

Citogenetica #1

Prof. A. Bentivegna – 16.04.25 – Sbobbatore 1: Stella Liguori, Sbobbatore 2: Soheil Mohammadi

Introduzione

La professoressa introduce la lezione domandando quale possa essere l'importanza delle analisi sui cromosomi.

I cromosomi, ad esempio, possono essere studiati in ambito pediatrico, tramite analisi su sangue periferico per sospetto di una patologia data da aneuploidie cromosomiche, come la sindrome di Down, la sindrome di Turner e la sindrome di Klinefelter (in quest'ultimo caso la diagnosi avviene più nell'adulto a causa dell'infertilità).

L'analisi cromosomica risulta importante anche in ambito riproduttivo, quando è presente un'anomalia cromosomica che di per sé non è patologica nel soggetto stesso ma può predisporre a sbilanciamenti e problemi in un figlio.

Da **National Human Genome**: “la citogenetica si definisce come una scienza che studia i **cromosomi** e il loro comportamento durante la mitosi e la meiosi, la loro origine e la loro relazione con la trasmissione e ricombinazione dei geni. In particolare, la **citogenetica medica** si occupa dell'identificazione di anomalie cromosomiche e la loro relazione eziologica e patogenetica con il fenotipo. Come conseguenza si occupa della prognosi del soggetto portatore e dei rischi di ricorrenza nella prole”.

È dunque una branca della genetica che studia le strutture del DNA all'interno del nucleo. Nel contesto medico viene utilizzata anche in ambito **oncologico** per poter fornire delle terapie efficaci in base alle alterazioni identificate nel clone tumorale.

Oggi, in realtà, si parla più di **citogenomica**, che non studia i singoli cromosomi ma l'intero genoma, perché negli ultimi anni le tecniche si sono evolute e la tecnologia ha permesso nuove scoperte, grazie alle quali si è in grado di trovare cause a patologie che prima non si potevano identificare.

- **mutazione somatica**: anomalia ristretta a un particolare tipo di cellule del tessuto di un individuo e di solito si riferisce ai tumori. Esempio: anomalia esaploide;
- **mutazione costitutiva**: anomalia all'interno dello zigote perciò tutte le cellule che ne derivano sono uniformemente fedeli all'alterazione. Si ritrova indagando sul sangue periferico ad esempio, normalmente di questo tipo riguarda la sindrome di Down.¹

La tecnica di base della citogenetica classica è il **bandeggio cromosomico**. Ci sono poi le **FISH**², tecniche di citogenetica molecolare usate ancora oggi in ambito oncologico e prenatale, dove tramite delle sonde fluorescenti vengono identificate delle regioni del genoma che si presuppone siano implicate in una patologia.

La differenza importante, quindi, è che mentre con il bandeggio della citogenetica convenzionale si analizza il numero di cromosomi e se siano morfologicamente corretti a livello strutturale, mentre la FISH è una tecnica mirata ad identificare una determinata sequenza di DNA; se, ad esempio, si sospetta una trisomia 21, si utilizzerà una FISH per verificare che ci siano effettivamente tre copie di quel determinato cromosoma, mentre senza un sospetto specifico si analizzano strutturalmente tutti i cromosomi tramite il bandeggio.

¹ Dalla sbobbina dell'anno scorso

² Fluorescence In Situ Hybridization

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man.

È una banca dati dove vengono depositati i geni legati a patologie mendeliane. Sono consultabili le sequenze, le informazioni sulle patologie e la descrizione del fenotipo.

- * gene with known sequence
- + gene with known sequence and phenotype
- # phenotype description, molecular basis known
- % mendelian phenotype or locus, molecular basis unknown
- none - other, mainly phenotypes with suspected mendelian basis

Storia

Determinare il numero esatto di cromosomi umani non è stato immediato. Inizialmente, non era semplice ottenere cellule in metafase da analizzare, soprattutto partendo dal **sangue periferico**, in quanto esse non vanno incontro a mitosi. Per questo motivo, in passato, i ricercatori erano costretti a prelevare cellule da **midollo osseo**, un tessuto in cui le cellule ematopoietiche sono attivamente in divisione. Tuttavia, i cromosomi risultavano tutti ammassati gli uni sugli altri, dunque i primi conteggi riportavano numeri errati, come 48 o 49 cromosomi. La svolta arrivò nel 1956, quando un tecnico di laboratorio, per errore, utilizzò una **soluzione ipotonica** anziché una soluzione isotonica per lavare le cellule. La soluzione ipotonica richiama acqua all'interno della cellula e, siccome le cellule in metafase non hanno più membrana nucleare, il gonfiore causato dall'ingresso di acqua permise ai cromosomi di separarsi tra loro, distribuendosi meglio nel citoplasma. A questo punto, utilizzando una **soluzione fissativa**, fu finalmente possibile ottenere preparati nei quali i cromosomi erano ben distinguibili e si giunse al conteggio corretto di **46 cromosomi**.

Un'altra importante scoperta tecnica che rivoluzionò la citogenetica fu l'introduzione della **fitoemoagglutinina**, una proteina che stimola i **linfociti T** del sangue periferico a rientrare nel ciclo mitotico, permettendo così di ottenere mitosi anche da sangue periferico, senza più dover ricorrere a biopsie cutanee o al midollo osseo. Questo passaggio fu fondamentale anche per lo studio delle sindromi genetiche, come ad esempio la sindrome di Down (trisomia 21), che inizialmente fu scoperta analizzando fibroblasti prelevati tramite **biopsia cutanea** in pazienti con sospette anomalie cromosomiche.

