



“Sperimenta il BioLab”



Le analisi cromosomiche

Università degli Studi di Milano
Settore Didattico, via Celoria 20, Milano
Laboratorio 105

INDICE

1.	INTRODUZIONE	p. 3
2.	STRUTTURA E MORFOLOGIA DEI CROMOSOMI EUCARIOTICI	
	2.1 Struttura	p. 3
	2.2 Morfologia	p. 4
3.	IL CARIOTIPO UMANO	
	3.1. Classificazione e nomenclatura dei cromosomi	p. 6
	3.2 I bandeggi	p. 8
4.	PATOLOGIA CROMOSOMICA	
	4.1 Variabilità cromosomica normale	p. 9
	4.2 Variabilità cromosomica patologica	p. 9
	4.2.1 Anomalie numeriche	p. 9
	4.2.2 Anomalie di struttura	p. 11
	4.3 Origine delle anomalie cromosomiche	p. 12
	4.4 Aspetti clinici delle anomalie degli autosomi	p. 14
	4.5 Aspetti clinici delle anomalie dei cromosomi sessuali	p. 17
5.	ANALISI DEL CARIOTIPO UMANO IN LABORATORIO	
	5.1 Colture cellulari e terreni di coltura	p. 19
	5.2 Colture di linfociti per ottenere cromosomi metafasici	p. 19
	5.3 Attività effettuate direttamente dagli studenti	p. 20
	5.3.1 Uomo o topo?	p. 20
	5.3.2 Cariotipo normale o patologico?	p. 23
6.	ESERCIZIO SUPPLEMENTARE	p. 25
7.	NORME DI SICUREZZA IN LABORATORIO	p. 26
8.	DOMANDE DI AUTOVALUTAZIONE	p. 27
9.	GLOSSARIO	p. 31
10.	BIBLIOGRAFIA	p. 33
11.	SITI WEB	p. 33

1. INTRODUZIONE

La **citogenetica** è la branca della genetica che studia i **cromosomi**. Ogni specie è caratterizzata da un determinato **assetto cromosomico**, vale a dire da un insieme specifico di cromosomi, il cui numero e struttura vengono mantenuti costanti attraverso le generazioni.

Lo scopo di questo laboratorio è di rendere familiari le metodologie usate in citogenetica umana per lo studio dei cromosomi, guidando gli studenti nell'osservazione e nell'interpretazione di assetti cromosomici normali o patologici.

Sono necessarie alcune conoscenze propedeutiche e, in particolare, è opportuno tener presente:

- la struttura della doppia elica del DNA
- la modalità di replicazione del DNA
- il ciclo cellulare delle cellule eucariotiche
- l'organizzazione strutturale della cromatina
- i processi di divisione cellulare (mitosi e meiosi), con particolare attenzione al comportamento dei cromosomi durante tali eventi.

2. STRUTTURA E MORFOLOGIA DEI CROMOSOMI EUCARIOTICI

2.1 Struttura

Nelle cellule eucariotiche, ogni cromosoma è costituito da una lunghissima molecola di DNA complessata con proteine e RNA a formare una sostanza denominata **cromatina**. La cromatina, suddivisa in parti, è dispersa nel nucleo durante l'interfase del ciclo cellulare, ma diventa compatta durante la meiosi e la mitosi (Fig. 1).

Durante tali divisioni, e in particolare alla metafase della mitosi, a causa appunto della progressiva condensazione della cromatina, appaiono visibili al microscopio ottico dopo colorazione delle strutture generalmente allungate, denominate **cromosomi** (Fig. 2).

Cromatina e cromosomi sono quindi due *aspetti diversi in momenti diversi* della stessa entità.

Di conseguenza, la possibilità di visualizzare i cromosomi ne consente l'identificazione e lo studio.

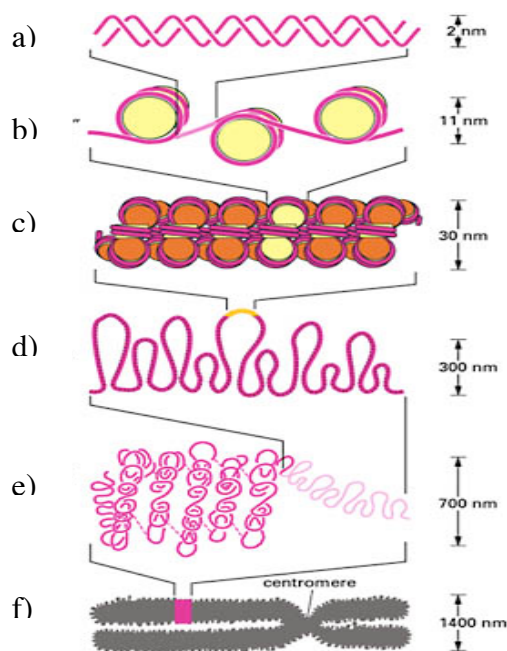


Fig. 1. I livelli di organizzazione della cromatina che danno origine ad un cromosoma eucariotico.

- a) Doppia elica di DNA
- b) "Collana di perle" o fibra di nucleosomi
- c) Fibra di nucleosomi avvolta a solenoide
- d) Domini ad anse
- e) Spirali condensate
- f) Cromosoma metafase

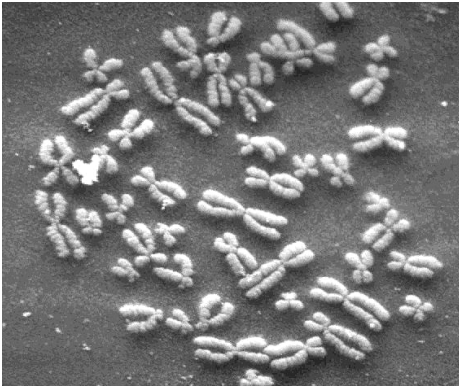


Fig. 2. Piastra metafasica in 3D.

Pertanto, il cromosoma degli eucarioti è costituito da **cromatina**, un complesso di DNA, proteine cromosomiche e RNA, che può presentarsi sotto forma di:

- **eucromatina**, che si colora più debolmente perché despiralizzata e geneticamente attiva
- **eterocromatina**, che si colora più intensamente perché condensata e geneticamente inattiva.

2. 2 Morfologia

I cromatidi

Nella metafase i cromosomi appaiono costituiti da due subunità longitudinali identiche, o **cromatidi fratelli**, unite a livello del centromero (Fig. 3), costituite ciascuna da una doppia elica di DNA.

I cromatidi fratelli sono geneticamente identici, essendo il risultato della replicazione del DNA nella fase S dell'interfase che ha preceduto la divisione cellulare.

Il centromero

Il centromero, localizzato a livello di una strozzatura detta *costrizione primaria*, è il punto di collegamento tra i due cromatidi fratelli ed è una sequenza che assume importanza particolare, poiché si associa al cinetocoro, formazione alla quale si attaccano le fibre del fuso durante la divisione. La funzione del centromero consiste pertanto nell'assicurare la corretta migrazione dei cromosomi e dei cromatidi alla meiosi e alla mitosi. Anche se la lunghezza assoluta di ogni cromosoma varia a seconda dello stadio della mitosi in cui viene fissato, la posizione relativa del centromero è costante e divide ciascun cromatidio in due bracci: *p* (da *petit*, corto) e *q* (da *queue*, lungo) (Fig. 4).

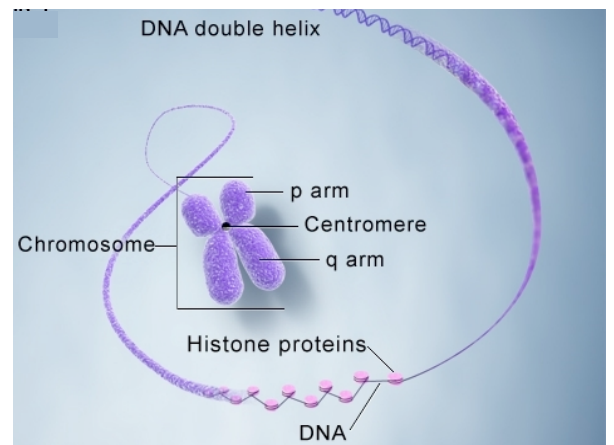


Fig. 3. Struttura del cromosoma metafaseico.

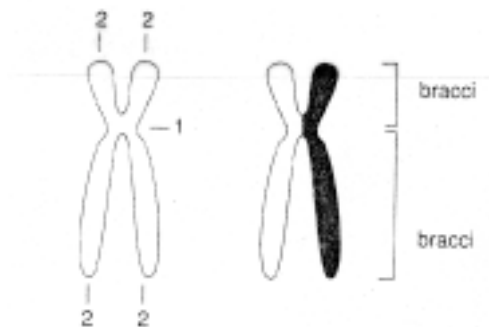


Fig. 4. Morfologia di un cromosoma metafaseico. 1. centromero o costrizione primaria; 2. telomeri. Nello schema a destra è evidenziato in nero uno dei due cromatidi.

Se i centromeri non funzionano correttamente, possono verificarsi non-disgiunzioni (errori nella segregazione) dei cromosomi omologhi durante prima divisione della meiosi o dei cromatidi fratelli durante la seconda divisione della meiosi o anche dei cromatidi fratelli alla mitosi.

I telomeri

Alle estremità dei cromatidi si trovano delle speciali regioni dette telomeri (Fig. 5), costituite da una sequenza di nucleotidi ripetuta migliaia di volte. Nell'uomo la sequenza è 5'GGGTTA3'. Essi hanno funzione di protezione delle estremità dei cromosomi e svolgono un ruolo fondamentale nell'assicurare una corretta replicazione della doppia elica del DNA di ogni cromatidio.

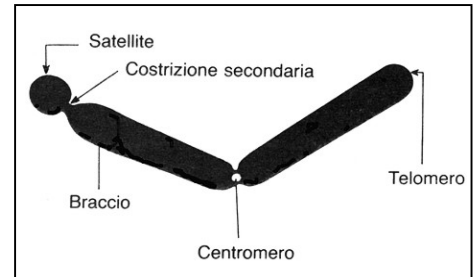


Fig. 5. Morfologia di un cromatidio.

Satelliti cromosomici

Alcuni cromosomi possono presentare oltre a quella del centromero, un'ulteriore strozzatura detta *costrizione secondaria*. Questa regione è la sede delle sequenze nucleotidiche che codificano l'RNA ribosomale (rRNA). La porzione di cromosoma che sporge viene denominata *satellite*. Nei cromosomi umani, la costrizione secondaria si trova sul braccio corto di tutti i cromosomi acrocentrici (Fig. 5).

