UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE FARMACIA

ESTANDARIZACIÓN DEL CULTIVO DE LÍQUIDO AMNIÓTICO PARA ANÁLISIS CROMOSÓMICO

POR FRANCISCA BELÉN MALDONADO ULLOA

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

Profesor patrocinante:
Dr. Claudio Aguayo Tapia
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología.
Facultad de Química y Farmacia
Universidad de Concepción

Profesional Guía:
BQ Diego Guerrero Tobar
Sección de Genética
Laboratorio Clínico
Hospital Regional Guillermo Grant Benavente

Agosto, 2024

Concepción, Chile

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

© 2024, Francisca Belén Maldonado Ulloa

Dedico mi trabajo de investigación a mis padres
Pamela y Luis por siempre entregarme su amor,
preocupación y apoyo a lo largo de mi vida
universitaria.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer este trabajo de investigación a mi tutor guía Bioquímico Diego Guerrero T., por su entrega de conocimientos e importante apoyo para llevar a cabo el presente trabajo investigación.

Agradecer también a mi profesor patrocinante Dr. Claudio Aguayo T., por la asesoría e importante colaboración en el desarrollo de este trabajo.

A los funcionarios y miembros del Laboratorio Clínico del Hospital Regional Guillermo Grant Benavente, por la oportunidad de realizar mi internado en sector salud y contribuir a mi desarrollo profesional y personal.

Finalmente, a mi familia y amigos que estuvieron presentes brindándome su cariño y apoyo incondicional para que este trabajo de investigación se realizara de manera exitosa.

ÍNDICE

RESUMEN ……Pág. ix

MARCO TEÓRICO……..……..Pág. 11

GAMETOGENESIS Y ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS……..Pág. 11

LÍQUIDO AMNIÓTICO……...Pág. 14

I. Bioquímica en líquido amniótico……..…….Pág. 17

Tabla1. Diferencias de metabolitos (expresados en porcentaje) entre los cuatro periodos de edad gestacional……..…Pág. 18

II. Células en líquido amniótico……..……..……Pág. 20

DIAGNOSTICO CITOGENÉTICO A PARTIR DE LÍQUIDO AMNIÓTICO……..…..….Pág. 22

I. Recolección e identificación de la muestra……..……..Pág. 23

II. Preparación de la muestra para el cultivo……... Pág. 24

III. Manipulación celular……..…….. Pág. 25

IV. Bandeo……..……. Pág. 27

V. Análisis cromosómico……..…… Pág. 28

RELEVANCIA CLÍNICA……..……..…..…..Pág. 29

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN……..……..….Pág. 31

OBJETIVOS……..……..……Pág. 32

Objetivo general……..……Pág. 32

Objetivos específicos……..……..…Pág. 32

METODOLOGÍA……..……Pág. 33

1. Obtención del cultivo primario……..…….Pág. 33

1.1. Descripción de población y muestra. ……..…Pág. 34

1.2. Siembra de muestras…….Pág. 35

2. optimización protocolo de cosecha, fijación y goteo a partir del cultivo…….Pág. 36

2.1. Estandarización tiempo de Colcemid®……..Pág. 38

2.2. Uso de Bromuro de etidio……..…..…Pág. 38

3. comparación de resultados……..…Pág. 39

4. Confeccionar de instructivo y registros asociados.…….Pág. 39

RESULTADOS…..……..….Pág. 40

DISCUSIÓN..…….…….. Pág. 50

CONCLUSIONES Y PROYECCIONES…….…….. Pág. 57

BIBLIOGRAFIA……..…….…..…. Pág. 58

ANEXOS ……..……. Pág. 61

Anexo 1: Carta de confidencialidad……..…….. Pág. 61

Anexo 2: Flujograma método estandarización…….……...… Pág. 62

Anexo 3: Manejo de residuos hospitalarios…….…… Pág. 63

Anexo 4: Manual de protocolo de cultivo de líquido amniótico para análisis cromosómico…….……Pág. 67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Diferencias de metabolitos (expresados en porcentaje) entre los cuatro periodos de edad gestacional (Orczyk-Pawiłowicz et al., 2016)……. Pág. 18

Tabla II. Optimización tiempo de Colcemid® 0.33 ug/mL (n=4)……. Pág. 42

Tabla III. Optimización Volumen de Colcemid® 2.5 horas (n= 4)…….. Pág. 44

Tabla IV. Correlación Clínica Sanatorio Alemán y Laboratorio de Genética HGGB…….. Pág. 47

Tabla V. Tabla de concordancia Laboratorio de Genética HGGB vs Laboratorio clínico Sanatorio Alemán…… Pág. 48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.Volumenes de líquido amniótico en mujeres que están en diferentes semanas de gestación (Queenan et al., 1972)…… Pág. 15

Figura 2. Características morfológicas de las células del líquido amniótico(Ochiai et al., 2018)……. Pág. 21

Figura 3. Cariotipo masculino normal visualizado con bandeo G (Turnpenny et al., 2022)…….. Pág. 28

Figura 4. Imágenes cultivo primario de amniocitos……... Pág. 41

Figura 5. optimización del tiempo de incubación de Colcemid® en función del número de metafases por portaobjeto……. Pág. 43

Figura 6. Optimización concentración de Colcemid® en función del número de metafases por portaobjeto ……. Pág. 44

Figura 7. Grafico de optimización concentración de bromuro de etidio en función de la resolución de banda de cada metafase analizada……. Pág. 45

Figura 8. Gráfico de Relación concentración de bromuro de etidio en función del número de metafases por portaobjeto…… Pág. 46

RESUMEN

La gametogénesis es el proceso en el que las células germinales masculinas y femeninas experimentan una serie de cambios que las convierten tanto genética como morfológicamente en gametos maduros preparados para la fecundación. Durante este proceso se reduce la cantidad de cromosomas y el material genético puede alterarse, lo que provoca diversas anomalías cromosómicas. En este contexto, el diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas oportuno es fundamental para la salud publica chilena, ya que proporciona información esencial para la toma de decisiones médicas y personales durante el embarazo. Un diagnóstico prenatal oportuno y preciso va a permitir una mayor prevención de complicaciones médicas, toma de decisiones informadas sobre el curso del embarazo, tratamiento médico necesario y/o el parto, además va a permitir un acceso a servicios de salud adecuados en base a las complicaciones que podría presentar el diagnostico de anomalías cromosómicas del feto. Así, el estudio citogenético permite cariotipar y determinar la presencia de anomalías cromosómicas, las que producen trastornos como el síndrome de Down, síndrome de Edwards, síndrome de Patau, entre otros. Para estos estudios, la amniocentesis transabdominal permite obtener líquido amniótico, la cual se utiliza como herramienta de diagnóstico prenatal. Este procedimiento invasivo se realiza

durante el segundo trimestre del embarazo y consiste en la introducción de una aguja espinal a través del abdomen, guiada por ecografía, para obtener una muestra de líquido amniótico. La muestra obtenida se somete a centrifugación para separar las células, que se utilizan para análisis de biología molecular y cariotipo, y el sobrenadante, se utiliza para evaluar metabolismo, defectos del tubo neuronal, isoinmunización y maduración fetal.

La implementación de un protocolo estandarizado de cultivo de líquido amniótico en el laboratorio clínico del Hospital Regional Guillermo Grant Benavente permitirá acortar los tiempos de respuesta y favorece el diagnóstico prenatal asertivo y oportuno de anomalías cromosómicas. Además de significar una disminución de costos para el mismo. Basados en estos antecedentes el objetivo de este trabajo de tesis es: “Estandarizar en el laboratorio de Genética del Hospital Guillermo Grant Benavente un protocolo de cultivo celular de líquido amnióticos para análisis cromosómico”, para lo cual trabajo con 13 muestras de líquido amniótico de mujeres con no más de 30 semanas de gestación y que presentaban sospecha de anomalías cromosómicas en el feto, se estandarizaron tiempos y concentración de reactivos que participan directamente en la obtención de metafases y de un tamaño de cromosomas óptimos para el análisis, al comparar los resultados con el referente local se obtuvo un 100% de concordancia.

MARCO TEORICO

GAMETOGÉNESIS Y ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS

La gametogénesis es el proceso en el que las células germinales masculinas y femeninas experimentan una serie de cambios que las convierten tanto genética como morfológicamente en gametos maduros preparados para la fecundación (Serna, 2015). Durante este proceso se reduce la cantidad de cromosomas de 46 (2n) a 23 (n) a través la meiosis, en la cual se produce el reagrupamiento de los cromosomas paternos y maternos, provocando una redistribución de la información genética por procesos de entrecruzamiento con el fin de obtener variabilidad genética (Carlson, 2020). La meiosis es un tipo especial de división celular que conlleva dos divisiones meióticas. La primera se conoce como división de reducción, en el que a través de un proceso de emparejamiento de los cromosomas homólogos en la profase y de su separación en la anafase a cada uno de los polos del huso mitótico, en esta fase ya son cromosomas con dos cromátidas (Moore, 2020). Uno de los principales componentes de la primera división meiótica es la recombinación genética entre cromosomas homólogos mediante el entrecruzamiento cromosómico (intercambio de segmentos entre cromosomas). Cada célula hija de la primera división meiótica contienen un numero haploide (1n) de cromosomas, pero cada

cromosoma aun consta de dos cromátidas (2c) unidas por un centrómero. La segunda división meiótica, llamada división ecuacional, los cromosomas se alinean a lo largo de la placa ecuatorial en la metafase II, se separan las cromátidas hermanas y cada cromosoma migra a los polos opuestos del huso durante la anafase II, resultando cada célula hija haploide (1n, 1c) preparada para la fecundación (Carlson, 2020).

A veces los cromosomas no se separan durante la meiosis, proceso conocido como no disyunción, resultando gametos haploides con 24 y otro con 22 cromosomas, los que al ser fecundado por el gameto normal del sexo opuesto puede formar un embrión con 47 cromosomas (trisomía de 1 cromosoma) o bien un embrión con 45 cromosomas (monosomía de 1 cromosoma). Esta condición caracterizada por un número anormal de cromosomas se conoce como aneuploidía y produce patologías como Síndrome de Down, Síndrome de Patau, Síndrome de Klinefelter, entre otros. Otra anomalía numérica que puede suceder es que la célula del embrión presente múltiplos distintos del número haploide (por ejemplo 3n,4n, etc), lo que se puede dar por fecundación simultanea de dos espermatozoides o fallo del segundo cuerpo polar en separase del ovocito en la segunda división meiótica, este tipo de alteraciones se conocen como poliploidías y producen patologías incompatibles con la vida extrauterina. Por otro lado, los cromosomas pueden presentar alteraciones estructurales como deleciones, inversiones, duplicaciones, inserciones, entre otras. Este tipo de alteraciones

producen síndromes similares a los de las aneuploidías (McGowan-Jordan et al., 2016).

El diagnóstico prenatal de estas anomalías cromosómicas es imprescindible para ofrecer orientación a las familias y se realice una toma de decisiones informada durante el embarazo, esto permite una mejor planificación en caso de riesgos durante el parto y los que pueda presentar el neonato. Para esto se pueden utilizar métodos no invasivos como el análisis de cribado en el suero materno, donde detectan valores elevados o reducidos de alfa-fetoproteina (AFP), o bien, la visualización fetal, donde se evalúa la translucencia nucal. Si los resultados son anormales y se sospecha de aneuploidías u otros defectos del tubo neural, se procede a métodos más invasivos como el análisis de tejidos fetales o la amniocentesis, que a través del análisis del líquido amniótico permite obtener un diagnóstico más exacto y especifico (Jorde et al., 2020).

Según la guía perinatal 2015, se sospecha de anomalías cromosómicas cuando se presentan factores como translucencia nucal en la ecografía de las 11-13+6 semanas, ausencia del hueso nasal, ductus venoso con flujo anormal, quistes de plexos coroideos, factores bioquímicos alterados como AFP, beta-hCG y estriol no conjugado. Por otro lado otros factores de riesgos son la edad materna avanzada (>35 años), historial familiar de anomalías cromosómicas y resultados anormales en pruebas genéticas previas(Ministerio de Salud, 2015).