Grazie a questi progressi tecnici, negli anni successivi, si susseguirono diverse scoperte fondamentali:

- Nel **1959** furono descritte per la prima volta le principali anomalie numeriche dei cromosomi:
 - **Trisomia 21**, responsabile della sindrome di Down;
 - **Monosomia X (45,X)**, associata alla sindrome di Turner;
 - **XXY (47,XXY)**, associata alla sindrome di Klinefelter.
- Nel **1960** fu descritta la prima anomalia di struttura legata a un tumore: il **cromosoma Philadelphia**, derivante da una traslocazione reciproca tra i cromosomi **9** e **22**, riscontrata nei pazienti affetti da **leucemia mieloide cronica (CML)**.
- Nel **1968** si arrivò al bandeggio cromosomico

Posizione dei cromosomi

Le molecole di DNA hanno una conformazione dinamica. I cromosomi sono visibili al microscopio ottico in metafase o in prometafase, in quanto la **cromatina** risulta essere impacchettata in modo regolare grazie agli istoni.

La cromatina condensata non è utilizzabile per l'espressione genica, viene quindi decondensata quando c'è bisogno di esprimere un gene e localmente gli istoni vengono spostati.

Il cromosoma metafasico è composto da due parti, chiamate **cromatidi fratelli**, che sono il prodotto diretto della replicazione del DNA avvenuta durante la **fase S** del ciclo cellulare. Ciascun cromatide è lo specchio dell'altro e contiene una doppia elica costituita da un filamento vecchio e uno nuovo di DNA.

Durante l'**interfase**, invece, la cromatina non è organizzata come nella metafase. Si presenta con una distribuzione dispersa, ma non casuale.

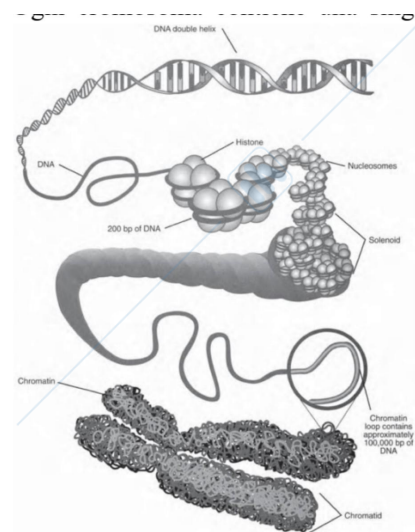
La cromatina nel nucleo, infatti, è disposta secondo i **TAD (Topologically Associating Domains)**, territori cromosomici per cui i cromosomi occupano zone specifiche del nucleo.

Questo è stato dimostrato tramite tecniche come la FISH. Utilizzando sonde specifiche, una per il **cromosoma 18** e una per il **cromosoma 19**, si è potuto osservare dove si localizzano ripetutamente questi cromosomi all'interno del nucleo.

Il risultato di questi studi ha mostrato che il cromosoma 19 si trova più internamente nel nucleo, mentre il cromosoma 18 occupa posizioni più periferiche. Questo è coerente con il fatto che il cromosoma 19 contiene molti più geni espressi, inclusi geni **housekeeping**, mentre il cromosoma 18 è costituito da meno geni.

Tendenzialmente, infatti, le regioni più trascritte si localizzano verso l'interno del nucleo, mentre le regioni meno trascritte si localizzano verso la periferia, cioè vicino all'eterocromatina. Il corpo di Barr, infatti, è periferico.

Questo si riflette anche sul numero di geni espressi e sulla compatibilità con la vita in caso di trisomia: la trisomia 18 è compatibile con la vita, mentre la trisomia 19 no. La **sindrome di Edwards** è appunto causata da trisomia 18, ed è una condizione clinica grave, ma compatibile con la sopravvivenza, a differenza di una ipotetica trisomia 19, che risulta letale già in fase embrionale, a causa dell'elevata densità genica di quel cromosoma.



Struttura del genoma

La struttura del genoma si suddivide in **sequenze uniche**, **sequenze moderatamente ripetute** e **sequenze altamente ripetute**. C'è poi il cosiddetto **DNA ripetitivo**, che in passato veniva definito "**DNA spazzatura**" perchè si pensava che non servisse, ma che oggi sappiamo essere coinvolto in processi regolatori e meccanismi evolutivi. Il primo DNA ripetuto che è stato studiato è soprattutto quello legato alle zone centromeriche (alfa satellite, beta satellite, telomeri, microsatelliti)

Tipo	Dimensioni dell'unità ripetitiva (bp)	Sequenza ripetuta	Localizzazione
α (DNA alfoide)	171	Sequenze ripetute in tandem	Tutti i cromosomi
β	68	Sequenze ripetute in tandem ricche in GC	Centromeri dei cromosomi 1, 9, 13, 14, 15, 21, 22 e Y
γ	220	Unità ripetute	Cromosoma 8 e cromosoma X
Satellite 1	25-48	Sequenze ripetute in tandem	Centromeri e altre regioni nell'eterocromatina della maggior parte dei cromosomi
Satellite 2	5	ATTCC	Cromosomi 1, 2, 10 e 16
Satellite 3	6	AATTC	Regioni pericentromeriche dei cromosomi 1, 9, 16 e Yq
Satellite 4	5;7	AAGAG (90%); Sequenza AAGAGAG (10%)	Maggior parte dei cromosomi

I **microsatelliti** sono molto usati in genetica forense, ma anche in controlli di qualità nei laboratori: ad esempio, per verificare che una linea cellulare coltivata in vitro non sia stata contaminata o scambiata accidentalmente, si analizzano i microsatelliti, che funzionano come una vera e propria impronta digitale genetica.

