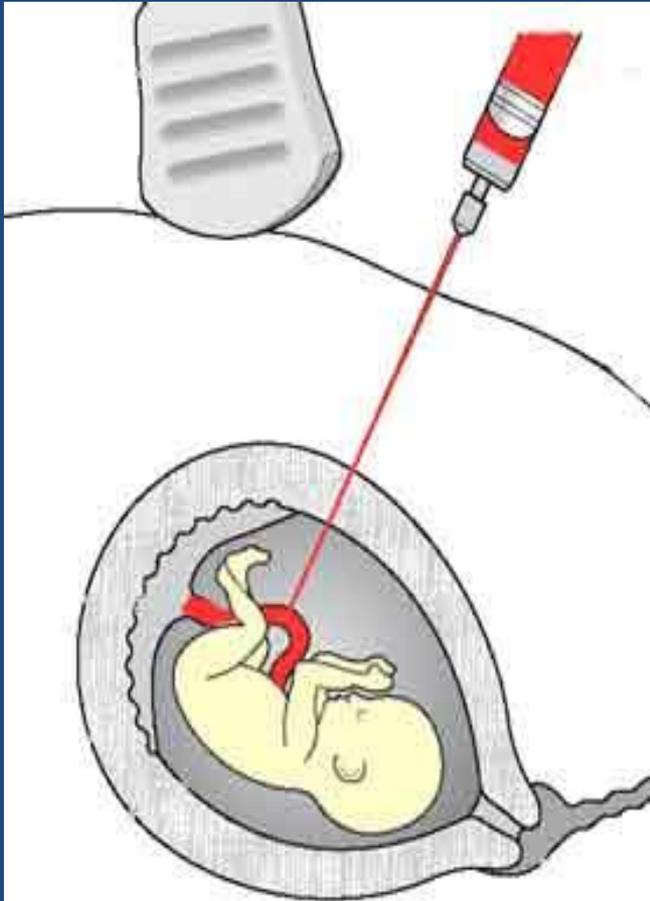








Funicolocentesi



La funicolocentesi è un prelievo di sangue fetale, che viene eseguito a scopo diagnostico e/o terapeutico, dopo la 18^a settimana di gestazione. Il rischio di aborto dopo la funicolocentesi è del 2%, il doppio rispetto all'amniocentesi.

Come si ottengono i cromosomi da analizzare?

MEDIANTE:

- COLTURE CELLULARI
- PREPARAZIONE CROMOSOMICA



COLTURE CELLULARI

I **cromosomi** sono visualizzabili durante la “mitosi” cellulare, quando una cellula organizza i suoi cromosomi per prepararli alla suddivisione nelle cellule figlie.

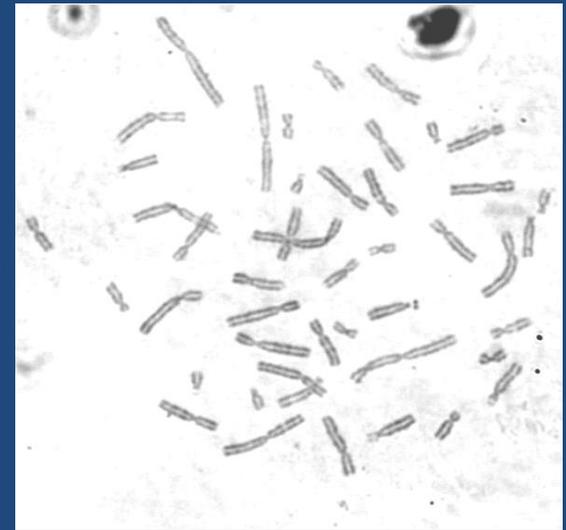
Il **citogenetista**, per poter analizzare i cromosomi, deve ottenere cellule in mitosi mediante le colture cellulari.

LA PREPARAZIONE CROMOSOMICA

...DALLA MITOSI AI CROMOSOMI...

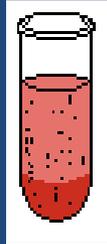


IPOTONICA
FISSATIVO
EVAPORAZIONE



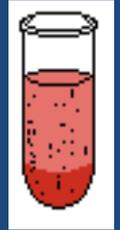
Coltura in un terreno di crescita

Seminare le cellule
Aggiungere una sostanza che stimoli la mitosi



Incubare per 2-3 giorni

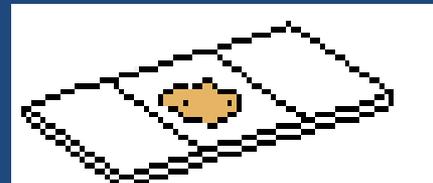
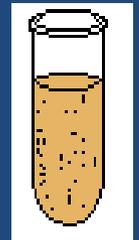
Aggiungere una sostanza che blocchi le mitosi in metafase



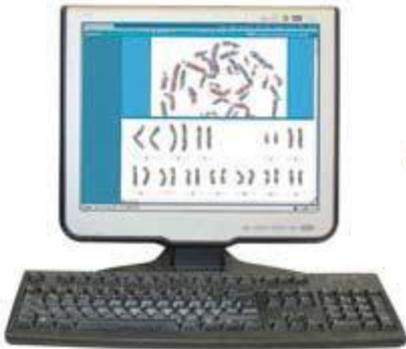
soluzione ipotonica



Passaggi in fissativo



Strisciare le cellule sul vetrino portaogg.