LÍQUIDO AMNIÓTICO

Para sobrevivir y crecer durante la vida intrauterina, el embrión mantiene una relación con el cuerpo de la madre, pues requiere oxígeno, nutrientes, eliminar desechos y evitar el rechazo del sistema inmune. Estos requerimientos se cumplen a través de la placenta y las membranas extraembrionarias que rodean al embrión, como lo son el saco vitelino y el amnios. Esta estructura actúa como una capsula protectora, esta se origina a partir del ectodermo de la masa celular interna en el embrión, rodea al mismo como una bolsa llena de líquido durante el embarazo, este se conoce como líquido amniótico (Carlson, 2020). En conjunto con la unidad fetoplacentaria, el líquido amniótico cumple funciones críticas en el desarrollo del feto, ya que representa una matriz para el intercambio de metabolitos, regular la temperatura y contribuye al desarrollo del feto, proporcionándole movimiento y actuando como un medio amortiguador, además de actuar como barrera frente infecciones.

Se conoce que el volumen de líquido amniótico va aumentando a medida que avanza el embarazo, como se observa en la figura 1., en la décima semana de gestación sufre un aumento considerable debido a la producción de orina fetal, en esta semana el volumen de líquido es de 30 ml, mientras que en la 20 semana de gestación es de 350 ml y entre 700 y 1000 ml en la semana 37, al final del embarazo el aporte de orina al líquido amniótico llega a ser de 500 ml diarios (Arsham et al., 2017; Queenan et al., 1972).

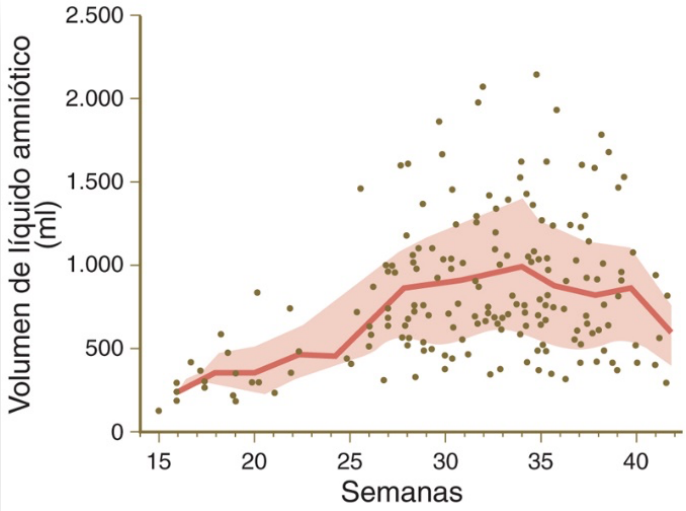


Figura 1.**Volumenes de líquido amniótico en mujeres que están en diferentes semanas de gestación.** La línea y zona sombreada representa la media ± la desviación estándar. Los puntos representan los valores atípicos (Queenan et al., 1972).

Si bien el origen y la dinámica de intercambio del líquido amniótico no han sido detallados por completo, se considera que durante las primeras semanas parte del líquido amniótico es producido por las células del amnios, pero la mayor parte corresponde a trasudado diluido del plasma materno, que llega al amnios por difusión simple a través de la membrana amniócorionica (Moore, 2020). Como la piel del feto aún no está queratinizada, esta se vuelve la vía principal de paso de agua y solutos, y el paso de líquido hístico del feto a la cavidad amniótica, por lo que se puede decir que el líquido amniótico es similar a los líquidos fetales. A partir de la semana 10, el feto es el responsable de la formación de este líquido

a través de su propio transudado, la deglución y la orina. El feto ingiere líquido amniótico, que es digerido por los aparatos respiratorios y digestivo. El líquido pasa al torrente sanguíneo fetal y los productos de desecho presentes en este atraviesan la membrana placentaria y entran en circulación materna del espacio intervelloso. Los riñones excretan el exceso de agua de la sangre fetal, y regresa al saco amniótico a través de las vías urinarias fetales(Moore, 2020; Morgan-Ortiz et al., 2015).

I. Bioquímica del líquido amniótico

La composición del líquido amitótico es muy diferente a la de todos los demás fluidos, ya sea fetal y materno, este refleja una combinación de la orina y el líquido del pulmón fetal, tiene una densidad de 1010, con un pH de 7.0 aproximadamente y está compuesto en un 99% de agua con material suspendido no disuelto, como células epiteliales fetales y sales orgánicas e inorgánicas, la mitad de los componentes orgánicos presentes corresponden a proteínas y la otra mitad la componen carbohidratos, grasas, enzimas, hormonas, entre otros. Estos componentes se modifican a medida que transcurre el embarazo, pues el feto excreta orina y meconio al liquido (Moore, 2020; Morgan-Ortiz et al., 2015).

En la tabla 1. se muestras los principales metabolitos presentes en líquido amniótico y como estos varían durante el embarazo. Se observa en el tercer trimestre una disminución de los niveles de glucosa, carnitina, aminoácidos (valina, leucina, isoleucina, alanina, metionina, tirosina y fenilalanina) y un aumento en los niveles de creatina, succinato, piruvato, colina , N,N-dimetilglicina y urocanato; los cuales están relacionados directamente con la madurez fetal (Orczyk-Pawiłowicz et al., 2016).

DIFERENCIAS DE METABOLITOS EN CUATRO PERIODOS DE EDAD GESTACIONAL				
Metabolitos	**T3 vs. T2**	**TD vs. T3**	**PP vs. T3**	**PP vs. TD**
Leucina	-52.81	29.34	7.17	-17.14
Valina	-62.29	24.84	2.54	-17.86
Isoleucina	-50.68	25.87	14.17	-9.29
Alanina	-44.60	1.92	-4.21	-6.02
Metionina	-44.41	11.91	1.02	-9.73
Tyrosina	-46.70	17.81	6.78	-9.36
Fenilalanina	-32.40	15.78	9.37	-5.54
N,N- dimetilglicina	55.26	-1.89	-3.54	-1.68
Carnitina	-44.37	-2.00	-17.65	-15.97
Creatinina	84.92	-5.84	1.99	8.32
Citrato	1.69	7.23	-26.18	-31.16
Succionato	114.06	-0.57	-11.19	-10.68
Piruvato	238.48	-22.64	-36.35	-17.74
AU 2	304.66	-8.97	-9.95	-1.08
Lac/Pir	-72.34	20.38	42.56	18.42
Urocanato	672.58	7.19	15.23	7.50
Glucosa	-50.24	24.23	-13.42	-30.31
Colina	32.71	0.84	11.23	10.31

Tabla I. Diferencias de metabolitos (expresados en porcentaje) entre los cuatro periodos de edad gestacional. T2, segundo trimestre; T3, tercer trimestre; PP, embarazo prologado; TD, momento del parto. (Orczyk-Pawiłowicz et al., 2016)

El líquido amniótico está compuesto de una fase liquida y componente celular, separables por centrifugación. Las células forman un pellet, quedando un líquido de color pajizo, con características bioquímicas que se pueden evaluar con tira reactiva para diferenciar de la orina. El líquido amniótico es alcalino y positivo para glucosa y proteínas, además el sobrenadante se utiliza para estudios adicionales como alfafetoproteína (AFP), acetilcolinesterasa para determinar defectos del tubo neural abierto en el feto (Arsham et al., 2017).

El líquido amniótico es utilizado para el diagnóstico diferentes patologías prenatales pues contiene los productos de excreción del feto, se pueden realizar estudios sobre sistemas enzimáticos fetales, aminoácidos y hormonas. Además, se pueden hacer estudios celulares para la detección y cuantificación de células presentes en el líquido amniótico para así diagnosticar el sexo del feto y detectar anomalías cromosómicas fetales. Por ejemplo, la presencia de concentraciones elevadas de alfafetoproteína en el líquido amniótico se asocia con defectos graves en el desarrollo del tubo neural, mientras que los niveles bajos de alfafetoproteína puede indicar anomalías cromosómicas como la trisomía del par 21 (Arsham et al., 2017; Jorde et al., 2020).

II.- Células en líquido amniótico

Cuando se cultiva el sedimento celular del líquido amniótico se pueden diferenciar al menos 3 tipos celulares, como se observa en la figura 2., los que difieren en morfología, potencial de crecimiento y adherencia (De Coppi et al., 2007). Estas pueden ser:

- Amnióticos (AF), células específicas del líquido amniótico, predominan en la mayoría de los cultivos y comprende células del tracto urinario, gastroinstestinal y del amnios. Estas células se caracterizan además por adherirse y formar colonias durante el cultivo.
- Fibroblastos (F), células del tejido fibroso conectivo y dérmico, se originan a partir del tejido mesenquimal. Se caracterizan por adherirse al *flask* de cultivo, tener mayor potencial de crecimiento que los amniócitos.
- Células epitelioides, células de la piel y de orina fetal. Estas no se adhieren al *flask* de cultivo y están presentes al inicio del cultivo disminuyendo a lo largo de este. Se caracterizan por proliferar más lentamente, tener una vida media más corta que los amniócitos, y resistir el subcultivo luego de la tripsinización (Arsham et al., 2017; Ochiai et al., 2018).

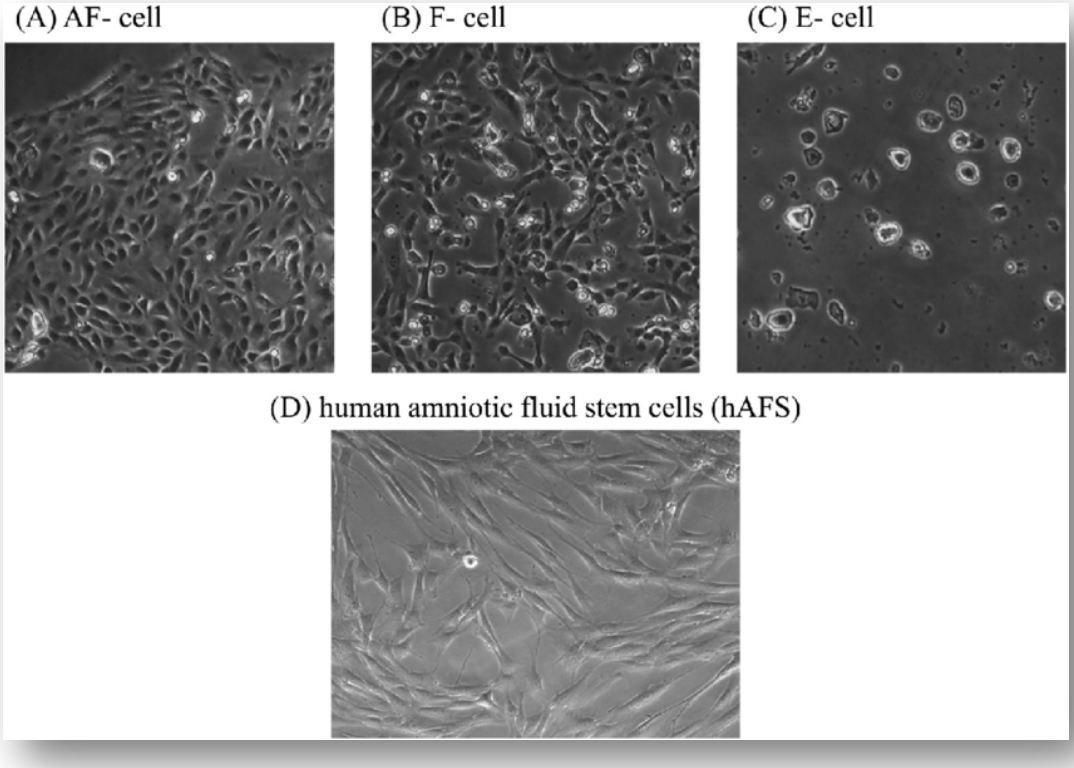


Figura 2. Características morfológicas de las células del líquido amniótico.(A) células tipo AF específicas del líquido amniótico, (B) células fibroblásticas tipo F, (C) células epiteloides tipo E y (D) líquido amniótico humano células madre (hAFS).(Ochiai et al., 2018).

