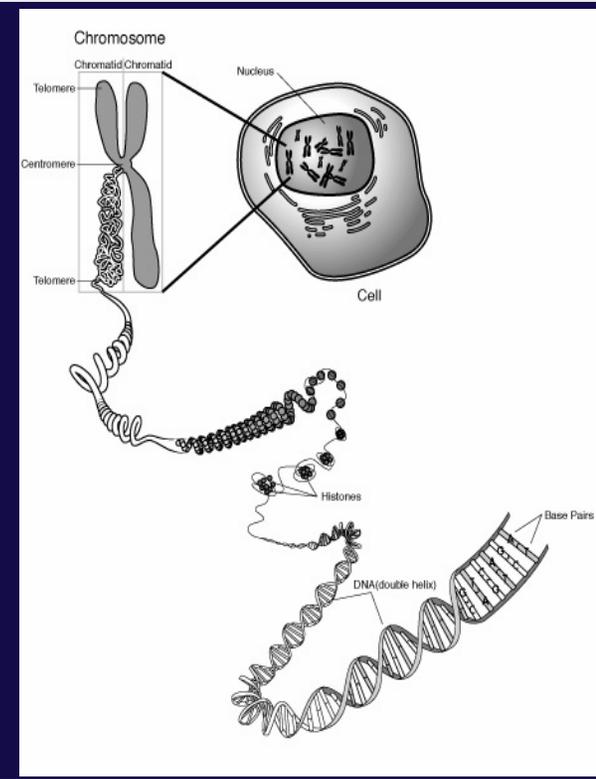


Métodos diagnósticos en Genética Clínica



Dra. Norma Elena de León Ojeda
MsC. Mayra Hernández Iglesias
Lic. Lourdes Marrón Portales
MsC. Marta María Acosta Sabatés



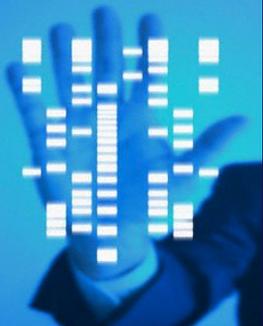
Dermatoglifos

Grabado en la piel. Harold Cummins (1926)

La evidencia más antigua que se conoce de las huellas digitopalmares fue encontrada en una cueva aborigen de Nueva Escocia.

Durante siglos los chinos utilizaron la impresión de las huellas como identificación personal para legalizar transacciones comerciales.

La quiromancia fue la primera referencia al examen sistemático de la mano y sus configuraciones, su práctica en China e India se remonta a los albores del siglo IV a.c.



Aplicaciones de los Dermatoglifos

- Medicina Forense: En dactiloscopia para la identificación personal.
- Antropología Física: Para el estudio de marcadores dermatoglíficos en poblaciones humanas.
- Estudio de gemelos: Como elemento de ayuda en la determinación de la cigocidad gemelar.
- Paternidad: Como recurso excluyente o más probable en una relación de parentesco de primer grado.



En genética médica son empleados específicamente en el estudio de:

- Anomalías y variantes dermatoglíficas.
- Enfermedades monogénicas.
- Enfermedades multifactoriales.

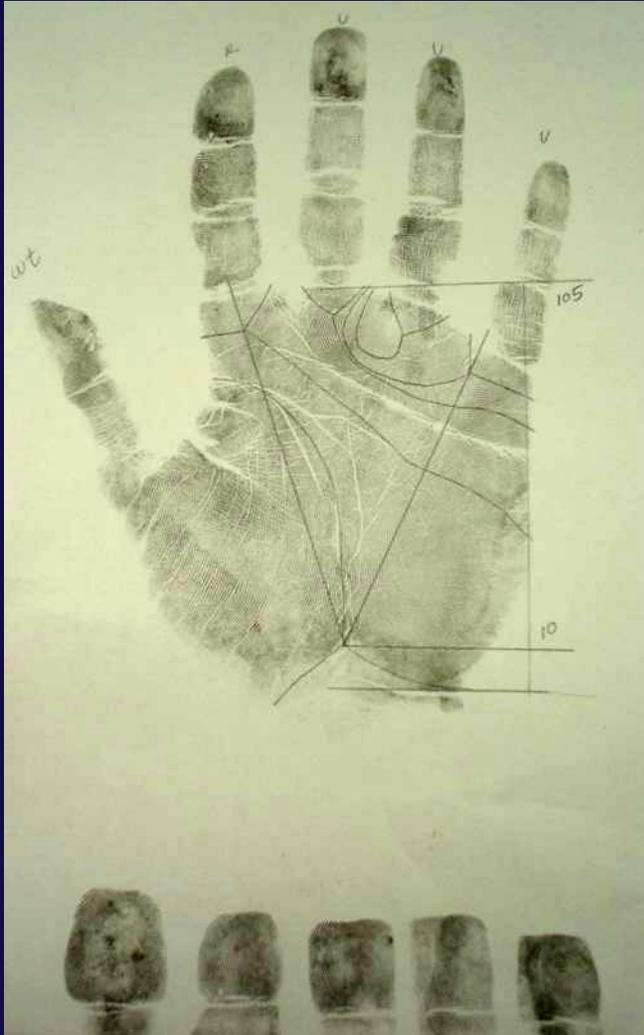


Técnica de obtención del dermatoglifo

Materiales

- Tinta
- Rodillo
- Lámina de cristal
- Papel
- Lápiz
- Lupa
- Microscopio estereoscópico

