



Universidad de Concepción
Facultad Farmacia

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CARIOGRAMA
EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA CLÍNICA DEL
HOSPITAL GUILLERMO GRANT BENAVENTE.**

POR ELENA ESTEFANÍA ROJAS ROA

Trabajo de Investigación de Internado en Sector Salud presentado(a) en la
Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción para optar al título
profesional de Bioquímico

Profesional guía

BQ Diego Guerrero
Sección/Laboratorio de Genética
Hospital Guillermo Grant Benavente.

Profesor patrocinante

Dr. Enrique Guzmán
Departamento de Bioquímica
clínica e inmunología
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Abril, 2022

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

INDICE

RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
Hacia la citogenética humana.....	7
Realidad regional y la necesidad de un laboratorio de citogenética en el Hospital Regional de Concepción.....	10
La técnica del cariotipo.....	16
La cosecha.....	21
El bandeo de cromosomas y sus tinciones.....	24
PROBLEMA.....	28
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	28
OBJETIVO GENERAL.....	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
METODOLOGÍA.....	30
Tipo de estudio.....	30
1. Cultivo de células mononucleares.....	31
1.1 Cultivo corriente.....	32
1.2 Cultivo sincronizado.....	33
2. Cosecha.....	34
3. Preparación de láminas.....	36
4. Bandas G (GBG).....	37
5. Tinción de Bandas C (CBG).....	38
6. Evaluación de láminas.....	40
7. Estrategia experimental.....	41
RESULTADOS.....	43
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIÓN.....	57

PROYECCIONES.....	58
BIBLIOGRAFÍA.....	59

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Niveles apropiados de resolución de bandas de acuerdo al objetivo de estudio clínico según la publicación “Directrices generales y garantía de la calidad para la citogenética”	17
Tabla 2. Variables que serán testeadas en la matriz de protocolos	42

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cariotipo humano femenino normal.	9
Figura 2. Esquema de matriz de protocolos y sus diferentes variables a aplicar.....	42
Figura 3. Fotografías de metafases resultantes de la matriz de protocolos.....	44
Figura 4. Graficas comparativas agrupadas de acuerdo al tiempo de exposición a Colcemid.....	46
Figura 5. Gráfica comparativa del promedio de metafases observadas en láminas obtenidas del cultivo corriente y sincronizado de células mononucleares en sangre periférica completa.....	47
Figura 6. Fotografías de metafases obtenidas de cultivo corriente vs sincronizado.	48
Figura 7. Fotografías de metafases sometidas a protocolos de tinción de Bandas C.....	50

RESUMEN

En Chile, debido a distintos factores involucrados en el desarrollo de anomalías genéticas, se ha dado la necesidad de implementar exámenes de apoyo diagnóstico asequibles a la población, lo que compete a establecer un laboratorio de citogenética en el Hospital Guillermo Grant Benavente (HGGB). La técnica del cariotipo depende tanto de variables físicas y químicas, como humanas. Por ello, fue necesario establecer las condiciones de tiempo y concentración de Colcemid, KCl, y metotrexato, y luego determinar un protocolo para bandas C. El procedimiento consistió de realizar una matriz de protocolos para obtener la combinación de variables con el mejor resultado de metafases observables en el microscopio. Se comparó el número de metafases obtenidas en métodos de cultivo con y sin metotrexato; y se probaron dos protocolos diferentes entre sí, para la obtención de bandas C. El protocolo establecido para el apoyo diagnóstico clínico del laboratorio de citogenética del HGGB, consta de dos métodos de cultivo acorde a la situación que lo amerite, un proceso de cosecha de 15 minutos de exposición a Colcemid, tratamiento hipotónico de 15 minutos de KCl 75mM, y fijación con reactivo de Carnoy. La obtención de bandas C requerirá de un tratamiento ácido, alcalino y salino respectivamente, en temperaturas de 60°C en baños termorregulados y lavados intermedios a temperatura ambiente.

INTRODUCCIÓN

Hacia la citogenética humana

No ha pasado más de un siglo desde los primeros descubrimientos y publicaciones que marcaron el rumbo de la citogenética a su aplicación en el estudio genético humano. Por el año 1921, Painter sugiere un número par de 48 cromosomas al estudiar y comprobar la presencia del cromosoma Y en preparaciones obtenidas a partir de testículo (Painter, 1921). Luego, este antecedente fue corregido por Tjio y Levan estableciendo el cariotipo humano con 46 cromosomas totales en 1956. Esto inicia la era de la citogenética humana, acercando estos análisis cada vez más a su aplicación clínica, al determinar en el mismo año que el cariotipo humano se conformaba por 44 cromosomas somáticos y 2 cromosomas sexuales, X e Y, presentados en pares, donde XX correspondía a la mujer y XY al hombre (Liehr, 2019; Tamar et al., 2008).

Los citogenetistas hacia 1960 concordaron en criterios de clasificación de los cromosomas según sus similitudes en tamaño y forma que, tras la introducción de los métodos de bandeo, se ordenaron de acuerdo a lo sugerido por Patau como se presenta en la Figura 1, añadiendo las primeras nomenclaturas utilizadas (Conference, 1971; Hamerton, 1967; NIJENHIUS, 1964).

Al conocerse el cariotipo normal del ser humano masculino y femenino, denota la existencia también de un cariotipo anormal que pudiese estar relacionado a enfermedades genéticas, dándole a la citogenética humana un papel dentro de la medicina. Esto es confirmado finalmente por Jerome Lejeune, un médico de la clínica *Des Maladies Infantiles* del Hospital *Necker-Enfants Malades* de París, a quien llamó la atención las uniformes características fenotípicas de los niños con síndrome de Down, estableciendo el origen cromosómico de este síndrome. La determinación del origen de enfermedades por aberraciones cromosómicas como el síndrome de Turner, síndrome de Klinefelter, etc, en conjunto con los avances técnicos de Nowell y Moorehead, hicieron posible la visualización de cromosomas a partir de métodos no invasivos de la toma de muestra, permitiendo el desarrollo de esta ciencia como Citogenética clínica (Liehr, 2019; Tamar et al., 2008).

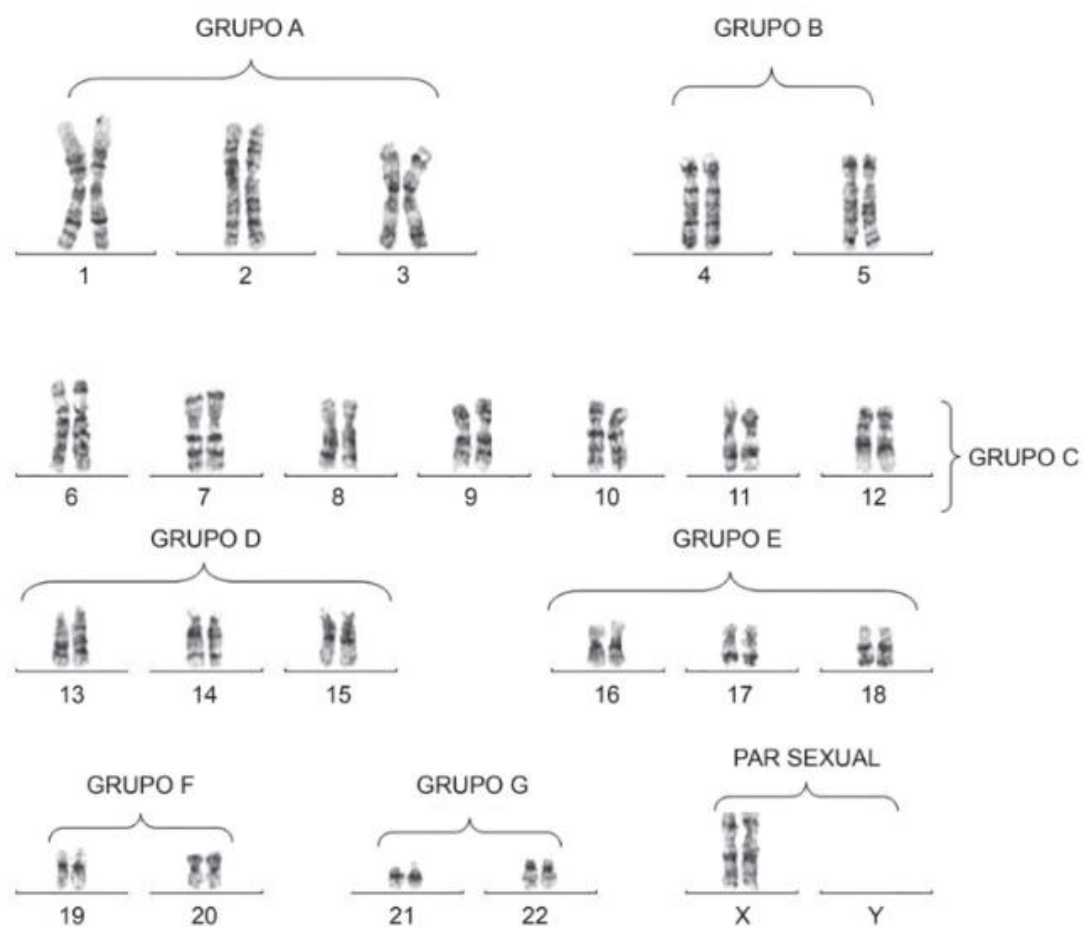


Figura 1. Cariotipo humano femenino normal. (Caparros et al., 2016)

Realidad regional y la necesidad de un laboratorio de citogenética en el Hospital Regional de Concepción

Las anomalías congénitas, también denominadas defectos de nacimiento, trastornos congénitos o malformaciones congénitas, son definidas por la OMS (Organización Mundial de la Salud) como “anomalías estructurales o funcionales, como los trastornos metabólicos, que ocurren durante la vida intrauterina y se detectan durante el embarazo, en el parto o en un momento posterior de la vida”. Sus causas o factores de riesgo conocidos se desenvuelven en diferentes áreas, como factores socioeconómicos y demográficos, factores genéticos, infecciones maternas, estado nutricional de la madre, y factores ambientales principalmente en exposición a productos químicos, fármacos y otras drogas como el tabaco, alcohol, etc (Organización Mundial de la salud, 2020). La situación en Chile en las últimas dos décadas ha llevado a una mejora dentro de Latinoamérica según los estudios de la ECLAMC (Estudio Colaborativo Latino Americano de Malformaciones Congénitas). Así, Chile es uno de los países con menor tasa de mortinatos, en parte debido a las políticas de mejora nutricional como la adición de ácido fólico a las harinas, la sal yodada, etc, en paralelo al monitoreo regular del embarazo dentro de la salud pública a nivel nacional. Sin embargo, por factores demográficos y socioeconómicos, la edad materna de las mujeres que cursan con embarazo en Chile se ha ido desplazando debido a la postergación de la maternidad por razones profesionales, siendo Chile ya en el 2005 el país con mayor porcentaje de mujeres que han sido madres a 35 o más años de edad.