DIAGNOSTICO CITOGENÉTICO A PARTIR DE LÍQUIDO AMNIÓTICO

El uso de líquido amniótico para el diagnóstico citogenético fetal fue descrito por Steele y Breg en 1966, sus estudios demostraron por primera vez la posibilidad de realizar análisis cromosómico en este material (Steele & Breg, 1966); posteriormente Jacobson y Barter reportaron el primer diagnóstico prenatal de anomalía cromosómica (Jacobson & Barter, 1967). En los años y siguientes se sigue empleando para informar los diagnósticos prenatales en una amplia variedad de anomalías cromosómicas y metabólicas.

Para el estudio citogenético se requiere de células en división activa, cromosomas visibles en metafase, por lo que se estudian en tejidos que se dividen espontáneamente o en células estimuladas para que proliferen en cultivo (Gersen & Keagle, 2013).

El procedimiento para estudio citogenético incluye:

I.- Recolección e identificación de muestra.

II.- Preparación de cultivo.

III.- Manipulación celular.

IV.- Bandeo.

V.- Análisis cromosómico

I.- Recolección e identificación de muestra

El éxito del análisis cromosómico depende mucho de la recolección y manipulación de la muestra, pues para el cultivo celular se requieren células vivas con capacidad proliferativa, lo que se va a ver directamente relacionado con la calidad de las metafases resultantes. La recolección de la muestra se realiza mediante el proceso de amniocentesis (Moore, 2020). La amniocentesis es un procedimiento invasivo que se realiza durante el segundo trimestre del embarazo y consiste en la introducción de una aguja espinal a través del abdomen, guiada por ecografía, para obtener una muestra del líquido amniótico que envuelve al feto y que contiene células de origen fetal(Parra-Saavedra et al., 2014). En este procedimiento se extraen entre 20-30 ml de líquido amniótico en un recipiente estéril y debidamente rotulado. La muestra obtenida se somete a centrifugación para separar las células, que se utilizan para análisis de biología molecular y cariotipo, y el sobrenadante, que se utiliza para evaluar metabolismo, defectos del tubo neuronal, isoinmunización y maduración fetal (Göktaş & Ayaz, 2020; Steele & Breg, 1966).

II.- Preparación del cultivo celular

Al llegar la muestra al laboratorio se deben evaluar su aspecto, color y volumen. Posteriormente, la muestra se debe centrifugar a baja velocidad para recuperar las células viables en el sedimento. Toda muestra para análisis cromosómico se cultiva en medios acuosos, que proporcionan una base de sales y glucosa esenciales para controlar el pH, presión osmótica, además de otorgarles la energía necesaria para el crecimiento. El cultivo se realiza en *flasks*, los que se mantienen en una incubadora con aire y humedad para evitar la evaporación del medio en los sistemas abiertos. Estudios han confirmado que los amniocitos crecen más rápido en un sistema abierto, con un estricto control del pH, CO_2 y temperatura. Se ha demostrado que las células cultivadas a partir de líquido amniótico crecen mejor a 37.5°C y 5% de CO_2, si disminuye la temperatura la tasa de crecimiento se ralentiza, lo cual influye en el tiempo que se retiran los cultivos de la incubadora ya sea para examinar o realizar trabajos de mantención del cultivo (Barraza et al., 2021) . Para un crecimiento celular optimo siempre será mejor trabajar con un medio definido específicamente para el cultivo de células de líquido amniótico, tales como AmnioMAX™, o bien, BIO-AMF™. Los medios de cultivo comerciales contienen: i) Factores de crecimiento y antibióticos y fungicidas. El tiempo para la primera revisión del cultivo va a depender del método de cultivo, procesamiento y el número de cultivos establecidos, en general el crecimiento debiera ser visible a los 4-5 días de incubación.

III. Manipulación celular

La selección del momento de cosecha en los cultivos primarios se basa en la observación de células redondeadas, presumiblemente en fase mitótica. Para estimular la división celular se realiza un cambio de medio 24 horas previas a la cosecha. Durante la cosecha se utiliza:

1.- un inhibidor del huso mitótico, con el fin de detener la división celular en la metafase durante la última fase de incubación, tal como N-deacetyl-N-methyl-colchicine (Colcemid® Demecolcina). Se sabe que una concentración más baja y durante el menor tiempo permite asegurar la obtención de cromosomas de mayor longitud.

2.- Bromuro de etidio, que actúa como agente intercalante, del ADN que se acopla con la contracción de la cromatina para lograr una mayor elongación cromosómica.

3.- tripsina-EDTA, se utiliza para favorecer la dispersión enzimática de las células de los cultivos en *flask.*

4.- KCl hipotónico y/o citrato de sodio; se usa para la obtención de metafases óptimas para su estudio, abiertas con bajo número de cromosomas sobrepuestos y fáciles de contar, esta puede ser realizada a temperatura ambiente o calentado a 37-37,5 °C, para lograr la hinchazón de las células.

4.- Fijador, se utiliza como fijador metanol y ácido acético, en una proporción de 3:1 respectivamente, para preparar la cromatina y la membrana nuclear para los pasos finales de la preparación y tinción del portaobjetos. La humedad y la

temperatura desempeñan un papel en la obtención de preparaciones en metafase bien distribuidas. Un nivel de humedad de 40-50% es un buen punto de partida a temperatura ambiente.

El número de portaobjetos que se requiere también dependerá de los métodos utilizados para el cultivo y recolección. Para asegurar un examen completo de los cultivos, se deben preparar al menos dos portaobjetos por flask. Si los portaobjetos tienen una cantidad insuficiente de metafases, se deberán realizar más a partir del sedimento celular o se necesitará una nueva cosecha. Si hay sospecha de mosaicismo, será necesario analizar cultivos y portaobjetos adicionales.

IV. **Bandeo**

Si bien existen diversos métodos para describir variantes cromosómicas con anormalidades estructurales, como el bandeo C, tinción NOR, bandas Q, Entre otros. El bandeo G es el método preferido para el análisis de cariotipos de rutina. En este los cromosomas son tratados con tripsina, que desnaturaliza su contenido proteico y, a continuación, se tiñen con colorante de unión a DNA (Giemsa), que da a cada cromosoma un patrón de bandas claras y oscuras característico y reproducible. El bandeo G generalmente proporciona un análisis cromosómico de alta calidad, con unas 400-500 bandas por conjunto haploide. Cada banda corresponde a una media de 6.000-8.000 kb de DNA (Turnpenny et al., 2022).

V.**Análisis cromosómico**

Para cultivos en *flask* de líquido amniótico, se deben contar los cromosomas de al menos 20 células, distribuidas de manera equitativa entre al menos dos *flasks* y portaobjetos distintos. Se deben analizar completamente al menos cinco células de al menos dos cultivos establecidos de forma independiente. Además, se deben generar e imprimir al menos dos cariogramas. En caso de mosaicismo, se debe crear al menos un cariograma para cada línea celular (Arsham et al., 2017).

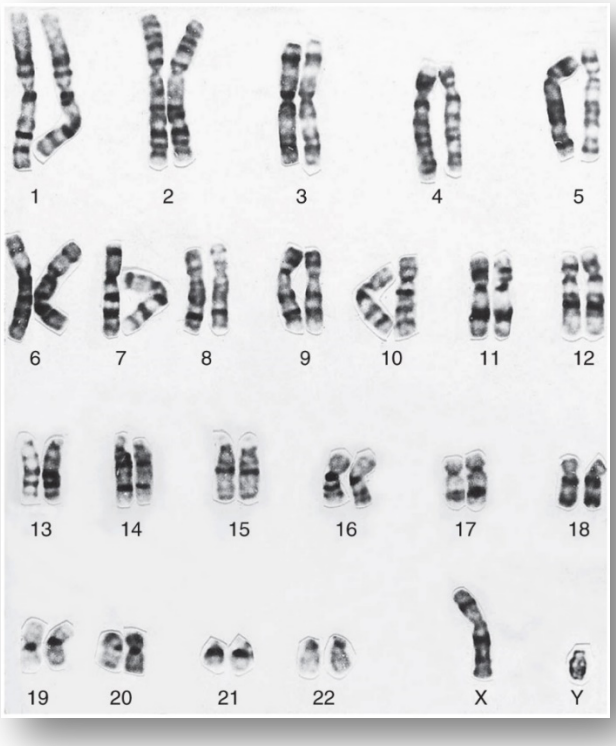


Figura 3. Cariotipo masculino normal visualizado con bandeo G (Turnpenny et al., 2022)

RELEVANCIA CLÍNICA

El diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas oportuno es fundamental para la salud publica chilena, ya que proporciona información esencial para la toma de decisiones médicas y personales durante el embarazo. Un diagnóstico prenatal oportuno y preciso va a permitir una mayor prevención de complicaciones médicas, toma de decisiones informadas sobre el curso del embarazo, tratamiento médico necesario y/o el parto, además va a permitir un acceso a servicios de salud adecuados en base a las complicaciones que podría presentar el diagnóstico de anomalías cromosómicas en el feto, por otra parte el diagnóstico oportuno permite reducir el impacto emocional y social en los padres al brindarles la oportunidad de preparase emocionalmente frente a cualquier resultado y decisión acompañados siempre de profesionales de la salud.

Las anomalías cromosómicas constituyen la principal causa conocida de aborto espontáneo, se estima que entre el 10 y 20% de las concepciones presentan una anomalía cromosómica, y que al menos el 95% de las concepciones cromosómicamente anormales se pierden antes del nacimiento. Los estudios de los cariotipos de los abortos indican que en torno al 50% de las anomalías son trisomías; el 20%, monosomías, y el 15%, triploidías. El resto consisten en tetraploidías y anomalías estructurales. Algunas anomalías cromosómicas que son frecuentes en la concepción rara vez sobreviven hasta el nacimiento. Por ejemplo, se cree que la trisomía 16 es la más común en la

concepción, pero nunca se da en nacidos vivos a menos que haya mosaicismo (Jorde et al., 2020).

En Chile, existe la ley n° 21.030 que regula la despenalización de la interrupción voluntaria del embarazo en tres causales (Ley IVE), según el artículo 1 del código sanitario dice que: “Mediando la voluntad de la mujer, se autoriza la interrupción de su embarazo por un médico cirujano, en los términos regulados en los artículos siguientes, cuando: 1) La mujer se encuentre en riesgo vital, de modo que la interrupción del embarazo evite un peligro para su vida. 2) El embrión o feto padezca una patología congénita adquirida o genética, incompatible con la vida extrauterina independiente, en todo caso de carácter letal. 3) Sea resultado de una violación, siempre que no hayan transcurrido más de doce semanas de gestación. Tratándose de una niña menor de 14 años, la interrupción del embarazo podrá realizarse siempre que no hayan transcurrido más de catorce semanas de gestación.” (Ley 21030, 2017)

Para la segunda causal, en el caso de anomalías cromosómicas detectadas durante el embarazo, especialmente aquellas que afectan la viabilidad del feto, la Ley IVE proporciona un marco legal para que los padres tomen decisiones sobre la continuación o interrupción del embarazo de acuerdo con sus circunstancias y creencias personales, siempre bajo la orientación médica y el apoyo adecuado.

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La ausencia de un protocolo estandarizado de cultivo de líquido amniótico en el Laboratorio Clínico del Hospital Regional Guillermo Grant Benavente, para el análisis cromosómico, no solo obstaculiza la implementación efectiva de este servicio esencial para diagnóstico, sino también conlleva a la dependencia de servicios externos costosos, lo cual impacta negativamente en la calidad de atención de los pacientes y representa una carga financiera innecesaria para el centro de salud.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Estandarizar en el laboratorio de Genética del Hospital Guillermo Grant Benavente un protocolo de cultivo celular de líquido amnióticos para análisis cromosómico.