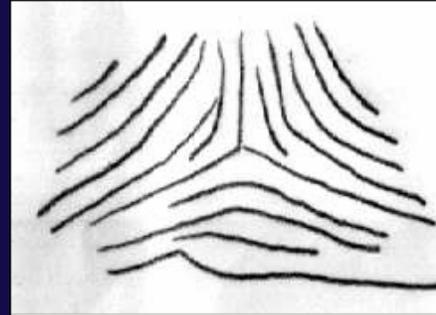
Huella digitopalmar



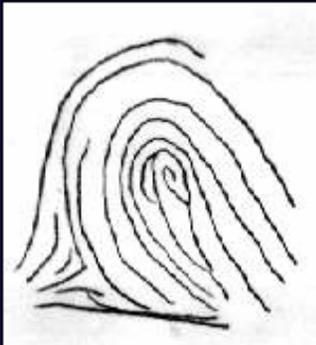
Crestas dérmicas

Nomenclatura

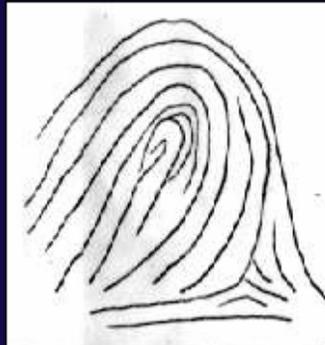
Trirradio: Sistema de crestas que confluyen en un punto



Dedos:



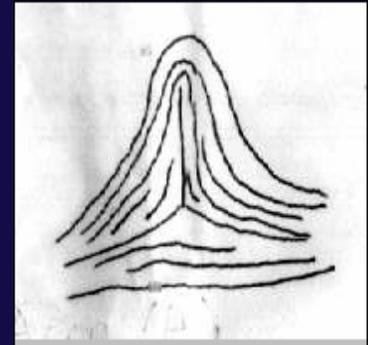
Bucle ulnar
(U)



Bucle radial
(R)



Vortículo
(W)



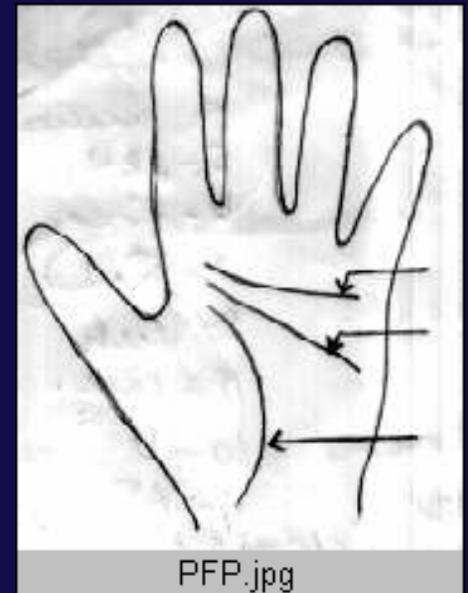
Arco
(A)



Nomenclatura (cont.)

Areas palmares

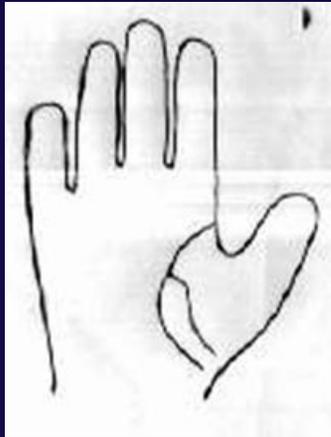
- Tenar
- Hipotenar
- Espacios Interdigitales
- Pliegues de flexión palmares