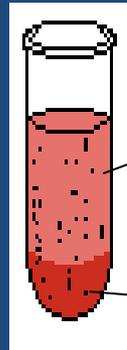
Identificare i cromosomi



LE MITOSI IN IPOTONICA

KCl 0,56%

H₂O 100 ml



Surnatante

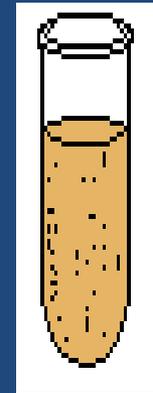
Fondello o Pellet



AGGIUNTA DEL FISSATIVO

Etanolo assoluto 3 parti

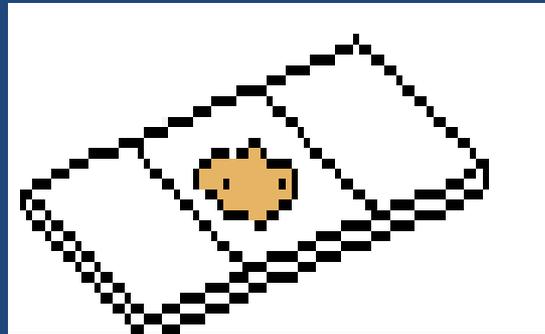
Acido acetico 1 parte

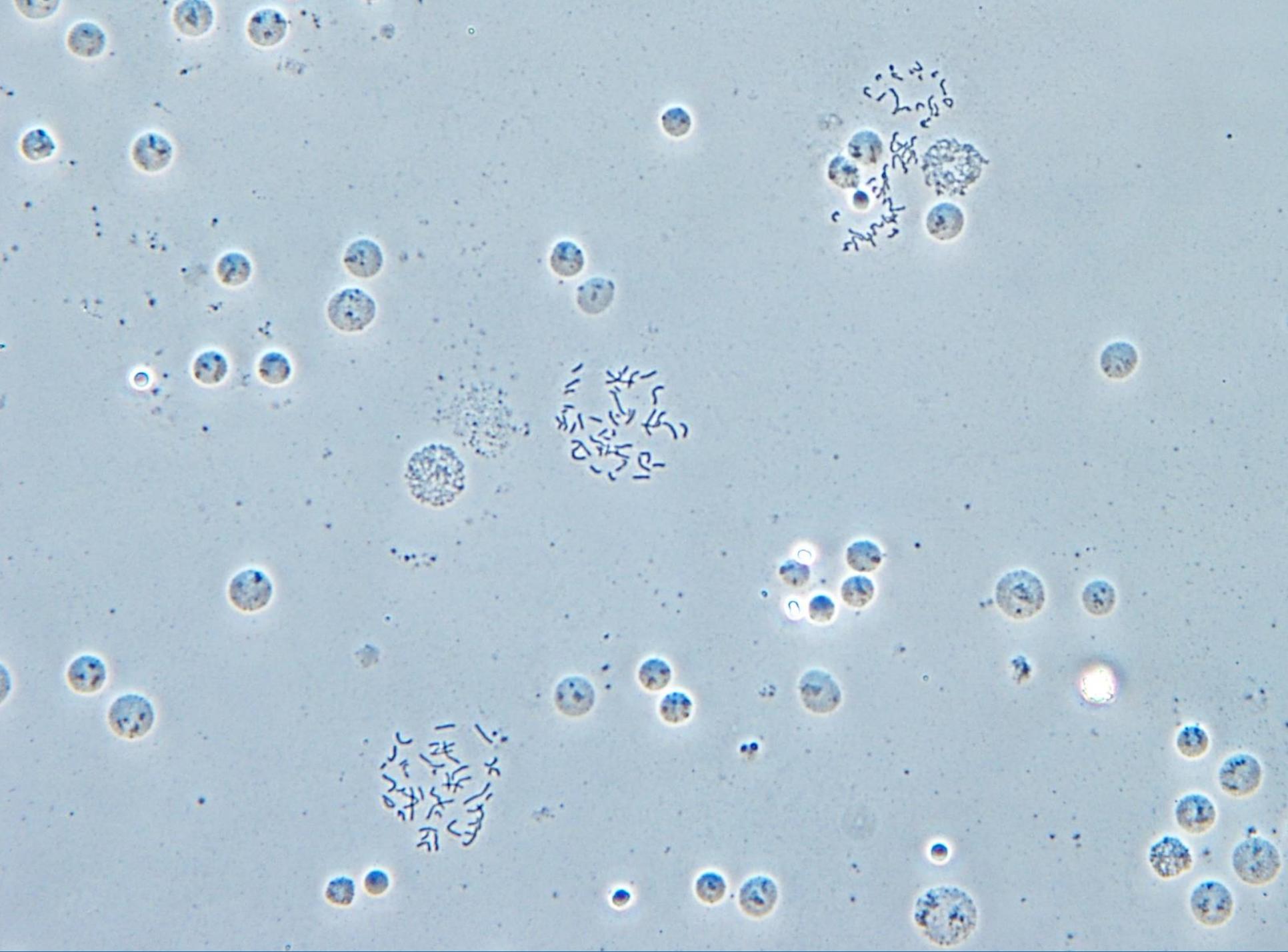




IL PELLET CELLULARE VIENE SGOCCIOLATO SUL
VETRINO...

...L'INCREDIBILE FENOMENO HA INIZIO...



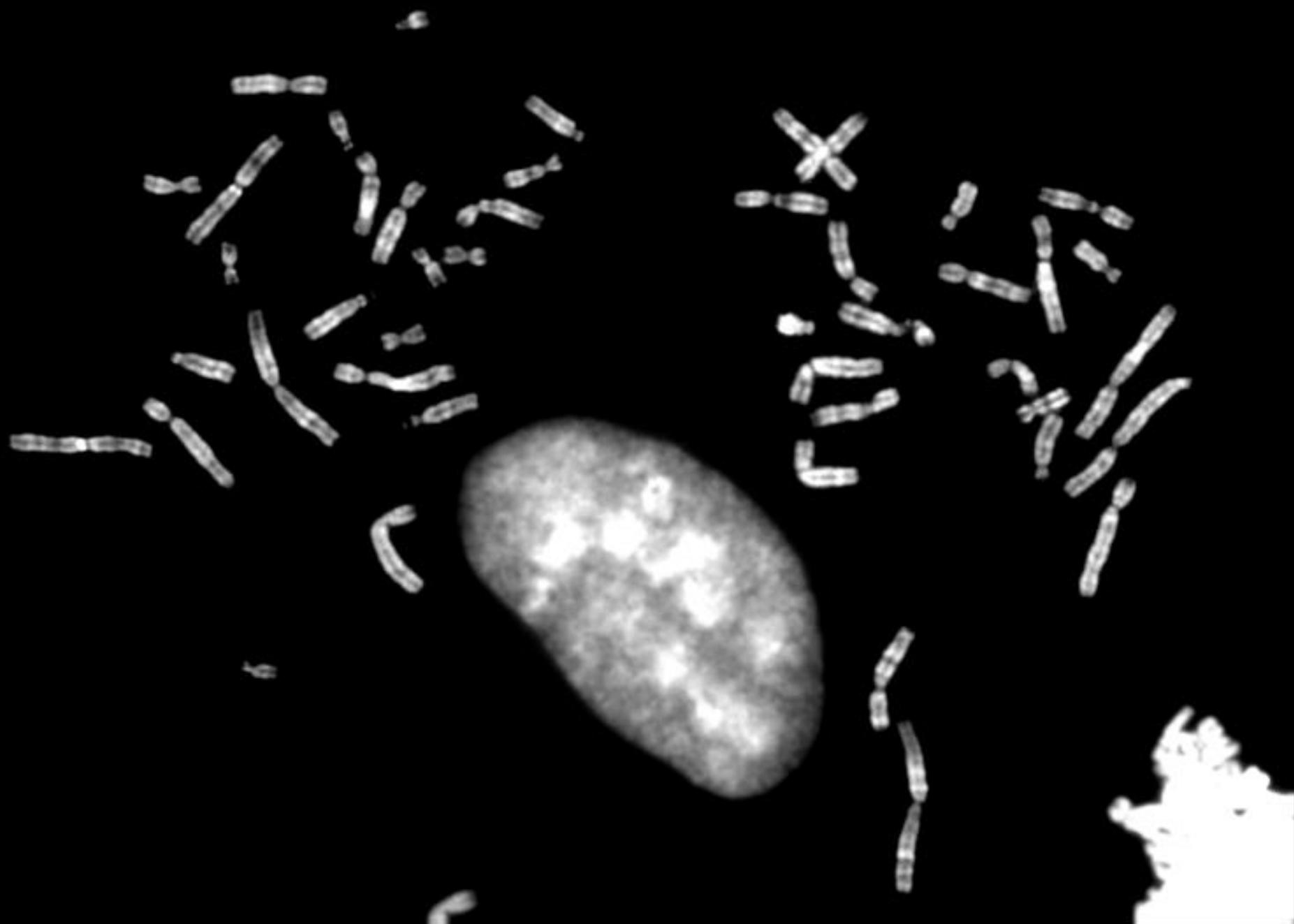


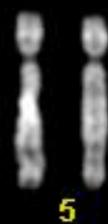
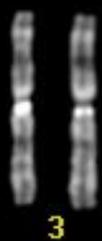
CONSEGUENZE DEL RIGONFIAMENTO DELLE PROTEINE DEL CITOPLASMA:

■ CROMOSOME SPREADING



Le proteine citoplasmatiche si gonfiano e si “disgregano”, trascinando con sé i cromosomi...sparpagliandoli.