Objetivos específicos:

1. Realizar cultivo primario de amniocitos a partir de muestras con sospecha de anomalía cromosómica.
2. Optimizar protocolo de cosecha, fijación y goteo de amniocitos a partir del cultivo celular.
3. Comparar los resultados obtenidos en muestras de gestantes con sospecha de anomalías cromosómica con los resultados, la misma muestra del referente local Laboratorio clínico Sanatorio Alemán.
4. Confeccionar un “Manual de protocolo de cultivo de líquido amniótico para análisis cromosómico” y sus registros asociados.

METODOLOGÍA

1. Obtención del cultivo primario de amniocitos a partir de muestras de líquido amniótico de embarazadas.

Las muestras biológicas utilizadas en este estudio fueron tomadas sólo con el propósito de estudio de cariotipo. Los resultados obtenidos y la identidad del donante fueron mantenidos en absoluta reserva y confidencialidad, siendo las muestras eliminadas posterior a la emisión del informe, tal como se estipula en el anexo 1 con la certificación de la recopilación de datos dentro del Laboratorio Clínico del hospital regional Guillermo Grant Benavente. La siguiente metodología se basó en el protocolo de cultivo de líquido amniótico presente en el “Manual de procedimientos, unidad de Genética” Servicio Clínico Anatomía Patológica Hospital Base Valdivia siguiendo el flujograma presente en el anexo 2.

1.1. **Descripción de población y muestra**

Se trabajó con muestras obtenidas mediante amniocentesis de 13 mujeres de menos de 30 semanas de gestación, periodo en el cual se sospecha de presencia de anomalía cromosómica, durante el segundo semestre del año 2023 en el HGGB. Las muestras fueron tomadas por el médico tratante en 2 frascos estériles, el primero fue enviado para su análisis correspondiente al referente local Laboratorio Clínico Sanatorio Alemán; y el segundo se utilizó para la estandarización en el Laboratorio de Genética del HGGB.

Las muestras se recibieron en forma anónima, sólo se registraron datos, tales como: número, edad gestacional, volumen, aspecto y color.

1.2. **Siembra de muestras**

Para la obtención del cultivo primario se utilizó como guía el “manual de procedimientos” HBV, adaptado a las condiciones del Laboratorio de genética HGGB. Para la siembra se consideró 1 *flask* por cada 5 ml de muestra.

Se sembraron 5 ml de muestra directamente con igual cantidad de medio de cultivo BioAMF®, el resto de la muestra fue traspasada a tubos estériles de 15 ml con tapa rosca y fueron centrifugadas a 800 rpm por 10 minutos. Se extrajo el sobrenadante suavemente con pipeta estéril, dejando aproximadamente 0,5 ml para no alterar el pellet. Posteriormente, se añadieron entre 3 – 4 mL de medio de cultivo BioAMF®, luego se agitó suavemente y finalmente se repartió la muestra en los *flasks* de cultivo, estos fueron dejados en estufa a 37 ºC, con 95% de humedad relativa (RH) y 5% de CO_2, en posición horizontal sobre superficie plana por 6 días. Al sexto día, el medio de cultivo fue cambiado en los flasks que evidenciaron crecimiento celular, por el contrario, los que no presentaron crecimiento celular suficiente, se mantuvieron en la estufa de cultivo hasta el séptimo día.

Para cambiar el medio, éste se retiró por aspiración con pipeta estéril y se añadieron 3 mL de medio fresco con una pipeta estéril, sin tocar las paredes. A partir del primer cambio de medio, éste se reemplazó 3 veces a la semana, hasta observar un crecimiento celular adecuado (confluencia mayor a 70%), luego se inició el proceso de cosecha y subcultivo.

2. **Optimización protocolo de cosecha, fijación y goteo de amniocitos a partir del cultivo:**

Cosecha de muestras.

El día previo a la cosecha se cambió el medio, y se dejó en estufa. Posteriormente, se agregaron 50 μl de Colcemid®, mezclado suavemente y se mantuvo a 37 ºC durante 2,5 hrs. A las muestras que no evidenciaron una cantidad suficiente de células redondeadas (Fase M del ciclo), se les retiró el medio con suavidad, se les añadió medio de cultivo fresco y se postergó la cosecha para el día siguiente. A las muestras que sí evidenciaron una cantidad suficiente de celulas redondeadas (fase M del ciclo), se les retiró el medio con colcemid y luego se realizaron 2 lavados con 3 ml de EDTA a 37°C. Se agregaron al flask 5 ml de tripsina-EDTA a 37°C, asegurando que la superficie se cubra totalmente, se incubaron por 5 minutos a 37°C, bajo campana**,** con platina caliente, golpeando suavemente el flask varias veces, mientras se está incubando, favoreciendo el desprendimiento de las células. Si al observar en microscopio invertido, no hubieron suficientes células desprendidas, la incubación fue prolongada con tripsina por 2 minutos adicionales. Finalmente, se detuvo el proceso agregando el medio de cultivo que había sido retirado. Este proceso fue realizado de manera rápida. Por último, las muestras fueron centrifugadas a 800 rpm por 5 minutos, se les extrajo el sobrenadante y se añadieron 0,5-1 ml de solución hipotónica KCl 0.05 M a 37 ºC, por goteo suave hasta un aforo de 6 ml, se dejó actuar durante 15 minutos en baño termorregulado

y se centrifugaron a 800 rpm por 8 minutos, se les extrajo el sobrenadante y se agregó 1 ml de fijador Carnoy (Metanol 3: 1 Ac. Acetico) recién preparado, frío y añadido lentamente. Posteriormente se resuspendió el pellet de cada tubo con pipeteo corto, hasta un aforo de 6 ml, se homogeneizó por inversión suave del tubo y se dejó actuar por 30 minutos, a -20°C. Luego, las muestras se centrifugaron a 800 rpm por 5 minutos, se les eliminó el sobrenadante, se les agregó fijador Carnoy y fueron agitadas. Esta etapa fue repetida dos veces para eliminar sobrenadante dejando aproximadamente 1 ml.

Las muestras fueron goteadas en portaobjetos limpios, sin grasa y fríos, identificados con número de examen y tubo. Paralelamente, se evaluó que el goteo fue correcto en un microscopio de contraste de fase. Finalmente, las muestras fueron secadas al aire y guardadas toda la noche a 37ºC hasta su tinción.

Subcultivo

Para el subcultivo, a las células desprendidas del flask con tripsina, se le adicionaron 3 ml de medio de cultivo y fueron dejadas nuevamente en la estufa.

A las células del tipo Fibroblastos se les dejó continuar su crecimiento y el proceso de evaluación y cambio de medio fue reiniciado tres veces por semana (Barraza et al., 2021).

2.1. Estandarización tiempo de Colcemid®

Se modificó el protocolo anterior (HBV) y se emplearon 50 µl, 75 µl, 100 µl y 125 µl de Colcemid® a 10 µg/ml. Se trabajaron en cuadruplicado por: 2 hrs., 2.5 hrs., 3 hrs. y 3.5 hrs. El tiempo óptimo de incubación fue aquel en donde se presentaron la mayor cantidad de metafases por portaobjeto.

2.2. Uso de Bromuro de etidio

Se modificó el protocolo agregando Bromuro de etidio como paso previo a la cosecha, este actúa como agente intercalante que permite visualizar los cromosomas más alargados. Este protocolo fue basado en 5.2 y 5.3 de The ATG Cytogenetic Laboratory Manual (Arsham et al., 2017).

Se trabajó con Bromuro de etidio en concentración 500 µg/ml y se hicieron pruebas de volumen. Se trabajó en cuadruplicado con los siguientes volúmenes: 20 µl, 26 µl, 33 µl y 45 µl de Bromuro de etidio 500 µg/ml. Como resultado óptimo se consideró aquel que presentó la mayor resolución de banda y que ésta sea superior a 550 bandas.

3. Comparar resultados obtenidos en muestras de gestantes con sospecha de anomalías cromosómica con los resultados del referente local Laboratorio clínico Sanatorio Alemán.

Las muestras fueron analizadas en paralelo en el Laboratorio clínico Sanatorio Alemán y los resultados obtenidos del análisis cromosómico fueron comparados con los obtenidos en HGGB. Con esto se evaluó reproducibilidad de la técnica.

La identificación de muestras se realizó utilizando un número designado en el laboratorio, por lo que no se trabajó con información personal de las gestantes. El análisis se realizó con el apoyo del software GenASIs.

La concordancia de los resultados obtenidos en comparación con los del referente local, se evaluó mediante el índice Kappa de Cohen, que contribuyó a garantizar la calidad y la fiabilidad de los diagnósticos cromosómicos.

4. Confeccionar instructivo y sus registros asociados

Se creó un documento escrito en base a los requerimientos del Laboratorio clínico HGGB denominado; “Manual de protocolo de cultivo de líquido amniótico para análisis cromosómico”. Éste quedó a disposicion a la sección de Genética del laboratorio clínico del Hospital Guillermo Grant Benavente para futuros procedimiento de análisis cromosómicos a partir de líquido amniótico.

RESULTADOS

1. Obtención del cultivo primario de amniocitos a partir de muestras de líquido amniótico de embarazadas.

Para la obtención del cultivo primario se consideró 1 flask por cada 5 mL de muestra, el cual fue cultivado con 3 mL de medio de cultivo Bio-AMF®, realizando el primer cambio de medio el día 7 de cultivo. Se determinó el crecimiento celular optimo como aquel que presenta una confluencia al ojo del operador igual o superior al 70% obteniéndose este resultado para 9 de las 10 muestras analizadas, con una tasa de éxito del 92.3% para la obtención de cultivo primario a partir de muestras de líquido amniótico.

En la figura 4C. se observa la evolución del cultivo primario de amniocitos, la confluencia esperada para el momento de la cosecha de la muestra, por otro lado en la figura 4D se observa el cultivo 7 dias post la incubación con Colcemid®, observandose las células redondeadas detenidas en metafase.

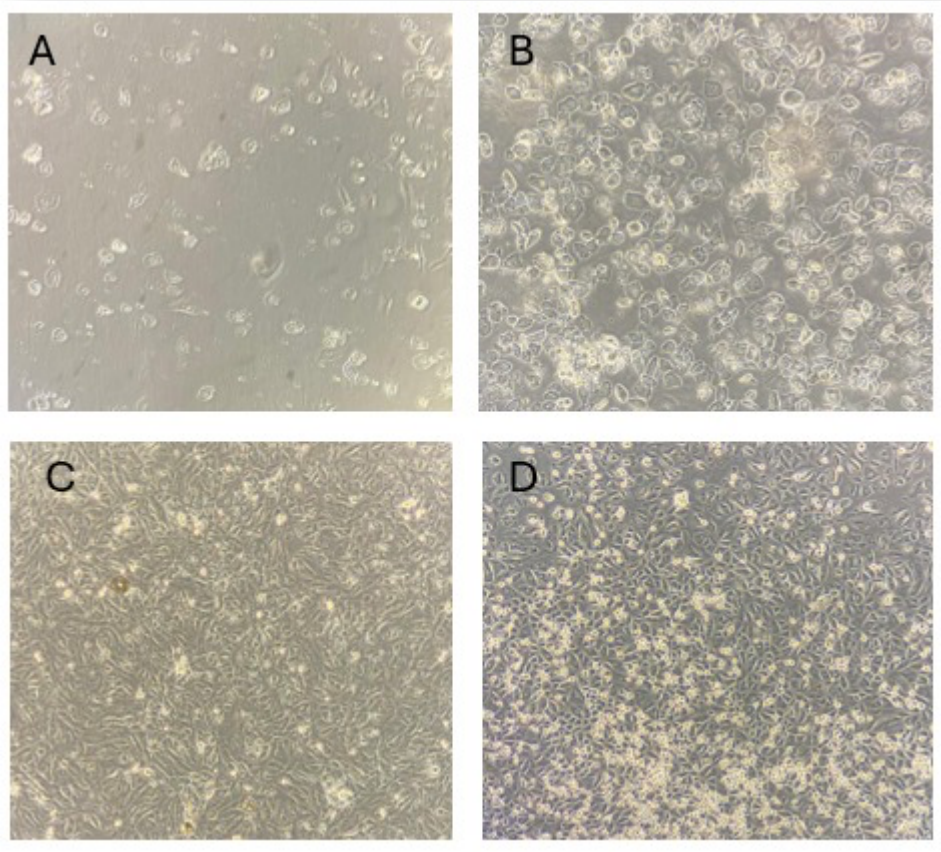


Figura 4. Imágenes cultivo primario de amniocitos. A) Día 0, objetivo 4X. **B)** Día 3, Objetivo 4X. **C)** Día 6, objetivo 4X. **D)** Día 7 post Colcemid, objetivo 4X**.**

2. Optimización protocolo de cosecha, fijación y goteo de amniocitos a partir del cultivo:

2.1. Optimización tiempo y concentración de Colcemid®

En la tabla II se observa para cada tiempo de incubación de Colcemid®, el resultado asociado en función del número de metafases por portaobjeto para una sola muestra, donde el tiempo que obtuvo un mejor desempeño y/o mayor número de metafases por portaobjeto fue el de 2.5 horas con un promedio de 122 metafases por portaobjeto, como se observa en la figura 5.