Área Tenar

Figuras verdaderas



Bucle proximal

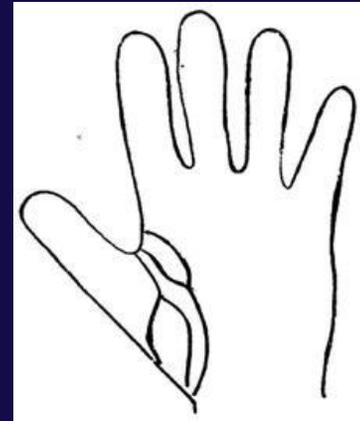


Figura compuesta



Bucle distal

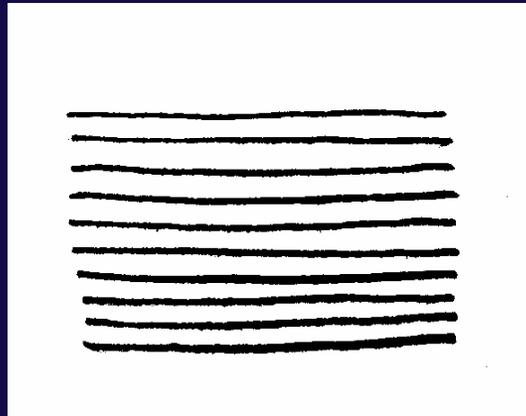


Vorticilo



Área Tenar

Figuras no verdaderas



Campo abierto



Vestigio



Área Hipotenar

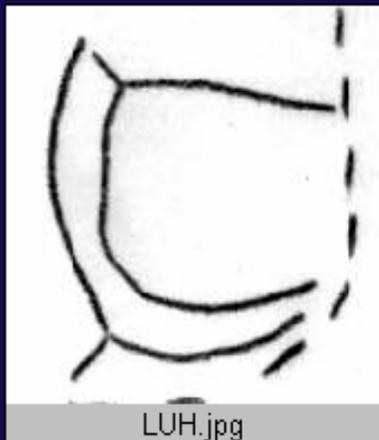
Figuras verdaderas



Bucle radial



Bucle carpal



Bucle ulnar

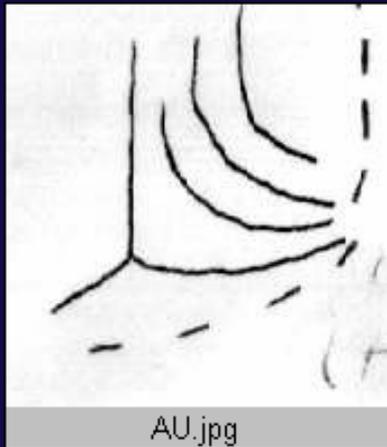


Vorticilo

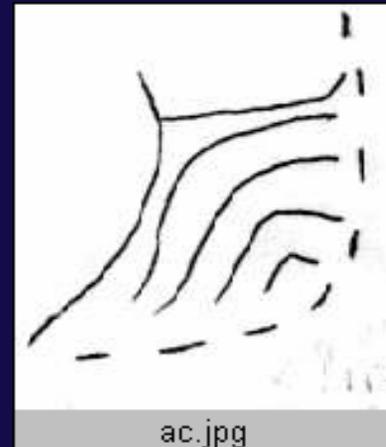


Área Hipotenar

Figuras no verdaderas



Arco
ulnar



Arco
carpal



Arco
radial

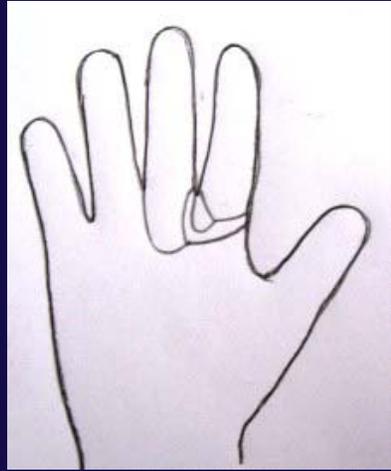


Espacios interdigitales

Figuras verdaderas



Bucle



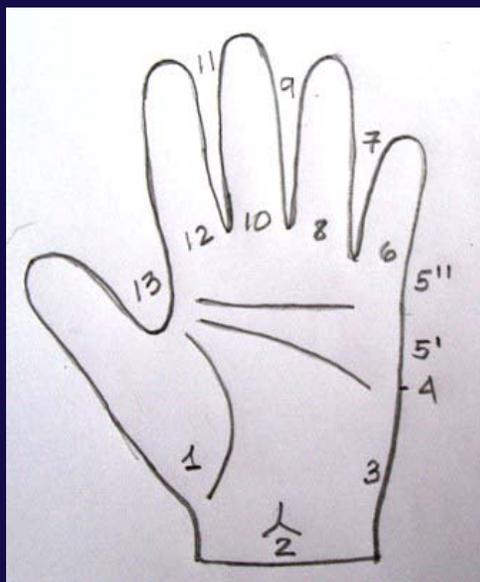
FiguraD



Vorticilo



Líneas principales: A, B, C y D.



Constituyen el radiante mayor de cada tri-radio subdigital.

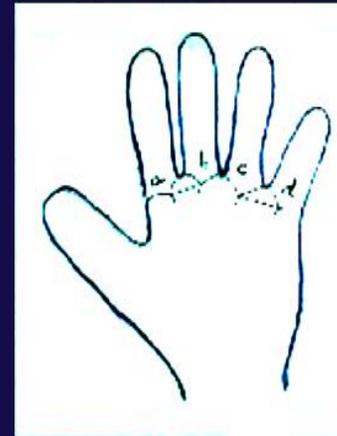
Su salida de la palma se designa como tipo modal de línea principal (A, B, C, D).



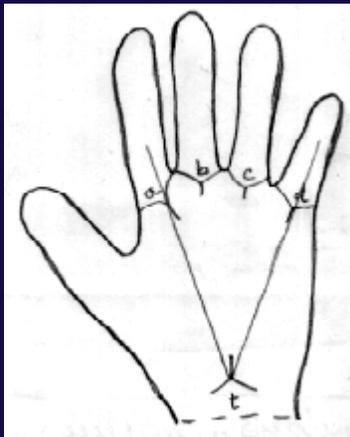
Parámetros cuantitativos.



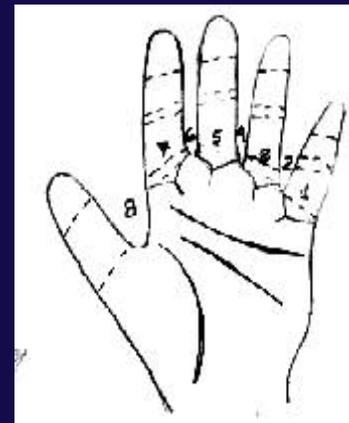
Índice de Walker



Conteo de crestas *ab*, *bc* y *cd*.



