

TEHNICI DE BANDARE A CROMOZOMILOR UMANI

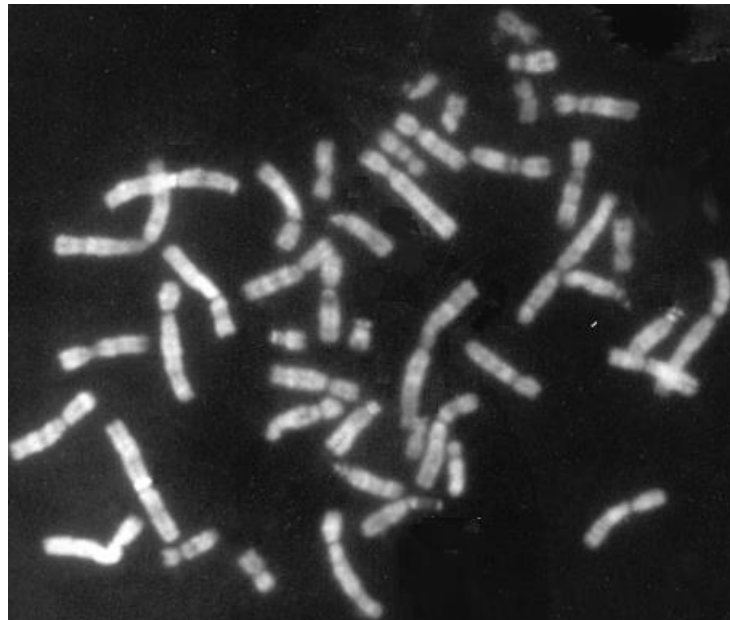
COLORAȚIA SIMPLĂ GIEMSA

- toți cromozomii vor fi colorați omogen, lucru ce permite stabilirea numărului, dar nu și identificarea cromozomilor sau a anomaliilor de structură



BANDAREA Q (Q = QUINACRINĂ)

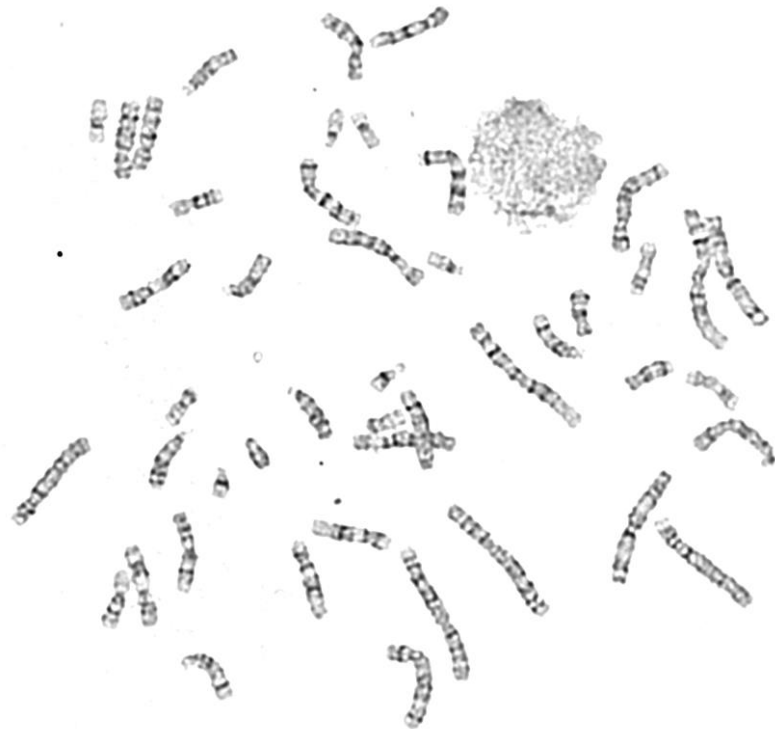
- tratarea preparatelor cromozomiale necolorate cu quinacrină, o substanță fluorescentă și cu afinitate mare pentru porțiunile cromozomiale bogate în A-T.
- în urma tratamentului, apar benzi fluorescente observate în lumină UV, ce alternează cu benzi nefluorescente.



Bandarea G (G = Giemsa)

- se obține prin tratarea preparatelor cromozomiale cu diverși agenți (de exemplu, digestie proteolitică cu soluție de tripsină) și colorare cu soluție Giemsa sau alți coloranți (de exemplu, Leishman).