1



2



3



4



5



6



7



8



9



10



11



12



13



14



15



16



17



18



19



20



21



22

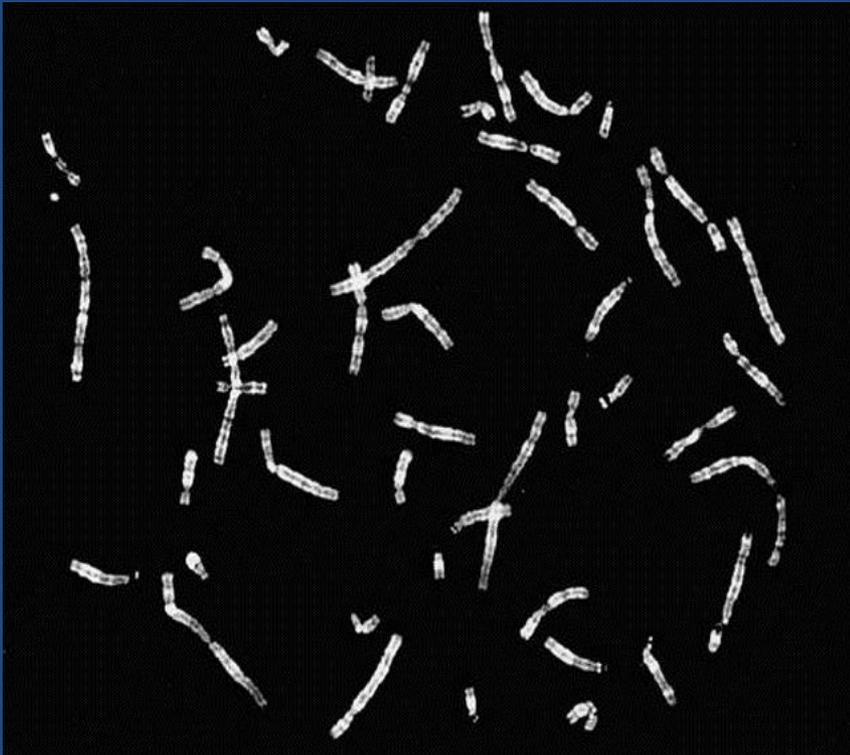


X

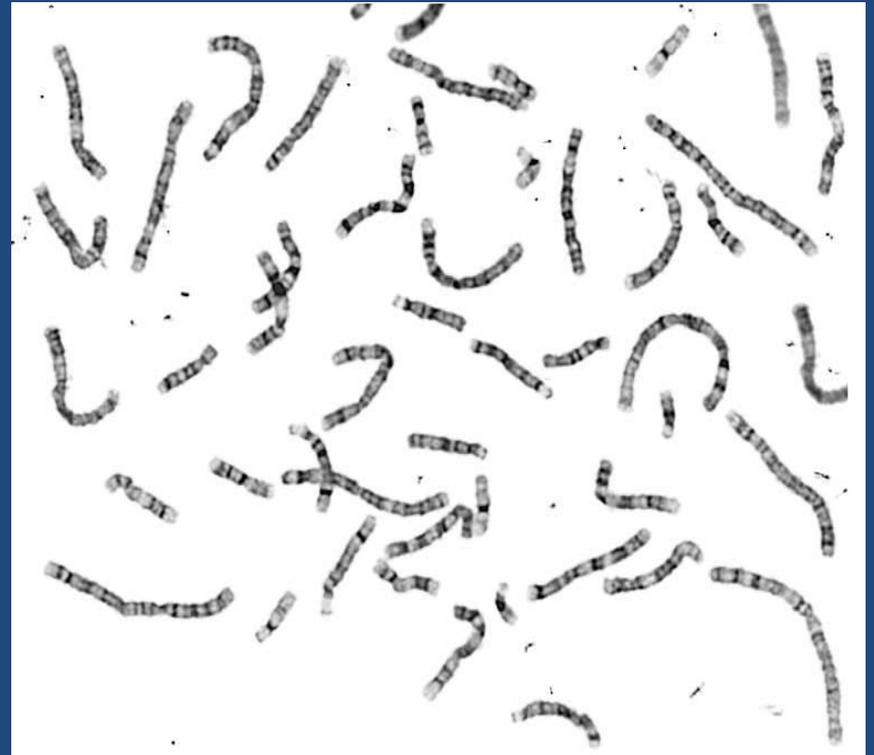
Y

TECNICHE DI BANDEGGIO

QFQ, Casperson (1970)



GTG, Seabright (1971)



BANDEGGIO CROMOSOMICO

-L'INTRODUZIONE DELLE METODICHE DI BANDEGGIO HANNO APERTO NUOVE PROBLEMATICHE E PROSPETTIVE ALLA RICERCA GENETICA ED ALLE SUE APPLICAZIONI.

- QUESTO HA CONTRIBUITO A DARE ALLA CITOGENETICA CLINICA UN CONSIDEREVOLE CONTRIBUTO, PERMETTENDO DI INDIVIDUARE E DI DEFINIRE NUOVE SINDROMI CROMOSOMICHE.

Table 17.2 Banding code descriptions

Banding Code	Banding Type	Technique	Stain
QFQ	Q	Fluorescence	Quinacrine
QFH	Q	Fluorescence	Hoechst 33258
GFG	G	Trypsin	Giemsa
GTL	G	Trypsin	Leishman
GAG	G	Acetic saline	Giemsa
CBG	C	Barium hydroxide	Giemsa
RFA	R	Fluorescence	Acridine orange
RIIG	R	Heating	Giemsa
RBG	R	BUdR	Giemsa
RBA	R	BUdR	Acridine orange
TIIG	T	Heating	Giemsa
TIA	T	Heating	Acridine orange

Note: New codes are defined in the text of the publication in which they are first used.