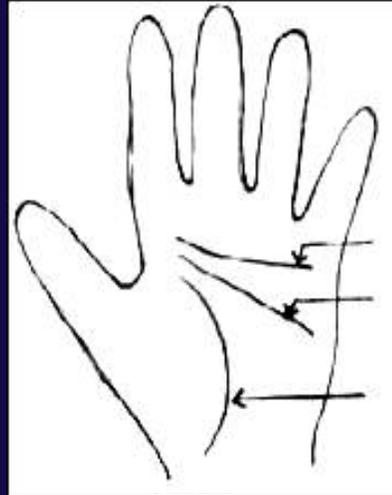
Ángulo *atd*



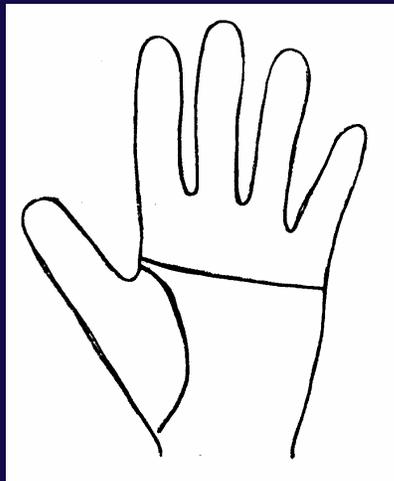
Índice de líneas principales



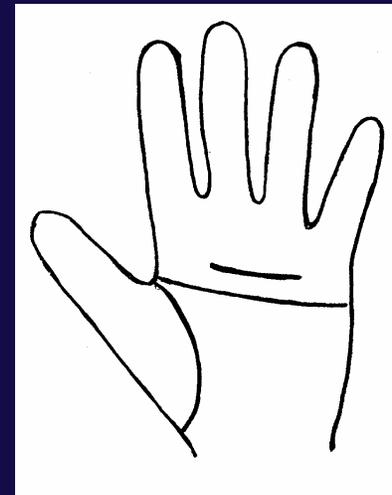
Pliegues de flexión palmares



Distal
Transverso
Proximal



Surco
simiano



Línea
de
Sydney

Informe dermatoglífico

Dedos:

1	2	3	4	5
W	R	U	U	U

IW= 12,3% t

atd= 40°

Area tenar= 0/0

Area hipotenar = Au

Espacios Interdigitales

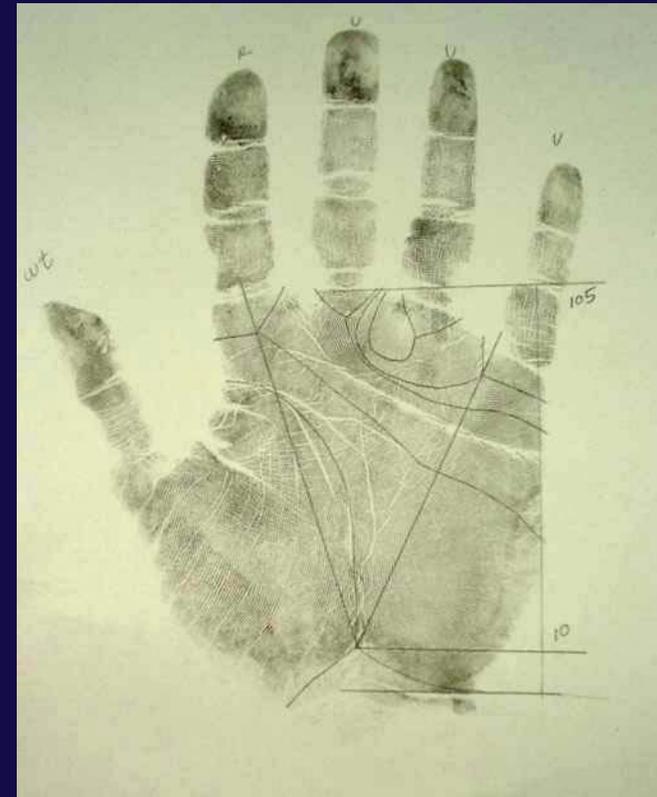
I2=0 I3=L I4=0

Pliegues de flexión palmares
y digitales = n/s

Conclusiones:

Dentro de límites normales.

Mano control





Alteraciones dermatoglíficas en Síndromes Genéticos

I- Craneosinostosis

II- Extremidades con/sin
defectos faciales

III- Secuencias disruptivas

IV- Cardiopatías congénitas

V-Displasias neuroectodérmicas



Continuación

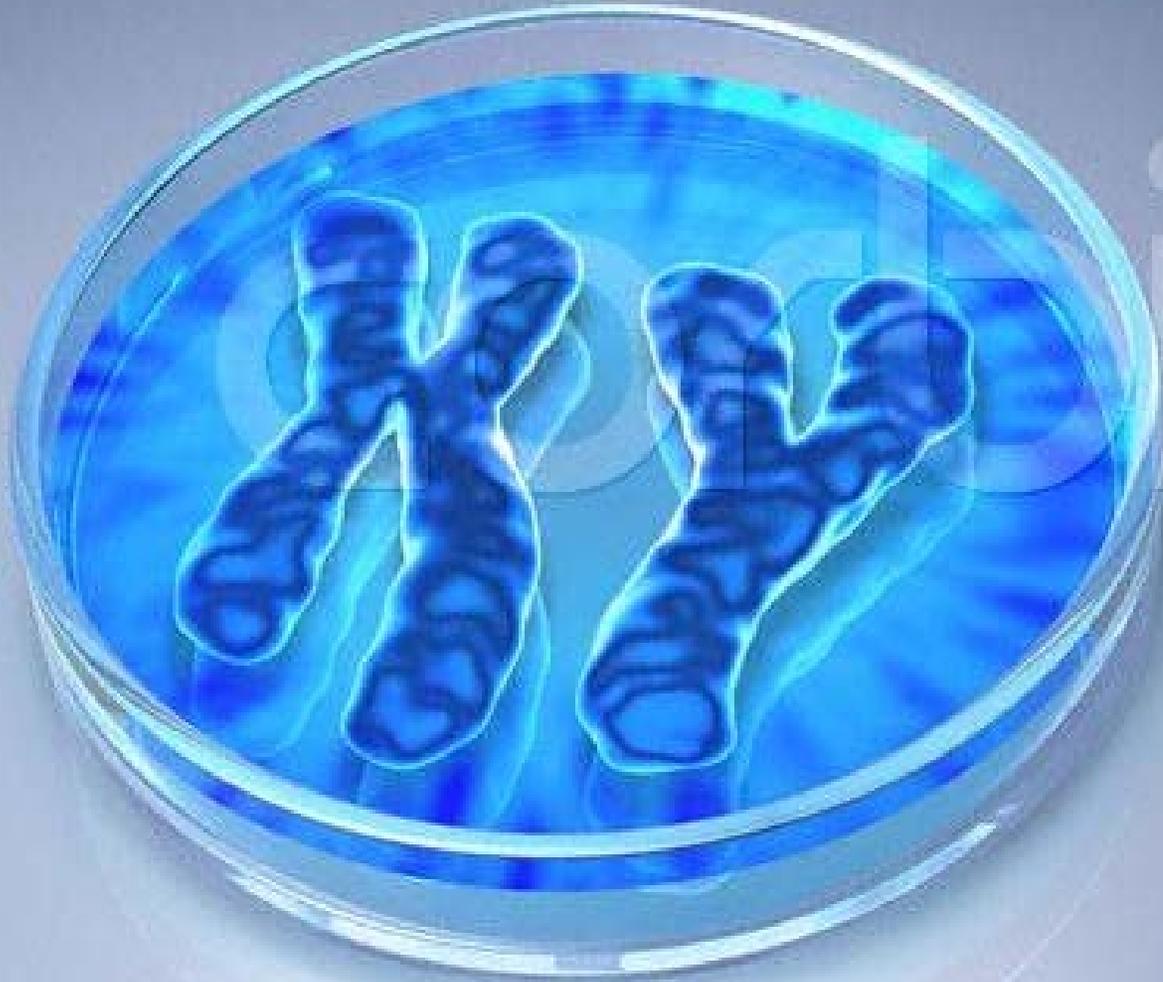
VI- Baja talla con/sin displasia esquelética