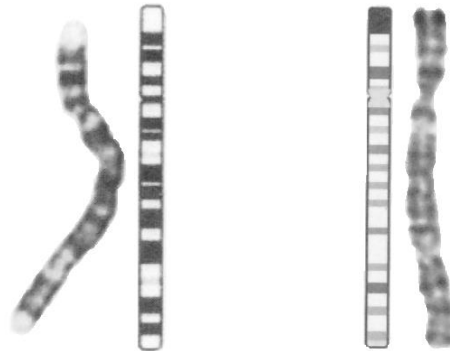
În urma tratamentului cu tripsină, se obțin benzi intens colorate, numite G+, care alternează cu benzi slab colorate, luminoase numite G-. Benzile G+ corespund regiunilor bogate în heterocromatină (A-T), în timp ce benzile G - corespund regiunilor bogate în eucromatină (G-C).



Bandarea R (R = reversie)

- se realizează prin tratarea termică controlată a cromozomilor (85°C), urmată de colorare cu soluție Giemsa sau agenți cu afinitate pentru regiunile bogate în G–C. Se obține o alternanță de benzi colorate, denumite R+ și benzi luminoase, R-.

Topografia benzilor R este inversă topografiei benzilor G și Q (benzile R negative se suprapun peste benzile G pozitive și Q fluorescente, și viceversa).

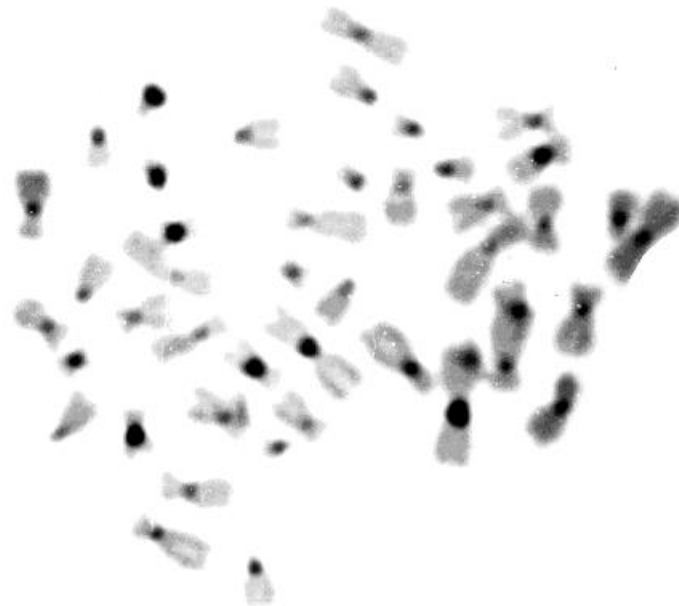


bandare G

bandare R

BANDAREA C (C=CENTROMER)

- permite evidențierea centromerului și a constricțiilor secundare.
- se obține după tratamente de denaturare-renaturare cu soluții saturate alcaline (hidroxid de bariu) și apoi colorare cu soluție Giemsa. Se observă o colorație intensă în regiunea centromerică (heterocromatina constitutivă centromerică)



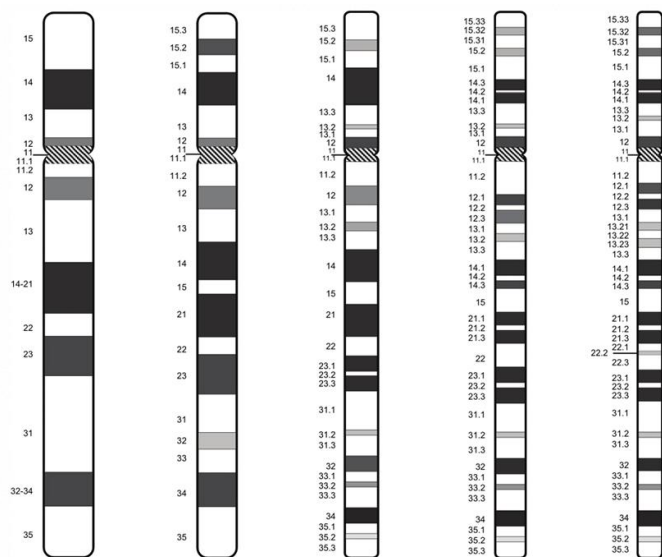
Bandarea T (T = telomere)

- permite evidențierea modificărilor ce implică telomerele cromozomilor. Se obține prin denaturare termică prelungită a preparatelor cromozomiale și colorarea lor cu acridine orange (evidențiindu-se o fluorescență verde la nivelul telomerelor).
- dacă colorația se efectuează cu soluție Giemsa, se observă colorarea intensă a telomerelor, comparativ cu restul cromozomului slab colorat



Numărul de benzi per set haploid de cromozomi, folosind marcajul G sau R este de aproximativ 400-500 de benzi în metafază și de aproximativ 550-850 de benzi în prometafază, folosind tehnici cu sincronizare.