Esto ha tenido como consecuencia una de las mayores tasas de población con síndrome de Down en Latinoamérica (Julio Nazer & Lucía Cifuentes, 2011).

Dentro de las anomalías congénitas se encuentran también las aneuploidías letales. Con la promulgación de la Ley N° 21.030 el año 2017, se despenaliza la interrupción voluntaria del embarazo (IVE) a tres causales definidas en el artículo 119 de la ley. La segunda causal se describe como “cuando el embrión o feto padezca una patología congénita adquirida o genética, incompatible con la vida extrauterina independiente, en todo caso de carácter letal” (Ministerio de Salud, 2017). De este modo, esta ley contempla como aneuploidías letales las trisomías 9, 13 y 18. Por ello, es necesario contar con herramientas de previsión para la consejería genética adecuada a futuros padres, así como de confirmación diagnóstica temprana para la aplicación de esta ley (Lagos L. & Poggi M., 2010; Pardo et al., 2020).

De este modo, la implementación tanto de la técnica de cariotipo como de un laboratorio de citogenética obedece a la necesidad del Hospital Guillermo Grantt Benavente (HGGB), al ser éste un centro de referencia del IVE. Además, estas implementaciones permitirían otorgar mayor accesibilidad a pacientes con motivos diagnósticos diferentes, debido a la diferencia en el precio del examen comparado a derivarlo a prestaciones extrasistema donde supera aproximadamente 14 veces su costo. Por ello, en primera instancia se

establecerá el protocolo a usar en el análisis de cariograma de sangre periférica, proyectando implementar la técnica en líquido amniótico y otros tejidos.

Para el análisis de cromosomas en laboratorio clínico de citogenética debe haber no solo protocolos estandarizados sobre la técnica, sino también protocolos escritos que establezcan los criterios de análisis donde se incluyan los criterios de aceptación o rechazo de la muestra, así como el descartar células rotas o incompletas en el análisis. El análisis de las metafases debe realizarse con la comparación de cada set homólogo de cromosomas incluyendo los cromosomas sexuales, banda por banda (Hastings et al., 2012).

El análisis citogenético debe ser considerado cuando existe la sospecha médica de que una anomalía citogenética sea la causa subyacente a la condición o desorden por el que esté pasando el paciente. Y los principales indicadores clínicos en la sospecha diagnóstica postnatal son:

- Fenotipo anormal
- Múltiples anormalidades congénitas
- Crecimiento anormal clínicamente significativo – baja estatura, crecimiento excesivo, microcefalia, macrocefalia.

- Amenorrea primaria o secundaria, o insuficiencia ovárica
- Genitalia ambigua
- Infertilidad de etiología desconocida
- Malformación fetal o aborto espontáneo de etiología desconocida
- Historial familiar significativo de discapacidad intelectual de posible origen cromosómico

Todo análisis debe ser llevado a cabo por el profesional calificado y entrenado en Laboratorio Genético Clínico. Para su validación debe ser revisado por un segundo profesional, el cual suele ser el encargado de la sección de laboratorio, aunque también es recomendable realizar un chequeo independiente “ciego” para evitar errores. Existen guías sobre el número de metafases que deben ser analizadas de acuerdo al tipo de tejido en estudio, siendo generalmente un mínimo de 2 células analizadas completamente. Sin embargo, ante la sospecha o indicación clínica de mosaicismo, se debe extender el análisis de metafases o realizar un conteo celular, esto siendo determinado por el laboratorio de acuerdo al protocolo de rutina. De este modo, los reportes internos deben incluir el número de células analizadas y contadas, con detalles relevantes encontrados (Silva et al., 2019).

El sistema de control de calidad para cada laboratorio de citogenética debiese cumplir con los estándares nacionales e internacionales. Sin embargo, en Chile hasta la fecha no se cuenta con una entidad que determine los estándares nacionales para la práctica del análisis citogenético. Por tanto, solo podemos considerar criterios internacionales y mantener un control de calidad interno activo.

El control de calidad interno consta principalmente en mantener un registro constante y controlado tanto de reactivos en uso, como de instrumentos y aparatos utilizados, incluyendo monitoreo de temperaturas en refrigeración, estufas e incubadoras. Al recibir un nuevo lote de reactivos, estos deben ser testeados antes de utilizarlos para prácticas clínicas. En el caso de reportes, el cariotipo debe ser realizado utilizando el Bandeo G, al ser la técnica más confiable, además de otorgar niveles máximos de resolución de bandas. El análisis completo debe ser logrado a satisfacción del supervisor, en que anomalías numéricas y estructurales han sido excluidas en un mínimo nivel apropiado de resolución según la tabla 1. En caso de que no sea posible llegar al mínimo de resolución de bandas G y no se haya detectado anomalía, el reporte puede ser aceptado con las observaciones correspondientes. Dentro del registro de calidad interna debe existir también el “ratio de éxito”, registrando aquellas muestras recibidas con la calidad adecuada que dieron cultivos y cariotipos

satisfactorios. Este ratio es considerado anualmente y cada laboratorio debe conservar estos registros para cada tipo de tejido incluido en el servicio de diagnóstico. Para el caso de sangre periférica postnatal, el ratio de éxito mínimo es del 98% (Hastings et al., 2012).

El control de calidad externo opera sobre el principio de las normas profesionales aceptadas y tiene 3 ejes de importancia: diagnóstico clínico, interpretación de los resultados y asesoramiento genético adecuado. Dentro de ellos, dos están sujetos al conocimiento y preparación de los profesionales participantes y al diagnóstico clínico correspondiente a la calidad del análisis entregado y reporte escrito de acuerdo al ISCN (*International System for Human Cytogenomic Nomenclature*)(Kramer, 2019).

La técnica del cariotipo

Para poder identificar estas aberraciones genéticas es necesario recurrir a técnicas citogenéticas que son aplicables como herramienta de apoyo al diagnóstico clínico de estos pacientes y que, en primera instancia, son útiles a la identificación de aneuploidías así como de anomalías estructurales observables a la resolución de estas técnicas convencionales (ver Tabla 1) (Torres, 2018). El proceso general para la obtención de un cariotipo en un laboratorio de citogenética consta principalmente de la cosecha, preparación de láminas, tinción, análisis de los cromosomas y reporte del caso.

Su aplicación en laboratorio clínico para el apoyo diagnóstico de enfermedades abarca desde la planificación familiar, estudios prenatales y estudios postnatales, en los cuales se buscan aberraciones genéticas constitutivas y adquiridas. En esta última se incluye el área oncológica, donde el examen citogenético puede ayudar tanto en diagnóstico, tratamiento y pronóstico de pacientes cuyo origen del cáncer sea especialmente hematológico y linfoproliferativo (Hastings et al., 2013).

Tabla 1. Niveles apropiados de resolución de bandas de acuerdo al objetivo de estudio clínico según la publicación “Directrices generales y garantía de la calidad para la citogenética” (Hastings et al., 2012)

Razón para referir a examen (anomalía constitucional)	Calidad de bandeo G mínimo (QAS)
Confirmación de aneuploidía, por ejemplo, en muestra directa de linfocitos, muestra directa de vellosidad coriónica, o cultivo preparado de tejido sólido.	QAS 2 $\Leftrightarrow$ <300 <i>bphs</i>
Exclusión de grandes reordenamientos estructurales conocidos, por ejemplo, linfocitos, tejido sólido, preparaciones directas de muestras de vellosidad coriónica o preparación de células de líquido amniótico.	QAS 3 $\Leftrightarrow$ 300 <i>bphs</i>
Identificación y exclusión de pequeños reordenamientos estructurales esperados, por ejemplo, linfocitos, tejido sólido, cultivo de muestreo de vellosidad coriónica o preparación de líquido amniótico. Muestreo de fluido amniótico de rutina y preparaciones de cultivo de vellosidad coriónica.	QAS 4 $\Leftrightarrow$ 400 <i>bphs</i>
Razones postnatales para referir (por ejemplo, discapacidad intelectual, defectos de nacimiento, dismorfia en niños o parejas con pérdida de embarazo frecuente)	QAS 6 $\Leftrightarrow$ 550 <i>bphs</i> *

Síndromes de microdeleciones (cuando no se encuentra disponible la técnica de hibridación in situ fluorescente o FISH)	QAS 7 $\Leftrightarrow$ 700 <i>bphs</i> *
--	---

**arrayCGH/microarrays* u otra técnica molecular puede ser más adecuado aplicar a algunas de estas categorías de referencia. Para referencias adquiridas no hay un mínimo de calidad de bandeo, ya que estas pueden ser menores en células neoplásicas comparado a células normales. *bphs* = *bands per haploid set*; bandas por set haploide. Para categorías QAS referir al apéndice 3 de “Recomendaciones generales de informes de laboratorio genético” (Cresswell et al., 2020)

Generalmente para el estudio de aberraciones constitucionales de cromosomas, se utiliza el cultivo de linfocitos desde una muestra de sangre periférica, debido a que usualmente resulta en la obtención de cromosomas más largos y mejor bandeados. Se debe tener en consideración que al estudiar casos donde puedan presentar mosaico, al estudiar solo sangre periférica pueden perderse los diferentes linajes celulares que podrían estar afectados, esto debido a que durante el desarrollo fetal la sangre proviene de las células germinales de la capa media o mesoderma, por lo que se pasaría por alto aquellas células provenientes del ectoderma y/o endoderma. El proceso de cultivo se debe realizar bajo estrictas medidas de asepsia, debido a que la presencia de microorganismos puede llevar a la pérdida del cultivo. Los linfocitos de sangre periférica no se dividen en adultos sanos y normales, por lo que deben ser estimulados a dividirse mediante la exposición a mitógenos como es la fitohemaglutinina. En respuesta

a este químico, las células T maduras se desdiferencian a células T linfoblásticas capaces de sintetizar ADN en preparación de someterse al proceso de mitosis. Del mismo modo, el sistema de incubación variará de acuerdo al tipo celular que se desea cultivar pudiendo ser un sistema abierto, el cual permite el intercambio de gases con la atmosfera que rodea al cultivo, facilitando la eliminación al ambiente de productos gaseosos del metabolismo celular que pueden resultar tóxicos para ellas, o puede ser un sistema cerrado, el cual no permite el intercambio de gases con la atmosfera, pero tiene menor probabilidad de contaminar los cultivos con microorganismos. El control del pH es otro factor importante en un cultivo celular, y es indicado mediante un buffer de bicarbonato en el medio de cultivo. Este puede ser controlado acorde al sistema de incubación en uso: en un sistema cerrado se puede permitir que el CO₂ y otros metabolitos del cultivo celular ajusten el pH del medio, o bombear gas directamente al frasco o tubo de cultivo con la mezcla de gas deseada y cerrar fuertemente el recipiente para prevenir el intercambio de gases con su exterior; en un sistema abierto lo óptimo es proveer un flujo constante del gas deseado de manera controlada, desde un tanque de gas conectado al incubador. También existen medios de cultivo con sistemas de buffer diferentes del CO₂-bicarbonato para mantener el equilibrio de pH, tal como el buffer HEPES. Para el cultivo de linfocitos, es ideal mantener un pH dentro del rango 7.0-7.4 y con una inyección constante de 5% de CO₂, donde el mayor factor en el tiempo de cultivo será la temperatura del incubador.