VII- S. Sobrecrecimiento con defectos asociados

VIII- S. Craneodigitales

IX- S. Cromosómicos

CROMOSOMAS HUMANOS





Técnicas para el estudio de los cromosomas humanos.

- **Tipos de cromosomas. Cariotipo.**
- **Obtención de cromosomas.**
- **Cromatina sexual. Cuerpo Barr .**



Citogenética

Ciencia que estudia los cromosomas y el proceso de división celular



Obtención de cromosomas humanos

- Toma de muestra por punción venosa
- Cultivo de sangre en incubadora a 37°C durante 72 horas
- Medio de cultivo
- Fitohemaglutinina
- Colchicina o Colcemid
- Solución hipotónica
- Fijación



Tipos de Cromosomas

Metacéntricos: Centrómeros en posición medial del cromosoma, definiendo brazo corto (p) y brazo largo (q)

Submetacéntricos: Centrómero desplazado de la posición medial.

Acrocéntricos: Centrómero casi terminal y se define en el brazo corto (p) con tallos y satélites



Clasificación de los cromosomas

Grupo A: pares 1 - 3

Grupo B: pares 4 - 5

Grupo C: pares 6 - 12 (incluyendo el X)

Grupo D: pares 13 - 15

Grupo E: pares 16 - 18

Grupo F: pares 19 - 20

Grupo G: pares 21 - 22 (incluyendo el Y)



Definición de Banda

Es una parte del cromosoma que se distingue claramente de su segmento adyacente mediante una apariencia más oscura ó más clara