Tabla II. Optimización tiempo de Colcemid® 0.33 µg/mL (n=4)

Tiempo (horas)	N° metafases Promedio
2	92.7 ± 6
2.5	122 ± 3
3	69.5 ± 4
3.5	77.5 ± 3

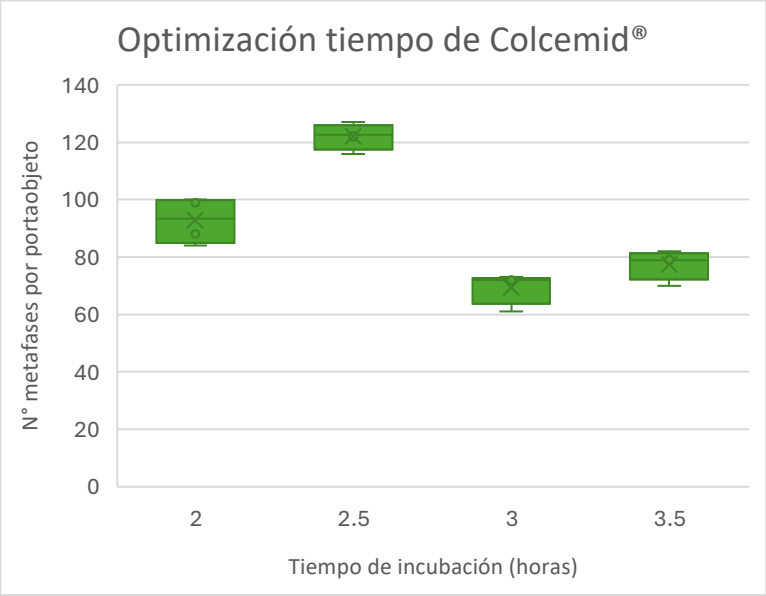


Figura 5. optimización del tiempo de incubación de Colcemid® en función del número de metafases por portaobjeto.

En la tabla III. se observa para cada concentración de Colcemid® incubado por 2.5 horas, el resultado asociado en función del número de metafases por portaobjeto para una sola muestra, donde la concentración que obtuvo un mejor desempeño y/o mayor número de metafases por portaobjeto fue la de 0.33 µg/mL con un promedio de 125.75 metafases por portaobjeto, como se observa en la figura 6.

Tabla III. Optimización Volumen de Colcemid® 2.5 horas (n= 4)

Concentración [µg/mL]	N° metafases Promedio
0.16	97.5 ± 7
0.25	83.5 ± 7
0.33	125.7 ± 4
0.42	84.5 ± 7

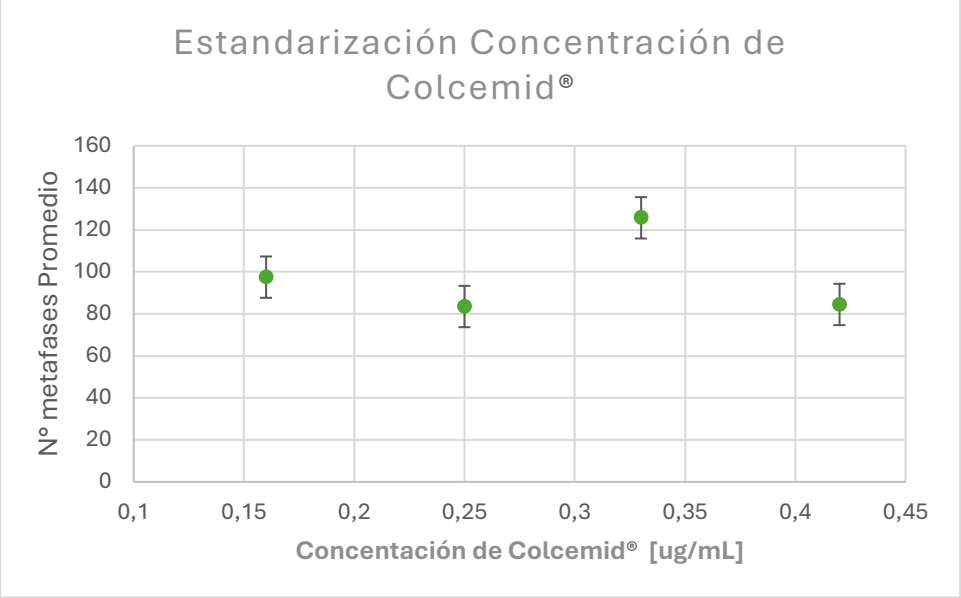


Figura 6. Optimización concentración de Colcemid® en función del número de metafases por portaobjeto.

2.2. Uso de Bromuro de etidio

En la figura 7 se observa que la concentración de 5.5 µg/mL tiene una distribución más alta en los resultados de evaluación, con un resultado promedio alto y relativamente consistente, mientras que las concentraciones de 4.3 y 7.5 µg/mL tienen resultados más variables.

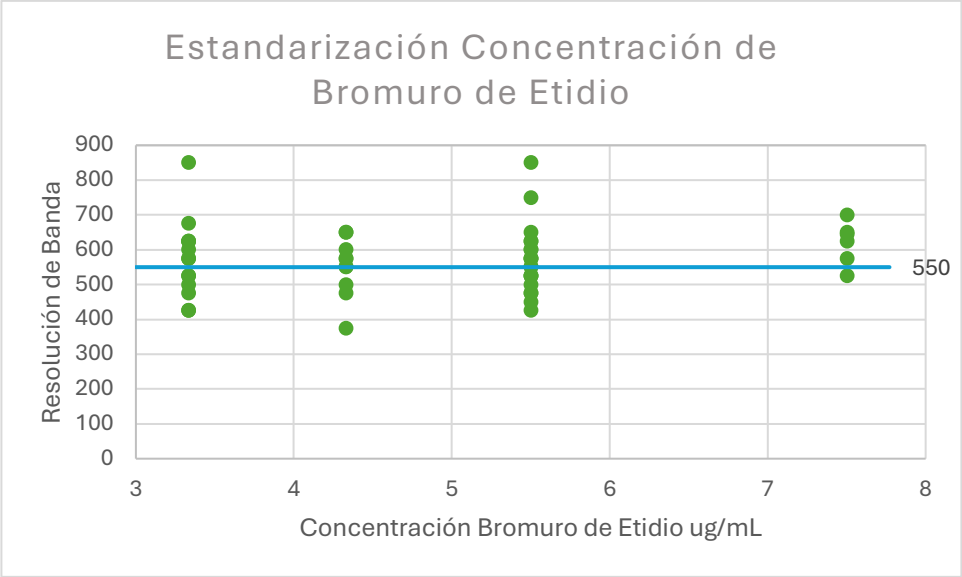


Figura 7. Gráfico de optimización concentración de bromuro de etidio en función de la resolución de banda de cada metafase analizada.

En la figura 8 se observa que el número de metafases aumenta con el uso de bromuro de etidio en un rango de concentración del mismo.

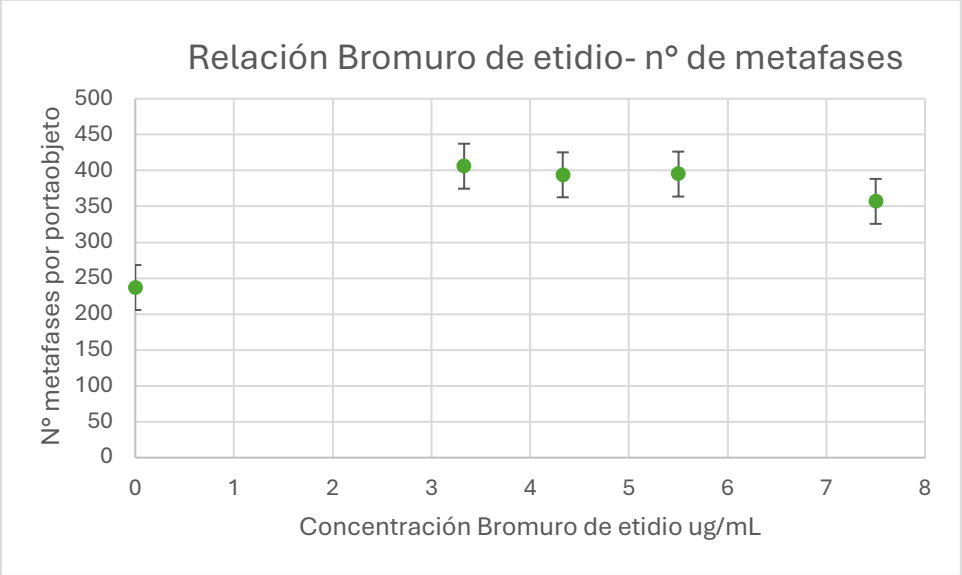


Figura 8. Gráfico de Relación concentración de bromuro de etidio en función del número de metafases por portaobjeto.

3. Comparación de los resultados obtenidos en muestras de gestantes con sospecha de anomalías cromosómica con los resultados del referente local Laboratorio clínico Sanatorio Alemán.

Se compararon los resultados obtenidos con el referente local Laboratorio Clínico Sanatorio Alemán, en una tabla simple de comparación de resultados. En la tabla III se observa que los resultados presentan un 100% de correlación. La muestra PLA-16 no presento crecimiento celular óptimo para ser analizado en el laboratorio clínico HGGB, por lo que no se consideró para el análisis estadístico.

Tabla IV. Correlación Clínica Sanatorio Alemán y Laboratorio de Genética HGGB

N° Interno	Resultado CSA	Resultado HGGB	Correlación
PLA-11	46,XY	46,XY	✓
PLA-12	46,XX	46,XX	✓
PLA-13	47,XX,+18	47,XX,+18	✓
PLA-14	46,XY	46,XY	✓
PLA-15	46,XY	46,XY	✓
PLA-17	46,XY	46,XY	✓
PLA-18	46,XY	46,XY	✓
PLA-19	46,XY	46,XY	✓
PLA-20	46,XY	46,XY	✓
PLA-21	47,XX,+13	47,XX,+13	✓
PLA-22	47,XX,+21	47,XX,+21	✓
PLA-23	46,XY	46,XY	✓

Se calculo el índice Kappa de Cohen para evaluar la concordancia y fiabilidad de los resultados obtenidos en el Laboratorio de Genética del HGGB; se realizó una tabla de frecuencia de resultados patológicos y no patológicos de ambos laboratorios. El valor índice kappa de cohen indica una concordancia muy buena. Con un porcentaje de concordancia del 100%.