Al ser cultivos de células provenientes de tejido humano, la temperatura óptima de crecimiento corresponde a la temperatura fisiológica del cuerpo humano, que fluctúa de 37 a 37,5°C. En el caso de superar esta temperatura, resultaría en el decaimiento rápido de la curva de crecimiento del cultivo celular. Para el cultivo de linfocitos el *peak* de actividad mitótica es alcanzado alrededor de las 68-70 horas de cultivo y es el tiempo considerado como punto óptimo de cosecha para estudios de cromosomas. Aunque los cultivos de 72 horas son bastante satisfactorios, un cultivo de 96 horas puede producir un número más elevado de figuras mitóticas llegando a 3 o más divisiones por célula mononuclear. Sin embargo, luego de una tercera división, se va perdiendo la integridad de los cromosomas obtenidos ("The AGT Cytogenetics Laboratory Manual," 2017).

Algunos cultivos requieren de la adición de otros químicos dentro del periodo de incubación. Para la obtención de cultivos sincronizados para estudios de metafases y prometafases, se requiere de una sustancia de bloqueo de la fase S del ciclo celular como el metotrexato y una sustancia que lo libere de este estado como es la timidina ("The AGT Cytogenetics Laboratory Manual," 2017; Weinstein et al., 1971).

La cosecha

Una vez que las células hayan aumentado lo suficiente, deben ser procesadas para obtener las metafases de estudio. El proceso de cosecha en general consta de 3 etapas: el arresto mitótico, realizado usualmente con Colcemid; el tratamiento hipotónico, que usualmente utiliza una solución de KCl, citrato de sodio, o una combinación de ambas; y la fijación, usando normalmente una preparación de 3:1 metanol-ácido acético.

El arresto mitótico consta de inducir la detención de las células en la fase mitótica requerida para el análisis citogenético convencional, que es la metafase. El efecto que tiene Colcemid es que previene la formación de la fibra del huso mitótico. No obstante, puede producir efectos no deseados como aumentar la condensación de los cromosomas cuando éstos se ven expuestos por mayor tiempo del necesario, así como a mayores concentraciones de este compuesto químico. Debido a que el objetivo en laboratorio es obtener cromosomas desde mediana a gran longitud con la finalidad de incrementar la posibilidad de detectar pequeñas reestructuraciones de cromosomas, se busca mantener siempre la menor dosis posible de Colcemid y un tiempo de exposición al mínimo. En algunos protocolos se utiliza un agente intercalante como el bromuro de etidio para mitigar el efecto de condensación de Colcemid. Debido a que también se conoce que a mayor dosis de Colcemid también aumenta dramáticamente el

índice mitótico, endereza los cromosomas, define mejor los bordes de las cromátidas y mejora la separación de los cromosomas al liberarse del huso mitótico. En la cosecha de cultivos de células mononucleares de sangre completa se recomienda un máximo de exposición a Colcemid de 30 minutos. ("The AGT Cytogenetics Laboratory Manual," 2017).

El tratamiento hipotónico cumple la función de aumentar el volumen celular mediante la propiedad semipermeable de la membrana celular. Si la concentración de la solución fuera de la célula es menor a la concentración dentro de la célula, ésta absorberá agua y se hinchará aumentando su volumen por osmosis, siendo este el paso más importante en la cosecha de cultivo de sangre completa, puesto que la primera exposición a la solución hipotónica lisará la gran mayoría de eritrocitos. Antes de utilizar la solución hipotónica, es recomendable calentarla a 37°C para aumentar la eficacia del proceso al acelerar el transporte de agua a través de la membrana celular, además de la posibilidad de otorgar elasticidad a la membrana citoplasmática, mejorando su resistencia a la centrifugación y evitando la dispersión explosiva de cromosomas al momento de preparar las láminas. La elección del tipo de sal utilizada en la solución hipotónica puede también afectar las dimensiones de los cromosomas resultantes. Por ejemplo, el citrato de sodio con frecuencia obtiene cromátidas más anchas que con cloruro de potasio. Se debe tener cuidado con el tiempo de exposición y

volumen utilizado debido a que algunos tipos celulares son sensibles a estos cambios y pueden dañarse fácilmente si son tratadas en exceso. Sin embargo, para el caso de células mononucleares, se recomienda un tiempo de exposición entre 10 a 30 minutos ("The AGT Cytogenetics Laboratory Manual," 2017).

La fijación es un proceso delicado, que tiene la finalidad de fortalecer y preservar las células, matándolas por remoción del agua. Esto endurece las membranas y la cromatina, preparándolas para el tratamiento de tinción de bandas. Para evitar el cambio brusco de ambiente para las células, se recomienda realizar una prefijación, la cual consiste en agregar un cierto volumen de fijador al recipiente con las células en solución hipotónica; lo delicado de este proceso es debido a que, si la solución fijadora se agrega rápidamente, creará turbulencia dentro del tubo con lo que las metafases pueden perderse por ruptura prematura de las células. Sin embargo, debe ser mezclada gentil y apropiadamente para evitar la aglutinación irreversible de las células. Tras la primera fijación, las células se endurecen por lo que las subsecuentes fijaciones pueden ser añadidas sin mayor cuidado. El uso de fijador frío ayuda a mejorar la morfología de los cromosomas; y si su composición consta de metanol-ácido acético, éste debe ser preparado al momento debido a que eventualmente la reacción química entre ambos compuestos producirá acetatos que alterarán la solución fijadora. Una ventaja adicional a la fijación es la eliminación de eritrocitos, dejando únicamente los

linfocitos de estudio, con excepción de células rojas nucleadas (“The AGT Cytogenetics Laboratory Manual,” 2017).

Una vez que la cosecha se ha completado, se realiza la producción de láminas para la observación de los cromosomas al microscopio, dejando caer una gota del preparado final sobre láminas de vidrio a cierta altura y secándola, utilizando condiciones de temperatura y humedad que permitan la óptima distribución y morfología de los cromosomas. Pese a que este proceso parece simple, su resultado depende también de una serie de factores mecánicos, químicos y físicos tales como: el ángulo de la lámina y la altura desde la cual se deja caer la gota de preparado, la temperatura y humedad del ambiente, la proporción utilizada de fijador así como su calidad y frescor, el volumen de dilución del preparado final y el periodo de tiempo de exposición a las condiciones ambientales (“The AGT Cytogenetics Laboratory Manual,” 2017).

El bandeo de cromosomas y sus tinciones

Finalmente, el proceso de tinción dependerá del tipo de material genético que se desea diferenciar debido a que estas técnicas permitirán distinguir diferentes regiones de los cromosomas de acuerdo a su estructura y composición química. Las bandas G, denominadas así debido a que utiliza como tinción el colorante Giemsa, es la tinción básica utilizada en la obtención del cariotipo para la

identificación de los cromosomas por patrón de bandas que refleja el patrón cromomérico de los cromosomas meióticos. Las bandas oscuras obtenidas se caracterizan por tener una composición de pares de bases relativamente ricas en adenina y timina que correspondería a la heterocromatina: zonas del ADN que se encuentran generalmente silenciada, se replican tardíamente durante el período de síntesis y se condensa tempranamente durante la mitosis (Drets, 2002; Grunstein, 1997).

Para realizar el bandeo G por la técnica GTG (bandas G utilizando tripsina y tinción Giemsa) se necesitan células fijadas en la solución ácido acético/metanol descrito en el proceso de fijación anterior, bien distribuidas sobre la superficie de una lámina de vidrio portaobjeto. Estas láminas deben ser secadas y, aunque es suficiente hacerlo a temperatura ambiente durante 2 a 4 días, también es posible deshidratarlas en estufa a baja temperatura, alrededor de 60°C por 2 a 18 horas, o a altas temperaturas de alrededor de 90 a 95°C por un tiempo mucho menor, de 20 a 60 minutos. A este proceso también se le conoce como “envejecimiento” o “añejado”, y de éste dependerá la respuesta de los cromosomas al tratamiento con tripsina. El tratamiento con proteasas como la tripsina reacomoda la cromatina de modo tal que este se puede teñir diferenciadamente formando las bandas G. El tiempo de exposición a la tripsina es un paso crítico para la calidad del bandeo que, además de depender del paso anterior, también dependerá de

la concentración y actividad de la enzima. Por ello se recomienda que el primer bandeo de cada paciente/tipo celular deba ser de prueba, para ajustar el tiempo de exposición a la tripsina aumentando con una variación de 2 a 5 segundos. Luego, la enzima debe ser lavada para aplicar la tinción con el colorante Giemsa. Este proceso también debe ser de acuerdo a ajuste, puesto que la tinción debe ser fresca y su tiempo de exposición puede ir variando en aumento dependiendo de la efectividad de la tinción ("The AGT Cytogenetics Laboratory Manual," 2017).

Las bandas C reciben este nombre debido a que permite la diferenciación de la heterocromatina constitutiva de los cromosomas. Esto permite la detección de polimorfismos de los segmentos heterocromáticos en cromosomas humanos (Gill & Kimber, 1974). Esta técnica tiñe específicamente los segmentos heterocromáticos localizados en las regiones pericentroméricas de la mayoría de cromosomas y en dos tercios distales del cromosoma sexual Y. Las bandas C se componen de secuencias de ADN satélite altamente repetido que casi carecen completamente de actividad génica, siendo estas regiones aquellas replicadas al final de la fase S del ciclo celular (Drets, 2002).