3. IL CARIOTIPO UMANO

L'insieme completo di tutti i cromosomi metafasi di una cellula è definito **cariotipo**; il cariotipo è specie-specifico e quello umano normale diploide è costituito da **46 cromosomi** (22 paia di **autosomi** e un paio di **cromosomi del sesso** o **eterocromosomi**: XX nella femmina, XY nel maschio).

3.1 Classificazione e nomenclatura dei cromosomi

La **ricostruzione del cariotipo** o **mappa cromosomica** viene effettuata attraverso la costruzione del **cariogramma**, ottenuto appaiando i cromosomi metafasi omologhi e ordinandoli secondo un sistema di classificazione internazionale.

La localizzazione del centromero è una caratteristica costante. In base alla posizione del centromero i cromosomi vengono pertanto così classificati:

- se il centromero ha una posizione centrale, il cromosoma è definito **metacentrico** (Fig. 6A)
- se è localizzato non esattamente in posizione mediana, il cromosoma è definito **submetacentrico** (Fig. 6B)
- se infine il centromero è localizzato all'estremità del cromosoma, questo è definito **acrocentrico** (Fig. 6C)

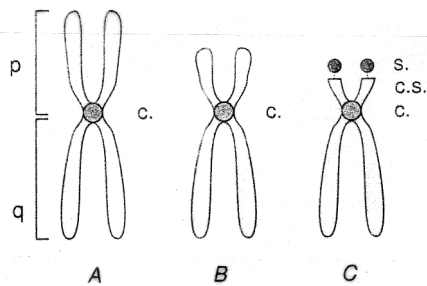


Fig. 6. Diversi tipi morfologici di cromosoma (p, braccio corto; q, braccio lungo; c, centromero; c.s., costrizione secondaria; s, satellite)

I cromosomi umani esaminati in mitosi sono classificati e ordinati in base alla lunghezza e alla posizione del centromero, in accordo con la **classificazione di Denver**, proposta nel 1960 al Congresso di Genetica Umana tenutosi in Colorado.

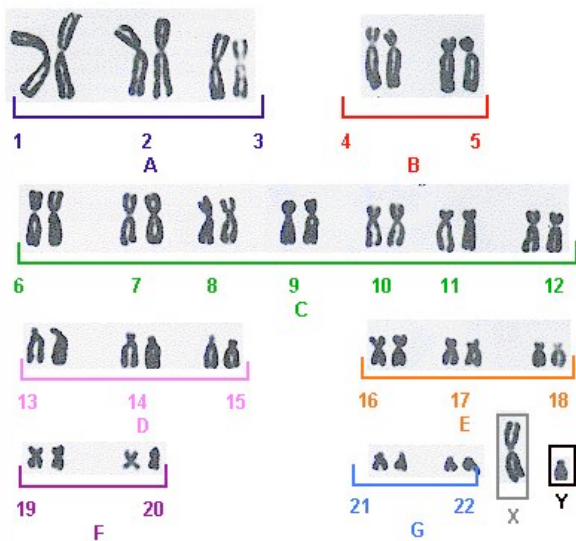


Fig. 7. Cariogramma di cromosomi metafasi umani ordinati secondo la classificazione di Denver.

I cromosomi sono stati suddivisi in 7 gruppi (Fig. 7), in ordine decrescente di lunghezza:

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

Nell'uomo i cromosomi 1, 3, 16, 19 e 20 sono metacentrici, i cromosomi 13, 14, 15, 21, 22 e Y sono

acrocentrici e gli altri sono submetacentrici.

Fino all'introduzione delle tecniche di bandeggio era peraltro praticamente impossibile classificare ed identificare singolarmente tutte le 23 coppie di cromosomi. Potevano essere chiaramente identificati solo i cromosomi 1, 2, 3, 16 e Y.

Successivamente al 1960 si sono accumulate informazioni su diverse aberrazioni numeriche e strutturali dei cromosomi (vedi paragrafo 4.2). Nella Conferenza Internazionale di Genetica Umana di Chicago del 1966 ed in seguito nella Conferenza di Parigi del 1971, è stata definita una nomenclatura standard per le varie aberrazioni cromosomiche: venne proposto di aggiungere alla nomenclatura originale di Denver una serie di simboli per indicare sia alcune caratteristiche del cariotipo normale che le aberrazioni cromosomiche.

Per convenzione, i cariotipi normali si rappresentano in modo sintetico come segue:

46, XX (individuo di sesso femminile)

46, XY (individuo di sesso maschile)

Alcuni dei simboli comunemente usati sono:

- / una linea diagonale indica la presenza di un mosaicismo (vedi paragrafo 4.3); per esempio 46/47 indica che l'individuo in esame presenta due linee cellulari, una con 46 cromosomi, l'altra con 47.
- + e - questi segni indicano la presenza di un cromosoma soprannumerario (+) o la mancanza di un cromosoma (-) o di una parte di cromosoma (es. 47, XX, +21 indica un individuo di sesso femminile con un cromosoma 21 soprannumerario).

La ricostruzione del cariotipo, ovvero il passaggio dal cariotipo al cariogramma, è rappresentata nella Fig. 8. A sinistra è presentata una metafase quale appare al microscopio (cariotipo), al centro e a destra la ricostruzione (cariogramma) di un cariotipo maschile e femminile rispettivamente con i diversi cromosomi appaiati, classificati e allineati.

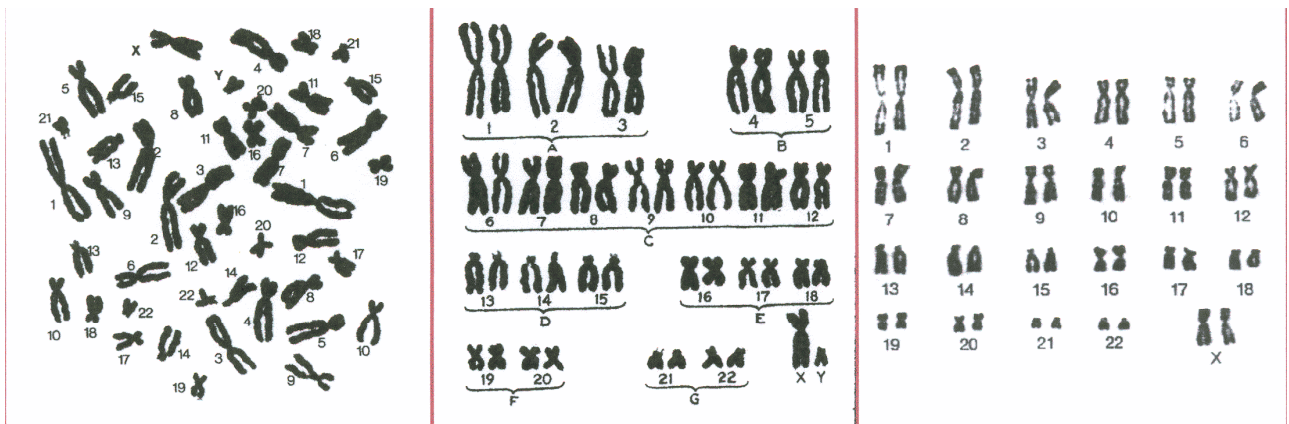


Fig. 8. Dal cariotipo al cariogramma.

Nel 1971 durante la conferenza di Parigi, la nomenclatura e la classificazione dei cromosomi sono state aggiornate, tenendo conto delle immagini di bande che si ottengono colorando i preparati cromosomici con Giemsa o con particolari fluorocromi quali la quinacrina (vedi paragrafo seguente). Le tecniche di bandeggio hanno consentito di identificare ed analizzare i singoli cromosomi.

3.2 I bandeggi

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.

Esistono diversi tipi di bandeggi, di cui i principali sono:

- **Bandeggio Q**, ottenuto mediante l'impiego di un colorante fluorescente, la **Quinacrina**. Consiste in un'alternanza di regioni intensamente fluorescenti e di regioni buie. Le bande più luminose corrispondono alle zone ricche in Adenina e Timina (Fig. 9 a).
- **Bandeggio G**, ottenuto col colorante **Giemsa** e con tripsina. Il bandeggio G è caratterizzato da un'alternanza di bande chiare e scure (Fig. 9 b). Le bande chiare corrispondono a regioni caratterizzate da attività trascrizionale, replicazione precoce, basso contenuto di DNA ripetuto e sensibilità alla DNasi I. Le bande più scure corrispondono alle zone ricche in Adenina e Timina, relativamente povere di geni, e risultano quindi corrispondenti e sovrapponibili alle bande Q. Il potere di risoluzione di questo tipo di colorazione è alquanto grossolano, infatti una banda citogenetica ha una dimensione media di circa 5 Mb (5 milioni di basi) e può contenere centinaia di geni.
- **Bandeggio R**, ottenuto mediante denaturazione al calore e opportuna colorazione: è l'inverso delle bande Q e G e le bande scure corrispondono a zone ricche in Citosina e Guanina.

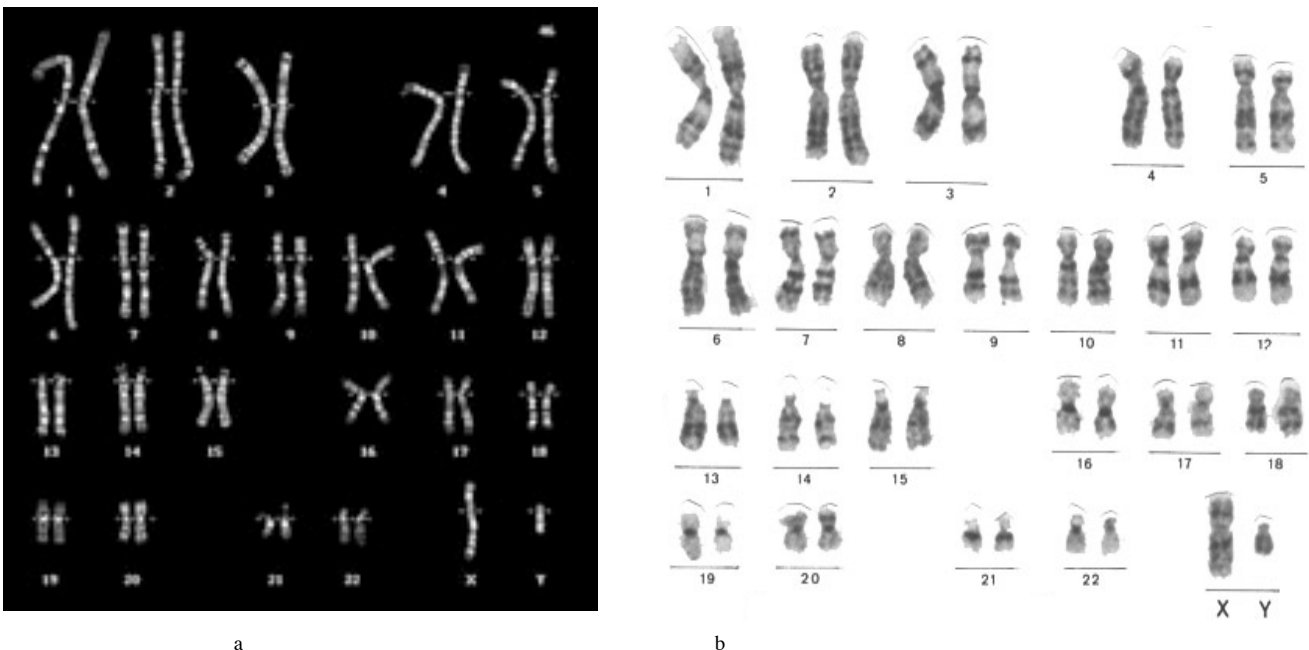


Fig. 9. Bandeggio di cromosomi umani:
a) Le bande Q si ottengono con la tecnica di bandeggio con Quinacrina
b) Le bande G si ottengono con la tecnica di bandeggio con Giemsa.