BANDEGGIO CROMOSOMICO

BANDEGGIO QFQ

BANDEGGIO GTG

BANDEGGIO RBA

BANDEGGIO CBG

BANDEGGIO DA/DAPI

BANDEGGIO NOR

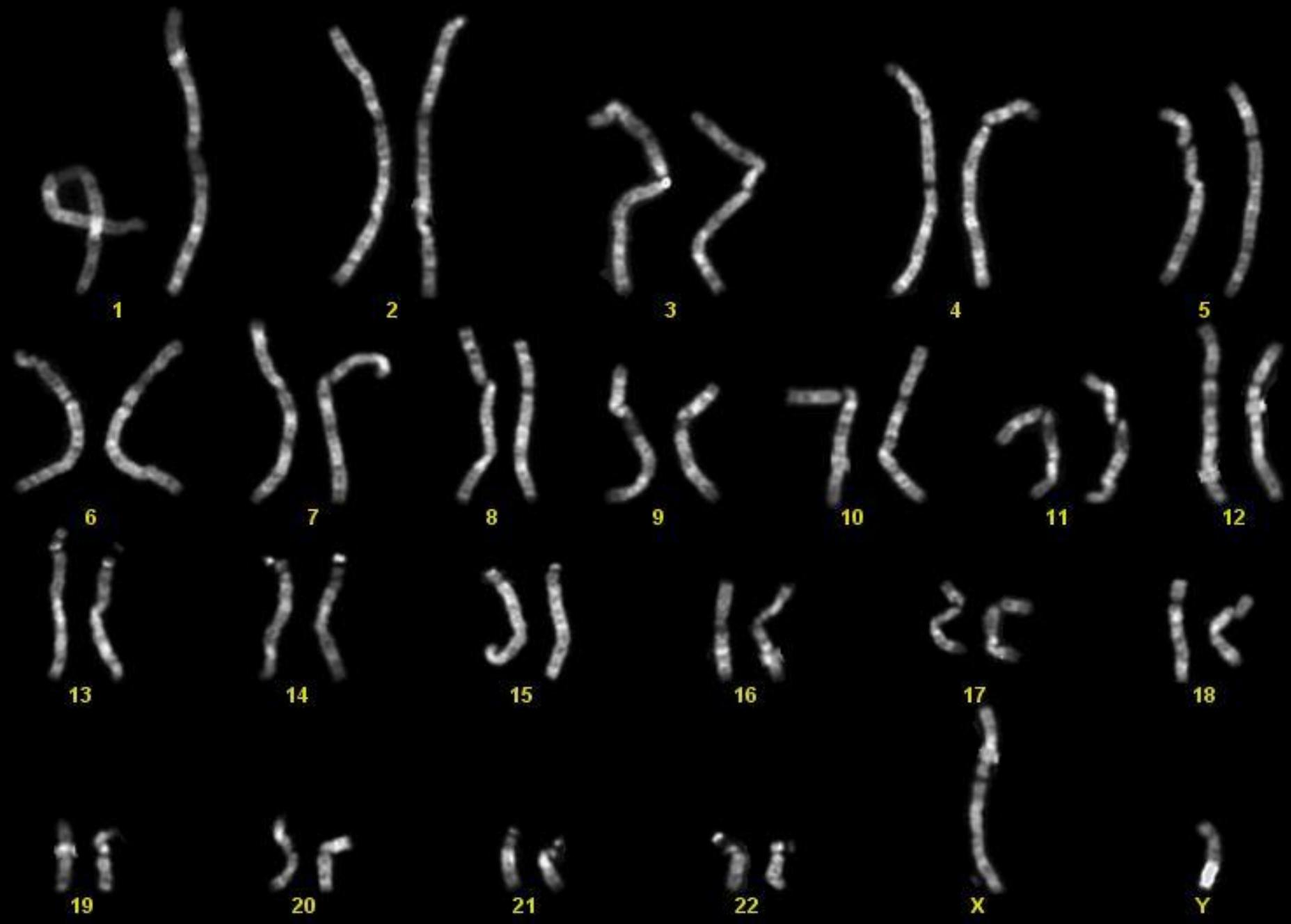
BANDEGGIO CROMOSOMICO

BANDEGGIO **QFQ**

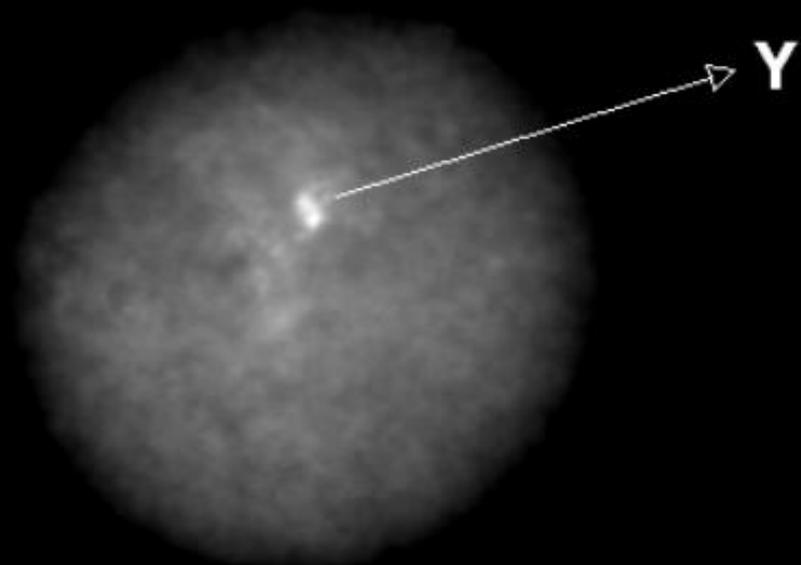
Q è il tipo di bandeggio

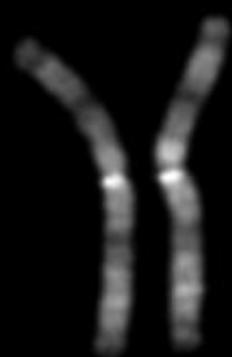
F Fluorescenza