Sono utilizzati anche in diagnosi prenatale, quando ad esempio si teme una cross-contaminazione del campione fetale con cellule materne (come può avvenire nei prelievi da villi coriali). Analizzando i microsatelliti si può quindi distinguere con precisione se il DNA proviene effettivamente dal feto oppure no.

Il cromosoma 21 è un cromosoma tipicamente **acrocentrico**. Questo tipo di cromosomi contiene una regione detta organizzatore del nucleo che contiene le sequenze che codificano per il **DNA ribosomale**. Tali regioni, comuni a cinque tipi di cromosomi umani acrocentrici (**13, 14, 15, 21, 22**), sono responsabili della formazione dei nucleoli all'interno del nucleo.

Le ripetizioni di **DNA satellite** si trovano tipicamente nelle regioni centromeriche e telomeriche dei cromosomi. I **minisatelliti** sono spesso presenti nei telomeri, mentre le **sequenze LINE** sono prevalentemente nelle **bande G scure**, regioni più compattate e ricche di eterocromatina. Tra i tipi di DNA satellite, ricordiamo:

- **Satellite alfa o alfoide**: nei centromeri
- **Beta-satellite**: adiacente alle regioni centromeriche.
- **Satellite 2 e satellite 3**: presenti solo in alcuni cromosomi, in particolare il satellite 3 si localizza nelle regioni pericentromeriche dei cromosomi 1, 9, 16 e Y (braccio lungo).

Cromatina

La cromatina è distinta in **euromatina** ed **eterocromatina**. L'euromatina è meno compattata, più interna nel nucleo e associata a trascrizione attiva. La sua struttura aperta ne facilita la replicazione precoce durante la fase S del ciclo cellulare. Al contrario, l'eterocromatina è compatta e associata a regioni non trascritte, con replicazione tardiva. Si distingue in:

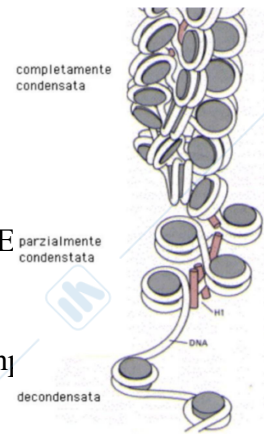
- **Eterocromatina facoltativa**: ad esempio, il cromosoma X inattivo (corpo di Barr).
- **Eterocromatina costitutiva**: sempre compatta, localizzata nelle regioni centromeriche o pericentromeriche.

Questa distinzione è visibile anche al attraverso il bandeggio:

- **Bande G scure:** regioni eterocromatiche, meno attive.
- **Bande G chiare:** regioni eucromatiche, più ricche di geni e trascrizione attiva.

I cromosomi **1, 9, 16** presentano ampie regioni di eterocromatina costitutiva. E costituiscono dei **polimorfismi**.³

Il cromosoma X può passare da inattivo ad attivo in specifici contesti, ad esempi nella meiosi femminile.



Ciclo cellulare

Il ciclo cellulare è composto da diverse fasi: **G1, S, G2 e la fase M** (mitosi). La mitosi comprende **profase, prometafase, metafase, anafase, telofase e citocinesi**.

Durante la mitosi, il numero di cromosomi resta invariato, ma in assenza di una corretta separazione dei cromatidi, si possono generare cellule con **92 cromosomi**. La meiosi, al contrario, non è un ciclo ma un processo riduzionale che porta alla formazione di cellule aploidi.

Durante la profase I della meiosi, avviene il **crossing-over**, fondamentale per la ricombinazione genetica.

Corredo cromosomico e comparazioni tra specie

Non esiste una correlazione diretta tra il numero di cromosomi e la complessità dell'organismo. Ad esempio, il pesce rosso ha 94 cromosomi, mentre un rospo ne ha 36. Questa variabilità è studiata nell'ambito dell'evoluzione dei genomi.

Nel nostro caso, si è osservato che il cromosoma 18, nelle scimmie più antiche, corrispondeva a due cromosomi acrocentrici poi fusi in un unico cromosoma metacentrico nell'uomo.

Ciò spiega perché, in alcuni modelli animali come il topo, non sempre è possibile studiare efficacemente patologie umane: **la densità genica e l'organizzazione cromosomica sono differenti.**

Anche il numero di geni codificanti non è proporzionale al numero di cromosomi. Ad esempio, il pesce Takifugu rubripes ha 94 cromosomi ma solo circa 18.500 geni, mentre la Drosophila, con appena 8 cromosomi, possiede ben 13.800 geni.