4. PATOLOGIA CROMOSOMICA

Nel corso degli anni le tecniche citogenetiche per lo studio del cariotipo si sono sempre più raffinate ed oggi, grazie al bandeggio dei cromosomi e alle colorazioni specifiche, è possibile verificare non soltanto la presenza di un corretto numero di cromosomi nelle cellule, ma anche di individuare alterazioni strutturali anche di piccole dimensioni. Si è sviluppata così una branca della patologia umana denominata **patologia cromosomica**.

Alcune applicazioni dell'analisi citogenetica nella patologia cromosomica sono:

- diagnosi prenatale di sindromi associate ad anomalie cromosomiche
- diagnosi postnatale di anomalie cromosomiche in individui portatori di sindromi o di malattie genetiche
- diagnosi postnatale di anomalie cromosomiche bilanciate in individui sani che mostrano poliabortività
- studio citogenetico delle cellule tumorali: identificazione di cromosomi "marcatori" e mappaggio di regioni subcromosomiche che contengono geni associati allo sviluppo o alla progressione tumorale.

4.1 Variabilità cromosomica normale

Il genoma umano presenta una grande variabilità genetica a livello molecolare, variabilità che ha riscontri anche a livello citogenetico quando coinvolge tratti di DNA dell'ordine di milioni di basi. Molta di questa variabilità riguarda l'*eterocromatina*, inerte dal punto di vista genetico, e pertanto senza effetti fenotipici.

Si tratta quindi di una variabilità normale che a livello di eterocromatina può manifestarsi sotto forma di *varianti morfologiche*, e precisamente:

- variazioni di lunghezza di zone pericentromeriche, soprattutto dei cromosomi 1, 9, 16 e Y;
- variazioni di lunghezza dei bracci corti dei cromosomi acrocentrici, con presenza di satelliti o assenza totale del braccio corto.

4.2 Variabilità cromosomica patologica

D'altra parte, una qualsiasi anomalia del cariotipo umano normale (46,XX o 46,XY) ha di norma come conseguenza una patologia, di gravità variabile.

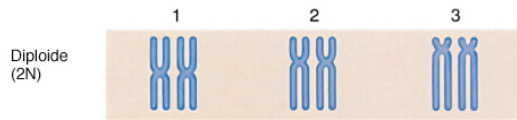
Le anomalie sono generalmente il risultato di errori durante la gametogenesi (non-disgiunzione dei cromosomi omologhi o rotture cromosomiche seguite da una riorganizzazione degli stessi in combinazioni anomale), ma possono verificarsi anche al momento della fecondazione o nelle prime fasi dello sviluppo embrionale. Le rotture dei cromosomi si verificano in modo casuale, pertanto a livello teorico sono possibili numerosissime anomalie; di fatto solo in piccola parte sono compatibili con la vita.

Le anomalie cromosomiche si possono distinguere in due gruppi: **anomalie numeriche** e **di struttura**.

4.2.1 Anomalie numeriche

Ogni assetto cromosomico corrispondente esattamente a un multiplo dell'assetto aploide n di una specie è definito **euploide**; in particolare, quelli superiori a $2n$ sono detti **poliploidi** (triploidi $3n$, tetraploidi $4n$, ecc.) (Fig.10).

Assetto cromosomico normale



a) Monoploidia
(un solo assetto cromosomico)



b) Poliploidia
(più del numero normale di assetti cromosomici)

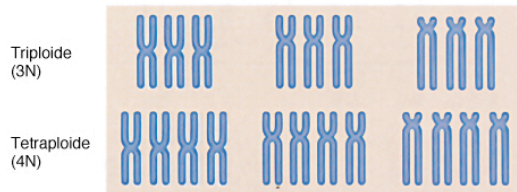


Fig. 10. Anomalie numeriche: le poliploidie.

Nell'uomo la presenza di una triploidia (Fig. 11) 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 è 1/10.000 nati).



Fig. 11. Cariotipo triploide.

Si definisce invece **aneuploide** qualunque numero di cromosomi che non sia un multiplo esatto di n : 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, X0) (Tab. 1)

Monosomie		Polisomie			
Degli eterocromosomi		Degli eterocromosomi		Degli autosomi	
cariotipo	sindrome	cariotipo	sindrome	cariotipo	sindrome
45, X0	Turner	47, XXX 48, XXXX 49, XXXXX	Polisomie del cromosoma X, "superfemmine"	47,XX o XY, +21	Down
		47, XXY 48, XXXY 49, XXXXY	Sindrome di Klinefelter	47,XX o XY, +18	Edwards
		47, XYY e 48, XXYY	Sindrome del doppio Y	47,XX o XY, +13	Patau
				47,XX o XY, +8	Trisomia 8

Tab.1. Schema riassuntivo delle più comuni aneuploidie dei cromosomi sessuali e degli autosomi.

4.2.2 Anomalie di struttura

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. Le modificazioni strutturali dei cromosomi possono essere sia *stabili*, vale a dire passano inalterate da una divisione cellulare all'altra, sia *instabili* in quanto non consentono una regolare divisione.

Le più importanti **modificazioni stabili** sono (Fig. 12):

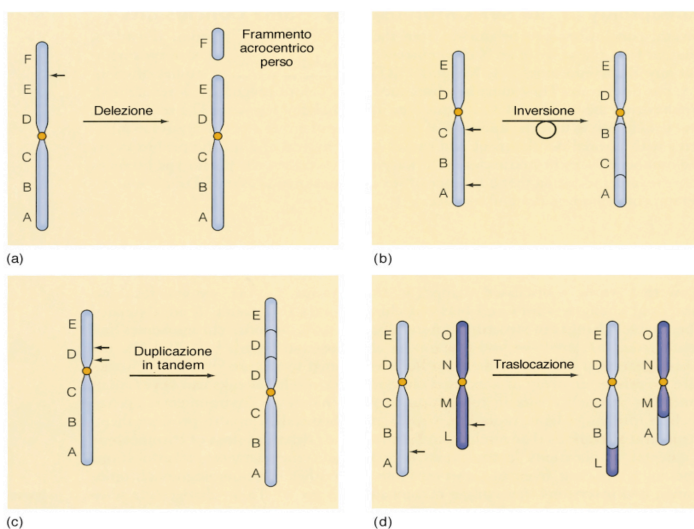


Fig. 12. Alcune delle anomalie cromosomiche strutturali stabili più frequenti.

- **delezione:** perdita di un frammento di cromosoma. La delezione può essere *terminale*, causata da una singola rottura cromosomica all'estremità (Fig. 12a) o, più frequentemente, *interstiziale*, come conseguenza di due rotture all'interno del cromosoma.
- **inversione:** rottura del cromosoma in due punti con formazione di un segmento cromosomico che si reinserisce nel cromosoma dopo rotazione di 180° (Fig. 12b).

- **duplicazione**: raddoppiamento di un tratto di un cromosoma (Fig. 12c). Le duplicazioni sono più frequenti e meno dannose delle delezioni.
- **traslocazione**: spostamento di un tratto o di un intero cromosoma su di un altro cromosoma non omologo (Fig. 12d); quando, in seguito al riarrangiamento, la quantità totale del materiale genetico non risulta alterata si parla di **traslocazione bilanciata** e non si hanno effetti sul fenotipo. Le traslocazioni possono però causare la produzione di gameti con corredo genico sbilanciato e quindi essere responsabili di gravi sindromi polimalformative nella prole.

4.3 Origine delle anomalie cromosomiche

Anomalie numeriche

● Poliploidie

Le *triploidie* ($3n$) si originano in seguito alla fecondazione di un singolo ovulo da parte di due spermatozoi (Fig. 13A) o ad errori della meiosi sia femminile (Fig. 13B) sia maschile (Fig. 13C) con formazione di gameti in cui non è avvenuta la riduzione del numero o ancora, meno frequentemente, per la mancata espulsione del globulo polare durante la gametogenesi femminile.

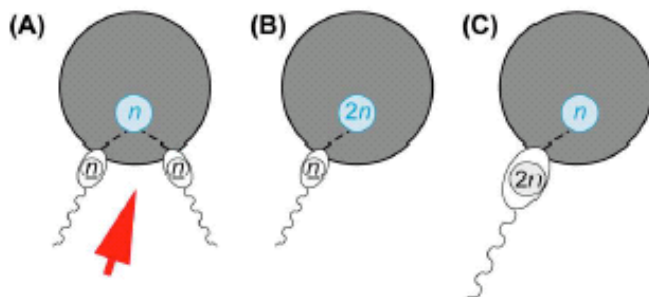


Fig. 13. Formazione di zigoti triploidi.

Le *tetraploidie* sono invece causate da un errore nelle prime segmentazioni dello zigote, per cui il corredo cromosomico diventa $4n$.

● Aneuploidie

Durante ciascuna delle due divisioni cellulari che caratterizzano la meiosi, può verificarsi un errore nella segregazione (*non-disgiunzione*) di una coppia di cromosomi omologhi (nella prima divisione) o dei cromatidi fratelli di un cromosoma (nella seconda) (Fig. 14).