Para esta técnica conocida como CBG (bandas C en hidróxido de bario y colorante Giemsa), al igual que en GTG se requiere de láminas añejadas, con metafases bien dispersas y con poco o nada de residuos de citoplasma. Estas

láminas son tratadas con hidróxido de bario y calor, que actúan denaturando el ADN de los cromosomas. El tiempo de incubación dependerá de la temperatura: cuando se usa $\text{Ba}(\text{OH})_2$ una temperatura adecuada pueden ser 50°C , puesto que 60°C puede ser difícil de controlar y a 37°C el tiempo necesario será demasiado largo para ser conveniente. El siguiente paso es la incubación en solución salina-sodio citrato (2xSSC), parte crucial en la obtención de las bandas C. Normalmente se lleva a cabo a $60\text{-}65^\circ\text{C}$ durante una hora, sin embargo, si tras la tinción las bandas no aparecen, se debe regresar al paso de incubación por al menos 15 minutos adicionales para luego volver a teñir con colorante Giemsa (“The AGT Cytogenetics Laboratory Manual,” 2017).

PROBLEMA

En la actualidad el aumento de enfermedades con causa genética ha provocado una mayor demanda de exámenes citogenéticos y asesoría genética para pacientes y médicos. Debido a que no todos los laboratorios de citogenética trabajan bajo las mismas condiciones, éstos deben adaptar sus protocolos de obtención de cariotipos por lo que cuentan con sutiles diferencias, haciendo necesario el estudio de estas variables al querer estandarizar e implementar esta técnica.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Se podrá estandarizar un protocolo de cultivo y obtención de células mononucleares y tinción en Bando C de los cromosomas en metafase y prometafase en el laboratorio de citogenética del Hospital Guillermo Grantt Benavente?

OBJETIVO GENERAL

Estandarizar un protocolo de cultivo y obtención de células mononucleares y tinción en Bando C de los cromosomas en metafase y prometafase en el laboratorio de citogenética del Hospital Guillermo Grantt Benavente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer las condiciones tiempo y concentración de Colcemid, KCl, y metotrexato para la obtención de un alto número de células mononucleares en metafase y prometafase.
2. Determinar el protocolo para la tinción en Bando C de las células mononucleares en metafase y prometafase.

METODOLOGÍA

Tipo de estudio

El estudio experimental fue llevado a cabo en muestras de sangre periférica de 5mL tomadas en vacutainer de tapa verde heparinizado. Fueron extraídas de 4 personas voluntarias presuntamente sanas del laboratorio con un recuento celular normal de linfocitos.

El tamaño muestral para este estudio con un margen de error del 2% en muestras de sangre periférica postnatal es de mínimo 4 (Hastings et al., 2012). Esto debido que al ser un estudio con resultados de carácter cualitativo, el análisis se llevará a cabo por muestreo por conveniencia.

Finalmente utilizando la siguiente fórmula para una población finita de participantes:

$$n = \frac{NZ^2pq}{d^2(N-1) + Z^2pq}$$

Donde $Z = 2.24$ para una confianza del 98%

$d = 0.02$

p, q como valores estándar del 50%

(Aguilar, 2005; Izcara Palacios, 2019)

1. Cultivo de células mononucleares

Se probaron dos métodos de cultivo diferentes evaluando sus beneficios para el apoyo al diagnóstico clínico. Estos corresponden a: el cultivo corriente y cultivo sincronizado.

Antes de comenzar, se preparó el material necesario de la siguiente forma:

El medio de cultivo completo (Karyotyping Medium, PB-MAX, Gibco) debe mantenerse a -20°C y resiste hasta 3 ciclos de congelación-descongelación. Por ello, se hizo conveniente alicuotarlo para luego descongelar solo lo necesario. Para alicuotar el medio de cultivo, se debe trabajar en medio estéril (dentro de cámara de flujo laminar) y, utilizando micropipeta, tomar volúmenes de 5mL y depositarlos en tubos falcon de 15 mL. Los tubos se almacenan protegidos de la luz y la temperatura dependerá del tiempo en que será utilizada. Para uso inmediato se almacenó a 4°C y para utilizar en futuros cultivos, se mantuvieron congelados a -20°C . Cuando se requirió utilizar las alícuotas congeladas, se descongelaron a una temperatura de 4°C durante al menos 48 horas previas a su uso.

Para realizar la siembra de las muestras fue necesario desinfectar con etanol al 70% las superficies de la cámara de trabajo para luego activar la luz UV por al menos 15 minutos.

Considerar que cada prueba se realizó por triplicado para asegurar la concordancia en los resultados.

1.1 Cultivo corriente

Se rotularon los tubos con la alícuota de medio de cultivo previamente descongelados de acuerdo a la muestra a utilizar y la prueba correspondiente (ej. C1-a, C1-b, C1-c; cultivo corriente, muestra, prueba). En la cámara de bioseguridad, la muestra de sangre completa fue homogenizada cuidadosamente. Luego, a cada tubo se añadieron 500 µL evitando la formación de burbujas. Tras cerrar la tapa de los tubos, se invierte cada tubo delicadamente para la homogenización de las alícuotas de muestra y medio de cultivo.

Los tubos fueron incubados en estufa a 37°C y 5% de CO₂ durante 72 horas, preocupándose de homogenizar los tubos al menos una vez diariamente. 24 horas antes de realizar la cosecha, se debe agregar en cada tubo un volumen de

50 μL de Timidina (10^{-1} M). Similares protocolos se pueden encontrar en (Howe et al., 2014; “The AGT Cytogenetics Laboratory Manual,” 2017)

1.2 Cultivo sincronizado

Consta de la sincronización de la división celular debido al bloqueo en fase S provocado por el metotrexato por inhibición de la enzima dihidrofolato reductasa.

Se rotularon los tubos con la alícuota de medio de cultivo previamente descongelados de acuerdo a la muestra a utilizar y la prueba correspondiente (ej. S1-a, S1-b, S1-c; cultivo sincronizado, muestra, prueba). En la cámara de bioseguridad se homogenizaron las muestras de sangre completa cuidadosamente. A cada tubo se añadieron 500 μL evitando la formación de burbujas, para luego invertir cada tubo delicadamente permitiendo la homogenización de las alícuotas de muestra y medio de cultivo.

Cada tubo debió ser incubado durante 72 horas a 37°C en 5% de CO_2 . Para realizar la sincronización, se agregaron 75 μL de metotrexato a las 48 horas desde que se inició el cultivo y, llegados a las 70 horas aproximadamente, se agregaron 75 μL de Timidina 10^{-3} M, para luego continuar hacia la cosecha. Similares protocolos se pueden encontrar en (Bangs & Donlon, 2005; “The AGT Cytogenetics Laboratory Manual,” 2017).

2. Cosecha

El primer paso de la cosecha debe ocurrir aproximadamente a una hora y media antes de que se cumplan las 72 horas del cultivo celular. Para este paso, se agregaron 50 μ L de Colcemid en cada tubo de cultivo. El desempeño del secuestro mitótico fue evaluado a distintos tiempos de incubación con 15, 30 y 60 minutos a 37°C en baño maría. Terminado el tiempo de incubación se centrifugaron los tubos a 1000 rpm durante 10 minutos. Luego, se eliminó el mayor volumen posible de sobrenadante para continuar con la siguiente etapa, la hipotonía.

Se resuspendieron las células con el sobrenadante remanente en una agitación suave con vortex. Luego se agregaron 2 mL de solución hipotónica de KCl por medio de goteo constante en cada uno de los tubos de cultivo, para luego homogenizarlos. A continuación, cada tubo se completó a volumen (14 mL) con la misma solución hipotónica. En este paso se estudiaron tanto el efecto de la concentración como del tiempo de incubación, probando las concentraciones de KCl 0,075 M y KCl 0,050 M, con tiempos de incubación de 15 y 20 minutos a 37°C en baño maría. Terminado el tiempo de incubación, se centrifugaron los tubos por 10 minutos a 1000 rpm. Luego, el sobrenadante es removido dejando al menos 2 mL, dependiendo del tamaño del pellet.

Las células del pellet fueron resuspendidas con el volumen de sobrenadante remanente para proceder a la etapa de fijación. Para ello, se agregó inicialmente 1 mL de fijador (solución de Carnoy, 3:1 metanol y ácido acético) a cada tubo con agitación suave y luego se centrifugaron los tubos por 10 minutos a 1000 rpm. Posteriormente se retiró el sobrenadante de los tubos y se añadieron 10 mL de fijador en cada tubo. Tras taparlos bien, se agitaron por 10 segundos en alta velocidad con vortex para luego ser incubados por mínimo 20 minutos a 4°C. A continuación, los tubos se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. Al finalizar, se descartó el sobrenadante siempre dejando un volumen aceptable para resuspender el pellet, para luego realizar 3 lavados consecutivos con 5 mL de Carnoy. Luego de cada lavado correspondió realizar una centrifugación con la misma configuración mencionada anteriormente. Posterior al último lavado-centrifugación se removi6 el sobrenadante hasta tener un volumen suficiente en relación al tamaño del pellet, de modo que al resuspender las células se obtuviera una suspensión celular con una concentración adecuada para la preparación de láminas con las cuales pudiéramos observar las metafases celulares. Similares protocolos se pueden encontrar en (P. Benn & Delach, 2008; “The AGT Cytogenetics Laboratory Manual,” 2017)

3. Preparación de láminas

Se debe contar con portaobjetos libres de aceites y grasas. Para ello, los portaobjetos utilizados atravesaron un tratamiento previo que consistió en sumergirlas por una solución de acetona y luego en solución etanol/HCl 1:1 durante 5 minutos respectivamente y posteriormente lavados dos veces con agua corriente. Estos portaobjetos pueden ser preparados con anticipación y ser almacenados en un frasco con agua a 4°C.

Una vez resuspendido el pellet final obtenido en la cosecha, se humedeció el portaobjetos a utilizar con 3 a 4 gotas de Carnoy tomadas con pipeta pasteur plástica y se distribuyeron uniformemente por la superficie con la misma pipeta recostada sobre el portaobjetos. A continuación, se tomó un pequeño volumen de la suspensión celular correspondiente con pipeta pasteur de vidrio, evitando que esta llegase hasta la zona de engrosamiento de la pipeta, para impedir la pérdida de células que se adhieren a las paredes de esa zona. Se procedió dejando caer al menos 3 a 4 gotas de la suspensión sobre el portaobjetos humedecido, el cual se encontraba inclinado a lo largo en un ángulo cercano a 30°, con una altura aproximada a la del antebrazo, evitando que las gotas cayesen en una misma zona. Luego se dejó secar a temperatura 60°C en estufa durante 16 a 18 horas manteniendo el ángulo de inclinación de la superficie.