Rezoluția analizei citogenetice convenționale este de 5-10 Mb, modificările mai mici necesitând tehnici speciale de citogenetică sau genetică moleculară.



Cromozomul 5

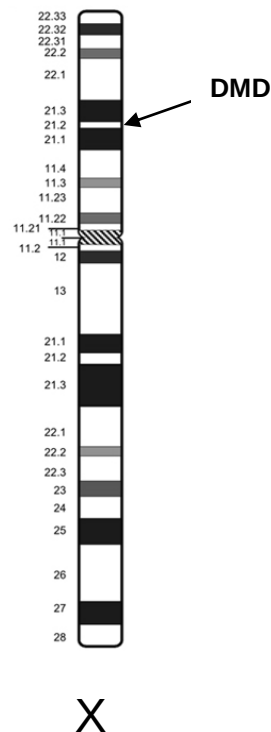
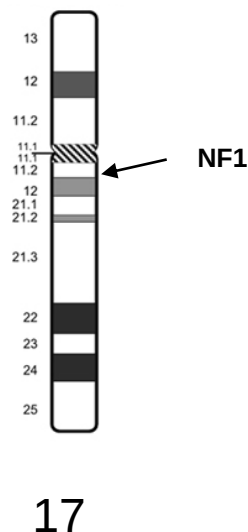
Idiograma benzilor G pentru cromozomul 5, pentru cinci niveluri de rezoluție, de la stânga la dreapta: 300, 400, 550, 700 și 850 de benzi (sursa: ISCN, 2013)

Pentru localizarea unei gene la nivelul unui cromozom, se notează numărul cromozomului, simbolul brațului (q sau p), numărul regiunii și numărul benzii.

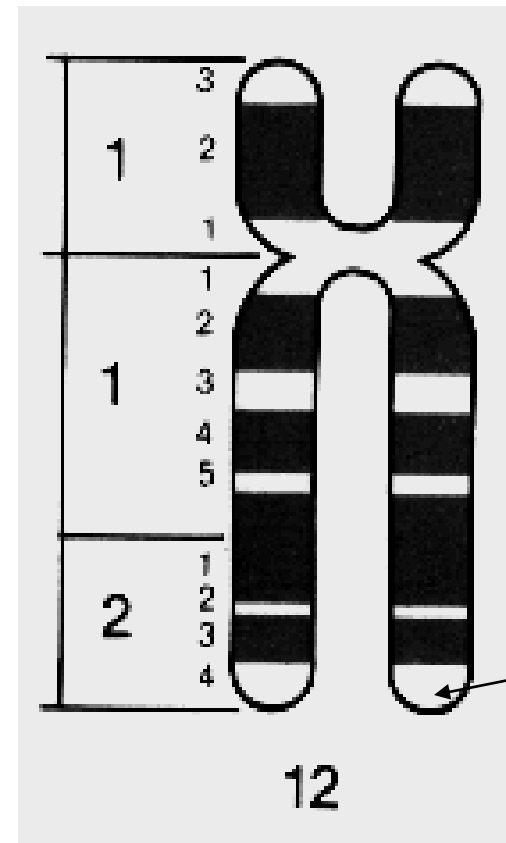
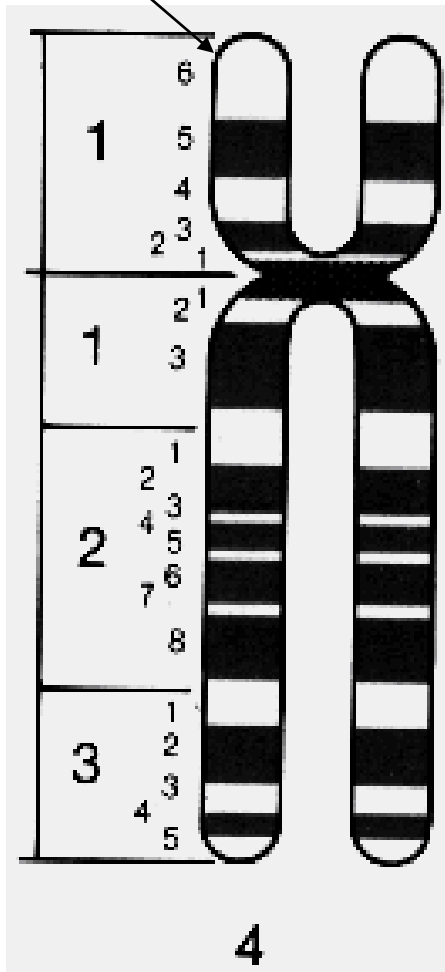
Pentru desemnarea subbenzilor vizibile în cromozomii prometafazici, după numărul benzii se pune punct, urmat de numărul subbenzii.