³ Dalla sbobina dell'anno scorso

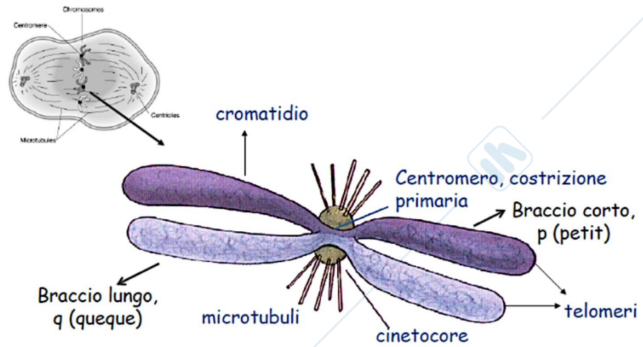
Struttura del cromosoma⁴

Il cromosoma X e il cromosoma Y sono detti **eterosomi**, particolari cromosomi dal cui assortimento è controllata la determinazione del sesso. Le restanti coppie sono dette **autosomi**.

I **cromosomi omologhi** contengono DNA codificante per le stesse proteine, hanno gli stessi geni nella medesima posizione (bande colorate), ma possono presentare varianti diverse (**alleli**) di ogni gene (diverse gradazioni dello stesso colore).

Ogni cromosoma è costituito da:

- **Braccio corto** (P, da "petite") e **braccio lungo** (Q, da "queue");
- **Centromero**, per suddividere correttamente i cromosomi. Il **cinetocore** è una struttura proteica del centromero per l'aggancio ai microtubuli (i microtubuli possono essere cinetocorici o non cinetocorici perchè non tutti i microtubuli sul fuso mitotico agganciano effettivamente i cromosomi);
- **Telomeri**, che stabilizzano le estremità cromosomiche.

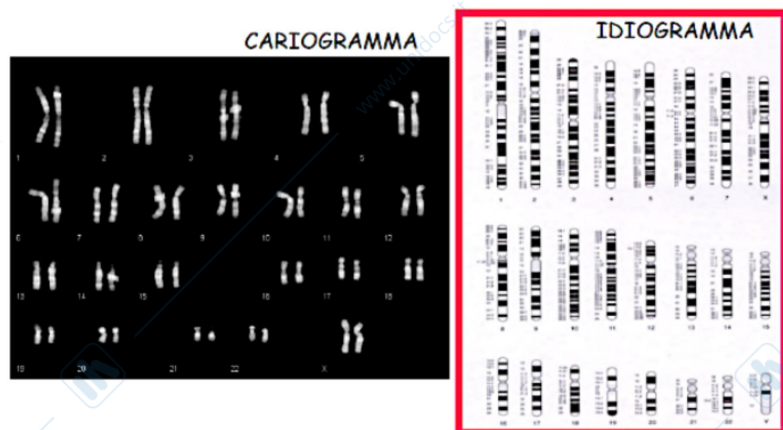


in divisione uno e i cromatidi fratelli in divisione due.

Metodologie per l'analisi del cromosoma

La prima analisi da effettuare in citogenetica è il conteggio dei cromosomi, ottenuto mediante un **cariotipo**, ovvero la disposizione ordinata delle coppie cromosomiche.

Il **cariogramma** rappresenta i cromosomi reali, mentre l'**idiogramma** è un modello standard ideale, conforme alle linee guida I SCN (**International System for Human Cytogenomic Nomenclature**), aggiornato periodicamente. L'ISCN stabilisce come dovrebbero apparire i cromosomi e come rappresentare le anomalie cromosomiche nei referti clinici.



Per ottenere un cariotipo, servono cellule vive in divisione che vadano in metafase.

⁴ Integrazioni dalla sbobina dell'anno scorso

Le fonti biologiche più comuni sono, per la **diagnosi postnatale**:

- **Sangue periferico**;
- **Midollo osseo**;
- **Fibroblasti**;
- **Linee cellulari immortalizzati** con Epstein-Barr virus (linee linfoblastoidi);
- **Linfonodi o tumori solidi**, purché contengano cellule vive.

Diagnosi prenatale:

- **Villi coriali**: prelievo tra la 10^a e la 13^a settimana di gestazione;
- **Liquido amniotico**: tra la 14^a e la 17^a settimana di gestazione;
- **Sangue fetale**: prelievo dal cordone ombelicale.

Queste sono indagini prenatali invasive, ma esistono anche tecniche non invasive, come il **NIPT (Non Invasive Prenatal Test)**, che si basa sull'analisi del DNA fetale libero nel sangue materno. Si tratta di uno screening, non di una diagnosi.

Indicazioni alla **diagnosi post-natale**:

- Sospette **sindromi cromosomiche**: Down, Turner, Edwards;
- **Malformazioni e dismorfologia**;
- **Ritardo psicomotorio/mentale**;
- Sindromi da **geni contigui**: Williams, Prader-Willi, Angelman, DiGeorge;
- **Amenorrea** primaria o secondaria (sospetto di sindrome di Turner);
- **Ipogonadismo**, soprattutto nel maschio;
- **Azoospermia**, in ambito di fertilità della coppia;
- **Criptorchidismo bilaterale**;
- **Pluriabortività spontanea** e nascita di bambini morti;
- Coppie con fallimento riproduttivo o precedenti figli con anomalie cromosomiche.
- **Sterilità**

Indicazioni alla **diagnosi prenatale**:

- Anomalie ecografiche, come **malformazioni**;
- Positività ai **test di screening**, come NIPT, bi-test, tri-test, che valutano rischio aumentato di avere un figlio con anomalie cromosomiche;
- Genitore portatore di un'**anomalia bilanciata** che rischia quindi di generare gameti sbilanciati;
- **Anomalie cromosomiche** in una gravidanza precedente;
- Diagnosi di sesso fetale per malattia **X-linked**;
- **Età materna** avanzata (oggi meno usata).