4. Bandas G (GBG)

Este proceso debe ser ajustado en cada ocasión, de acuerdo al envejecimiento de las láminas y la calidad de la tripsina utilizada (debido a que su actividad puede variar desde la fecha en que se haya preparado y por la cantidad de veces que este es congelado y descongelado). Para realizar la tinción G se requirió preparar las siguientes soluciones:

Tripsina: disolver 1,25 gramos de tripsina en polvo en 500 mL de solución salina de PBS.

PBS: disolver 3 mL de suero bovino fetal en 47 mL de solución salina de Hanks.

Suero fisiológico: NaCl al 0.9%

Tinción Giemsa: disolver 2,5 mL de Giemsa en 50 mL de buffer Gurr.

El proceso fue ajustado en sus tiempos de inmersión de la siguiente manera:

En primer lugar, se sumergieron las láminas en un frasco Coplin con 50 mL de solución de Tripsina en un rango de 20 a 30 segundos. Luego fueron traspasadas al siguiente frasco Coplin con 50 mL de PBS agotando la actividad de tripsina restante en la lámina durante al menos 1 minuto. Al cumplir con el minuto, se lavó la o las láminas pasando por 2 frascos Coplin consecutivos con suero fisiológico durante 1 minuto en cada uno. Finalmente, fueron sumergidas en un Coplin con tinción Giemsa fresca (preparada en el momento, no debe superar las 2 horas de

uso) durante 15 a 25 minutos. Terminado el tiempo de espera se debió lavar bajo un chorro suave de agua corriente, para luego dejarlas secar a temperatura ambiente con inclinación, dejando la zona esmerilada de la lámina en contacto con la toalla de papel absorbente. Similares protocolos se pueden encontrar en (P. A. Benn & Tantravahi, 2001; “The AGT Cytogenetics Laboratory Manual,” 2017).

5. Tinción de Bandas C (CBG)

Se estudiaron dos protocolos para la visualización del bandeo C de cromosomas. El primero requiere de las siguientes soluciones a preparar para el momento de la tinción:

Solución de hidróxido de bario ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) al 5%: pesar 5 g de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ y disolverlos en 100 mL de agua destilada des ionizada.

Tinción Giemsa al 5%: diluir 2,5 mL de Giemsa en 50 mL de buffer Gurr.

El procedimiento consistió en primer lugar en sumergir las láminas en Coplin con $\text{Ba}(\text{OH})_2$ calentado y mantenido en baño termorregulado a 37°C por 15 minutos. Luego, las láminas se debieron lavar 3 veces con agua desionizada (en piseta) y, a continuación, se incubaron las láminas en un Coplin con 2xSSC (solución comercial invitrogen de citrato y cloruro de sodio) que debe estar en baño

termorregulado a 60°C durante 2 horas. Al finalizar las 2 horas de incubación, se lavaron nuevamente, 3 veces con agua desionizada, para luego ser sumergidas en la tinción de giemsa al 10% durante 10 minutos.

Para la segunda alternativa se requiere la preparación fresca de los siguientes reactivos:

Stock de $\text{Ba}(\text{OH})_2$: disolver 2,75 g en 50 mL de agua desionizada.

Solución de trabajo de $\text{Ba}(\text{OH})_2$: diluir 15 mL de la solución preparada de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ con 35 mL de agua desionizada.

Preparar HCl 1N: diluir 4,9mL de HCl 10,15N con 45 mL de agua estéril.

Solución de trabajo de HCl 0,2N: diluir 10 mL de HCl 1N con 40 mL de agua estéril.

Otra alternativa, es preparar directamente la solución de trabajo HCl 0,2N: diluyendo 2 mL de HCl fumante al 37% en 98 mL de agua desionizada estéril.

Tinción Giemsa: homogenizar bien 2,5 mL de Giemsa con 50mL de Buffer Gurr.

El procedimiento constó de lo siguiente:

Se sumergieron las láminas en HCl 0,2 N durante una hora con 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, se lavaron con abundante agua estéril, para continuar con la inmersión en frasco Coplin con $\text{Ba}(\text{OH})_2$ por 45 segundos en 60°C, con un posterior lavado con abundante agua estéril. A continuación, las láminas se incubaron a 60°C en baño termostático con 2xSSC durante 1 hora. Al terminar este paso se deben lavar nuevamente con abundante agua estéril, para finalmente teñir en la solución de Giemsa durante al menos 26 minutos. Se vuelven a lavar con agua estéril y se dejan secar a temperatura ambiente. Similares protocolos se pueden encontrar en (P. A. Benn & Tantravahi, 2001; “The AGT Cytogenetics Laboratory Manual,” 2017).

6. Evaluación de láminas

En el estudio de metafases por cada lámina, se registraron observaciones correspondientes a la presencia de restos celulares, distribución de las metafases y visualización de bandeo G, para luego evaluar comparativamente el mejor resultado obtenido del protocolo correspondiente dentro de la matriz de protocolos y, posteriormente, del resultado de cultivo corriente y sincronizado desde la comparativa del recuento de metafases por campo menor en cada lámina.

7. Estrategia experimental

Entre las variables más fácilmente ajustables se encuentran principalmente los tiempos de exposición a las soluciones químicas, así como sus concentraciones en el proceso de la hipotonía. Una matriz de protocolos permite el estudio combinado de variables, con lo cual vislumbrar en el menor tiempo posible la(s) vía(s) que entrega(n) el mejor resultado. Para esto, se tomaron 4 muestras de sangre periférica de voluntarios del laboratorio, donde por cada muestra se realizaron 6 cultivos de células mononucleares, los cuales se separaron en parejas siendo expuestos a 3 tiempos diferentes de exposición a Colcemid. Luego cada pareja fue separada, siendo sometidos a distintas concentraciones de tratamiento hipotónico y, a su vez, agrupados en partes iguales para aplicar una exposición diferenciada de tiempo, siendo un grupo sometido a tratamiento hipotónico por 15 minutos y el otro por 20 minutos (ver Figura 2). Finalmente, tras obtener los precipitados y completar el proceso de fijación, se realizaron las láminas por triplicado para luego ser bandeadas y observadas en el microscopio evaluando calidad del bandeo, obtención de metafases, y su distribución.

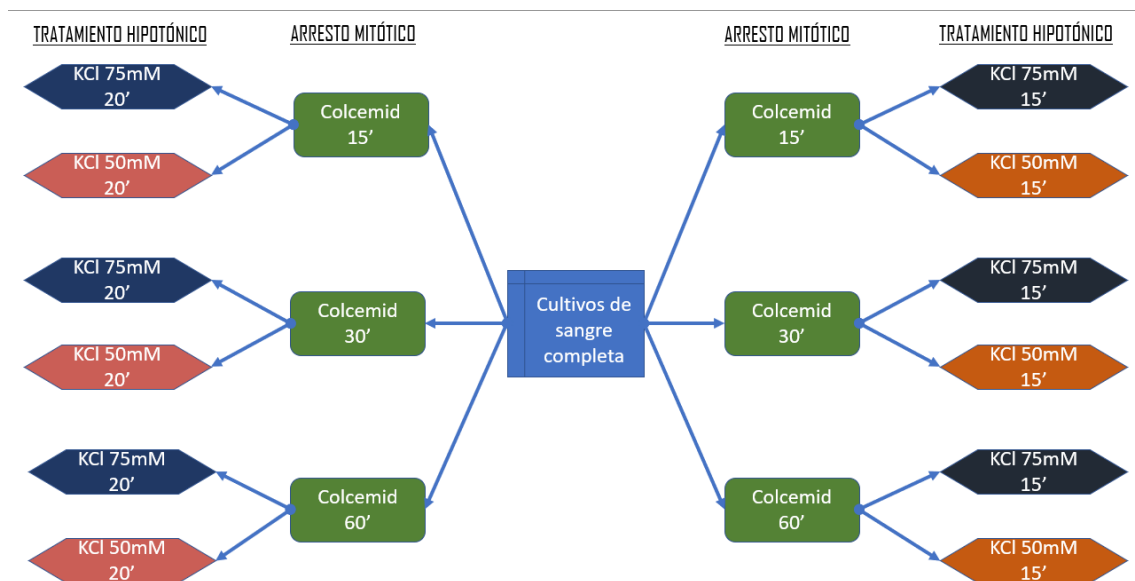


Figura 2. Esquema de matriz de protocolos y sus diferentes variables a aplicar.

Tabla 2. Variables que serán testeadas en la matriz de protocolos

Matriz de protocolos		
Reactivo	concentración	tiempo
Colcemid	5 µg/mL	15', 30', 60'
KCl	50mM	15', 20'
KCl	75mM	15', 20'

RESULTADOS

Matriz de protocolos tras aplicación de cultivo de células mononucleares en sangre periférica.

Al observar las láminas resultantes, se pudo diferenciar cambios en las metafases obtenidas tras la aplicación de las variables descritas de secuestro mitótico y tratamiento de hipotonía. Como se puede observar en la figura 3, las diferencias en la distribución de las metafases obtenidas en un mismo tiempo de exposición en Colcemid, pero diferente tiempo de exposición y concentración de KCl. Las primeras imágenes de la figura 3 correspondientes a la fotografía a y b, comparten una misma concentración de KCl de 75mM, pero la fotografía a, con 15 minutos de exposición a éste se encuentra menos dispersa que en la fotografía b con 20 minutos de exposición al tratamiento de hipotonía. Para los casos de las fotografías c y d, que comparten la misma concentración de 50mM de KCl a diferente tiempo de exposición, se puede ver nuevamente un aumento en la dispersión de los cromosomas proporcional al tiempo de exposición, siendo mayor en la fotografía d, sin embargo, al tener una concentración menor de KCl, este par de fotografías tiene una menor distribución a las metafases observadas de las primeras dos fotografías con 75mM de KCl.