**Human female
G-bands**





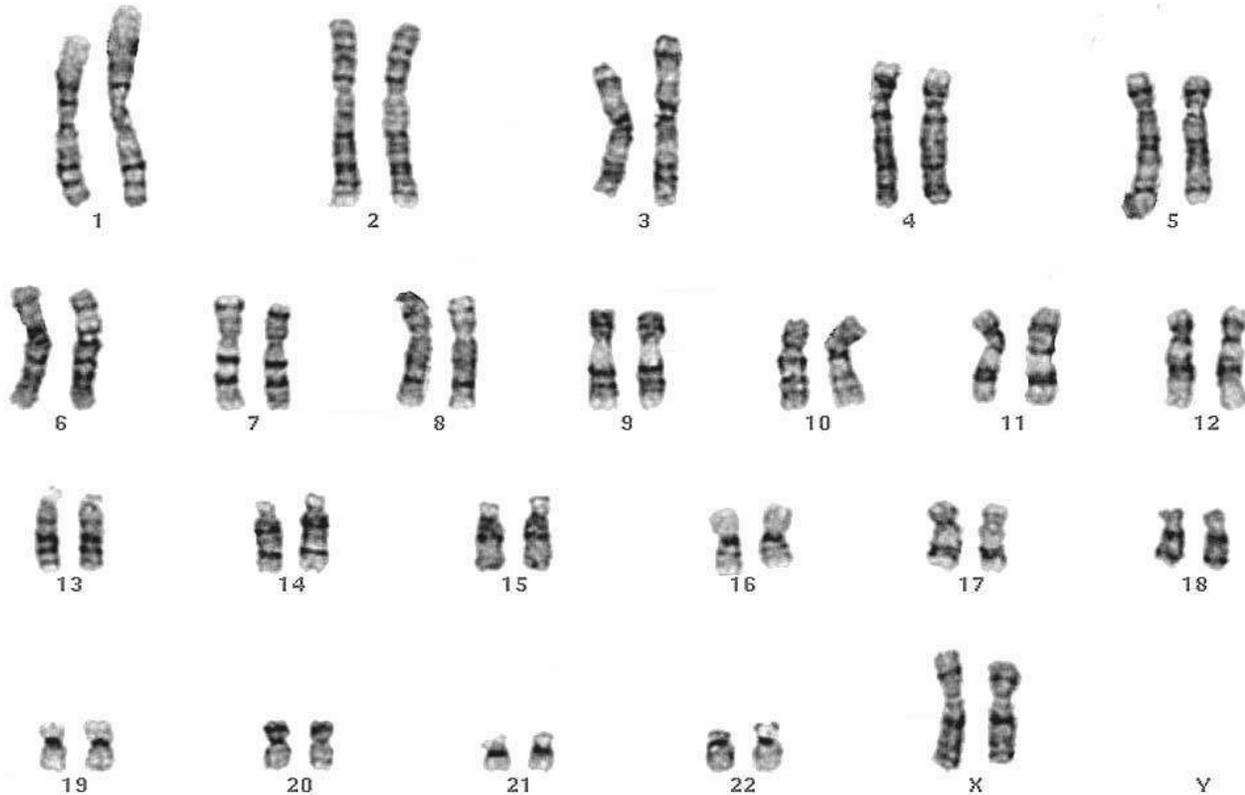
Concepto de cariotipo

- Es el ordenamiento de los cromosomas de acuerdo a criterios internacionalmente establecidos
- Los cromosomas se clasifican por pares en grupos denominados por letras de la A a la G



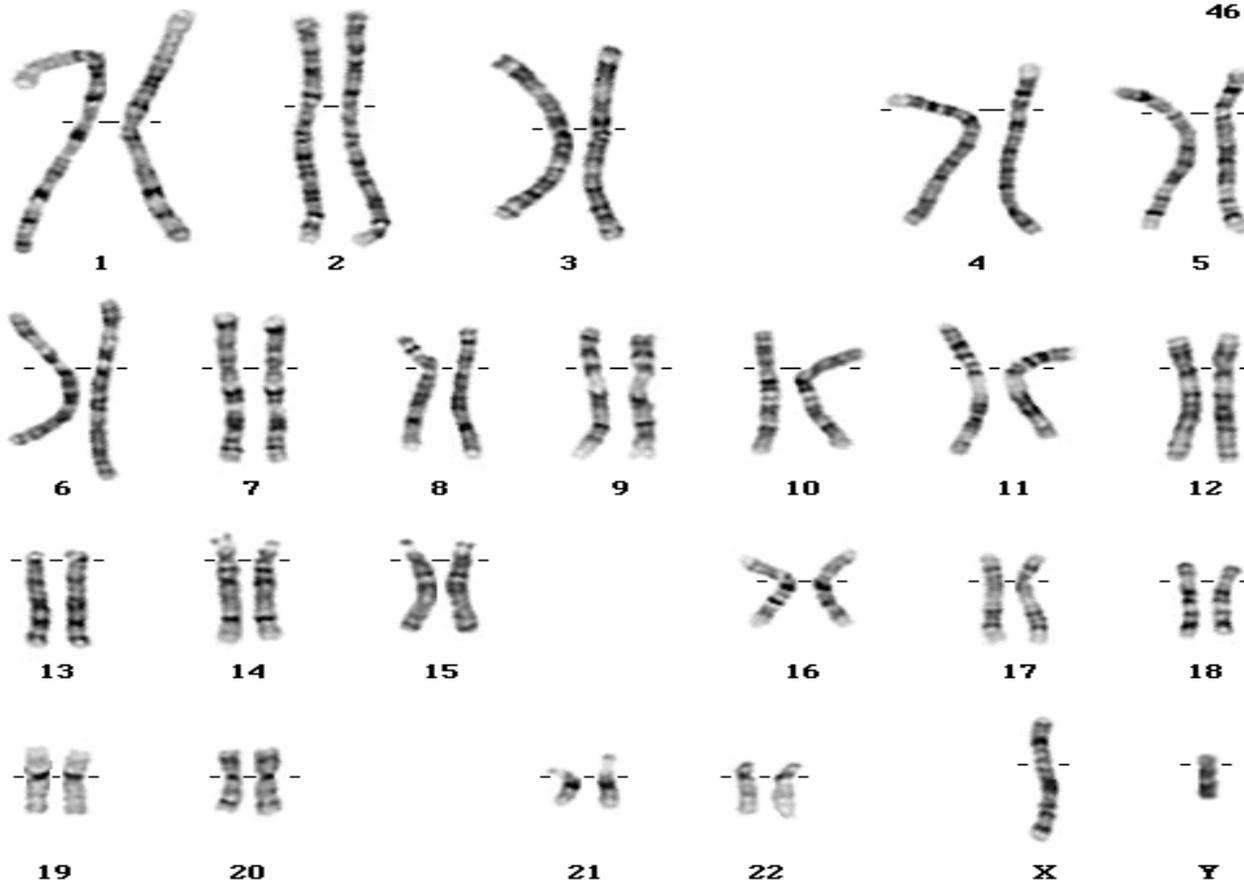
CARIOTIPO 46, XX

Human female
G-bands





CARIOTIPO 46, XY





ESTUDIO DE LA CROMATINA SEXUAL

Toma de muestra por raspado de la mucosa oral.

Extensión en láminas portaobjetos.

Coloración.

Observación al microscopio.