Tabla V. Tabla de concordancia Laboratorio de Genética HGGB vs Laboratorio clínico Sanatorio Alemán

		Laboratorio clínico Sanatorio Alemán	
Laboratorio de Genética HGGB		Patológico	No Patológico
	Patológico	3	0
	No Patológico	0	9

$$P° = \frac{casos\ concordantes}{total\ de\ casos} = \frac{12}{12} = 1$$

$$Pe = \frac{3}{12} x \frac{3}{12} + \frac{9}{12} x \frac{9}{12} = 0.625$$

$$k = \frac{P° - Pe}{1 - Pe} = \frac{1 - 0.625}{1 - 0.625} = 1$$

$$P°\ \% = \frac{casos\ concordantes}{total\ de\ casos}\ x\ 100 = \frac{12}{12} x\ 100 = 100\%$$

4. Confeccionar instructivo y sus registros asociados

El instructivo “Manual de protocolo de cultivo de líquido amniótico para análisis cromosómico” (Anexo 4) se realizó con el fin de optimizar y asegurar el correcto desempeño en el diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas a partir de líquido amniótico La estructura a considerar se definió en base a:

1. OBJETIVO
2. CAMPO DE APLICACIÓN Y ALCANCE
3. FUNDAMENTO
4. RESPONSABLES DE SU APLICACIÓN
5. RESPONSABLE DE LA SUPERVICIÓN
6. DISTRIBUCIÓN
7. DEFINICIONES
8. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS
9. PROTOCOLO DE CULTIVO DE LIQUIDO AMNIOTICO
    - 9.1. ETAPA PRE-ANALITICA
    - 9.2. ETAPA ANALITICA
    - 9.3. ETAPA POST-ANALITICA
10. DOCUMENTOS ASOCIADOS
11. REFERENCIAS
12. ANEXOS

DISCUSIÓN

La gametogénesis es el proceso en el que las células germinales masculinas y femeninas experimentan una serie de cambios que las convierten tanto genética como morfológicamente en gametos maduros preparados para la fecundación. Durante este proceso se reduce la cantidad de cromosomas y el material genético puede alterarse, lo que provoca diversas anomalías cromosómicas numéricas y estructurales(Carlson, 2020; Moore, 2020). En este contexto, el diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas oportuno es fundamental para la salud publica chilena, ya que proporciona información esencial para la toma de decisiones médicas y personales durante el embarazo. Un diagnóstico prenatal oportuno y preciso va a permitir una mayor prevención de complicaciones médicas, toma de decisiones informadas sobre el curso del embarazo, tratamiento médico necesario y/o el parto, además va a permitir un acceso a servicios de salud adecuados en base a las complicaciones que podría presentar el diagnostico de anomalías cromosómicas del feto(Jorde et al., 2020; Ley 21030, 2017).

En el laboratorio clínico del HGGB no se implementaba la técnica de cariograma en líquido amniótico para diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas, si no que se realizaba por compra de servicio al referente local Laboratorio clínico Sanatorio Alemán; es por esto que se realizó la estandarización de un protocolo

de cultivo para análisis cromosómico con el objetivo de implementar esta técnica en el laboratorio.

Para el estudio citogenético se requiere de células en división activa, los cromosomas solo son visibles en metafase, por lo que se estudian en tejidos que se dividen espontáneamente o en células estimuladas para que proliferen en cultivo. El procedimiento para estudio citogenético incluye recolección e identificación de muestra, preparación de cultivo, manipulación celular, bandeo y análisis cromosómico (Gersen & Keagle, 2013)

El diagnóstico prenatal de estas anomalías cromosómicas se realiza principalmente a través del análisis genético de amniocitos provenientes del líquido amniótico. La fase preanalítica, correcta toma de muestra y condiciones de traslado, es esencial para que en el laboratorio se obtenga un pellet con células viables y no contaminado con células sanguíneas maternas o de otros tejidos.

Estudios han confirmado que los amniocitos crecen más rápido en un sistema abierto, con un estricto control del pH, CO_2 y temperatura. Se ha demostrado que las células cultivadas a partir de líquido amniótico crecen mejor a 37.5°C, si disminuye la temperatura la tasa de crecimiento se ralentiza, lo cual influye en el tiempo que se retiran los cultivos de la incubadora ya sea para examinar o realizar trabajos de mantención del cultivo (Barraza et al., 2021) . Para un crecimiento celular optimo siempre será mejor trabajar con un medio definido

específicamente para el cultivo de células de líquido amniótico, tales como AmnioMAX^{TM}, o bien, BIO-AMF^{TM} (Arsham et al., 2017).

En el laboratorio de genética del HGGB se trabajó con el medio de cultivo Bio-AMF^{TM}. En base a las recomendaciones del proveedor y las fuentes utilizadas para establecer el protocolo de cultivo, se estableció que la muestra al ser recepcionada se someterá a centrifugación y el pellet será sembrado con el medio de cultivo a 37°C en los *flasks* correspondientes, para ser incubados en la estufa asegurando condiciones de 37°C, 5% CO2 y 95% de humedad relativa durante 6-7 días. Es importante mantener las condiciones de bioseguridad y esterilidad al trabajar con las muestra evitando riesgos de contaminación(Barraza et al., 2021; Biological, 2015).

Para la estandarización del protocolo de cultivo de amniócitos se trabajó con 13 muestras, de las cuales 1 no presento crecimiento celular suficiente para ser analizada en el laboratorio de genética del HGGB, correspondiente al 7.7% de la tasa de fracaso en el cultivo celular, por otra parte esta muestra si presentó crecimiento y se obtuvo un resultado, no patológico, en el referente local Laboratorio clínico Sanatorio Alemán. El fracaso en el crecimiento celular se presenta entre el 0.2 y el 2% de los casos (Barraza et al., 2021) el principal factor que puede producir el fracaso en el crecimiento celular es la contaminación bacteriana, otros factores tales como contaminación por hongos, micoplasmas, virus, así como problemas técnicos relacionados con la preparación de los

medios de cultivo, la incubación o la manipulación de las muestras(Baust et al., 2017).

Algunos cultivos crecen mal a pesar de ser tratados de forma idéntica a los que si tienen un buen desarrollo, esto se puede dar por un bajo número de células viables por mililitro inicialmente, el volumen de muestra, las condiciones de recolección y transporte, estrés por manipulación y/o cambios en el microambiente celular. Algunos con crecimiento deficiente aceleran su crecimiento a los 8-10 días, lo que permitiría un diagnóstico exitoso sin la necesidad de otra amniocentesis (Arsham et al., 2017; Sobral, 2020).

La selección del momento de cosecha en los cultivos primarios se basa en la observación de células redondeadas, presumiblemente en fase mitótica. Para estimular la división celular se realiza un cambio de medio 24 horas previas a la cosecha. Durante la cosecha se añade Colcemid®, N-deacetyl-N-methyl-colchicine, como un inhibidor del huso mitótico, con el fin de detener la división celular en la metafase durante la última fase de incubación. Se sabe que una concentración más baja y durante el menor tiempo favorece la obtención de cromosomas de mayor longitud(Arsham et al., 2017). En el desarrollo de este proyecto se determinó que la concentración optima de Colcemid® es de 0.33 μg/mL incubados por 2.5 horas, pues presentaba un mayor número de metafases por portaobjeto, si bien los cromosomas eran contables, no cumplían con el tamaño adecuado para obtener una resolución de banda igual o superior a 550

bandas, que es lo recomendado para un óptimo análisis cromosómico. Es por lo anterior que se determinó evaluar el uso de Bromuro de etidio.

El Bromuro de etidio actúa como agente intercalante, del ADN que se acopla con la contracción de la cromatina para lograr una mayor elongación cromosómica. Por lo general se añade poco antes o junto al Colcemid®. Se determino que se utilizaran 5.5 μg/mL 30 minutos previos a la adhesión del Colcemid® pues es el que presento el resultado promedio más alto y relativamente consistente de resolución de banda. Se observó un aumento en el número de metafases por portaobjeto en aquellos que si utilizaron bromuro de etidio, si bien no hay estudios que relacionen el bromuro de etidio con el detener el ciclo celular en metafase se sabe que su uso en cultivos celulares inhibe fuertemente el crecimiento celular provocando incluso la muerte de algunas células. Además, se sabe que el bromuro de etidio inhibe la síntesis de ADN y de algunas proteínas, generando un bloqueo en el ciclo celular (Heinen et al., 1974).

La tripsina-EDTA se utiliza en la cosecha de cultivos celulares para desprender las células adherentes del sustrato en el que están creciendo. Esta combinación de enzimas y quelantes facilita el proceso de recolección de las células para su posterior subcultivo o análisis.

El KCl hipotónico y/o citrato de sodio; se usa para la obtención de metafases óptimas para su estudio, abiertas con bajo número de cromosomas sobrepuestos y fáciles de contar, esta puede ser realizada a temperatura ambiente o calentado a 37 - 37,5 °C durante 15 minutos, para lograr un aumento en el volumen de las

células y una mayor distribución de los cromosomas. Finalmente se utiliza un fijador, metanol y ácido acético en una proporción de 3:1 respectivamente, para preparar la cromatina y la membrana nuclear para los pasos finales de la preparación y tinción del portaobjetos (Arsham et al., 2017; Barraza et al., 2021). En la preparación de los portaobjetos la humedad y la temperatura desempeñan un papel en la obtención de preparaciones en metafase bien distribuidas, un nivel de humedad de 40-50% es un buen punto de partida a temperatura ambiente. A mayor humedad aumenta la dispersión (Arsham et al., 2017).

Para el análisis de muestras de líquido amniótico, a partir de cultivos en matraz se recomienda contar un mínimo de 20 células en metafase, distribuidas equitativamente entre al menos dos *flask* distintos, además, se recomienda cariotipar y/o analizar completamente al menos cinco metafases. En el caso del mosaicismo, se crea al menos un cariograma para cada línea celular.

Existen criterios consensuados de nomenclatura para describir el cariotipo normal y sus variantes. Actualmente, se utiliza la nomenclatura ISCN 2020 con características como número total de cromosomas, caracterización del par de cromosomas sexuales o sexo genético, aberraciones cromosómicas en orden alfabético y decreciente de acuerdo al o los cromosomas comprometidos, en orden correlativo y con alteraciones numéricas y luego estructurales (McGowan-Jordan et al., 2020). En esta nomenclatura se basó el análisis tanto del laboratorio clínico de genética del HGGB como el del referente local Laboratorio clínico Sanatorio Alemán.

Al comparar los resultados y evaluar la concordancia se obtiene un resultado del índice kappa de Cohen de 1, lo que indica una concordancia muy buena, lo que se traduce en que el método que se estandarizo en el laboratorio presenta una alta precisión, por lo que la técnica es confiable y se puede implementar en el laboratorio clínico del HGGB.

CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

El laboratorio clínico del HGGB ha logrado estandarizar con éxito un protocolo para el cultivo de líquido amniótico y análisis cromosómico, demostrando la capacidad de realizar este tipo de análisis de manera autónoma.

La comparación de los resultados obtenidos con el laboratorio de referencia mostró una concordancia muy alta, lo que indica que el protocolo implementado es preciso y confiable.

Se determinaron las condiciones óptimas para el cultivo de amniocitos, incluyendo el tipo de medio de cultivo, temperatura, tiempo de incubación y concentración de reactivos como el Colcemid® y el bromuro de etidio.

Se reafirma la importancia del diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas para la salud pública, permitiendo una toma de decisiones informada y un acceso a servicios de salud adecuados.

Con los resultados obtenidos, se recomienda la implementación rutinaria del análisis cromosómico de líquido amniótico en el laboratorio clínico del HGGB.

Además, con todo lo expuesto anteriormente se abre la posibilidad de realizar cariogramas con otro tipo de muestras, tales como vellosidades coriónicas, sangre de cordón umbilical o restos de abortos espontáneos.

BIBLIOGRAFÍA

Arsham, M. S., M.S., M. J. B. C., B.S., H. J. L., & CG(ASCP)CM. (2017). The AGT Cytogenetics Laboratory Manual. En *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Wiley. https://doi.org/10.1002/9781119061199

Barraza, X., Fernandez, M., Estrada, C., & Sanchez, M. (2021). *Manual citogenetica Procedimientos*. https://udeconce-my.sharepoint.com/:w:/r/personal/fmaldonado2018_udec_cl/_layouts/15/Doc.aspx?sourcedoc=%7BD0EB43D2-618C-4D87-B418-333E41797E8E%7D&file=Manual citogenetica Procedimientos 2021 (1).docx&action=default&mobileredirect=true&DefaultItemOpen=1

Baust, J. M., Buehring, G. C., Campbell, L., Elmore, E., Harbell, J. W., Nims, R. W., Price, P., Reid, Y. A., & Simione, F. (2017). Best practices in cell culture: an overview. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, *53*(8), 669–672. https://doi.org/10.1007/S11626-017-0177-7

Biological, I. (2015). *BIOAMF-2 Human Amniotic Fluid Instructions for Use*. *June*.