Analisi cromosomica

fare l'**analisi cromosomica** bisogna avere delle cellule vive, perché si deve fare una coltura cellulare. Per vedere i cromosomi vanno messi in una coltura e fatti crescere. Dopodiché, una volta che la coltura cellulare ha raggiunto una certa numerosità, si fa il **preparato cromosomico**. Il preparato cromosomico viene poi colorato, e quindi si ottengono dei bandeggi diversi per ogni cromosoma. A questo punto si fanno delle fotografie al microscopio, che vengono usate per il conteggio dei cromosomi. Quando si è stabilito che il conteggio è corretto, oppure incorretto in alcuni dei casi, si ricostruisce il **cariotipo**, andando a vedere anche la **morfologia**, quindi accoppiando le diverse coppie, e poi si fa il referto finale. Nel caso in cui tutto sia normale, il referto sarà 46 XX o 46 XY. Nel caso, invece, in cui qualcosa non è prevista, c'è la linea guida che indica il tipo di **alterazione**.

Culture cellulari

Per fare le colture cellulari in biologia si usano dei **terreni**, fondamentali perché le cellule del nostro corpo (eucariotiche), soprattutto a livello pluricellulare, hanno bisogno di determinate sostanze (soluzioni saline, isotoniche, aminoacidi per fare proteine, nucleotidi per la sintesi del DNA e RNA, vitamine). Si utilizzano anche **indicatori di pH**, perché una variazione di quest'ultimo ci fa capire se la cellula ha metabolizzato oppure no; e quindi in base alla colorazione risultante (arancione/giallo) si decide se fornire nuovo nutrimento, espandendo la coltura cellulare.

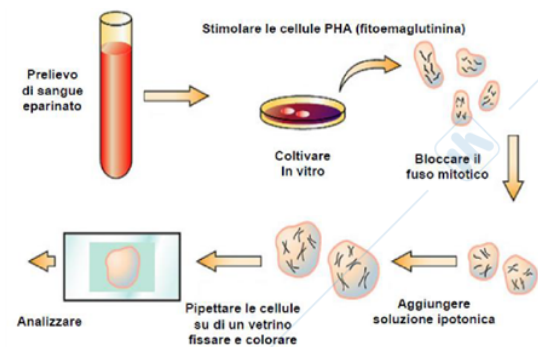
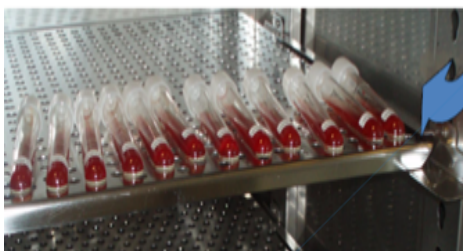
Serve inoltre il **siero** (contenente proteine e fattori di crescita e zuccheri) e i **mitogeni** come il **PHA**, per stimolare i linfociti T a riprendere il ciclo cellulare. Si usano anche altri mitogeni (dalla sbobina dell'anno scorso: Lipo-poli-saccaride (LPS) e la Concanavalina A per i linfociti di tipo B). Inoltre bisogna aggiungere, a un determinato momento nella nostra coltura, dei **veleni mitotici**, sostanze come la **colchicina** (che è anche un farmaco) che inibisce e **blocca il flusso mitotico** per poi passare all'analisi.

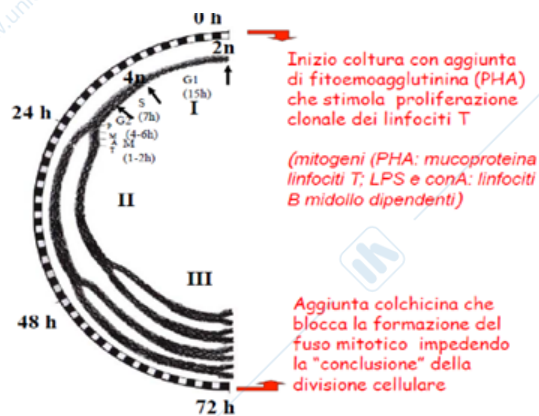
Preparato cromosomico

Al sangue periferico viene aggiunto l'anticoagulante **eparina**, successivamente si stimola il sangue periferico con **PHA**, si effettua la coltura in vitro e poi si blocca il flusso mitotico delle cellule. Infine si aggiunge la **soluzione ipotonica** per gonfiare le cellule e analizzarle.

Le cellule sono messe in un **incubatore a controllo di CO₂** in provette tappate per evitare scambi gassosi. Si lasciano per 72-96 ore aggiungendo il **mitogeno** che in questo caso è la **PHA** (per la stimolazione dei linfociti T). La quantità di sangue che serve è di 500 microlitri in 9 ml di terreno da aggiungersi a 500 microlitri di PHA, con **un totale di 10 ml in una provetta**.

colture di sangue
intero: 72 o 96 ore



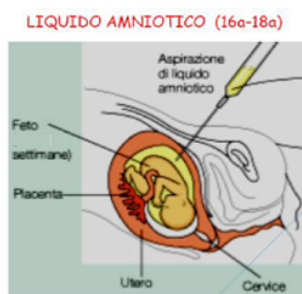


Sapendo che il ciclo mitotico dura circa 24 ore, al termine si sono raggiunte tante cellule, Di solito si aspettano 72 ore per fare l'analisi del sangue periferico. Dopo il terzo giorno, si aggiunge la **colchicina** che blocca il fuso mitotico (bloccando i microtubuli) e quindi non permette l'avanzamento della cellula verso l'anafase e la telofase. **Questa fase è importante perché permette di fotografare le cellule in metafase.** La colchicina deve rimanere 15-30 minuti sul preparato.