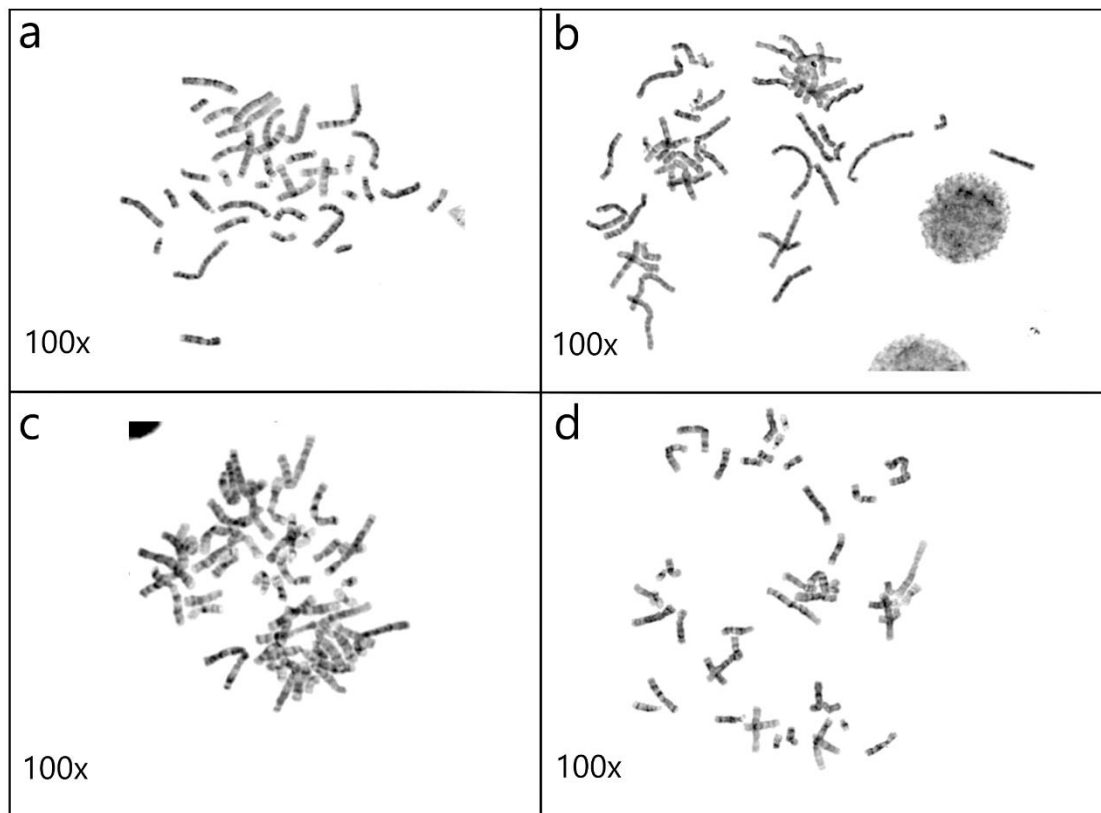


Figura 3. Fotografías de metafases resultantes de la matriz de protocolos.

Cromosomas en 15 minutos de Colcemid. a) lámina con 15 minutos de hipotonía 75mM. b) lámina con 20 minutos de hipotonía 75mM. c) lámina con 15 minutos de hipotonía 50mM. d) lámina con 20 minutos de hipotonía 50mM.

El estudio comparativo de las diferentes láminas mediante la observación de los parámetros de distribución de los cromosomas, calidad del bandeo G obtenido, y la cantidad de restos celulares, se llevó a cabo asignando un puntaje a cada uno de estos parámetros, para luego ponderar estos obteniendo los mejores puntajes

como reflejo del mejor desempeño de estas variables en la matriz de protocolos. Con ello, podemos observar en la figura 4, que en la gráfica a, se comparan 4 protocolos con mismo método de secuestro mitótico de 15 minutos de exposición a Colcemid, con diferencias en el tratamiento hipotónico, donde ambos protocolos con 15 minutos de exposición a KCl obtuvieron el puntaje más significativo de su grupo. En la gráfica b de la figura 4, tenemos los 4 protocolos con una exposición a Colcemid de 30 minutos, donde pese a no haber diferencias significativas entre ellos, si podemos observar una tendencia hacia los protocolos que tienen tratamiento hipotónico de 50mM de KCl. No obstante, en el gráfico c correspondiente al grupo con 60 minutos de exposición a Colcemid, se observan dos protocolos que se diferencian significativamente del resto, siendo el que presenta mayor significancia el resultado del tratamiento hipotónico de 15 minutos con 50mM de KCl. Finalmente, en el gráfico d, donde se diferencian los mejores protocolos seleccionados de cada grupo, no se aprecia una diferencia significativa, sin embargo, se observa una tendencia de un mejor desempeño para el protocolo correspondiente a 15 minutos de Colcemid, y un tratamiento hipotónico de 15 minutos de KCl 75mM.

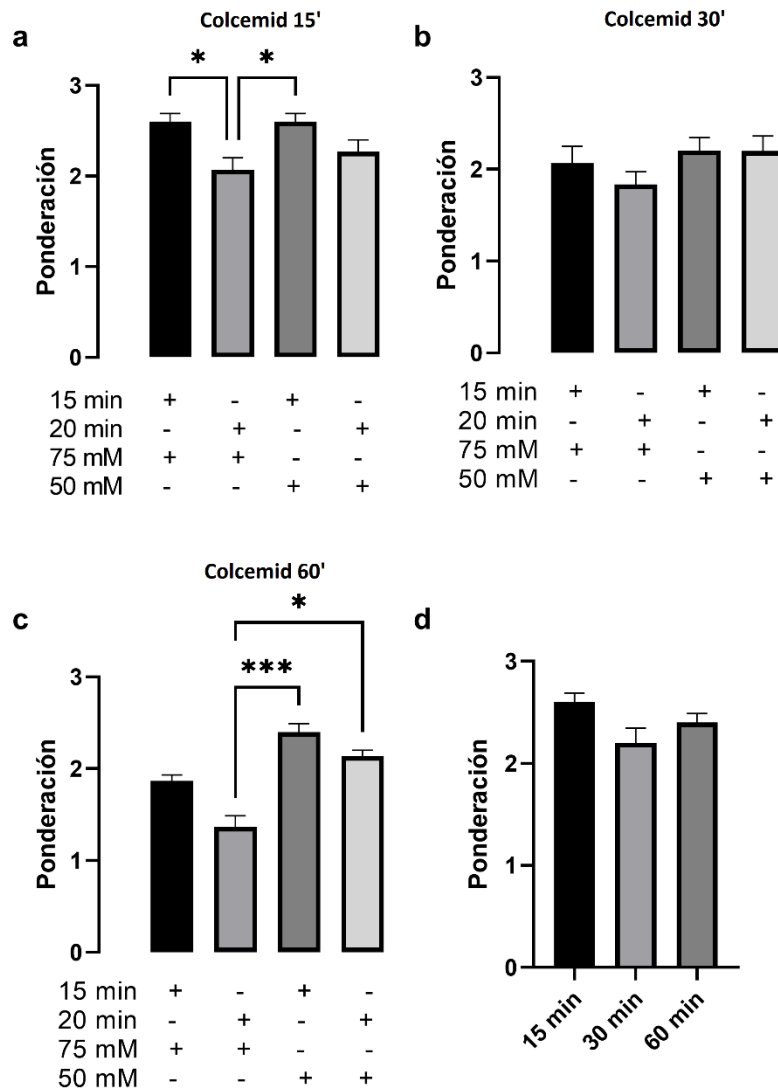


Figura 4. Graficas comparativas agrupadas de acuerdo al tiempo de exposición a Colcemid.

a. Ponderaciones de puntajes asignados a las láminas de 15 minutos de Colcemid en condiciones diferentes de tiempo y concentración de KCl. (N=24).
b. Ponderaciones de puntajes asignados a las láminas de 30 minutos de Colcemid en condiciones diferentes de tiempo y concentración de KCl. (N=24).
c. Ponderaciones de puntajes asignados a las láminas de 60 minutos de Colcemid en condiciones diferentes de tiempo y concentración de KCl. (N=24).
d. Comparación de las mejores ponderaciones obtenidas a 15, 30 y 60 minutos de exposición a Colcemid. (N = 18). * = $p < 0,05$ *** = $p < 0,001$

Aplicación de metotrexato en el método de cultivo.

El método de cultivo sincronizado, en el cual se utiliza metotrexato para aumentar el número de metafases por lámina, fue comparado al método de cultivo corriente determinado mediante la matriz de protocolos. En la figura 5, se ve graficado la diferencia entre ambos protocolos en cuanto al número de metafases observadas por campo menor en el microscopio, dando como resultado una gran diferencia significativa entre ambos métodos de cultivo, esto puede ser observado a su vez en las fotografías tomadas de las láminas tanto en campo menor como campo mayor que se hayan en la figura 6.

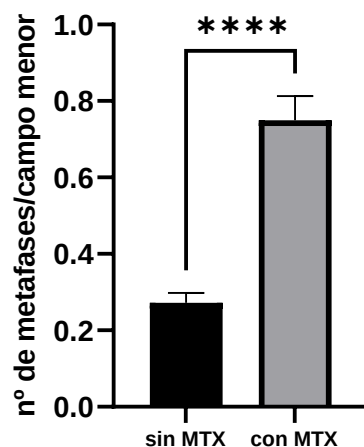


Figura 5. Gráfica comparativa del promedio de metafases observadas en láminas obtenidas del cultivo corriente y sincronizado de células mononucleares en sangre periférica completa.

Promedio de metafases observadas por campo menor en láminas obtenidas del cultivo corriente de células mononucleares, sin metotrexato (MTX); promedio de metafases observadas por campo menor en láminas obtenidas del cultivo sincronizados de células mononucleares, con metotrexato. (N= 36).

**** P<0,0001

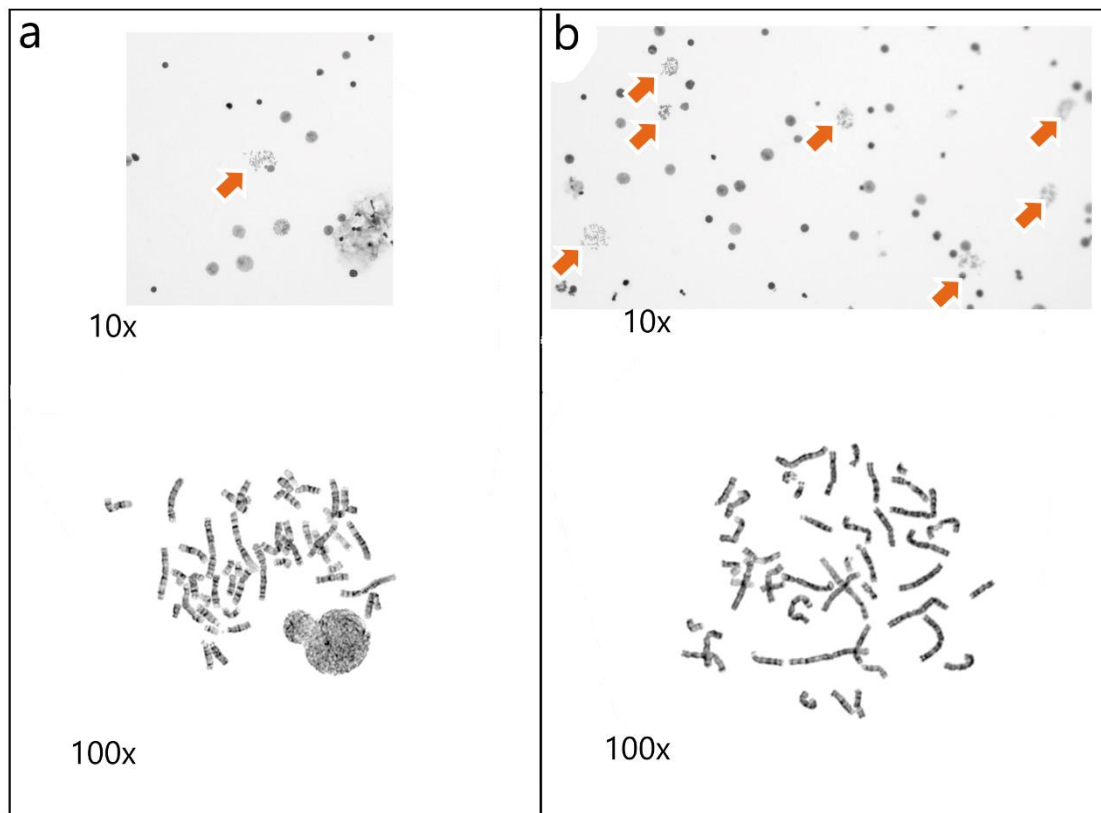


Figura 6. Fotografías de metafases obtenidas de cultivo corriente vs sincronizado.

a. Metafases observadas en campo 10x y 100x de cultivo corriente sin metotrexato (MTX). b. Metafases observadas en campo 10x y 100x de cultivo sincronizado con metotrexato. Metafases presentes en fotografía 10X indicadas con las flechas ➡.