Carlson, B. (2020). *Embriología humana y biología del desarrollo* (6th ed.). https://www.clinicalkey.com/student/content/toc/3-s2.0-C20180056236

De Coppi, P., Bartsch, G., Siddiqui, M., Xu, T., Santos, C. C., Perin, L., Mostoslavsky, G., Serre, A. C., Snyder, E. Y., Yoo, J. J., Furth, M. E., Soker, S., & Atala, A. (2007). *Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy*. https://doi.org/10.1038/nbt1274

Gersen, S. L., & Keagle, M. B. (2013). The principles of clinical cytogenetics, third edition. *The Principles of Clinical Cytogenetics, Third Edition*, 1–569. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1688-4/COVER

Göktaş, E., & Ayaz, R. (2020). Prenatal Genetic Diagnostic Test Outcomes in Van Province and Nearby Cities in Eastern Turkey. *Duzce Medical Journal*, *22*(1), 7–12. https://doi.org/10.18678/DTFD.631734

Heinen, E., Lepoint, A., Bassleer, R., & Goessens, G. (1974). Effects of ethidium bromide on chick fibroblasts and mouse Ehrlich tumor cells cultivated in vitro. Cytological and cytochemical observations. *Beitrage zur Pathologie*, *153*(4), 353–369. https://doi.org/10.1016/S0005-8165(74)80126-5

Jacobson, C. B., & Barter, R. H. (1967). Intrauterine diagnosis and management of genetic defects. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *99*(6), 796–807. https://doi.org/10.1016/0002-9378(67)90395-X

Jorde, L., Carey, J. C., & Bamshad, M. J. (2020). *Genética médica* (6th ed.). https://clinicalkeymeded.elsevier.com/reader/books/9788491138808/epubcfi

/6/8[%3Bvnd.vst.idref%3Db9788491137979099917]!/4/2/2/2[CN]

McGowan-Jordan, J., Simons, A., & Schmid, M. (Eds.). (2016). *ISCN 2016: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016)*. S.Karger AG. https://doi.org/10.1159/isbn.978-3-318-06861-0

McGowan-Jordan, J., Simons, A., & Schmid, M. (2020). *ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature*.

Ministerio de Salud. (2015). Guia Perinatal 2015. En *Guia perinatal 2015*. http://web.minsal.cl/sites/default/files/files/GUIA PERINATAL_2015_ PARA PUBLICAR.pdf

Moore, K. L. (2020). *Placenta y membranas fetales - Embriología clínica*. https://www.clinicalkey.com/student/content/book/3-s2.0-B9788491135906000075

Morgan-Ortiz, F., Morgan-Ruiz, F. V., Quevedo-Castro, E., Gutierrez-Jimenez, G., & Báez-Barraza, J. (2015). Anatomía y fisiología de la placenta y líquido amniótico. *Rev. Med. UAS.*, *5*(4), 156–164.

Ochiai, D., Masuda, H., Abe, Y., Otani, T., Fukutake, M., Matsumoto, T., Miyakoshi, K., & Tanaka, M. (2018). Human Amniotic Fluid Stem Cells: Therapeutic Potential for Perinatal Patients with Intractable Neurological Disease. *The Keio Journal of Medicine*, *67*. https://doi.org/10.2302/kjm.2017-0019-IR

Orczyk-Pawiłowicz, M., Jawień, E., Deja, S., Hirnle, L., Ząbek, A., & Młynarz, P. (2016). Metabolomics of Human Amniotic Fluid and Maternal Plasma during Normal Pregnancy. *PLoS ONE*, *11*. https://api.semanticscholar.org/CorpusID:17999460

Parra-Saavedra, M., Cruz-Lemini, M., Borobio, V., Bennasar, M., Goncé, A., Martínez, J. M., & Borrell, A. (2014). Amniocentesis: A practice guideline. *Diagnostico Prenatal*, *25*(1), 20–27. https://doi.org/10.1016/J.DIAPRE.2013.07.004

Queenan, J. T., Thompson, W., Whitfield, C. R., & Shah, S. I. (1972). Amniotic fluid volumes in normal pregnancies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *114*(1), 34–38. https://doi.org/10.1016/0002-9378(72)90285-2

Ley 21030, 1 (2017).

Serna, N. L. (2015). Gametogénesis y espermatogénesis. En *Biología del desarrollo. Cuaderno de trabajo*. McGraw-Hill Education. http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1115012696

Sobral, M. V. (2020). *Cultivo de células*. *August*, 166.

Steele, M. W., & Breg, W. R. (1966). Chromosome analysis of human amniotic-fluid cells. *Lancet (London, England)*, *1*(7434), 383–385. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(66)91387-0

Turnpenny, P., Ellard, S., & Cleaver, R. (2022). *Emery. Elementos de genética médica y genómica* (16°). https://www.clinicalkey.com/student/content/toc/3-s2.0-C20210009603

Anexo 1:

Carta de confidencialidad

22 de marzo del 2024

Comité de Docencia
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción
Presente

Estimados miembros del Comité de Docencia,

Por medio de la presente, y en respuesta a su solicitud, me dirijo a ustedes en calidad de jefe del Laboratorio Clínico del Hospital Regional Guillermo Grant Benavente de Concepción.

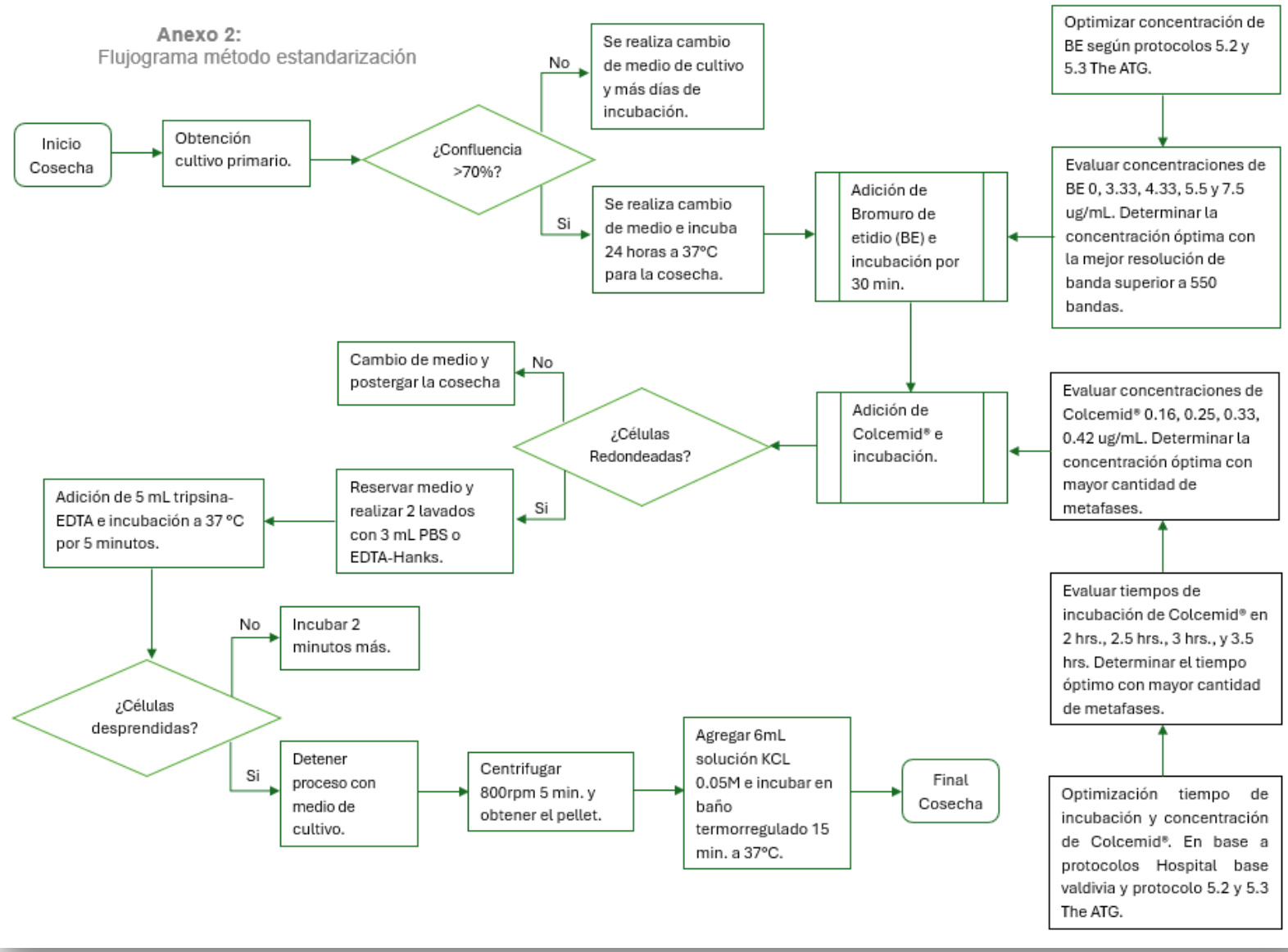
Es un placer informarles que el proyecto de la Srta. Francisca Maldonado Ulloa titulado: "ESTANDARIZACION DEL CULTIVO DE LIQUIDO AMNIOTICO PARA ANALISIS CROMOSOMICO" cuenta con el manejo confidencial de los datos de los líquidos amnioticos de pacientes que se utilizarán como control.

Quedo a disposición del Comité de Docencia para cualquier consulta adicional que pudieran tener respecto a este asunto.

Atentamente,

BQ. Roberto Vega
Jefe Laboratorio Clínico
Hospital Regional Guillermo Grant Benavente
Concepción

Anexo 2:
Flujograma método estandarización



Anexo 3:

Manejo de residuos hospitalarios (REAS) en el Hospital Guillermo Grant Benavente, según el manual de Bioseguridad del Laboratorio Clínico 2021-2026.

1. **Clasificación de residuos**

Según el Reglamento sobre Manejo de Residuos de Establecimientos de Atención de Salud, para efectos de la identificación de los residuos generados en establecimientos de Atención de la Salud, se considerarán las siguientes categorías: peligrosos, radiactivos, especiales y asimilables a domiciliarios.

2. **Clasificación de residuos según tipo de residuo y contenedor respectivo**

CATEGORIA	TIPO DE RESIDUO	RESIDUO	CONTENEDOR
1	Peligrosos	Fenol, metanol, acetona, ácido clorhídrico fumante, ácido acético glacial, etanol absoluto, alcohol isopropílico, Neoclear, Metotrexato y nitrato de plata.	Bolsa de polietileno color rojo con logo de residuos peligrosos Contenedor color rojo para residuos peligrosos
2	Radioactivos	No aplica	No aplica
3	Especiales	Sangre, Fluidos Biológicos, cortopunzantes contaminados (Jeringas, porta	Bolsa de polietileno amarillo con logo de Biopeligro

		objetos, agujas, vidrios) y cultivos.	Contenedor amarillo para residuos cortopunzantes contaminados
4	Asimilables a domiciliarios	Residuos sólidos (Papel, plásticos, cartones, etc.)	Bolsa de polietileno color negro

1. MANEJO DE RESIDUOS EN EL LABORATORIO CLINICO.

La disposición, caracterización y selección adecuada de residuos es esencial para controlar y minimizar los riesgos desde los lugares de generación, ayudando al cuidado y bioseguridad del personal del laboratorio y del medio ambiente.

3.1. **Almacenamiento inicial o primario**. Corresponde al lugar donde se generan los residuos, es decir, en las áreas de trabajo.

3.1.1. Todos los funcionarios que se desempeñan en el laboratorio son responsables de la clasificación y segregación de los desechos, incluidos los estudiantes en práctica.