Liquido Amniotico

Parlando invece di che tipi di prelievi possono arrivare, ossia campioni possono arrivare, oltre al sangue periferico si ha **liquido amniotico** e **villi coriali**. Il liquido amniotico è di **colore giallo** (un po' più chiaro dell'urina), mentre gli elementi ematici sono le **biopsie dei villi coriali**, dato che è il materiale solido che viene aspirato.

Nella seconda finestra temporale, per quanto riguarda il liquido amniotico, i colori stanno a identificare proprio quello che viene aspirato. L'ago non è sottile, ma non è neanche spesso quanto la **cannula** che serve per la biopsia dei villi coriali; questo viene fatto passare a **livello trans addominale** e serve per aspirare **circa 15-20 ml di liquido amniotico**. All'interno del liquido amniotico si ha la sospensione di cellule che derivano direttamente dal feto. Quindi non si possono utilizzare queste cellule derivanti dal feto, in quanto alcune saranno morte, altre saranno vive e sono utilizzate per la coltura.



Nel LA si trovano cellule di diversa provenienza:

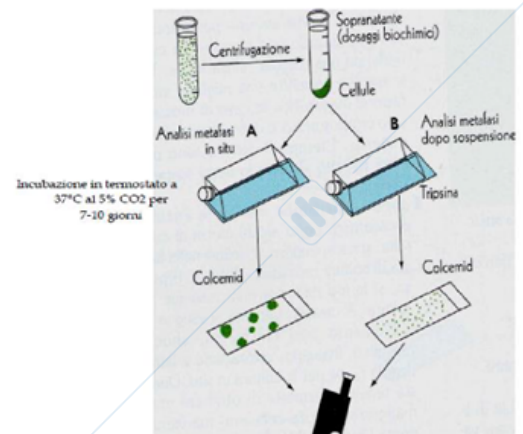
- epidermide del feto.
 - cellule delle vie genitourinarie e della membrana amniotica.
 - cellule delle mucose e dell'apparato digerente.
- Il numero di cellule vitali nel liquido amniotico si va progressivamente riducendo con il proseguire della gravidanza; il periodo più adatto è la 16a settimana.

È possibile osservare nel **surnatante**, dopo la **centrifugazione**, delle piccole **cellule verdi** sul fondo provenienti dal liquido amniotico. La parte liquida può essere utilizzata per fare dei **dosaggi biochimici**. Nel laboratorio si possono fare separatamente anche delle analisi per esempio per dosare l'**alfa-fetoproteina**, che dà un'indicazione sulla salute del feto.

Le cellule nel laboratorio di genetica medica vivono isolate dal liquido amniotico e possono essere coltivate con due metodiche in situ. Generalmente si predilige la **metodica A** rispetto alla **metodica B** e il diagramma aiuta a capire il perché. Le "macchie" sono le cellule che sono cresciute nell'incubatore che si sono formate dalle mitosi delle cellule iniziali.

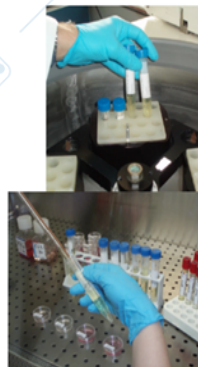
L'**informazione in A** è **più utile**, perché quando si utilizza il metodo in fiasca le cellule **vanno staccate usando un enzima proteolitico che è la tripsina**. Non sempre le informazioni ottenute dall'analisi cromosomica possono essere omogenee, dato che **le cellule dividendosi in coltura possono andare incontro a degli errori**. Il liquido amniotico si lascia una decina di giorni, quindi **dividendosi ogni 24 ore** si stimano una decina di mitosi. Ipotizzando che le cellule ottenute dal prelievo siano tutte diploidi, e che quindi il feto stia bene, se le si mettono in coltura e alla fine si individuano delle eterogeneità non c'è modo di sapere se l'errore sia avvenuto nella coltura o era presente prima.

Allestimento Culture LA



Le colture di liquido amniotico si allestiscono dopo aver:

- ❖ cfz il prelievo,
- ❖ eliminato il surnatante,
- ❖ risospeso il pellet cellulare e
- ❖ suddividendolo in parti uguali in capsule di Petri di plastica con vetrino oppure in fiasche di coltura