Ne consegue la formazione di gameti con un cromosoma in più ($n + 1$) o un cromosoma in meno ($n - 1$) (Fig. 15).

Generalmente, il rischio aumenta con l'aumentare dell'età materna.

La non-disgiunzione può interessare tutte le coppie di cromosomi, così come evidenziato dagli studi di citogenetica condotti sugli aborti spontanei.

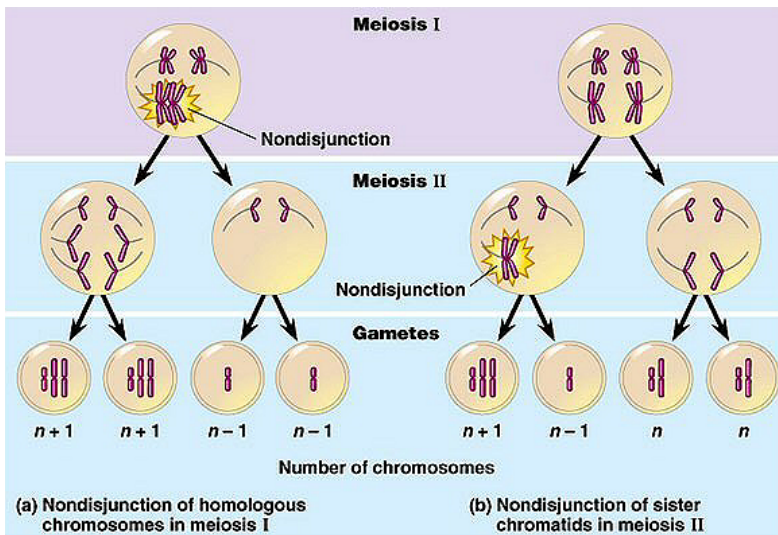


Fig. 15. Meiosi femminile con produzione di cellule uovo anormali, aventi un cromosoma 21 in più o in meno (per semplicità sono rappresentate solo alcune paia cromosomiche, 1, 21, 22 e X).

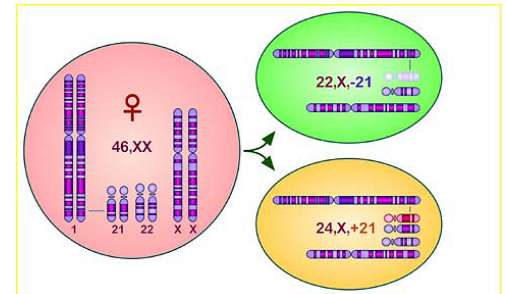


Fig. 14. La non - disgiunzione in prima divisione meiotica (a sinistra) e in seconda divisione meiotica (a destra), con le rispettive conseguenze.

Anomalie di struttura

Derivano da rotture e successivi riarrangiamenti nell'ambito dello stesso cromosoma (delezioni, inversioni), o di due o più cromosomi non omologhi (traslocazioni) o ancora da ripetizioni di un tratto di un cromosoma (duplicazioni).

Mosaici

Un individuo viene definito *mosaico cromosomico* quando presenta almeno due linee cellulari diverse, derivate da uno stesso zigote, a seguito di un'anomalia in una delle cellule formatasi in un qualunque momento dello sviluppo embrionale; tutte le cellule che derivano da questa presenteranno la stessa anomalia. L'anomalia nei mosaici può essere sia strutturale che numerica. Nel caso in cui l'anomalia sia originata da una non disgiunzione mitotica si originano due linee cellulari: una a 47 cromosomi ed una a 45 (oltre alla linea normale a 46). La linea a 45 cromosomi è, però, letale, per cui l'individuo sarà costituito da due linee cellulari: una trisomica ed una normale (Fig. 16).

In un mosaico, la gravità dello sbilanciamento dipende dal numero di cellule che compongono ciascuna linea cellulare, vale a dire dal momento in cui è avvenuto l'evento anomalo (ampiezza del settore anomalo tanto maggiore quanto più precocemente si è verificato l'evento).

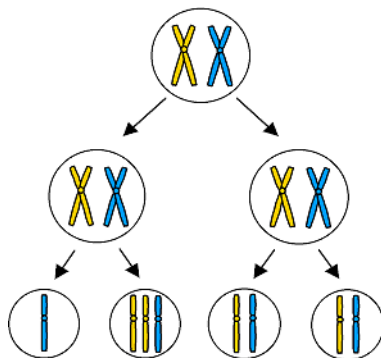


Fig. 16. Origine di un mosaico cromosomico 46/47.

4.4 Aspetti clinici delle anomalie degli autosomi

Anomalie numeriche

L'incidenza totale delle anomalie degli autosomi e dei cromosomi sessuali fra i nati vivi è di circa lo 0,3%, per quanto riguarda quelle che comportano un effetto fenotipico (trisomie totali e parziali e delezioni); a ciò va aggiunto uno 0,2% di portatori di traslocazioni bilanciate. Pertanto lo 0,5% dei nati vivi presenta un cariotipo anomalo.

In generale, uno sbilanciamento genico conseguente ad un'anomalia numerica o strutturale dei cromosomi provoca sempre un danno nello sviluppo. Se lo sbilanciamento è esteso, questo può compromettere lo sviluppo embrionale (con conseguente aborto spontaneo) oppure determinare la nascita di bambini con gravi malformazioni, generalmente associate a ritardo mentale. Se esso è modesto, come nel caso di delezioni e duplicazioni di lieve entità, potranno non essere presenti malformazioni gravi e quadri dismorfici accentuati, mentre è probabile un ritardo psicomotorio, anche se limitato.

Le trisomie complete fra i nati vivi si riscontrano a carico solo di pochi autosomi, mentre negli aborti spontanei ne sono state descritte per tutti i cromosomi. Di seguito sono descritte le aberrazioni a cui corrisponde una precisa sindrome clinica.

- **Trisomie**

Trisomia del cromosoma 21 o sindrome di Down

Fu Langdon Down nel 1866 a descrivere per primo la sindrome caratteristica di questa malattia, in seguito attribuita alla presenza del cromosoma 21 in triplice dose (Fig.17).

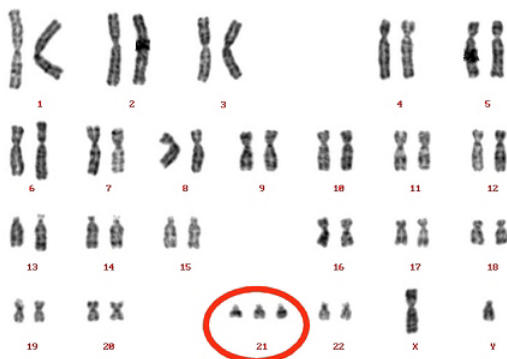


Fig. 17. Cariotipo di un individuo di sesso maschile affetto da sindrome di Down (47, XY, +21).

L'individuo affetto deriva dall'unione tra un gamete normale e un gamete con un cromosoma 21 soprannumerario (Fig. 18).

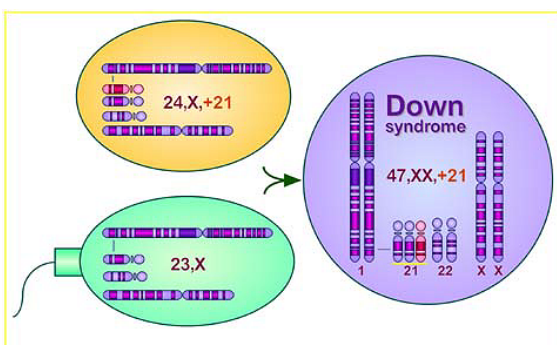


Fig. 18. Formazione di uno zigote da cui si svilupperà un individuo affetto da sindrome di Down (per semplicità sono rappresentate solo alcune paia cromosomiche, 1, 21, 22 e X).

L'incidenza della trisomia 21 è nella popolazione di 1 su 600-700 nati, ma i valori aumentano in modo esponenziale se si mettono in relazione con l'età della madre (ad es. se la madre ha 37 anni l'incidenza è di circa 1/100) (Fig.19): la spiegazione dell'incremento risiede nella maggiore probabilità che durante la meiosi materna si verifichino errori nella segregazione dei cromosomi dell'ocita quando l'età materna supera i 35 anni.

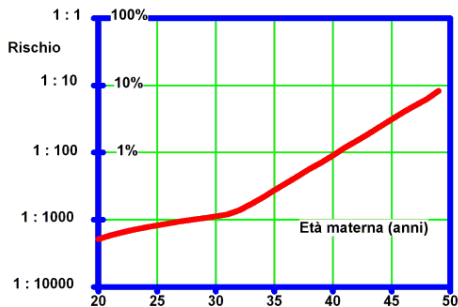


Fig. 19. Incidenza della sindrome di Down in relazione all'età materna.

Quasi tutti i soggetti affetti da sindrome di Down sono trisomici (95% circa) a causa di una non-disgiunzione e presentano la cosiddetta sindrome di Down da trisomia *primaria*.

Il 3,5% circa degli affetti presenta invece un cariotipo con 46 cromosomi, uno dei quali è anomalo perchè risultato di una **traslocazione robertsoniana** (dal nome del ricercatore Robertson, che le descrisse per la prima volta in alcuni insetti) che ha coinvolto il cromosoma 21 e un cromosoma acrocentrico, più frequentemente il 14. Si definisce traslocazione robertsoniana la traslocazione tra due cromosomi acrocentrici non omologhi, con punti di rottura a livello dei centromeri e fusione dei bracci lunghi a formare un unico cromosoma (Fig. 20). Il piccolo cromosoma risultante dalla fusione dei bracci corti va generalmente perduto senza conseguenze; l'individuo portatore risulta perciò avere 45 cromosomi e non ha alcuna anomalia fenotipica. D'altra parte l'individuo portatore fenotipicamente normale può produrre dei gameti anomali sbilanciati (Fig. 21) e dalla fusione di uno di questi (avente un cromosoma 21 e il cromosoma risultante dalla fusione dei bracci lunghi del 14 e del 21) può nascere un figlio affetto da sindrome di Down. In questi casi si parla anche di trisomia *secondaria*, nel senso che non è originata da una non-disgiunzione, ma è secondaria a una situazione preesistente in un genitore.

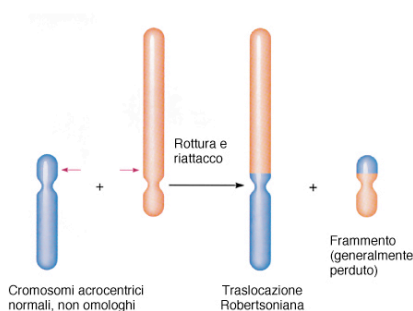


Fig. 20. Traslocazione robertsoniana tra cromosomi acrocentrici non omologhi.