Elección de un protocolo efectivo en la obtención de bandeo C.

Los protocolos que fueron estudiados para este caso fueron dos. En la figura 7 se pueden observar fotografías correspondientes a cada protocolo a y b respectivamente, donde en el primer protocolo solo se obtuvieron cuerpos coloreados sin diferenciación de estructuras en los cromosomas, mientras que en el segundo protocolo, cuyo resultado puede observarse en la fotografía b de la figura 7, se puede apreciar una diferencia de coloración donde el tono más intenso corresponde a la heterocromatina constitutiva que es lo que buscamos diferenciar efectivamente con el Bando C.

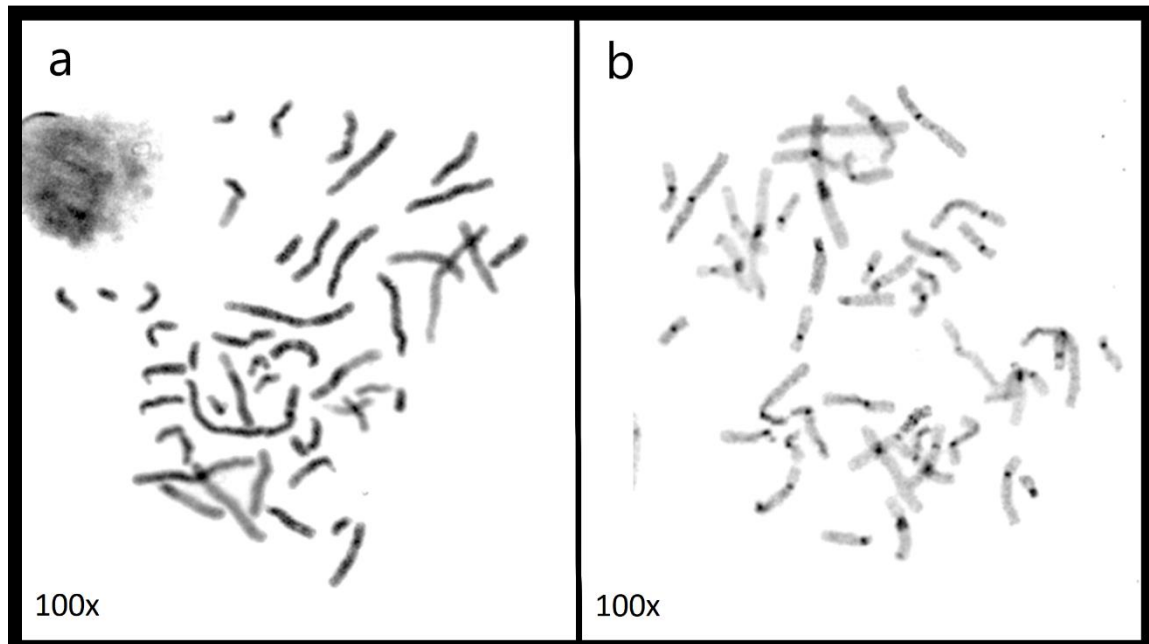


Figura 7. Fotografías de metafases sometidas a protocolos de tinción de Bandas C.

- a. Fotografía de metafase sometida al protocolo 1 de tinción de Bandeo C.
- b. Fotografía de metafase sometida al protocolo 2 de tinción de Bandeo C.

DISCUSIÓN

Pese a que es importante la obtención de cromosomas con buena resolución para poder llevar a cabo análisis completos, dependientes de la cosecha, es también necesario en ocasiones poder contar con un mayor número de metafases, ya sea para agilizar procesos analíticos o confirmar hallazgos importantes para el diagnóstico médico. Es por ello la importancia de contar con métodos de cultivo celular corriente y sincronizado en el cual la contribución de utilizar metotrexato como añadido en el protocolo puede aumentar considerablemente el número de metafases observables por lámina preparada.

Dentro de las variables consideradas en la matriz de protocolos, fue posible determinar el tiempo de exposición del cultivo celular a 50 μ L de Colcemid 5 μ g/mL como 15 minutos. Para la variable concentración de KCl se pudo observar una mejor distribución de las metafases en aquellos protocolos con el menor tiempo de exposición. Sin embargo, pese a no haber diferencias considerables en la concentración de KCl para estos casos, si fue observable una mejor separación entre cromosomas en la exposición a KCl 75mM.

La elección final del protocolo para la tinción de bandas C no tuvo mayor complicación debido al éxito del protocolo 2 por sobre el protocolo 1 que no logró una tinción diferencial de la heterocromatina constitutiva.

Sobre la caracterización del protocolo

Al ser una técnica que involucra distintas etapas, se tuvo que tomar en consideración cómo estas etapas pueden afectar a los cromosomas resultantes que podemos observar de las metafases cosechadas. El grado de condensación de los cromosomas que puede exacerbar la prolongada exposición a Colcemid, puede ser controlado optando por la menor concentración y tiempo de exposición efectivos posibles, o utilizando compuestos químicos que pueden contrarrestar el efecto de Colcemid impidiendo la condensación de los cromosomas como, por ejemplo, el bromuro de etidio. Sin embargo, para muestras como la sangre periférica completa este efecto parece ser evidente y por tanto, identificable. El tratamiento hipotónico depende principalmente de la propiedad osmótica y, aunque mecanismos pasivos están involucrados, también lo están mecanismos activos de transporte, que si llegasen a no estar operativos evitarán que la célula se hinche como, por ejemplo, por la presencia de drogas que bloqueen la bomba de sodio/potasio. En efecto, es importante tener en cuenta que llevar la solución hipotónica a 37°C previo a utilización puede aumentar la eficacia en el transporte pasivo de agua a través de la membrana celular. En esta etapa también pueden

ocurrir problemas debido al uso de volúmenes excesivos de solución hipotónica. Se ha descrito que esto puede aumentar la fragilidad de las células llevando a la pérdida o rotura prematura de éstas durante la centrifugación. A su vez, una incubación prolongada en hipotonía llevará a que en algún momento las células recuperen su tamaño original. Durante la fijación, ocurre un *shock* en la célula que, al ser removida el agua de ella, es preservada tras su muerte, endureciendo sus membranas y sus cromosomas permitiéndole resistir su posterior tinción. En esta etapa es muy importante poder llevar el pellet celular a suspensión con el fijador de forma gentil y completa, para evitar que las células se unan y aglutinen irreversiblemente (“The AGT Cytogenetics Laboratory Manual,” 2017). Al revisar otros protocolos publicados y en literatura, las principales diferencias se encuentran en la etapa del secuestro mitótico donde la concentración utilizada de Colcemid, así como su periodo de incubación, aumentan de acuerdo al intercalante que puedan estar utilizando como el bromuro de etidio que fue mencionado anteriormente. Respecto del tratamiento hipotónico, la utilización de KCl temperado a 37°C es muy común, así como también la concentración de la solución hipotónica en 75mM (P. Benn & Delach, 2008; Howe et al., 2014; Hungerford, 1965; “The AGT Cytogenetics Laboratory Manual,” 2017).

El método de cultivo utilizando metotrexato, cumple la tarea de aumentar el número de metafases cosechadas debido a su efecto sincronizante de la fase S.

Esto lo logra interrumpiendo la vía de síntesis de purinas al inhibir la enzima dihidrofolato reductasa. La forma activa del ácido fólico, el tetrahidrofolato, es una coenzima que participa como donante de un carbono en reacciones de síntesis de aminoácidos, purinas y timidina, incluyendo la conversión de desoxiuridilato (dUMP) a desoxitimidilato (dTMP) a través de la enzima timidilato sintetasa. La liberación de las células es activada al añadir timidina, lo que permite la síntesis de dTMP a través de la vía de rescate con la enzima timidina quinasa. Dentro de las precauciones que se deben tener en este proceso, es que poco tiempo de exposición a metotrexato puede causar que pocas células sean efectivamente sincronizadas, pero un exceso de tiempo puede llevar a las células a morir por ausencia prolongada de timidina (“The AGT Cytogenetics Laboratory Manual,” 2017). Por ello, tanto en literatura como en el protocolo utilizado, coinciden en que el periodo de incubación con metotrexato debiese encontrarse dentro del rango de 16 a 18 horas, para luego ser incubados con timidina aproximadamente 4 horas (Figura 6) (Bangs & Donlon, 2005; “The AGT Cytogenetics Laboratory Manual,” 2017).