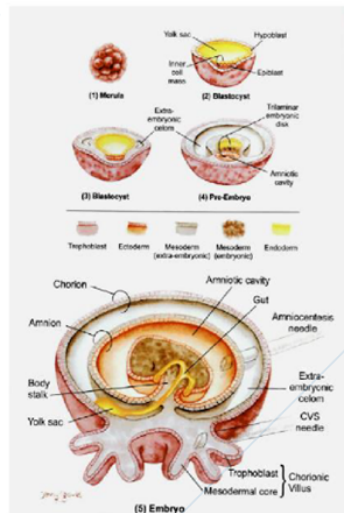
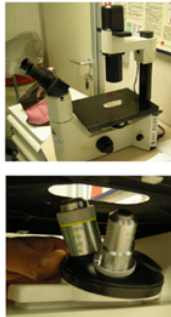
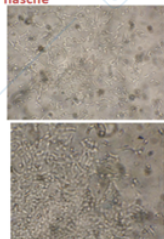
Effettuando l'analisi in situ lo si semina su un vetrino circolare e poi messo in una **capsula di Petri**. Si avranno perciò delle **aree di crescita ciascuna riferita alla cellula iniziale**. Quindi ogni cellula iniziale avrà vicino **le sue cellule figlie e le corrispettive metafasi cellulari** e si potranno distinguere gli errori nelle singole cellule. Il prelievo di sangue a livello post-natale si fa a livello della provetta e poi si esegue l'analisi sulla sospensione. **La crescita dei linfociti non è su adesione, ma in sospensioni**,

quindi sono già sospesi. Mentre invece **gli amniociti aderiscono**, quindi si esegue l'analisi in situ. Ogni liquido amniotico ha **quattro repliche risultanti**, così si ha una maggiore verifica del risultato.

Villi Coriali

Si prelevano dei **frustoli di villi coriali**, tramite un ago di diametro maggiore (una cannula), che va ad aspirare pezzi della **placenta**. Questa è l'indagine che mette **più a rischio** per perdita di gravidanza rispetto ad un amniotico, perché viene fatto in un'epoca precedente, però ha il **vantaggio di avere una risposta diagnostica precedente** a quella del liquido amniotico, a seconda di quale sia l'indicazione. Facendo un'amniocentesi si va ad aspirare il liquido amniotico, prelevando i villi coriali, ma le cellule che ne derivano possono non essere fedelmente la fotografia di quello che invece sta tenendo a livello del feto.

si segue la crescita delle colonie a distanza di alcuni giorni e si blocca secondo le necessità. Si prosegue con il preparato in situ se le colture sono in Petri oppure con il preparato in sospensione se sono state allestite fiasche



I campioni per l'esame citogenetico provengono dal *corion frondoso* con ben sviluppata la vascolarizzazione. Nei villi sono presenti tre tipi di cellule:

- **Citotrofoblasti,**
- **Sinciziotrofoblasti,**
- **Cellule del Mesenchima**

Le prime si dividono spontaneamente così che è possibile ottenere metafasi mediante raccolta diretta di queste cellule.

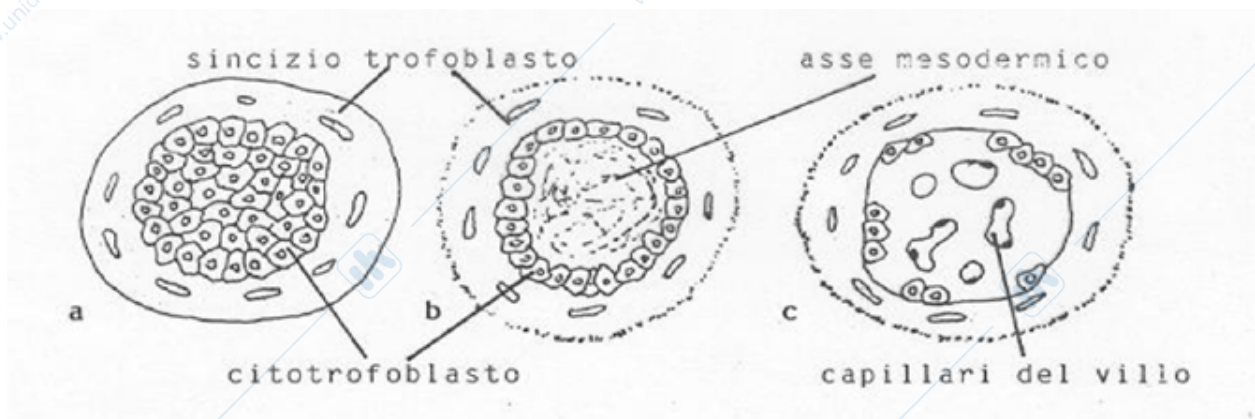
Per l'ultima categoria di cellule invece, per ottenere le mitosi si devono allestire colture in vitro.

Le cellule del cito trofoblasto si dividono spontaneamente, quindi non hanno bisogno di mitogeno, e quindi si hanno delle metafasi con un sistema che viene chiamato metodo diretto, permettendo di **analizzare molto rapidamente**, senza dover fare una coltura a lungo termine. Il **mesenchima** invece necessita di una coltura a lungo termine, dato che le sue cellule sono **interne ai villi coriali**. Quando le cellule arrivano nel laboratorio bisogna dividere in due il campione, una parte viene utilizzata per fare l'analisi diretta, per l'appunto sul cito trofoblasto, la seconda parte viene utilizzata a seguito di una digestione con **enzimi proteolitici** come la **pronasi**, digerendo lo strato esterno e liberando lo strato di cellule mesenchimali. Pertanto si allestiscono in parallelo da un unico campione due diverse colture, una dal cito trofoblasto e una dal mesenchima.