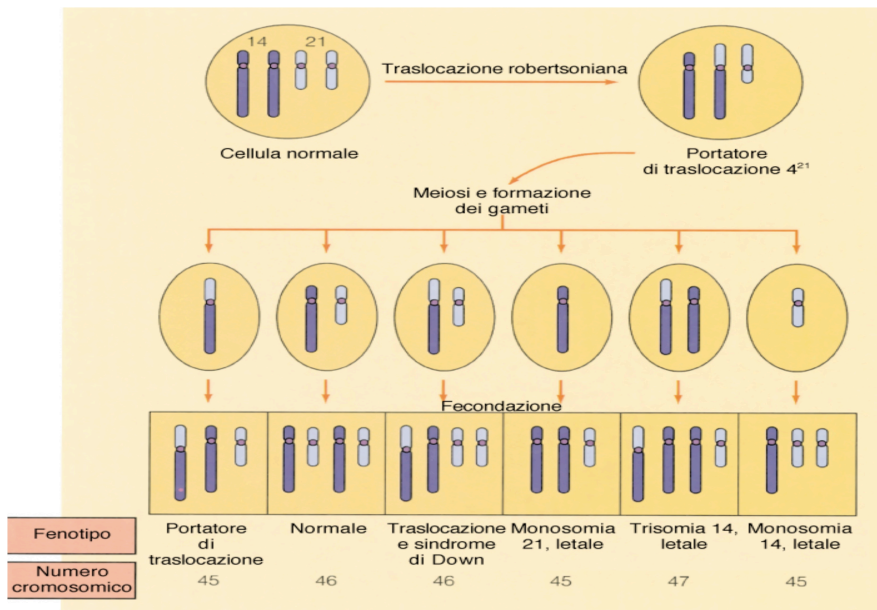


Fig. 21. Gameti prodotti da un individuo portatore di una traslocazione robertsoniana e zigoti prodotti dopo la fecondazione.

Il rimanente 1,5% dei casi è rappresentato da mosaici.

Il fenotipo caratteristico della sindrome di Down presenta una serie di anomalie fisiche e una costante presenza di ritardo cognitivo, il sintomo funzionale più grave e drammatico. Sono anche frequenti malformazioni scheletriche e cardiovascolari, diminuita resistenza ad agenti infettivi ed aumentata suscettibilità alle leucemie.

La prognosi di vita è molto aumentata negli ultimi anni ed oggi si possono osservare anche individui adulti con sindrome di Down.

Trisomia del cromosoma 18 o sindrome di Edwards

Fu descritta per la prima volta da Edwards nel 1960. L'incidenza fra i nati vivi è di 1/4.000 (M:F 1:4) e la prognosi è infausta con sopravvivenza media di 2 mesi, a causa delle numerose malformazioni, cardiache, cerebrali, scheletriche e muscolari (Fig. 22).



Fig. 22. Cariotipo di un bambino affetto da sindrome di Edwards.

Trisomia del cromosoma 13 o sindrome di Patau

Descritta da Patau nel 1960; ha un'incidenza fra i nati vivi di 1/6.000 ed una prognosi molto infausta (la metà dei malati muore entro il primo mese di vita) (Fig. 23).

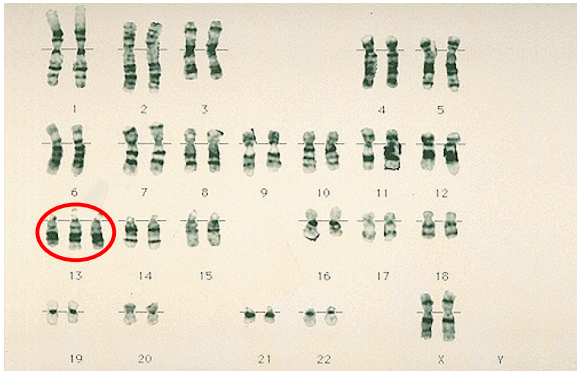


Fig. 23. Cariotipo di un bambino affetto da sindrome di Patau.

- **Monosomie**

Le monosomie degli autosomi possono essere considerate una condizione letale; infatti si riscontrano molto raramente negli aborti spontanei perchè la maggior parte degli embrioni vengono persi molto precocemente, spesso quando la gravidanza non è ancora stata accertata.

Anomalie di struttura

- **Delezioni**

Sindrome del Cri du chat

Nel 1963 fu descritto per la prima volta un bambino con una delezione di parte del braccio corto del cromosoma 5 (5p-) (Fig. 24). Questa sindrome ha un'incidenza di 1/100.000 nascite. Il fenotipo patologico è determinato dalla perdita dei geni associati alla porzione di cromosoma deleta, ed è caratterizzato da ritardo mentale e varie malformazioni; tuttavia non essendo associata a malformazioni cardiache, questa sindrome permette una sopravvivenza prolungata. I bambini affetti hanno un pianto caratteristico che assomiglia al miagolio di un gatto, da cui il nome della sindrome.

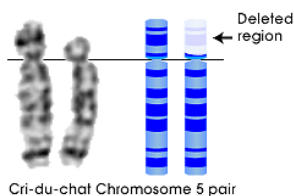


Fig. 24. La coppia di cromosomi n° 5 e la regione deleta nella sindrome del Cri du chat.

4.5 Aspetti clinici delle anomalie dei cromosomi sessuali

Nelle cellule somatiche delle femmine, durante lo sviluppo embrionale, si verifica il fenomeno della *inattivazione* precoce di uno, a caso, dei due cromosomi X. Quindi, nei soggetti normali 46,XX in ogni cellula uno solo a caso dei due X è attivo, per cui le femmine risultano funzionalmente emizigoti, come i maschi. Il cromosoma X inattivato è visualizzabile citologicamente nei nuclei femminili come **corpo di Barr** o **eterocromatina sessuale** (Fig. 25) e fu scoperto a seguito di un'ipotesi del 1961, proposta da una genetista inglese di nome Mary Lyon.

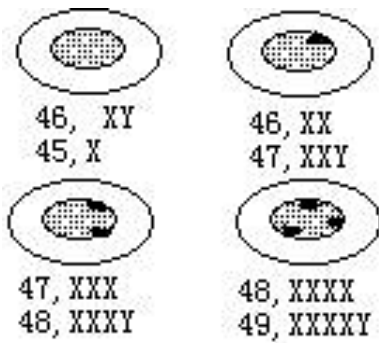


Fig. 25. Corpo di Barr e relazione tra numero di corpi di Barr e numero di cromosomi X.

Nei soggetti con cromosomi X sovrannumerari (XXX, XXXX, XXY, XXXY, ecc.), rimane sempre attivo un solo X, indipendentemente dal numero di X presenti. Da questo deriva la minor gravità delle sindromi dovute ai cromosomi sessuali, rispetto alle anomalie numeriche degli autosomi.

Monosomia dell’X o sindrome di Turner (45, X0)

La definizione clinica della sindrome risale al 1938 mentre la sua associazione con il cariotipo 45,X0 è del 1959 (Fig. 26). L’incidenza è di 1/2500 neonate femmine e molto alta è l’incidenza negli aborti spontanei.

La diagnosi viene di solito fatta alla pubertà, in quanto alla nascita non vi sono segni evidenti, salvo l’aspetto generale di un neonato piccolo.

Alla pubertà invece si riscontra soprattutto amenorrea primaria ed assenza dei caratteri sessuali secondari.

Sindrome di Klinefelter (47, XXY)

L’incidenza è di 1/1.000 neonati maschi (Fig. 26); nel 20% dei casi è associato a mosaicismo. Il fenotipo è normale fino alla pubertà e pertanto la sindrome non è diagnosticabile a livello clinico. Alla pubertà si rilevano ipogonadismo associato a normale sviluppo del pene; talvolta, dato che provoca azospermia, viene diagnosticato durante analisi svolte per sterilità di coppia.

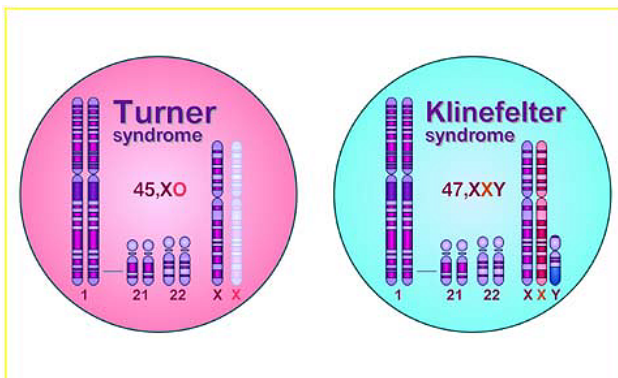


Fig. 26. Aspetti cromosomici corrispondenti alle sindromi di Turner (X0) e di Klinefelter (XXY) (per semplicità sono rappresentate solo alcune paia cromosomiche. 1. 21. 22 e XY).

Sindrome del doppio Y (47, XYY e 48, XYY)

Il cariotipo ha una frequenza di 1/1.000 neonati maschi ed il fenotipo è in realtà assolutamente normale. Questi maschi sono solo più alti della media.

Considerazioni finali

Si sa che una percentuale delle gravidanze (circa il 15%) si arresta spontaneamente prima del termine naturale. Lo studio degli aborti spontanei si è rivelato interessante dal punto di vista citogenetico, poiché in circa metà degli aborti vi è un’anomalia cromosomica. In essi si ritrovano tutte le anomalie dei cromosomi, anche se alcune come le monosomie degli autosomi hanno

incidenza molto bassa poiché comportano un'alterazione tanto grave da arrestare lo sviluppo dello zigote in stadi precocissimi.

Si verificano trisomie per tutti i cromosomi, anche se con frequenze diverse. Pertanto i nati vivi con trisomia rappresentano solo "la punta di un iceberg". Ad esempio, i trisomici 21 nati vivi sono solo il 20% dei concepiti con questa anomalia, poiché la maggior parte viene abortita spontaneamente prima della 28esima settimana. Il cromosoma 21 non è più soggetto di altri ad errori meiotici ma, poiché la sua presenza in triplice copia non sempre provoca l'arresto dello sviluppo embrionale, è quello percentualmente più rappresentato nei nati vivi trisomici.