Q Quinacrine



QFQ





3q-var



4centr+4p



13centr



satelliti-acro



Yqh

QFQ



Yqh

BANDEGGIO GTG

BANDEGGIO GTG

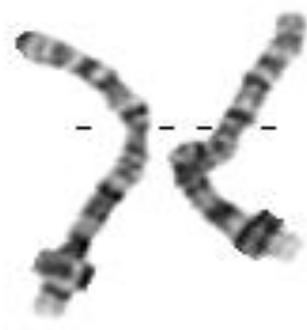
G è il tipo di bandeggio

T Tripsina

G Giemsa



1



2



3



4



5



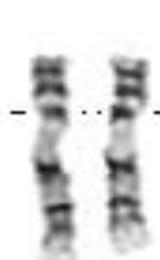
6



7



8



9



10



11



12



13



14



15



16



17



18



19



20



21



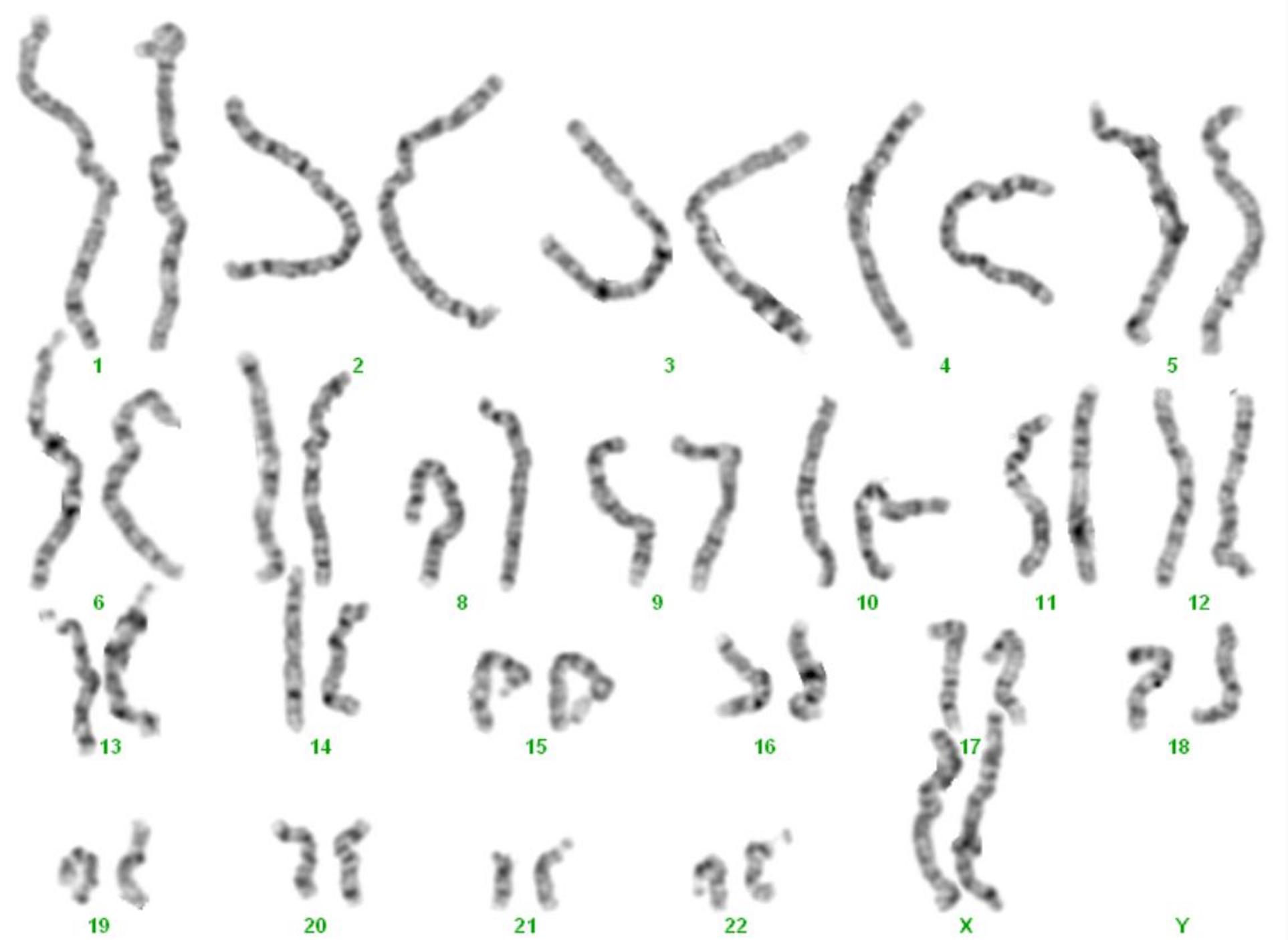
22

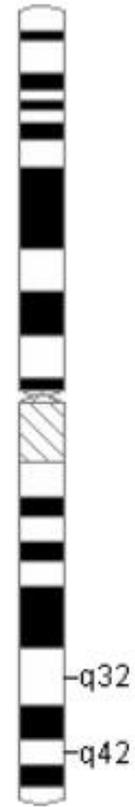


X



Y





1

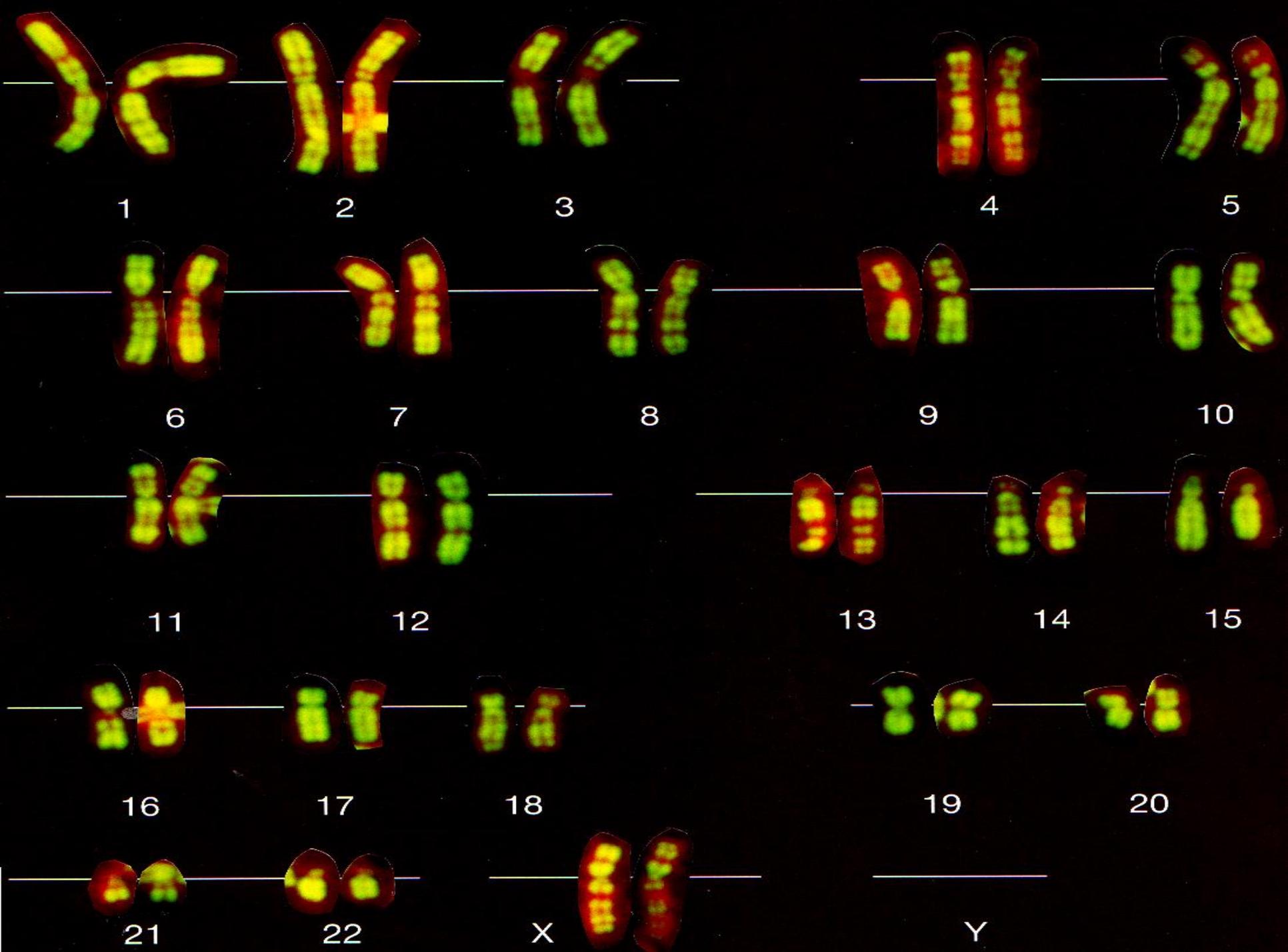
BANDEGGIO RBA

BANDEGGIO **RBA**

R è il tipo di bandeggio

B BrdU

A Acridina Orange



Bandeggio CBG

BANDEGGIO **CBG**