Exemple: - gena NF1 care codifică neurofibromina, ale cărei mutații sunt asociate neurofibromatozei tip 1, este localizată pe 17q11.2 – cromozomul 17, brațul lung (q), regiunea 1, banda 1, subbanda2

- gena DMD ce codifică distrofina, ale cărei mutații sunt asociate cu distrofia musculară Duchenne, este localizată pe Xp21.2 – X indică cromozomul, p – brațul scurt, regiunea 2, banda 1, subbanda 2 .



FGFR3



PAH

4p16.3

cromozom

brat

regiune

banda

subbanda

CARIOTIPUL UMAN NORMAL

Cariotipul

Cariograma reprezintă aranjarea și clasificarea cromozomilor în grupe morfologice pe baza unor criterii standardizate.

Cariotipul se referă la formula cromozomială asociată cariogramei.

Cromozomii omologi din cadrul perechilor, unul de proveniență maternă și celălalt de proveniență paternă, au aproximativ aceeași dimensiune și morfologie (poziție a centromerului), conțin același număr și tip de gene (alelele pot fi diferite pentru majoritatea locilor), și prezintă același model de benzi cromozomiale.

Cariotip - notare

Numarul total de cromozomi,

Cromozomii sexuali,

Anomalii/variante.

46,XY

47,XX,+21

47,XXX

69,XXY

Trisomia 21 (Sindromul Down)

Sindromul Triplu X

Triploidie

Pe baza criteriilor:

- mărime,**
- model de benzi,**
- raportul brațelor cromozomilor – $R=q/p$,**
- indice centromeric – $IC=p/p+q$,**
- constricții secundare,**
- sateliți**

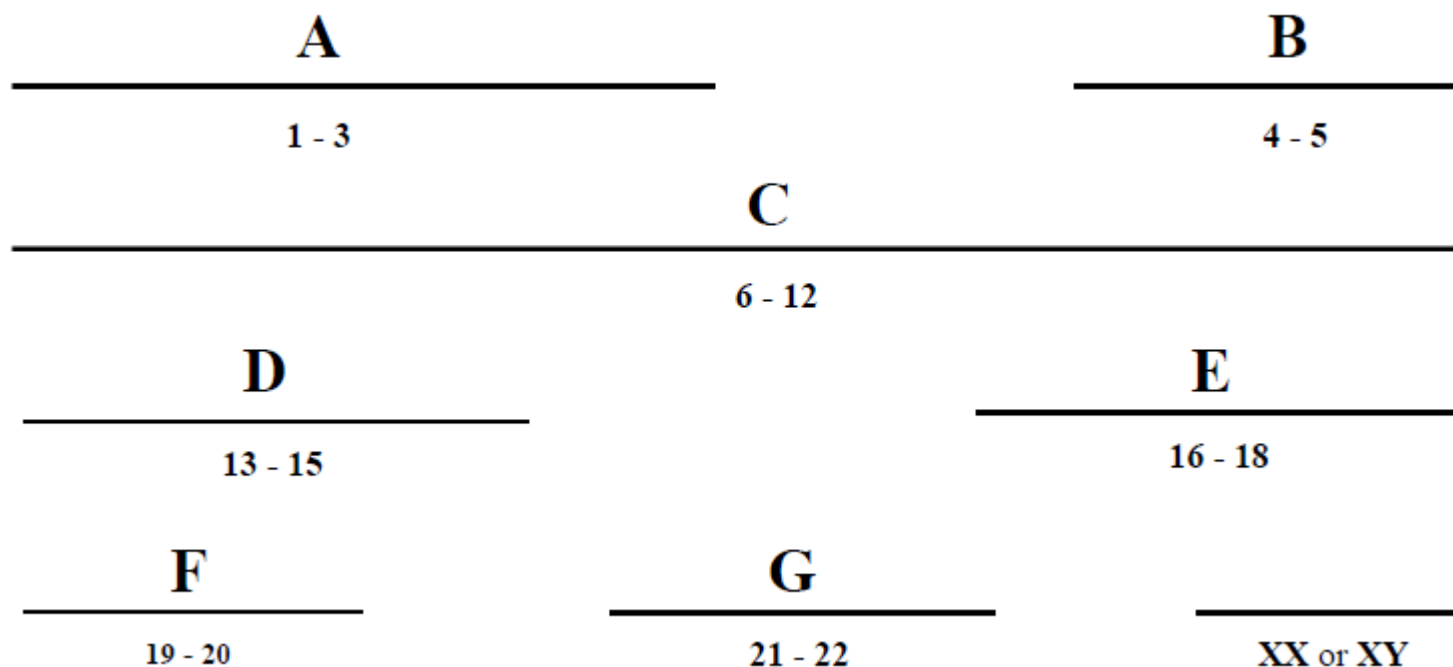
cromozomii umani au fost repartizați în 7 grupe morfologice, notate de la A la G.