Anche la monosomia dell'X presenta questo andamento: solo un quarto delle femmine con cariotipo 45, X0 concepite arriva alla nascita, mentre gli altri embrioni sono abortiti a stadi molto precoci. Relativamente ai cromosomi sessuali, con l'aumentare del numero di cromosomi soprannumerari aumenta la gravità della sintomatologia; questo dimostra che il dosaggio genico di questi cromosomi deve essere perfettamente equilibrato per il normale sviluppo sia nel maschio che nella femmina.

5. ANALISI DEL CARIOTIPO UMANO IN LABORATORIO

5.1 Colture cellulari e terreni di coltura

Per poter effettuare un'analisi cromosomica è necessario utilizzare cellule in mitosi che possono essere ottenute da campioni prelevati espressamente per questa analisi (sangue periferico, liquido amniotico, villi coriali) o da colture cellulari.

I tessuti che più si prestano a essere coltivati *in vitro* sono quelli che già *in vivo* mostrano attività proliferativa. Essi comprendono tessuti embrionali, adulti e tumorali. In linea teorica è possibile allestire preparati cromosomici a partire da qualsiasi tessuto purché si usino i metodi adatti per ciascun tipo di cellule da esaminare. Nell'uomo, la maggior parte delle procedure diagnostiche citogenetiche utilizzano colture di linfociti, cellule del midollo osseo, cellule embrionali sospese nel liquido amniotico, villi coriali e fibroblasti cutanei.

I primi terreni di coltura studiati per le colture *in vitro* di tessuti animali, ed ancora oggi utilizzati per particolari tipi di colture, erano costituiti esclusivamente da componenti naturali, come il plasma o il siero, il liquido amniotico o ascitico, gli estratti di tessuti e di organi.

Nell'intento di rendere più controllabili, e quindi riproducibili, le condizioni di coltura *in vitro*, i terreni nutritivi naturali sono stati progressivamente sostituiti con soluzioni a composizione chimica nota.

Per quanto esistano in commercio terreni di coltura definiti in tutti i loro componenti, nella maggior parte delle colture non può essere evitata l'aggiunta di siero animale intero o dializzato, costituito da numerose componenti proteiche e non, per la maggior parte sconosciute.

Un terreno di coltura contiene:

- ioni inorganici: sodio, potassio, cloro, calcio, magnesio, solfato, carbonato, fosfato;
- amminoacidi, carboidrati e vitamine;
- proteine del siero.

5.2 Coltura di linfociti per ottenere cromosomi metafasici

Per le analisi cromosomiche in particolare, le colture cellulari sono in genere ottenute da linfociti, cellule del sangue della serie bianca, utilizzate a questo scopo data la facilità con cui questo tessuto è prelevabile dall'organismo. Si deve ricordare che i globuli rossi non si prestano per l'analisi cromosomica, essendo privi di nucleo.

Le cellule vengono messe in coltura in una provetta a 37°C in presenza di fitoemoagglutinina (PHA, dall'inglese **phyto**haemo**agglutin**in, una sostanza che induce i linfociti ad entrare in mitosi); raggiunta una fase di crescita esponenziale, viene aggiunta per 1 ora 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 che stabilizza la struttura dei cromosomi, altrimenti fragili, e rende più duraturo il preparato, ritardando l'azione degli agenti ossidanti.

Il sedimento cromosomico è mantenuto in una soluzione di fissativo (costituita da metanolo: acido acetico in rapporto 3:1). 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 in provetta alla temperatura di -20°C anche per qualche anno, prima di venire strisciata su vetrino.

La Fig. 27 illustra schematicamente i diversi passaggi descritti.

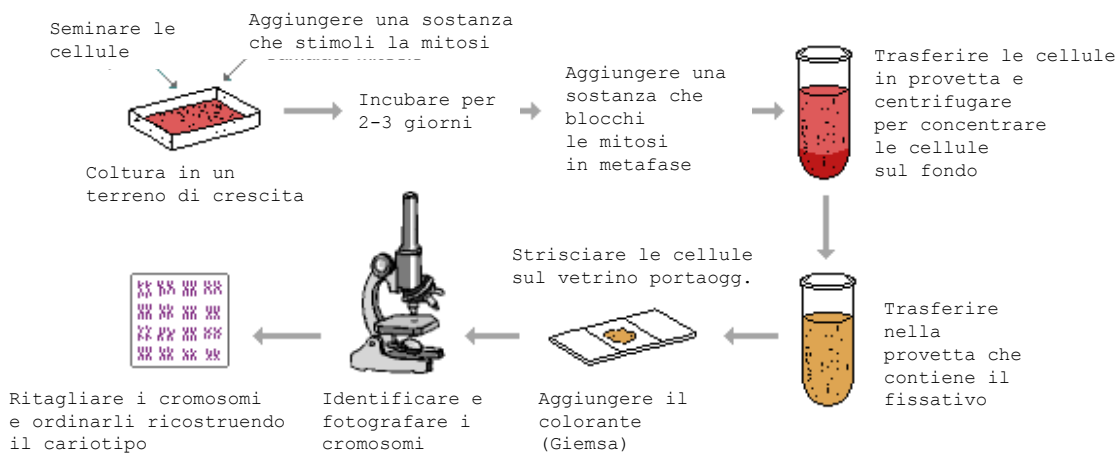


Fig. 27. Procedura di allestimento di un preparato cromosomico.

5.3 ATTIVITÀ EFFETTUATE DIRETTAMENTE DAGLI STUDENTI

Materiali necessari all'allestimento di un preparato cromosomico

 microscopio	 beuta e becker	 carta bibula	 portaprovette
 vetrini coprioggetto	 provette 5-50 ml	 camice	 pipetta Pasteur
 vetrini portaoggetto	 vaschette da istologia	 pinzette	 guanti in lattice monouso

Reagenti

Etanolo assoluto

Acqua distillata

Colorante Blu di metilene 0,025%

Procedura

Striscio su vetrino

La sospensione cromosomica viene strisciata su un vetrino sgrassato e lavato, effettuando i seguenti passaggi:

- prelevare con una pinzetta un vetrino portaoggetto da un becker con etanolo assoluto
- asciugarlo perfettamente con un telo di lino
- con una matita scrivere il proprio nome sulla parte smerigliata del vetrino
- immergere il vetrino in una vaschetta di acqua distillata
- riempire il capillare della pipetta Pasteur con la sospensione cromosomica
- togliere il vetrino dalla vaschetta e lasciare cadere due gocce di sospensione su metà della superficie del vetrino
- asciugare con carta assorbente il retro del vetrino
- lasciare asciugare all'aria per 5'-10' e quindi procedere alla colorazione

Colorazione con colorante (BLU di METILENE 0,025%)

E' una metodica che determina la colorazione omogenea di tutti i cromosomi, evidenziando la loro dimensione e morfologia rispetto alla posizione del centromero.

La colorazione si basa sulla differenziazione dei costituenti cellulari: i componenti aventi reazione acida (i cromosomi) si colorano in blu con i prodotti di ossidazione del Blu di Metilene, basici.

La colorazione si effettua attraverso due passaggi:

- immergere i vetrini per 15' in una soluzione di Blu di metilene 0,025%
- sciacquare i vetrini con acqua distillata e lasciare asciugare all'aria
- osservare i vetrini al microscopio ottico.

I vetrini possono essere montati con vetrino coprioggetto in modo permanente utilizzando apposite resine.

NB: Tutti i procedimenti per la colorazione vanno effettuati coi guanti.

Cariotipo umano normale o patologico?

Verranno distribuite alcune foto di cariotipi umani con bandeggio Q, appartenenti ad individui diversi di cui non è specificato il sesso e la presenza o meno di patologie. Gli studenti dovranno sovrapporre un foglio di acetato alla foto e, utilizzando un pennarello per cancellare i cromosomi durante il conteggio, contare i cromosomi e riconoscere le coppie di omologhi.

Dovranno quindi rispondere alle seguenti domande:

- 1) Il cariotipo che stai osservando è di un maschio o di una femmina?
- 2) Riconosci una patologia dal conteggio del numero dei cromosomi?
- 3) Se sì, a quale sindrome corrisponde?

Istruzioni per l'insegnante

Le metafasi fotografate sono state ottenute applicando il **bandeggio Q** (colorazione con quinacrina e osservazione al microscopio a fluorescenza). Gli studenti dovranno anzitutto contare il numero totale di cromosomi e, per formulare una risposta, utilizzare come criterio il conteggio e l'osservazione dei cromosomi acrocentrici corti (21, 22 e Y), simboleggiati nel modo seguente:

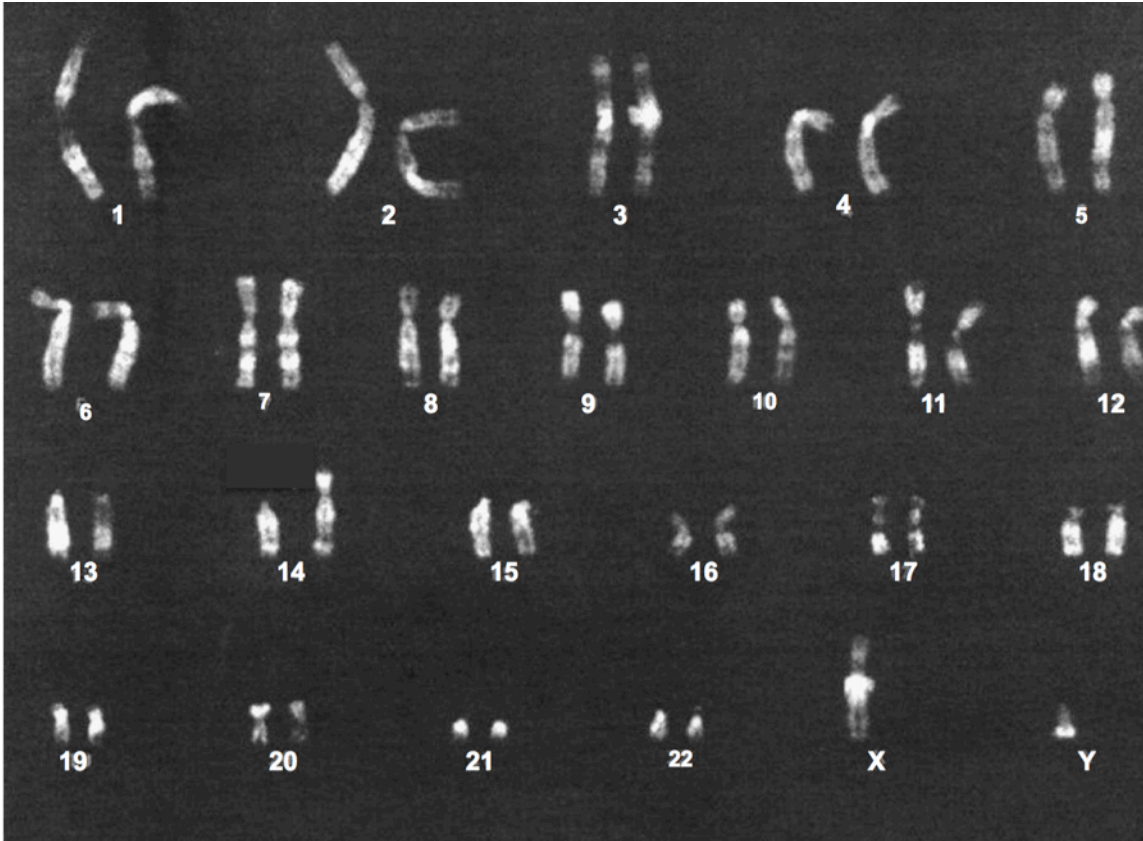
^ acrocentrico corto (21 e 22)