Corpúsculo o cuerpo Barr:

Uno de los cromosomas X, el que completa su replicación más tarde que su homólogo, queda condensado e inactivo durante la interfase de células somáticas.

$$\# \text{ cuerpos Barr} = \# \text{ cromosomas X} - 1$$



cuerpo Barr

0

Hembra

45,X

Varón

46,XY

1

46,XX

47,XXY

2

47,XXX

48,XXXYY

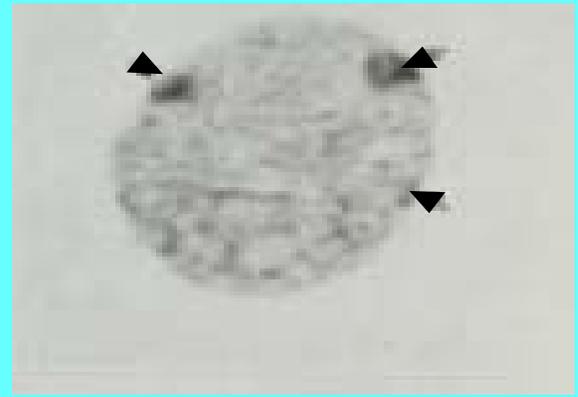
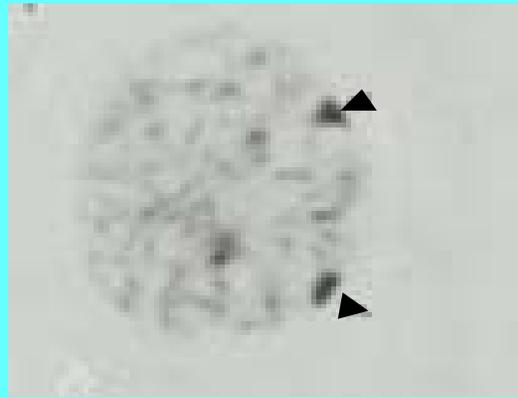
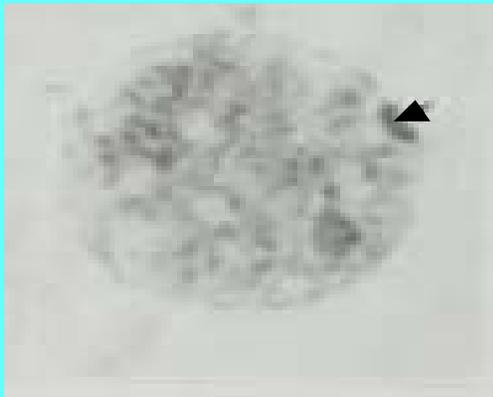
3

48,XXXX

49,XXXXYY



CUERPOS DE BARR TÉCNICA ACETO ORCEÍNA





Ventajas de la técnica de Cromatina Sexual:

- 1- Rápida y sencilla.**
- 2- Se realiza en núcleos interfásicos .**
- 3- No requiere de cultivo de células.**
- 4- Da el estado de los cromosomas sexuales de forma inmediata.**



Pruebas de laboratorio para el estudio del ADN

Tecnología del ADN recombinante

- Hibridación molecular. Southern blot.
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Diagnóstico prenatal de enfermedades monogénicas en Cuba



Pruebas de laboratorio para el estudio del ADN

Tecnología del ADN recombinante

- Obtención de un segmento específico de ADN del genoma humano
- Unión de este segmento a una molécula de ADN de un microorganismo
- Obtención de múltiples copias del segmento de ADN humano que se estudia



Pruebas de laboratorio para el estudio del ADN

Herramientas

1. Enzimas de restricción
2. Un vector
3. Sondas, probes y oligonucleótidos



Pruebas de laboratorio para el estudio del ADN

Enzimas de restricción.

- **Producidas por las bacterias. Tienen la propiedad de degradar o destruir todo ADN extraño que penetre en ellas. Este mecanismo se conoce como RESTRICCIÓN**



Pruebas de laboratorio para el estudio del ADN

Vector

Se emplean (virus, cromosomas artificiales de levadura o plásmidos) para introducir un segmento de ADN en el ADN de otra célula o una bacteria.

Propiedades

- **Que se REPLIQUE**
- **Que se pueda DETECTAR**
- **Que se pueda INTRODUCIR en una célula**



Pruebas de laboratorio para el estudio del ADN

Sondas de ácidos nucleicos

Hebra de ADN marcada con sustancias fluorescentes o radiactivas que se hibridiza con la hebra complementaria del fragmento de ADN objeto de estudio.



Hibridación con sondas o Southern blot

etapas:

- **Digestión** del ADN con enzimas de restricción tras conseguir extraer un ADN de alta pureza.
- Separación de los fragmentos obtenidos por medio de una **electroforesis** en gel de agarosa.
- **Desnaturalización** de los fragmentos separados y cortados.
- **Transferencia** de las cadenas simples a una membrana de nitrocelulosa o nylon y fijación de las mismas por medio de calor (80°C).



- **Prehibridación** con sondas de ADN inespecífico para bloquear los lugares de unión inespecíficos que pudiera haber en la membrana.
- **Marcaje de la sonda** con nucleótidos radioactivos (P^{32} normalmente).
- **Hibridación** de la sonda marcada y desnaturalizada con los fragmentos de ADN fijados a la membrana, y lavado de la membrana para eliminar el exceso de sonda o aquellas que hayan hibridado mal.
- **Revelado** en placa radiográfica e **interpretación** de los resultados.



Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica fue ideada en 1989 por Kary B. Mullis que obtuvo el premio Nobel de Química en 1993 por dicho invento.

Permite amplificar más de un millón de veces un ADN obtenido a partir de una región seleccionada del genoma, siempre y cuando se conozca su secuencia de nucleótidos.

El uso de la PCR permite amplificar muestras tan mínimas como pueden ser células de la ***raíz del pelo, una minúscula mancha de sangre o semen e incluso caspa*** son suficientes en muchos casos para llevar a cabo un análisis de identificación genética.