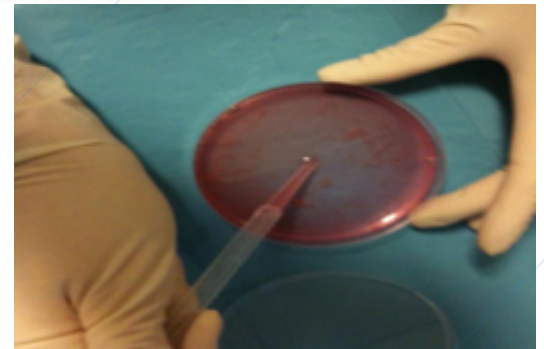
Allestimento Colture CVS



La prof. fa un breve ripasso di embriologia riguardo alla cellula uovo fertilizzata, che si modifica in blastocisti, trofoblasto, inner cell mass, epiblasto, ectoderma amniotico e ectoderma primitivo e poi i tre foglietti embrionali. Arrivando ai tessuti del citotrofoblasto e del mesenchima.



In particolare, come vedremo, nella diagnosi prenatale si può avere il **mosaicismo**, ovvero genomi diversi che derivano da errori post-zigotici direttamente in vivo. Quindi una cellula può errare la segregazione di cromosomi e per quello è utile avere una **doppia analisi**. Se si visualizza sia il mesenchima che il cito trofoblasto e si nota un'anomalia cromosomica, la situazione sicuramente è più a rischio rispetto a trovare solo l'analisi diretta, cioè il cito trofoblasto con l'alterazione o solo l'analisi dopo coltura del mesenchima, perché non c'è una **concordanza** delle analisi.



Quando si trovano delle alterazioni in ambito dei **villi coriali**, generalmente si richiede un'analisi di conferma nel liquido amniotico che è fatta successivamente come finestra temporale e si va ad indagare se il feto ha la stessa **anomalia cromosomica** che è stata identificata nell'indagine precedente; quindi bisogna fare un **secondo prelievo**. Questo perché si creano delle alterazioni che possono magari essere confinate alla placenta e non essere invece inserite, per questo **sono una netta minoranza di cellule che danno vita al nascituro rispetto a quelle che danno gli ammassi embrionali nella suddivisione**. E quindi è più facile che ci sia un errore nelle cellule degli ammassi embrionali rispetto alla possibilità che una cellula del feto invece incappi in un errore mitotico.

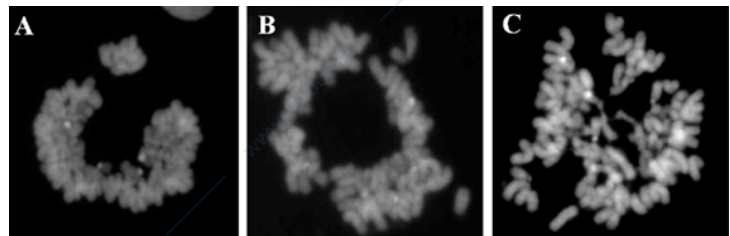
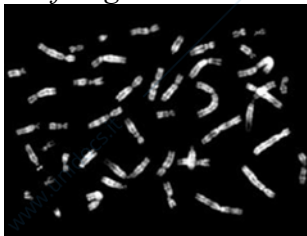
Mentre per il liquido amniotico il laboratorio può scegliere se fare l'analisi in situ o in sospensione, qui vengono utilizzate entrambe. *Un esempio: si fa una coltura a lungo termine dopo dieci giorni, non serve inserire né in siero né uno stimolante di mitosi perché il cito trofoblasto ha cellule attive nel ciclo cellulare e quindi dopo 24 si aggiunge la colchicina, si esegue il passaggio in soluzione ipotonica per gonfiare le cellule, quindi distendere i cromosomi l'uno dall'altro e mettono in fissazione. Il fissativo può essere alcol metilico a base di alcol e acido acetico.*



Osservazione delle colture

Dopo 7-8 giorni si vanno ad osservare per vedere la crescita le macchie dei cloni. Il vetrino serve per **mantenere in situ i fibroblasti**. L'allestimento del preparato è diciamo molto semplice, le cellule vengono raccolte, si utilizza una **centrifuga**, quindi poi vengono risospese dopo aver **eliminato il terreno** assieme a tutto lo **scarto delle colture cellulari**, si risospese con la **soluzione ipotonica**, che è fondamentale per fare entrare la soluzione acquosa, quindi **gonfiare le cellule**, che è fatta da **KCL 0-0.75 M**, dopodiché ancora dopo sei minuti di azione si centrifuga, si elimina la soluzione ipotonica e si risospescono le cellule con **fissativo**, si ripete per almeno **due o tre cicli**. Così le cellule mantengono i cromosomi al loro interno, e si ha la possibilità di fare delle foto di alta qualità.

Si osservano cromosomi prima della colorazione che appaiono grigi, cromosomi bandeggiati e tre esempi di cellule tumorali (A, B, C) in cui non è stata utilizzata la soluzione ipotonica, di cui si osserva il numero elevato di cromosomi. Inoltre le cellule conservano la disposizione dei nuclei, infatti le cellule di glioblastoma già in anatomia patologica vengono fotografate di ematossilina e eosina con questi nuclei particolari, a forma di ciambella, e mantengono grazie al fissativo la morfologia del nucleo.



La prof. sottolinea l'importanza di sapere quando usare la soluzione ipotonica, da non usare dopo il fissativo ma prima, ricordando le tappe: PHA, colchicina, bloccaggio della soluzione ipotonica, e infine il fissativo.