O grupă include perechile de cromozomi care au valori apropiate ale mărimii, indicelui centromeric și prezintă unele particularități morfologice (sateliți).

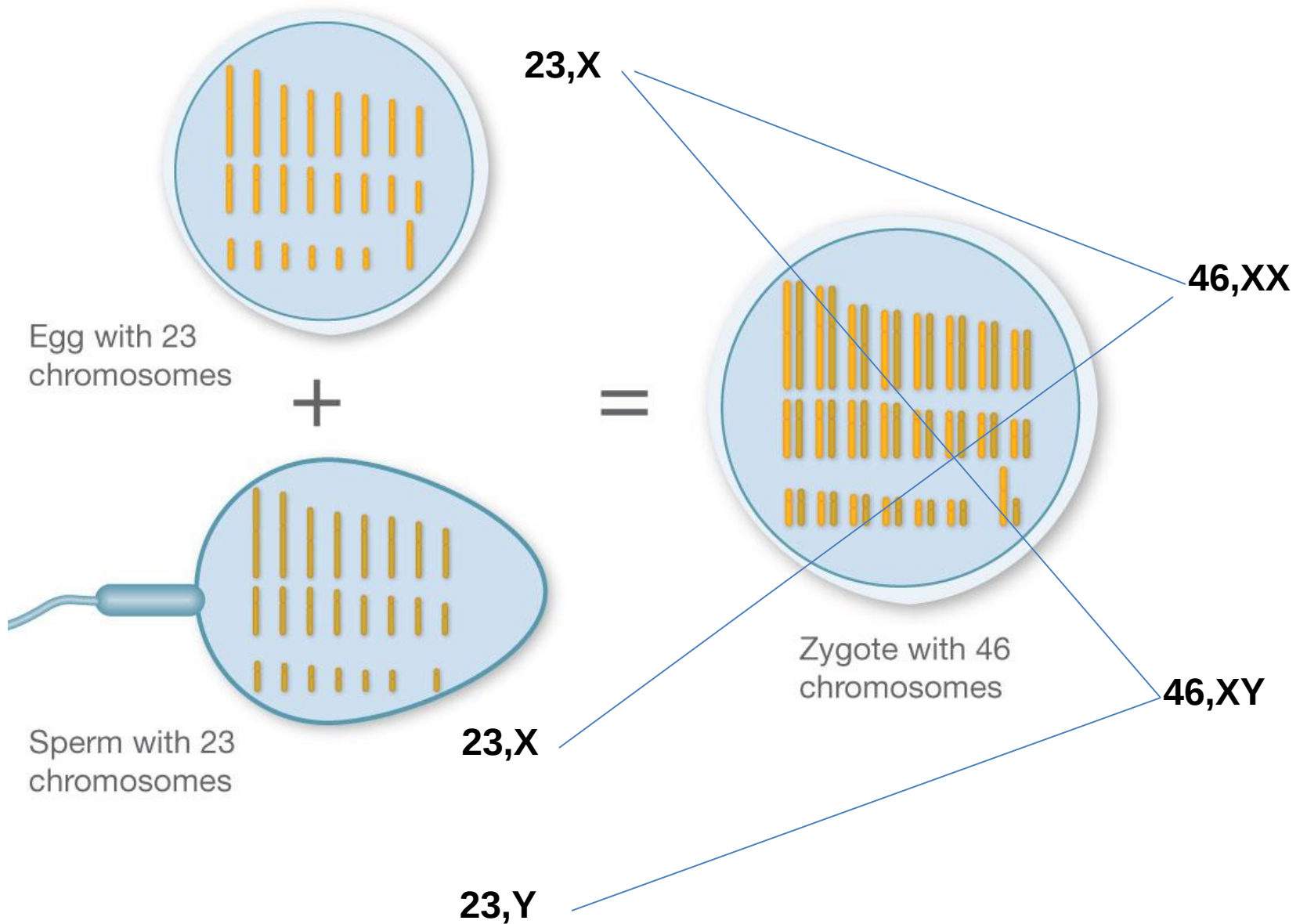
Cromozomul X are mărime și morfologie asemănătoare cu cea a cromozomilor din grupa C, iar cromozomul Y cu cea a cromozomilor din grupa G. Cromozomii sexuali se aranjează în cariogramă după grupa G (perechea 22).