^ cromosoma Y

1) Femmina normale	♀	46 cromosomi (XX) Cromosomi acrocentrici corti: 4	^^	^^	
			21	22	
2) Maschio normale	♂	46 cromosomi (XY) Cromosomi acrocentrici: 5	^^	^^	^
			21	22	Y
3) Down	♀	47 cromosomi (XX) Cromosomi acrocentrici: 5	^^^	^^	
			21	22	
4) Down	♂	47 cromosomi (XY) Cromosomi acrocentrici: 6	^^^	^^	^
			21	22	Y
5) Klinefelter	♂	47 cromosomi (XXY) Cromosomi acrocentrici: 5	^^	^^	^
			21	22	Y
6) XYY	♂	47 cromosomi (XYY) Cromosomi acrocentrici: 6	^^	^^	^^
			21	22	YY
7) Turner	♀	45 cromosomi (X0) Cromosomi acrocentrici: 4	^^	^^	
			21	22	

6. ESERCIZIO SUPPLEMENTARE

Lo studente, facendo riferimento al cariotogramma presentato, deve rispondere alle seguenti domande.



- 1) L'individuo a cui corrisponde il cariotogramma è maschio o femmina?
- 2) E' sano o malato?
- 3) Se è malato, da quale sindrome è affetto?
- 4) Qual è la possibile spiegazione di questa eventuale patologia?

Risposte

- 1) L'individuo è maschio (ha una X e una Y)
- 2) L'individuo, pur avendo 46 cromosomi, è affetto da una patologia cromosomica, in quanto portatore di un cariotipo anomalo (i due cromosomi del paio 14 sono morfologicamente diversi)
- 3) E' affetto dalla sindrome di Down
- 4) E' portatore di cromosoma con una traslocazione tra un cromosoma 14 e un cromosoma 21 ereditato da uno dei due genitori; di conseguenza possiede tre dosi, anziché due, del braccio lungo del cromosoma 21 e in quanto tale è affetto dalla sindrome di Down. Bisogna ricordare i gameti prodotti da un individuo portatore di una traslocazione Robertsoniana (vedi paragrafo 4.4).

7. NORME DI SICUREZZA IN LABORATORIO

Qui di seguito sono elencate alcune norme elementari di sicurezza, che devono essere tassativamente rispettate.

- Entrando in laboratorio, individuare le vie di fuga, indicate dalla segnaletica verde.
- In laboratorio indossare sempre il camice. Il camice deve essere chiuso sul davanti, con maniche lunghe e polsini ad elastico. Al termine delle attività, prima di lasciare il laboratorio, togliersi il camice. In ogni caso, non uscire dal laboratorio, per recarsi in altre aree (biblioteca, uffici, bar, ecc.), senza aver prima tolto il camice.
- Non introdurre in laboratorio borse, zaini o altro materiale non necessario.
- I guanti si sfilano rovesciandoli e vanno gettati negli appositi contenitori.
- Gli studenti che presentano dermatiti o altre lesioni sulle mani, devono indossare guanti protettivi in tutte le fasi di lavoro.
- I guanti vanno tolti, quando si usino strumenti di qualsiasi natura (telefono, tastiere, strumenti scientifici, maniglie, ecc.). I guanti usati non vanno riutilizzati.
- Lavare le mani routinariamente e, in ogni caso, dopo la fine delle attività, anche quando sono stati indossati i guanti. Lavare sempre le mani prima di lasciare il laboratorio.
- In laboratorio è vietato mangiare, bere, fumare o portare oggetti alla bocca ed applicare cosmetici.
- Non pipettare mai con la bocca, ma utilizzare le apposite propipette.
- Non appoggiare recipienti contenenti liquidi biologici vicino al bordo del banco di lavoro per evitare che si rovescino.
- Decontaminare e pulire sempre, al termine del loro utilizzo, le apparecchiature scientifiche e, al termine della attività, i piani di lavoro.
- Seguire scrupolosamente le indicazioni di sicurezza riportate nei protocolli di esperimento.
- Segnalare immediatamente al personale docente qualsiasi incidente o la mancanza di materiale di protezione.

8. DOMANDE DI AUTOVALUTAZIONE (la risposta corretta è in grassetto)

- 1) Nella molecola di DNA:
 - a) lo zucchero è il ribosio
 - b) i nucleotidi si differenziano tra loro per il gruppo fosfato e il pentoso
 - c) vi sono legami ionici tra le basi azotate complementari
 - d) ciò che varia è la sequenza delle basi azotate**
 - e) vi possono essere differenti tipi di gruppi fosfato

- 2) Al termine del processo di duplicazione del DNA:
 - a) ogni molecola di DNA è composta da due nuovi filamenti
 - b) ogni molecola di DNA è composta da un filamento originario e da uno nuovo**
 - c) una molecola di DNA è nuova, l'altra è originaria
 - d) nei filamenti si alternano parti originarie a parti nuove
 - e) sono vere tutte le precedenti, in quanto il processo è casuale

- 3) Nel processo di duplicazione del DNA, quale enzima catalizza il legame tra i nucleotidi per formare un nuovo filamento?
 - a) DNA polimerasi**
 - b) DNA elicasi
 - c) RNA polimerasi
 - d) DNA ligasi
 - e) DNA girasi

- 4) La citogenetica è la branca della genetica che si occupa di:
 - a) selezione delle piante
 - b) difesa dell'ambiente
 - c) analisi cromosomiche**
 - d) studio dei tessuti
 - e) trasmissione ereditaria

- 5) Il cariotipo è:
 - a) il numero dei cromosomi di un gamete
 - b) il corredo aploide
 - c) l'insieme delle forme dei cromosomi
 - d) l'allineamento dei cromosomi alla metafase
 - e) l'insieme dei cromosomi di una cellula in metafase**

- 6) La sindrome di Down è:
 - a) la presenza di un cromosoma Y in più
 - b) una monosomia del cromosoma X
 - c) una trisomia del cromosoma 21**
 - d) una malattia a trasmissione sessuale
 - e) una malattia infettiva

- 7) Il corredo cromosomico dell'uomo è:
 - a) $2n=16$
 - b) $2n=64$
 - c) $2n=46$**
 - d) $2n=48$
 - e) $2n=23$

- 8) Le fasi della mitosi, nell'ordine corretto, sono:
- metafase,anafase,telofase,profase
 - telofase,profase,anafase,metafase
 - profase,metafase,anafase,telofase**
 - interfase,metafase,anafase, telofase
 - anafase,profase,telofase,metafase
- 9) I cromosomi umani contengono:
- DNA e proteine**
 - DNA e aminoacidi
 - DNA e protammine
 - DNA e vitamine
 - DNA
- 10) Il numero di autosomi presenti nelle cellule somatiche della specie umana è:
- 44**
 - 22
 - 23
 - 46
 - 21
- 11) I cromosomi metafasici vengono osservati con:
- microscopio elettronico a scansione
 - microscopio ottico**
 - microscopio elettronico a trasmissione
 - lente d'ingrandimento
 - occhio nudo
- 12) L'analisi del cariotipo viene effettuata osservando i cromosomi in:
- interfase
 - fase G₁ del ciclo cellulare
 - metafase**
 - telofase
 - fase S del ciclo cellulare
- 13) Le due parti in cui è diviso longitudinalmente ogni cromosoma metafasico sono dette:
- centromeri
 - centrioli
 - telomeri
 - bracci
 - cromatidi**
- 14) Completa la tabella abbinando i termini (*lettere*) con le rispettive definizioni (*numeri*).
- | | |
|------------------------------|---|
| A) cromosomi metacentrici | 1) divisi dal centromero in due bracci di dimensioni diverse |
| B) cromosomi submetacentrici | 2) il centromero è subterminale |
| C) cromosomi acrocentrici | 3) divisi dal centromero in due bracci di dimensioni circa uguali |

A	B	C

A	B	C
3	1	2

- 15) L'analisi del cariotipo consente di evidenziare:
- a) le anomalie di numero o di struttura dei cromosomi**
 - b) la perdita di un gene
 - c) le mutazioni geniche
 - d) l'acquisizione di un gene
 - e) il crossig-over
- 16) Cosa si intende per bandeggio G a livello dei cromosomi?
- a) una colorazione specifica con verde janus
 - b) una colorazione a bande con eosina
 - c) una colorazione a bande fluorescenti
 - d) un trattamento con tripsina e colorazione con Giemsa**
 - e) un trattamento specifico che colora solo i centromeri
- 17) La disidratazione del citoplasma per evidenziare e selezionare i cromosomi viene effettuata in:
- a) alcool assoluto**
 - b) solvente idrofobo
 - c) resina
 - d) colorante ematossilinico
 - e) enzima RNA polimerasi
- 18) La rottura della membrane cellulari e il rigonfiamento del nucleo si ottengono trattando i preparati con:
- a) soluzioni ipertonica
 - b) soluzione ipotonica**
 - c) soluzione isotonica
 - d) alcool
 - e) soluzione di NaCl
- 19) Quale requisito essenziale devono possedere le cellule utilizzate per allestire i preparati cromosomici?
- a) le cellule devono provenire da tessuti indifferenziati
 - b) le cellule devono essere capaci di dividersi o spontaneamente o dopo stimolazione**
 - c) le cellule devono essere incapaci di dividersi
 - d) le cellule devono provenire esclusivamente da individui giovani
 - e) le cellule devono essere in fase S al momento della preparazione del vetrino
- 20) L'occhio umano ha un potere di risoluzione di circa 0,1mm. V F
- 21) Il microscopio ottico ingrandisce un oggetto di circa 1000 volte. V F
- 22) La dicitura 10x, 20x, riportata sulla lente di un microscopio ottico indica un ingrandimento di 10, 20 volte. V F