El uso principal para la técnica de bandeo C es la identificación de variantes polimórficas de los cromosomas, tales como el aumento o decrecimiento del largo de regiones de heterocromatina e inversiones o reestructuraciones de cromosomas. Esta técnica es útil también en la caracterización de cromosomas

supernumerarios o cromosomas utilizados como marcadores y para la identificación de cromosomas específicos en células somáticas híbridas. Respecto de la técnica para producir estas bandas C, la literatura actual explica que tras pasar por un tratamiento de condiciones ácidas, alcalinas y en solución salina a altas temperaturas, ocurriría una extracción de las bases de purina del ADN rompiendo selectivamente los enlaces azúcar-fosfato de los fragmentos eucromáticos y permitiendo que este ADN fuera eluido en los siguientes lavados produciendo las zonas ligeramente teñidas con Giemsa, a diferencia de las bandas o zonas oscuras que retienen su estructura y que corresponden a la heterocromatina constitutiva. La función del tratamiento ácido es la depurinación parcial del ADN, mientras que el tratamiento alcalino denatura las proteínas estructurales permitiendo la ruptura y elusión de material genético, donde finalmente las proteínas solubles son extraídas con la solución salina. En estudios más antiguos la solución salina a alta temperatura permitía además facilitar la reasociación de las hebras de ADN localizado en las bandas C, donde también se sugeriría que el pretratamiento alcalino produciría la denaturación completa de los cromosomas. Sobre el estado de las láminas, si estas deben ser preparaciones frescas o añejadas, suele preferirse añejadas puesto que de lo contrario los cromosomas podrían resultar con un patrón de bandas similar a las bandas G y poco definidos. Lo mismo puede ocurrir si el tratamiento con hidróxido de bario, que es más agresivo que el hidróxido de sodio, tiene un periodo de incubación insuficiente. Otra variable que cumple con este mismo propósito es la

temperatura, puesto que si el tratamiento tiene una temperatura baja podría resultar en el mismo problema de visualización de bandas tipo G. Esto es exactamente lo que ocurre en los resultados obtenidos de los dos protocolos utilizados, mostrando estas dos diferencias (McKay, 1973; “The AGT Cytogenetics Laboratory Manual,” 2017).

Los parámetros estudiados, son suficientes para obtener cariogramas adecuados en los estándares alcanzados para su utilización en área clínica. Sin embargo, existen otras maneras de controlar y optimizar aún más la obtención de metafases bien distribuidas determinando un protocolo de manejo en las pericias técnicas, por ejemplo, la altura de caída de la gota de la suspensión celular sobre la superficie de la lámina de vidrio, el ángulo preciso en el que la lámina recibe la gota y, por supuesto, la humedad relativa, temperatura y tiempo de secado. Siendo estos últimos los que podrían tener el potencial de que al ser controlados y poder determinar tiempos específicos de secado a una temperatura y humedad relativa específica, permitirían obtener láminas en tiempos diferidos de acuerdo a la necesidad y urgencia del caso (Spurbeck et al., 1996). Esta sería una temática interesante de abordar a futuro, contando con las herramientas correspondientes.

CONCLUSIÓN

El protocolo para la obtención de cariograma en el laboratorio de citogenética del Hospital Guillermo Grant Benavente consiste finalmente de un protocolo para cultivo celular corriente que permitiría el estudio de metafases de óptima resolución, protocolo de cultivo sincronizado con la utilización de metotrexato para la detención de las células mononucleares en fase S y posterior liberación de este estado con la presencia de Timidina, permitiendo obtener un mayor número de metafases observables por campo menor en el microscopio. El protocolo para la cosecha celular consta de 15 minutos de exposición a Colcemid, tratamiento hipotónico de 15 minutos en KCl 75mM y fijación con el reactivo de Carnoy preparado en el momento que se deba utilizar. Tras la preparación de las láminas se lleva a cabo la tinción correspondiente al caso, con una tinción de bandas G estándar ajustada para el lote de láminas que hayan sido preparadas, y tinción de bandas C, donde las láminas son sumergidas por un tratamiento ácido, alcalino y salino respectivamente, en temperaturas de 60°C y lavados intermedios a temperatura ambiente.

PROYECCIONES

Ya obtenido el protocolo para la obtención de láminas de metafases, es posible profundizar y estudiar otras tinciones que pueden ser complementarias a GBG y CBG, como, por ejemplo, la tinción de bandas Cd que en conjunto al bandeo C permitirían la identificación de centrómeros activos en anomalías cromosómicas estructurales, tales como, las traslocaciones robertsonianas, cromosomas dicéntricos, pseudo dicéntricos, en anillo, etc. También se encuentra la posibilidad de ajustar la tinción NOR (*nucleolus organizing regions*) e inclusive llevar este examen al uso de tinciones que requieren de fluorescencia para un potencial estudio más exhaustivo de anomalías estructurales.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, S. (2005). Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud. *Salud En Tabasco*, 11, 333–338. <https://www.redalyc.org/pdf/487/48711206.pdf>
- Bangs, C. D., & Donlon, T. A. (2005). Metaphase chromosome preparation from cultured peripheral blood cells. *Current Protocols in Human Genetics / Editorial Board, Jonathan L. Haines ... [et Al.], Chapter 4*, 1–19. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0401s45>
- Benn, P. A., & Tantravahi, U. (2001). *Human cytogenetics: Constitutional analysis* (D. E. Rooney, Ed.; 3rd ed.). Oxford University Press, Oxford.
- Benn, P., & Delach, J. (2008). Human lymphocyte culture and chromosome analysis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 3(9). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5035>
- Caparros, M. M., Pardo, J. B. C., & Sarrión, M. C. S. (2016). *Biología molecular y citogenética* (1st ed.).
- Conference, P. (1971). Standardization in human cytogenetics. *Birth Defects: Original Article Series*, 8(7), 1–46.
- Cresswell, L., Wallis, Y., Fewes, G., Deans, Z., Fratter, C., Monkman, L., & Morgan, S. (2020). General Genetic Laboratory Reporting Recommendations. *Association for Clinical Genetic Science*, 1–11.
- Drets, M. (2002). Una saga citogenética: El descubrimiento de los métodos de bandeo cromosómico. Significado y proyección bio-médica. *Revista Médica Del Uruguay*, 18(2), 107–121.

Gill, B. S., & Kimber, G. (1974). *C-Banded Karyotype of*. 71(4), 1247–1249.

Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, 389(6649), 349–352. <https://doi.org/10.1038/38664>

Hamerton, J. L. (1967). Chicago Conference 1966: Standardization in Human Cytogenetics. *Journal of Medical Genetics*, 4(3), 226. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1468574/>

Hastings, R., Howell, R., Betts, D., Porter, S., Haferlach, C., Dastugue, N., Radford-weiss, I., Beverloo, H. B., Simons, A., Mellink, C., Snijder, S., Ruiter, E. V. D. B., Schoumans, J., Espinet, B., Siebert, R., Couturier, J., Bernheim, A., Solé, F., Luquet, I., ... Cavani, S. (2013). E.C.A. Guidelines and Quality Assurance for Acquired Cytogenetics. *European Cytogeneticists Association Newsletter*, 31, 7–21.

Hastings, R., Howell, R., Bricarelli, F. D., Kristoffersson, U., & Cavani, S. (2012). *General Guidelines and Quality Assurance for Cytogenetics A common European framework for quality assessment for constitutional, acquired and molecular cytogenetic investigations*. E.C.A. Permanent Working Group for Cytogenetics and Society. 29, 7–25.

Howe, B., Umrigar, A., & Tsien, F. (2014). Chromosome preparation from cultured cells. *Journal of Visualized Experiments*, 83, 3–7. <https://doi.org/10.3791/50203>

Hungerford, D. A. (1965). Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCL. *Biotechnic and Histochemistry*, 40(6), 333–338. <https://doi.org/10.3109/10520296509116440>

Izcara Palacios, S. (2019). Manual de investigación cualitativa. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9). <http://www.grupocieg.org/archivos/Izcara> (2014) Manual de Investigación Cualitativa.pdf

- Julio Nazer, H., & Lucía Cifuentes, O. (2011). Malformaciones congénitas en Chile y Latino América: Una visión epidemiológica del ECLAMC del período 1995-2008. *Revista Medica de Chile*, 139(1), 72–78. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872011000100010>
- Kramer, S. (2019). Clinical genetics. *Clinical Precision Medicine: A Primer*, 49–62. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819834-6.00005-7>
- Lagos L., M., & Poggi M., H. (2010). Tests genéticos: Definición, métodos, validación y utilidad clínica. *Revista Medica de Chile*, 138(1), 128–132. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872010000100019>
- Liehr, T. (2019). From human cytogenetics to human chromosomics. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ijms20040826>
- McKay, R. D. G. (1973). The mechanism of G and C banding in mammalian metaphase chromosomes. *Chromosoma*, 44(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/BF00372569>
- Ministerio de Salud. (2017). Ley 21030. 1–6. <http://bcn.cl/2fd6u>
- NIJENHIUS, L. E. (1964). THE LONDON CONFERENCE ON “THE NORMAL HUMAN KARYOTYPE” AUGUST 28-30, 1963. *American Journal of Human Genetics*, 16(1), 156–158.
- Organización Mundial de la salud. (2020). *Anomalías congénitas*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/congenital-anomalies>
- Painter, T. S. (1921). THE Y-CHROMOSOME IN MAMMALS. *Science*, 53(1378), 503 LP – 504. <https://doi.org/10.1126/science.53.1378.503>
- Pardo, R., Zavala, M., Sanz, P., Daher, V., Tobella, L., Salazar, S., Sanhueza, C., & Castillo, S. (2020). Trisomy 9, trisomy 13 and trisomy 18: Results of the prenatal cytogenetical analysis, Hospital Clínico Universidad de Chile, years 2000-2017. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 85(4), 335–341. <https://doi.org/10.4067/S0717-75262020000400335>

- Silva, M., de Leeuw, N., Mann, K., Schuring-Blom, H., Morgan, S., Giardino, D., Rack, K., & Hastings, R. (2019). European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. *European Journal of Human Genetics*, 27(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0244-x>
- Spurbeck, J. L., Zinsmeister, A. R., Meyer, K. J., & Jalal, S. M. (1996). Dynamics of chromosome spreading. *American Journal of Medical Genetics*, 61(4), 387–393. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19960202\)61:4<387::AID-AJMG15>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19960202)61:4<387::AID-AJMG15>3.0.CO;2-O)
- Tamar, C., Constanza, N., Janeth, D., & Medicina, L. A. (2008). Utilidad de la citogenética en la medicina actual Visión histórica y aplicación The utility of cytogenetics in modern medicine Historical view and application. *Acta Médica Colombiana*, 33(4), 309–316.
- The AGT Cytogenetics Laboratory Manual. (2017). In *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. <https://doi.org/10.1002/9781119061199>
- Torres, E. (2018). Ventajas y limitaciones de la citogenética en la medicina actual. *Memorias Del Instituto de Investigaciones En Ciencias de La Salud*, 16(2), 107–112. [https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2018.016\(02\)107-112](https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2018.016(02)107-112)
- Weinstein, G. D., Goldfaden, G., & Frost, P. (1971). Methotrexate Mechanism of Action on DNA Synthesis in Psoriasis. *Arch Derm*, 104.