Cariotipul

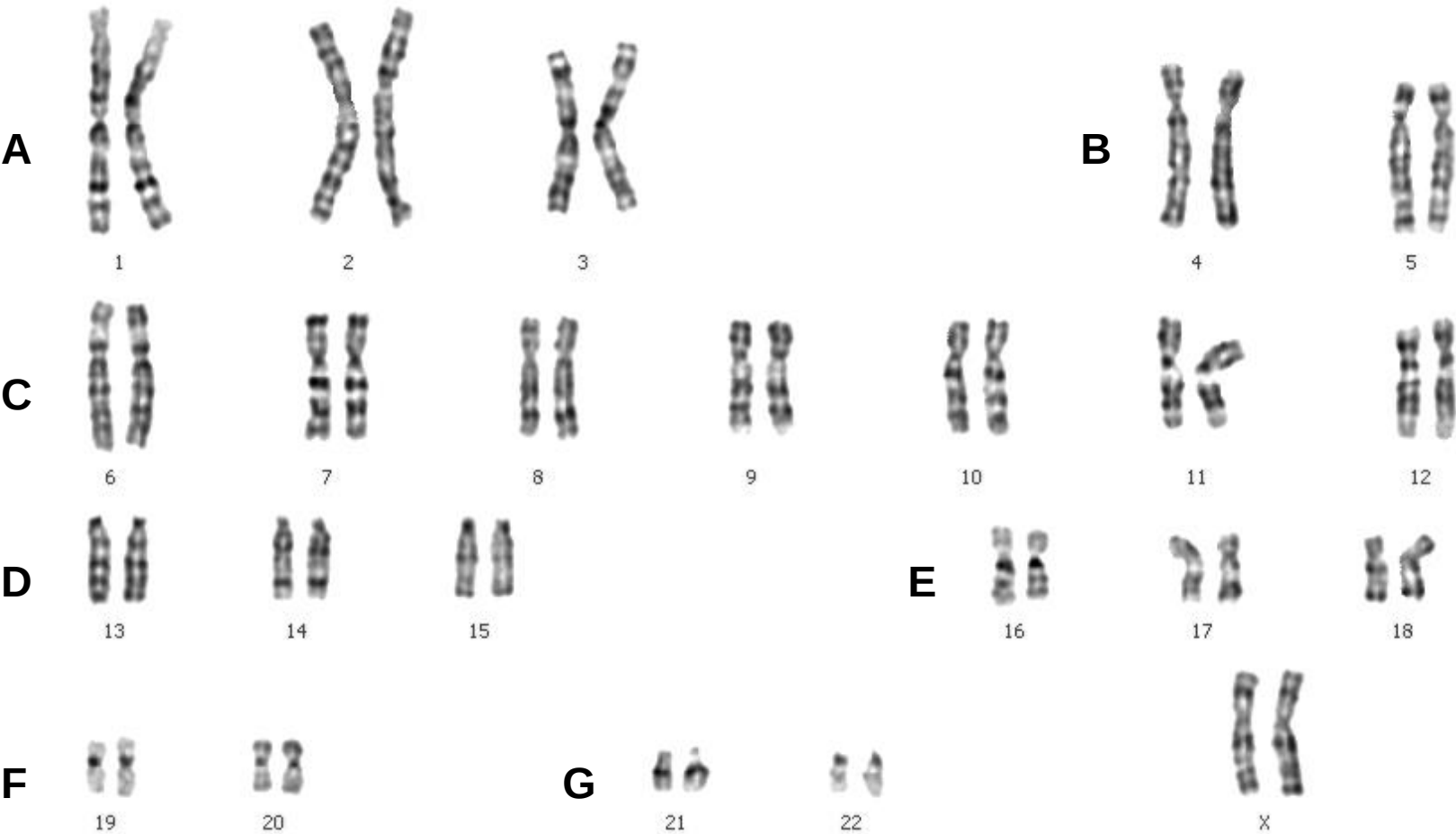
- 7 grupe identificate in functie de lungimea relativa si morfologia cromozomilor
- 22 perechi de cromozomi omologi – autozomi
- 1 pereche de cromozomi sexuali