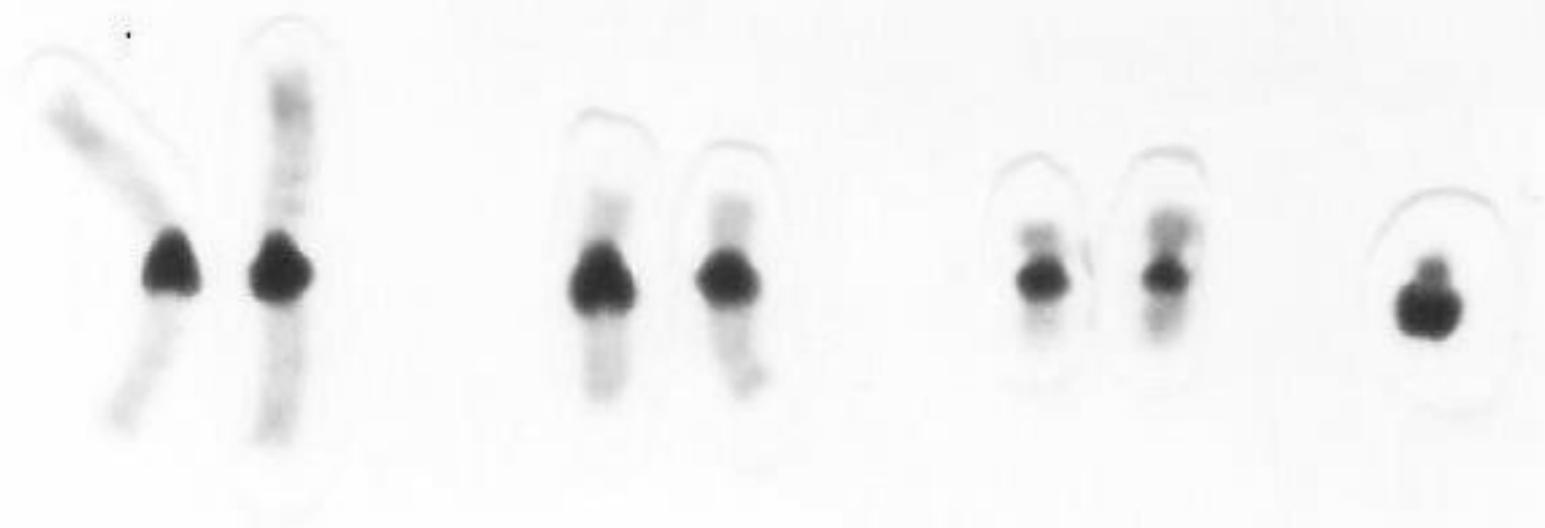
C è il tipo di bandeggio

B Idrossido di Bario

G Giemsa

BANDE

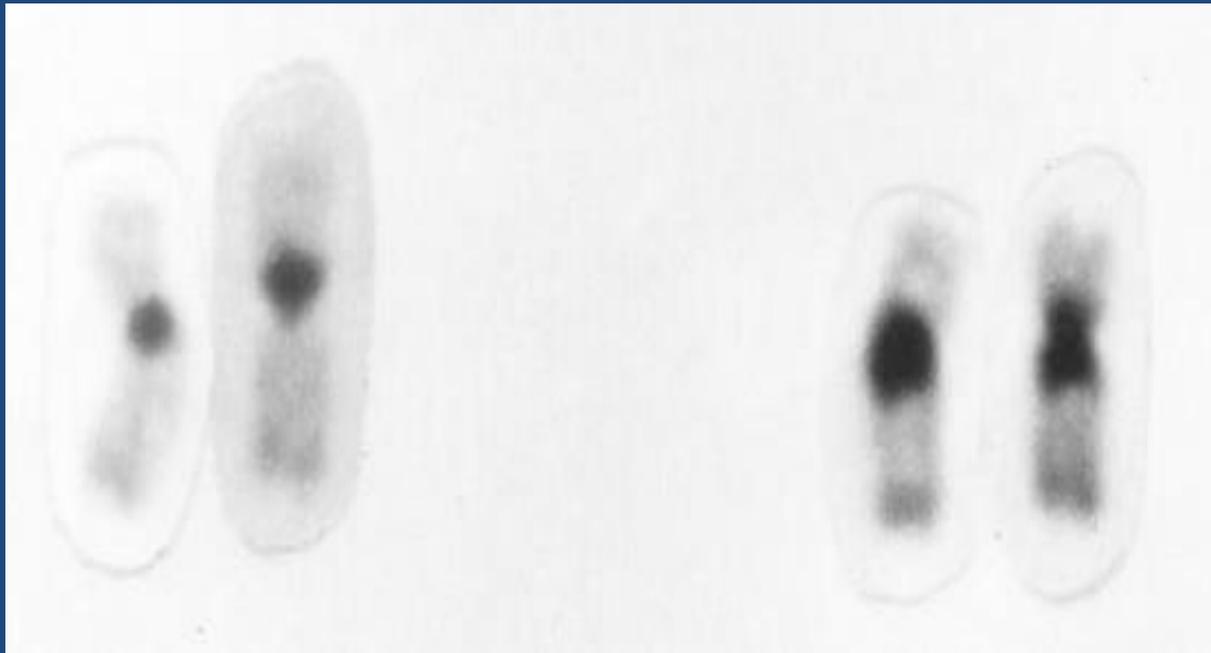
CBG

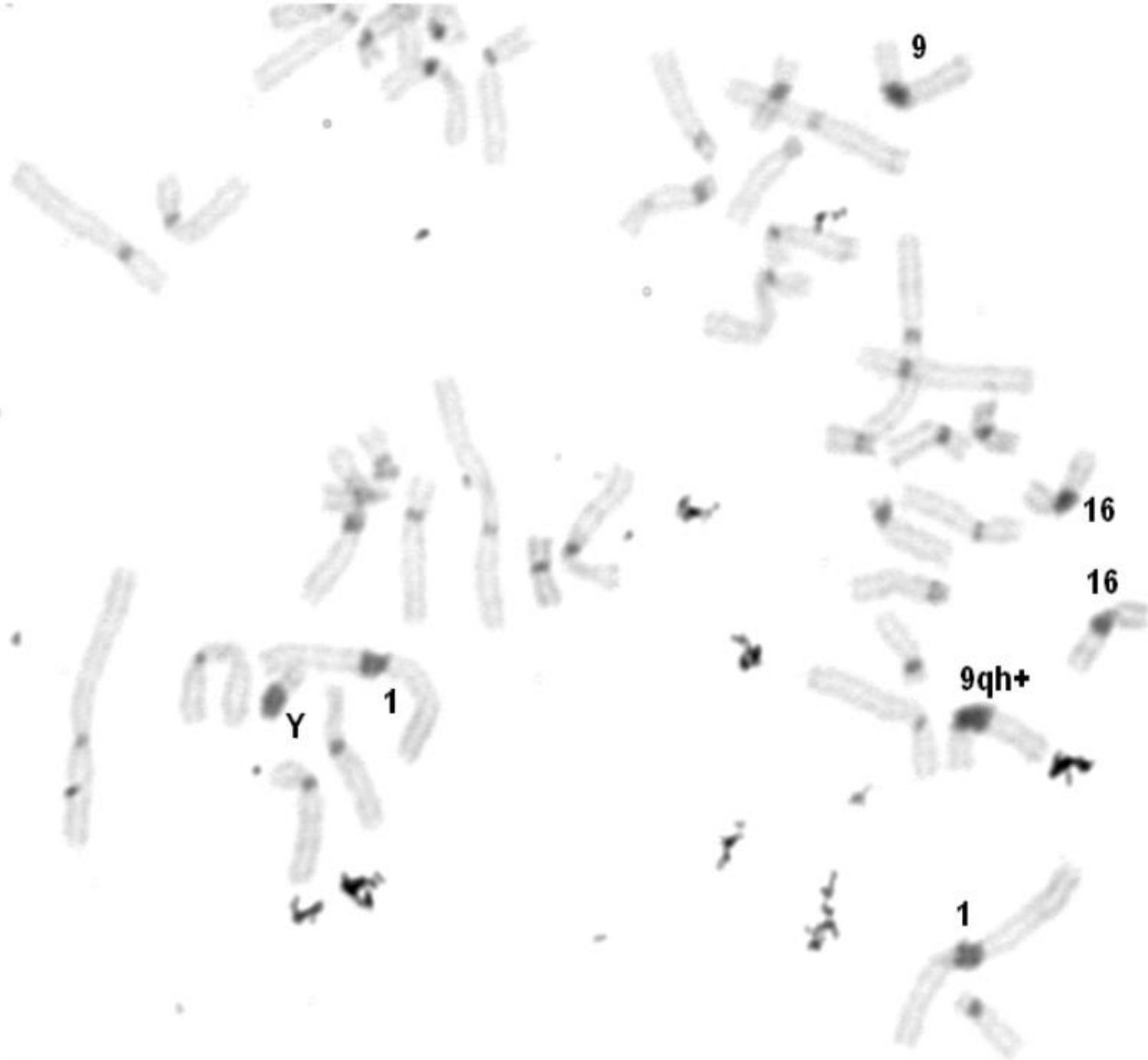


Inversione cromosoma 9

I Tipo

II Tipo





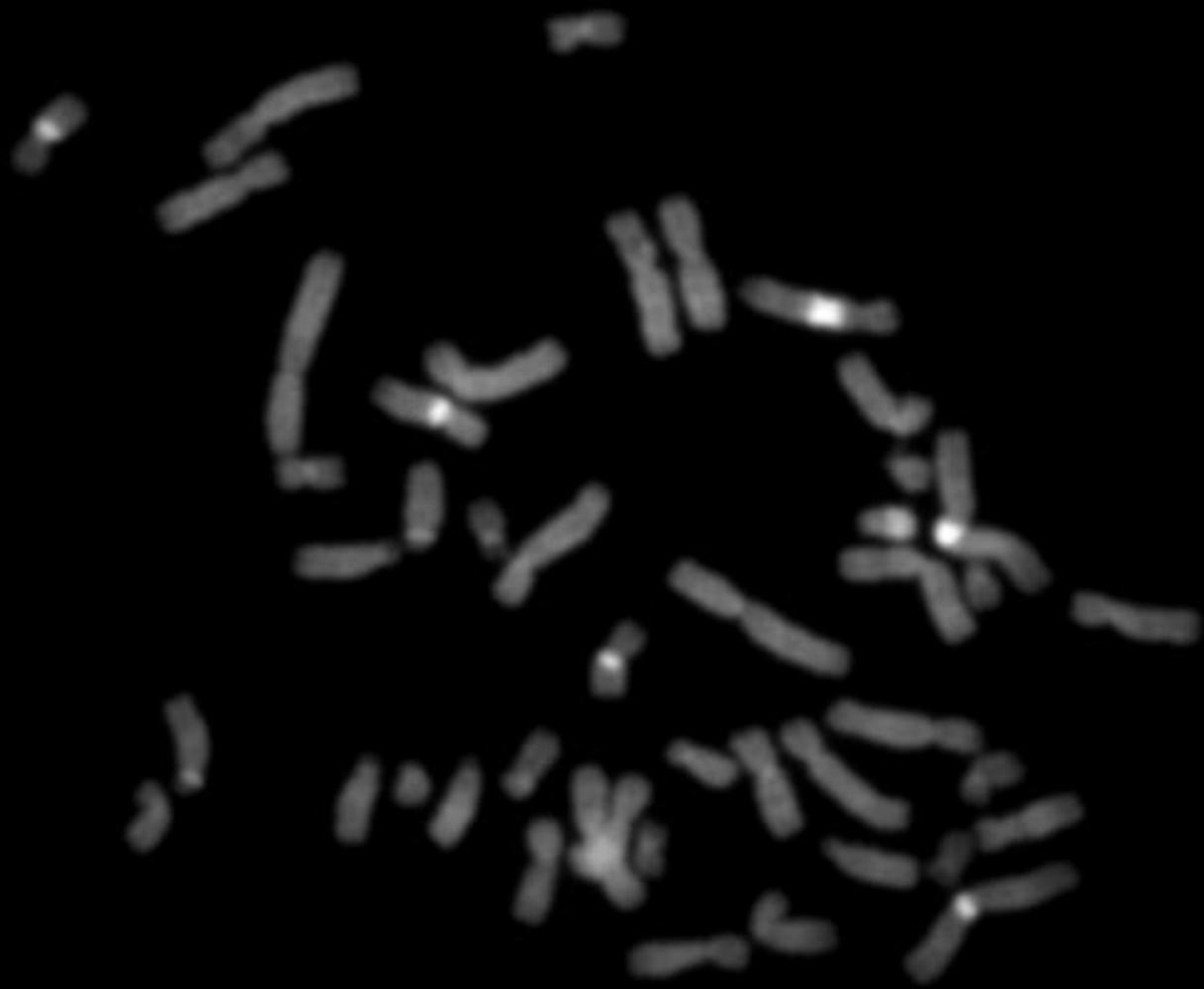
BANDEGGIO DAPI-DA/DAPI

BANDEGGIO DA/DAPI