- 23) Maggiore è l'ingrandimento fornito da un microscopio, maggiore sarà il suo potere di risoluzione. V F
- 24) Il microscopio ottico ha un potere di risoluzione di circa 0,5 nm. V F
- 25) La sindrome di Turner si riscontra con un'incidenza di circa uno ogni 5.000 bambini nati vivi. V F
- 26) La sindrome di Down può verificarsi a causa della non-disgiunzione del cromosoma 21 durante la meiosi I. V F
- 27) La sindrome del Cri-du-chat è causata da una delezione del cromosoma 4. V F
- 28) L'inversione cromosomica consiste in una:
- a) **doppia rottura con rotazione di 180° del frammento cromosomico**
 - b) traslocazione fra due cromosomi sessuali
 - c) rottura del cromosoma a livello del centromero
 - d) traslocazione di un autosoma su un cromosoma del sesso
 - e) doppia rottura con rotazione di 90° del frammento cromosomico
- 29) Quale dei seguenti cariotipi è un esempio di aneuploidia?
- a) 46, XX
 - b) 23, X
 - c) 69, XXX
 - d) 92, XXXX
 - e) **90, XX**
- 30) Se durante la prima divisione meiotica avviene una non-disgiunzione, che tipi di gameti si origineranno alla fine della seconda divisione meiotica?
- a) **due gameti disomici e due nullisomici**
 - b) un gamete disomico e tre trisomici
 - c) quattro gameti monosomici
 - d) un gamete disomico, tre nullisomici
 - e) due gameti trisomici e due nullisomici

9. GLOSSARIO

Acrocentrico	Cromosoma con centromero subterminale
Aneuploidia	Variazione cromosomica di numero che comporta la presenza in eccesso o in difetto di specifici cromosomi rispetto al numero diploide
Anomalia di struttura	Variazione della morfologia di uno o più cromosomi
Anomalia numerica	Variazione del numero dei cromosomi
Anomalia o aberrazione cromosomica	Modificazione del normale assetto cromosomico sia relativamente al numero sia alla struttura
Aploide/aploidia	Assetto cromosomico contenuto nei gameti (numero cromosomico = n)
Autosomi	Cromosomi non sessuali. Nell'uomo le paia dall'1 al 22
Banda	Vedi Bandeggio cromosomico
Bandeggio cromosomico	Tecnica di trattamento e colorazione cromosomica che produce un'alternanza di aree (bande) intensamente colorate e di aree più chiare, o di segmenti fluorescenti alternati a segmenti bui
Bracci cromosomici	Tratti di cromosoma compresi tra l'estremità terminale e il centromero
Cariogramma o idiogramma	Rappresentazione diagrammatica dell'assetto cromosomico di una specie, ottenuta mediante ricostruzione del cariotipo
Cariotipo	Assetto cromosomico di un individuo o di una cellula
Centriolo	Corta serie cilindrica di microtubuli. Una coppia di centrioli si trova di solito al centro di un centrosoma nelle cellule animali
Centromero	Tratto di unione tra i due cromatidi fratelli di un cromosoma metafasico corrispondente alla costrizione primaria. Sito in cui si forma il cinetocore che cattura i microtubuli del fuso mitotico. Regione indispensabile al movimento dei cromosomi in mitosi e meiosi
Centrosoma	Organello delle cellule animali, centro primario di organizzazione dei microtubuli, che agisce da polo del fuso durante la mitosi. Contiene una coppia di centrioli
Ciclo cellulare	Sequenza ciclica e regolare degli eventi di crescita e divisione di una cellula eucariotica; è costituito dalle fasi G_1 , S, G_2 , M e citodieresi
Cinetocore	Struttura complessa formata da proteine a livello del centromero di un cromosoma mitotico a cui si attaccano i microtubuli e che ha un ruolo attivo nel movimento dei cromosomi verso i poli
Citocinesi o citodieresi	Divisione in due del citoplasma di una cellula animale o vegetale
Citogenetica	Branca della genetica che studia i meccanismi dell'eredità a livello cellulare e cromosomico
Colchicina	Sostanza che determina il blocco della mitosi in metafase, inibendo la formazione del fuso mitotico e favorendo l'accumulo di metafasi
Corpo di Barr	Masserella di eterocromatina costitutiva, presente nei nuclei delle cellule somatiche femminili e corrispondente all'X inattivato
Costrizione primaria	Vedi centromero
Costrizione secondaria	Strozzatura eventualmente presente in un cromosoma, sede del DNA che codifica l'RNA ribosomale
Cromatidio	Ciascuna delle due subunità longitudinali di un cromosoma duplicato
Cromatina	Sostanza contenuta nei cromosomi e costituita da DNA e da diversi tipi di proteine (istoniche e non istoniche)

Cromosoma	Struttura generalmente allungata, costituita da cromatina condensata, visibile al microscopio ottico durante la divisione cellulare
Cromosomi del sesso o eterocromosomi	Paio di cromosomi, il cui assortimento determina il sesso. Nell'uomo i cromosomi X e Y
Cromosomi omologhi	Coppia di cromosomi di forma simile (uno di origine paterna, l'altro materna), presenti nelle cellule diploidi, che contengono la stessa sequenza lineare di geni e quindi informazioni per gli stessi caratteri
Delezione	Perdita di un frammento di cromosoma, a seguito di una (delezione terminale) o di due rotture (delezione interstiziale)
Denaturazione DNA	Separazione dei due filamenti della doppia elica, per rottura dei legami a idrogeno tra le basi azotate, con conseguente perdita della struttura
Diploide/diploidia	Assetto cromosomico contenuto nelle cellule somatiche (numero cromosomico = $2n$)
DNA	Abbreviazione di acido deossiribonucleico. Il DNA costituisce il materiale genetico di tutti gli organismi, e ha per lo più struttura a doppia elica
Duplicazione	Aggiunta di un tratto di un cromosoma per raddoppiamento dello stesso
Eterocromatina	Cromatina condensata, inattiva dal punto di vista trascrizionale e intensamente colorabile
Eucarioti	Organismi costituiti da una o più cellule con un nucleo avvolto da membrana
Eucromatina	Cromatina poco condensata, attiva dal punto di vista trascrizionale e debolmente colorabile
Fissativo	Soluzione di reagenti chimici utilizzata per rendere inalterato e più duraturo il materiale organico, ritardando l'azione degli agenti ossidanti (generalmente una miscela di alcool e acido)
Fitoemagglutinina (PHA)	Sostanza di origine vegetale che stimola la moltiplicazione dei linfociti
Fusione centrica	Vedi traslocazione Robertsoniana
Fuso mitotico	Struttura costituita da microtubuli, presente nelle cellule in divisione, coinvolta nei movimenti dei cromosomi
Giemsa	Colorante specifico per il DNA cromosomico
Inversione	Anomalia strutturale che comporta la rotazione di 180° e il riattacco di un segmento di cromosoma dopo una o due rotture
Istoni	Proteine basiche, ricche in arginina e lisina, che partecipano alla formazione dei nucleosomi della cromatina nei cromosomi eucariotici
Metacentrico	Cromosoma con centromero mediano (i due bracci hanno la stessa lunghezza)
Metafase	Stadio della mitosi o della meiosi in cui i cromosomi si dispongono sul piano equatoriale della cellula e hanno una morfologia ben visibile al microscopio ottico
Mitosi	Divisione di un nucleo in due nuclei figli geneticamente identici. Corrisponde alla fase M del ciclo cellulare
Monosomia	Variazione numerica del cariotipo che corrisponde ad un assetto cromosomico del tipo $2n-1$
Mosaicismo	Presenza di due o più linee cellulari, che differiscono tra loro per variazioni cromosomiche numeriche o strutturali
Non-disgiunzione	Mancata segregazione di una coppia di cromosomi omologhi alla I divisione meiotica o dei due cromatidi di un cromosoma alla II divisione meiotica o alla mitosi

Nucleo interfascico	Nucleo durante l'interfase del ciclo cellulare (in G1, S e G2). Non sono visibili i cromosomi
Nucleosoma	Unità fondamentale di condensazione della cromatina, costituita da DNA avvolto attorno a otto molecole di istoni
Nucleotide	Unità base del DNA e dell'RNA, formato da gruppo fosfato, zucchero e base azotata
Poliploidia	Variazione cromosomica di numero, per cui il cariotipo dell'organismo risulta essere un multiplo esatto del corredo n ; esempi: triploidia = $3n$; tetraploidia = $4n$
Procarioti	Microrganismi unicellulari le cui cellule sono prive di un nucleo circondato da una membrana
Quinacrina	Colorante fluorescente specifico per il DNA cromosomico
Rinaturazione del DNA	Processo in cui si riforma la doppia elica del DNA dopo la denaturazione
Satelliti	Formazioni caratteristiche dei cromosomi acrocentrici, di cui costituiscono la parte terminale separata dal resto dalla costrizione secondaria
Soluzione ipotonica	Soluzione in cui la concentrazione del soluto è minore di quella di una soluzione di riferimento
Submetacentrico	Cromosoma con centromero spostato verso un'estremità (i due bracci hanno diversa lunghezza)
Surnatante	Sostanza che si stratifica in superficie dopo la centrifugazione e che è possibile separare dalla parte sottostante (sedimento)
Telomero	Parte terminale di un cromosoma
Traslocazione reciproca	Scambio di parti tra cromosomi non omologhi
Traslocazione Robertsoniana	Traslocazione che coinvolge cromosomi acrocentrici con punti di rottura a livello dei centromeri. I cromosomi risultanti sono uno che deriva dalla fusione dei bracci lunghi e l'altro dalla fusione dei bracci corti (generalmente quest'ultimo va perduto)
Trisomia	Variazione numerica del cariotipo che corrisponde ad un assetto cromosomico del tipo $2n+1$

10. BIBLIOGRAFIA

Russel P.J., "iGenetica Fondamenti", EdiSES, 2004, I edizione italiana

Pierce B.A., "Genetica", Zanichelli, 2005

A.A.V.V., "Filo diretto con le malattie genetiche", UTET, 2003

11. SITI WEB

Siti con esercizi interattivi sul cariotipo

<http://gslc.genetics.utah.edu>

www.biology.arizona.edu/human_bio/activities/karyotyping/karyotyping.html