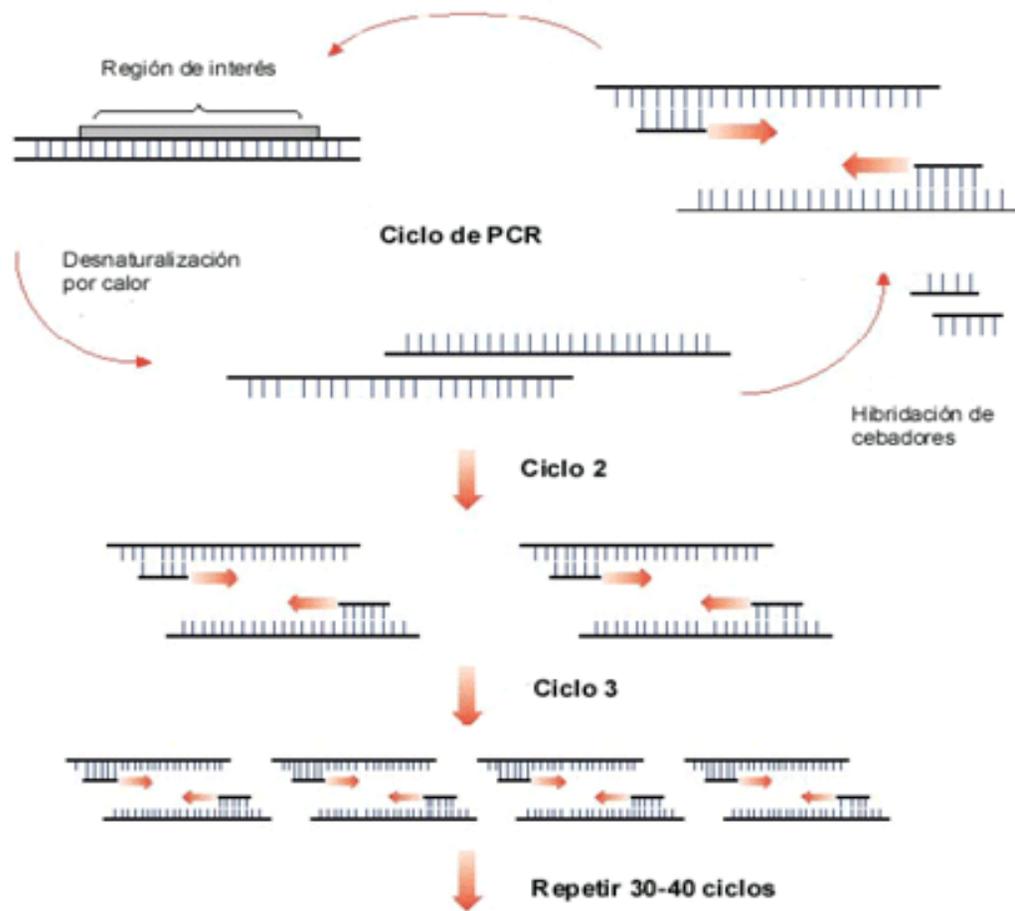


Fases o pasos de la reacción en cadena de la polimerasa

1. **Desnaturalización:** Se produce la separación de las dos cadenas de ADN a temperaturas entre 90 y 95 °C
2. **Hibridación:** Se disminuye la temperatura entre 40 y 60 °C para producir la unión de los primers a las secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar.
3. **Extensión:** La Taq polimerasa incorpora nucleótidos en el extremo 3' del primer utilizando como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada. La Taq polimerasa alcanza su máxima actividad a los 72°C.



Descripción de la reacción en cadena de la polimerasa

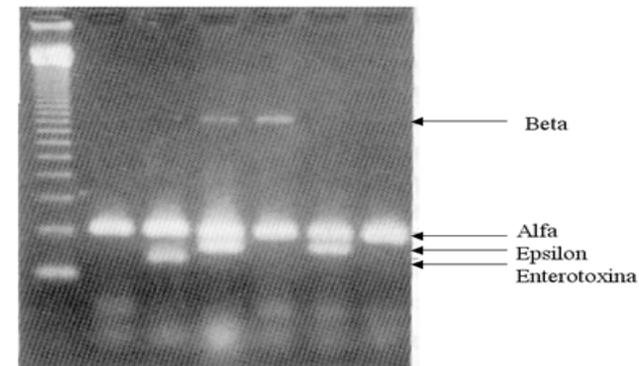




Lectura de los resultados de la PCR

La forma más habitual conlleva

- Separación electroforética de los fragmentos amplificados en un gel de agarosa
- Tinción con bromuro de etidio (u otro colorante fluorescente o radioactivo)
- Observación final en transiluminador con luz ultravioleta





Ventajas de la PCR

- Permite amplificar muestras **mínimas o en casos** en los que el ADN esté parcialmente **degradado**.
- Permite obtener en poco tiempo un **elevado número de copias** de la secuencia de ADN que es objeto de estudio.
- Permite la determinación y agrupación alélica en **clases discretas**, lo que facilita la elaboración de bases de datos al ser la estandarización inmediata y posibilitar la aplicación de métodos bioestadísticos y programas elaborados.



Usos de la PCR

- * **Individualización genotípica para alelos seleccionados.**
- * **Test de Paternidad**
- * **Diagnóstico de enfermedades hereditarias**
- * **Clonación de genes**
- * **Mutagénesis**
- * **Análisis de ADN fósil**
- * **Genotipo de mutaciones específicas**



Diagnóstico prenatal molecular en Cuba

1. Fibrosis Quística (HAR)
2. Sicklemia (HAR)
3. Acondroplasia (HAD)
4. Distrofia Muscular Duchenne (HRLX)
5. Corea de Huntington (HAD)
6. Ataxia Espinocerebelosa de Holguin (HAD)
7. Distrofia Miotónica (HAD)
8. Atrofia óptica de Leber (HM) Sancti Spiritus
9. Hemofilia (HRLX)
10. Atrofia Espinal Wernig- Hoffman (HAR)
11. Frágil X (HLX)
12. Fenilcetonuria (HAR)