DA distamicina A

DAPI 4,6-diamidino 2-fenilindolo

DA/DAPI

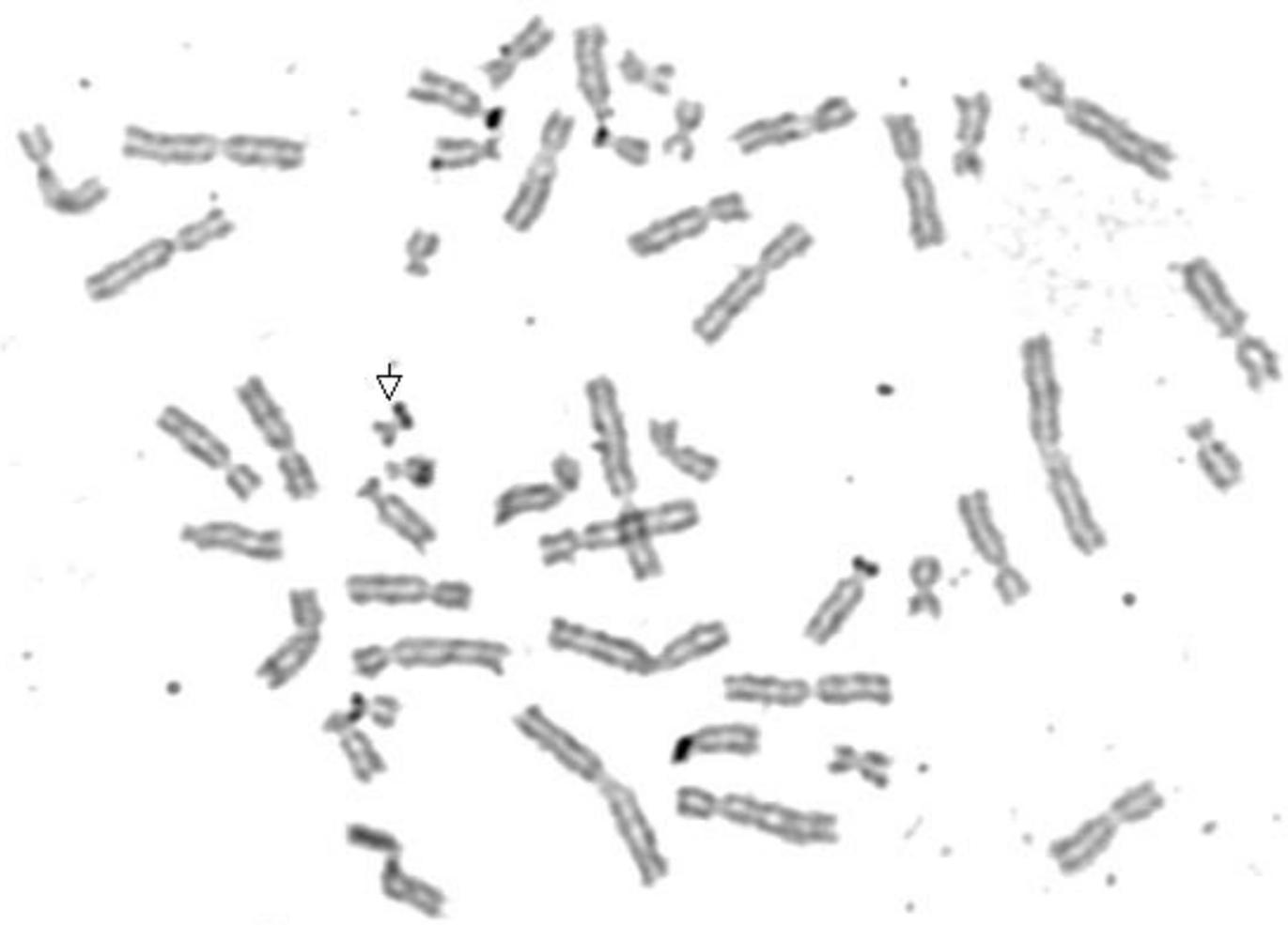


BANDEGGIO CROMOSOMICO

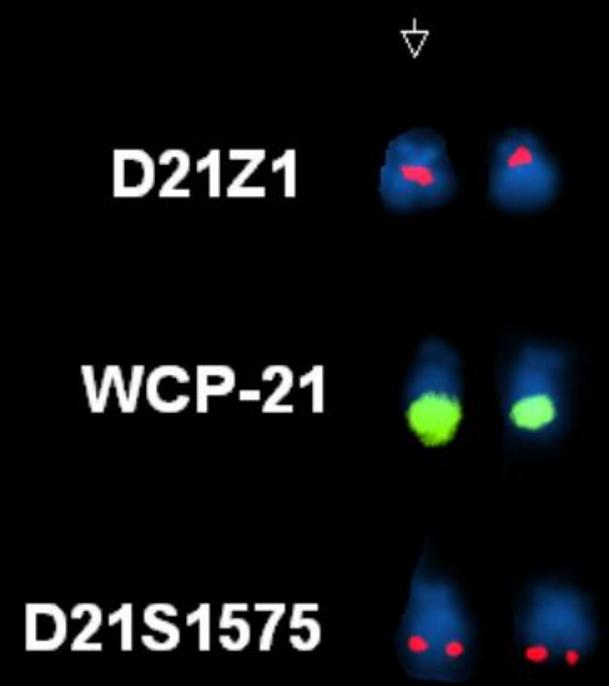
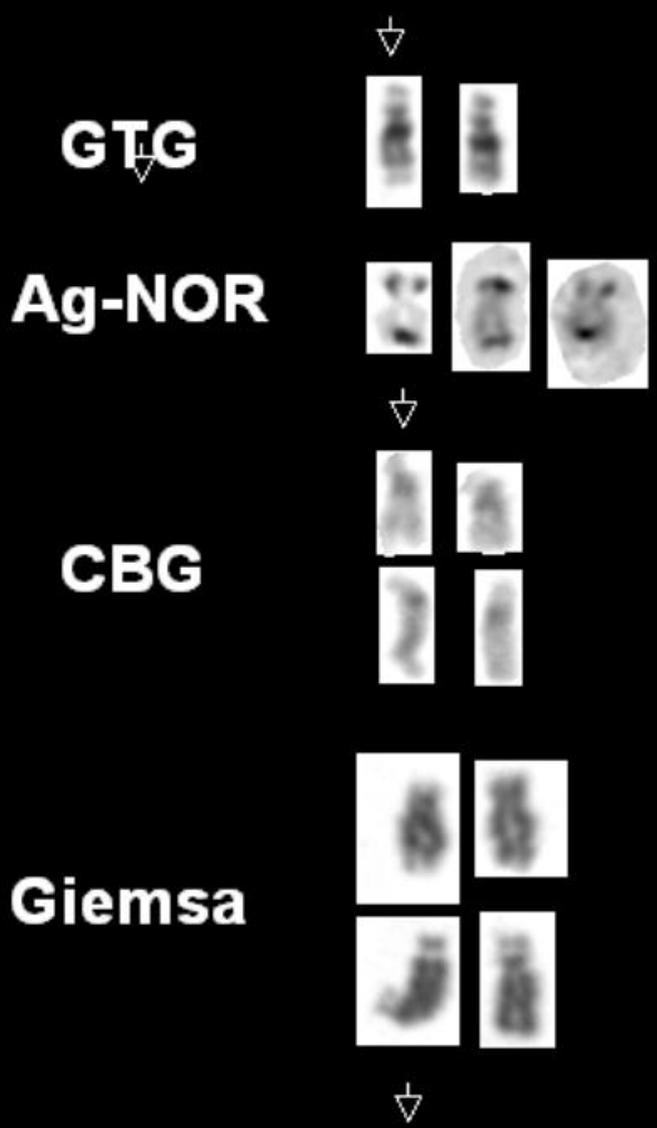
BANDEGGIO **Ag-NOR**

Ag Nitrato di Argento

NOR (Nucleolar Organizing Region)



21qs



GRAZIE



Colchicum autumnale