Grupa	Perechile de cromozomi	Dimensiune si forma
A	1 - 3	Mari si metacentrici (1,3) submetacentric (2)
B	4 si 5	Mari si submetacentrici
C	6 - 12 si X	Medie si submetacentrici
D	13 - 15	Medie si acrocentrici
E	16 - 18	Mijlociu și metacentric (16) Mici si submetacentrici (17,18)
F	19 si 20	Mici si metacentrici
G	21 - 22 si Y	Mici si acrocentrici



Cariotip Normal Feminin - 46,XX



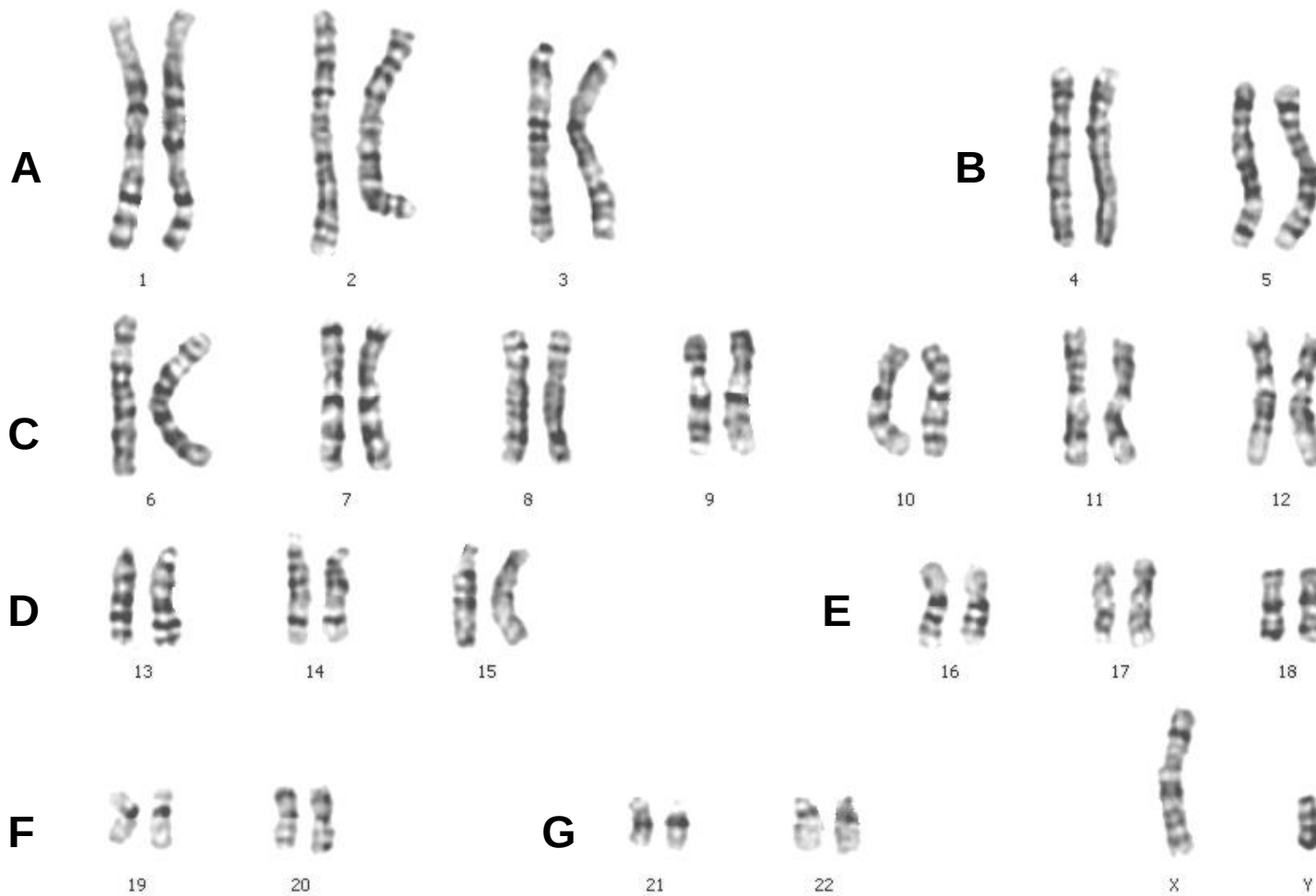
Formula citogenetică (cariotip) normală pentru o femeie:

46,XX.

46 = numărul total de cromozomi

XX = cromozomii sexuali

Cariotip Nomal Masculin - 46,XY



Formula citogenetică (cariotip) normală pentru un bărbat:

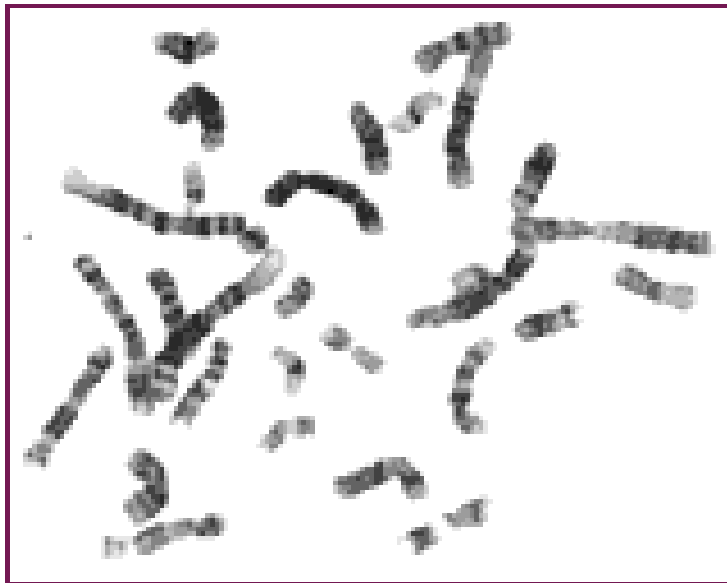
46,XY.

46 = numărul total de cromozomi

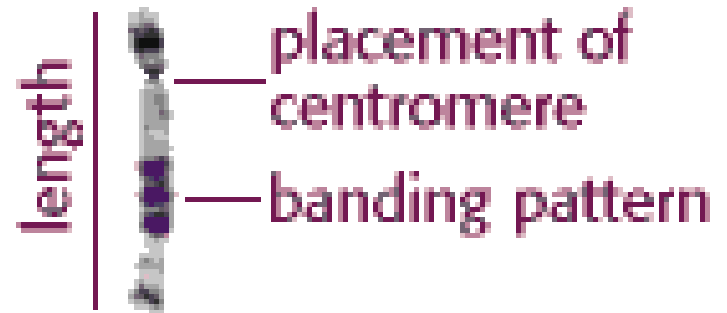
XY = cromozomii sexuali

Analiza implică compararea cromozomilor în funcție de: lungimea relativa, pozitia centromerului (zonele în care cele două cromatide sunt unite) și dispoziția și dimensiunile benzilor G.

Chromosome smear



Identifying features of a chromosome



ETAPELE OBȚINERII UNUI CARIOTIP:

- a) efectuarea și bandarea preparatelor cromozomiale;**
- b) examinarea preparatelor folosind microscopul optic și captarea metafazelor reprezentative;**
- c) prelucrarea metafazelor și obținerea cariogramelor cu ajutorul softurilor de cariotipare (ce permit decuparea cromozomilor, eliminarea suprapunerilor, plasarea în perechi, ajustarea contrastului etc.);**
- d) analiza imaginilor și scrierea formulei cromozomiale.**