3.1.2. **Residuos sólidos asimilables a domiciliarios:** Almacenar en un contenedor, en cuyo interior debe haber una bolsa negra. Aquí se incluyen muestras microbiológicas que han sido autoclavadas.

3.1.3. Residuos especiales: Almacenar en bolsas de color amarillo con logo de bioseguridad y rotuladas con las palabras “Residuos Infecciosos”, puestas dentro de un contenedor.

3.1.4. Los contenedores destinados a los residuos clasificados como **cortopunzantes** deberán ser de color amarillo, paredes rígidas, resistentes al corte y a la punción, con tapa y tener el logo de bioseguridad y rotulada con las palabras “Contenedor para cortopunzantes”. Estos contenedores deberán llenarse como máximo, hasta 3/4 de su capacidad.

3.1.5. Residuos Peligrosos: Almacenar en contenedor de color rojo, paredes rígidas, resistentes al corte y a la punción, con tapa y tener el logo de bioseguridad y rotulada con las palabras “Residuos Peligrosos”. Llenar los contenedores hasta 3/4 de su capacidad como máximo.

3.1.6. La segregación de residuos debe mantenerse durante todas las etapas del manejo interno. En caso de producirse mezclas de ellos, esta debe ser manejada de acuerdo a lo prescrito para el residuo de mayor riesgo, de acuerdo a la normativa aplicable.

3.2. Almacenamiento temporal o secundario

3.2.1. El Auxiliar de Servicio deberá, a lo menos dos veces al día, retirar de cada Sección o área los **residuos asimilables a domiciliarios,** reponiendo de inmediato la bolsa de color negro. Deberá trasladar los residuos al contenedor ubicado en Sala de Aseo del CAA.

3.2.2. El Auxiliar de Servicio deberá retirar, a lo menos dos veces al día, de cada Sección o área los **Residuos Especiales**, reponiendo de inmediato la bolsa de color amarillo y/ o los contenedores para cortopunzantes. Se llevaran a un lugar denominado “Acopio Transitorio de Residuos” y serán depositados en contenedores grandes con ruedas de color amarillos, que se encuentran dentro del habitáculo. Para realizar esta actividad debe utilizar delantal y guantes.

3.2.3. El Auxiliar de Servicio deberá retirar, a lo menos dos veces al día, de cada Sección o área los **Residuos Peligrosos**, reponiendo de inmediato el contenedor de color rojo. Se llevaran a un lugar denominado “Acopio Transitorio de Residuos” y se almacenarán de forma ordenada.

3.2.4. Es obligatorio que la manipulación de bolsas y/o cajas se efectúe con delantal, guantes domésticos y pechera plástica.

3.3. Almacenamiento final o terciario

3.3.1. Los **residuos asimilables a domiciliarios** serán retirados, desde el contenedor ubicado en Sala de Aseo del CAA, por el funcionario

responsable de la Empresa Externa de Aseo y Limpieza y trasladados al contenedor de acopio de residuos comunes del establecimiento. El retiro se realizará con una frecuencia de dos veces al día, o más si se requiere.

3.3.2. Los **Residuos Especiales** serán retirados, dentro de contenedores amarillos, desde el lugar denominado “Acopio Transitorio de Residuos”, por el funcionario responsable de Servicio de Aseo y Saneamiento. Esta actividad será realizada, a lo menos, dos veces al día y registrada en un formulario “Registro retiro de desechos Laboratorio Clínico HGGB”. El funcionario efectuará el traslado, de acuerdo a las normas de bioseguridad establecidas por el establecimiento. Los llevará a la Sala de almacenamiento de residuos, donde serán pesados y registrados, de acuerdo a procedencia y clasificación.

3.3.3. Los **Residuos Peligrosos** serán retirados desde el lugar denominado “Acopio Transitorio de Residuos”, por el funcionario responsable de Servicio de Aseo y Saneamiento. Esta actividad deberá ser realizada, a lo menos, dos veces al día y registrada en un formulario “Registro retiro de desechos Laboratorio Clínico HGGB”. El funcionario efectuará el traslado, de acuerdo a las normas de bioseguridad establecidas por el establecimiento. Los llevará a la Sala de almacenamiento de residuos peligrosos, donde deben ser pesados y registrados, de acuerdo a procedencia y clasificación.

3.3.4. Retiro de residuos desde el establecimiento

El retiro de todos los residuos generados en el establecimiento será efectuado, según convenio, por la empresa acreditada para tal efecto.

Anexo 4:

Instructivo “Manual de protocolo de cultivo de líquido amniótico para análisis cromosómico”

HOSPITAL GUILLERMO GRANT BENAVENTE
UNIDAD DE LABORATORIO CLÍNICO

MANUAL DE PROTOCOLO DE CULTIVO DE LÍQUIDO AMNIÓTICO PARA ANÁLISIS CROMOSÓMICO

GENÉTICA
2024

Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:
Fecha:	Fecha:	Fecha:

CONTENIDO

13. OBJETIVO
14. CAMPO DE APLICACIÓN Y ALCANCE
15. FUNDAMENTO
16. RESPONSABLES DE SU APLICACIÓN
17. RESPONSABLE DE LA SUPERVICIÓN
18. DISTRIBUCIÓN
19. DEFINICIONES
20. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS
21. PROTOCOLO DE CULTIVO DE LIQUIDO AMNIOTICO
    - 21.1. ETAPA PRE-ANALITICA
    - 21.2. ETAPA ANALITICA
    - 21.3. ETAPA POST-ANALITICA
22. DOCUMENTOS ASOCIADOS
23. REFERENCIAS
24. ANEXOS

1. OBJETIVO

Describir procedimientos en el análisis cromosómico a partir de líquido amniótico en las etapas preanalíticas, analíticas y post analíticas, en el laboratorio clínico de genética, Hospital Guillermo Grant Benavente.

2. CAMPO DE APLICACIÓN Y ALCANCE

Muestras de gestantes con fetos con sospecha de alteraciones cromosómicas numéricas (aneuploidías) y estructurales; provenientes de servicio de obstetricia y de establecimientos externos pertenecientes a la red de Servicio de Salud Concepción.

Debe ser conocido por todos los profesionales, técnicos, administrativos y auxiliares de servicio del laboratorio clínico de genética.

3. FUNDAMENTO

3.1. La citogenética es el estudio de los cromosomas y el cariotipo consiste en el ordenamiento de los cromosomas metafásicos a partir de su análisis microscópico según tamaño, forma y patrón de bandas. Generalmente se solicita cuando se tiene sospecha que el feto presenta cromosomopatías. En él se pueden determinar la presencia de alteraciones numéricas y/o estructurales de los cromosomas.

4. RESPONSABLES DE SU APLICACIÓN

4.1. Profesionales del área que realizan el análisis y validación de cariogramas.

5. RESPONSABLE DE LA SUPERVICIÓN

5.1. Encargado del área de genética.

5.2. Encargado de calidad del Laboratorio Clínico del HGGB.

5.3. Director técnico del Laboratorio Clínico del HGGB.

6. DISTRIBUCIÓN

6.1. Área de Genética.

6.2. Dirección técnica del Laboratorio Clínico del HGGB.

7. DEFINICIONES

7.1. Banda: Parte de un cromosoma que es distinguible de las partes que la rodean en intensidad de tinción más oscura o más clara. De acuerdo al International System for Human Cytogenomic Nomenclature (ISCN), la nomenclatura de una banda tiene cuatro características: número del cromosoma, brazo, región y banda. Las bandas pueden ser sub-divididas en sub-bandas usando un punto decimal, en resoluciones muy altas.

7.2. Cariograma: Es la disposición ordenada de todos los cromosomas, de acuerdo a su tamaño, posición del centrómero y patrón de bandas.

7.3. Células analizadas: células metafásicas bandeadas, en las que los cromosomas se cuentan y evalúan en su totalidad, ya sea al microscopio, o con imágenes digitalizas intactas o impresiones fotográficas.

7.4. Células contadas: número de células metafásicas evaluadas para el recuento cromosómico.

7.5. Mosaico: Presencia de dos o más poblaciones celulares con diferente composición genética en un mismo organismo, originados
de un único cigoto. La ganancia de cromosomas y las aberraciones estructurales son informadas cuando están presentes en dos o más células metafásicas. Las pérdidas cromosómicas son informadas cuando están presentes en tres o más células metafásicas.

7.6. Resolución de bandas: Hace relación de cuan elongado se encuentra un cromosoma y por ende cuántas bandas se es capaz de distinguir. El método de Vancuver es el que generalmente se emplea para estimar la resolución de bandas. El nivel de resolución de todo cariograma informado debe ser

7.7. mayor a 550 bandas.

8. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

8.1. Materiales

8.1.1. Tubo de polipropileno de 15 mL estériles.

8.1.2. Jarras de tinción tipo Coplin.

8.1.3. Portaobjetos con placa esmerilada.

8.1.4. Pipeta Pasteur de Vidrio

8.2. Reactivos

8.2.1. Medio de cultivo completo, compatible con cultivo de amniocitos.

8.2.2. Solución de N-desacetil-N-metilocolchicina (Colcemid) a una concentración de 10 mg/mL.

8.2.3. Bromuro de etidio a concentración 500 ug/mL.

8.2.4. Tripsina-EDTA al 0.5%.

8.2.5. Buffer Gurr.

8.2.6. Solución de Azur Eosina Azul de Metileno, según Giemsa.

8.2.7. Solución de Cloruro de Potasio (KCl) 0.05 M.

8.2.8. Fijador de Carnoy.

8.2.9. Aceite de Inmersión.

8.3. Equipos

8.3.1. Gabinete de Bioseguridad.

8.3.2. Campana de Extracción de gases.

8.3.3. Cámara de Incubación.

8.3.4. Centrífuga de tubos de 15 mL.

8.3.5. Microscopio con sistema cariotipador acoplado.

9. PROTOCOLO DE CULTIVO DE LIQUIDO AMNIOTICO

9.1. ETAPA PRE ANALITICA

Toma y transporte de muestras

Previo al procedimiento se realizará proceso de consentimiento informado, responsabilidad del médico clínico, que debe ser firmado por la paciente.

La obtención de la muestra de líquido amniótico se realiza idealmente entre la **14 y 20 semanas de embarazo**, por punción transabdominal, bajo guía ecográfica, en dependencias del Servicio de Obstetricia, con técnica estéril, según su normativa.

Se requiere 20-30 ml de líquido amniótico y se recomienda descartar los primeros 1 o 2 ml iniciales, cambiando jeringa, para disminuir el riesgo de contaminación con sangre materna. La muestra se recibirá en jeringa estéril, sin aguja, pudiendo ser transportada directamente al laboratorio o traspasada a tubo estéril con tapa rosca.

El tubo o jeringa debe rotularse con el nombre del paciente y RUT, según la normativa vigente en el laboratorio.

Es conveniente que en la solicitud se consigne una completa identificación del paciente (nombre completo con dos apellidos, RUT, fecha de nacimiento, número de ficha clínica) que debe coincidir con la rotulación del tubo que contiene la muestra, diagnóstico clínico. Identificación clara del servicio y profesional solicitante.

La muestra debe ser enviada a temperatura ambiente inmediatamente luego de la toma del examen al Laboratorio de Genética del HGGB, si proviene de un hospital externo esta debe venir con unidad refrigerante, no congelada.

Recepción

a) La muestra es recibida por el personal del laboratorio de Genética. Verificando la solicitud y la identificación del paciente, si estos no presentan discrepancias o falta de información, serán recepcionadas conforme.
b) Criterios de recepción con observaciones:
   - Ausencia de datos generales requeridos en la solicitud tales como: nombre del médico, previsión, n° de ficha. Se obtiene información con datos de plataforma informática o contactándose telefónicamente al lugar de procedencia para completar información.
   - Muestra con coágulos.
   - Muestra con unidad refrigerante.
c) Criterios de rechazo:

- Ausencia de nombre y RUT del paciente en la solicitud.
- Ausencia de rotulación de la muestra con nombre de paciente.
- Discordancia en datos del paciente entre la solicitud y el rótulo de la muestra.
- Letra ilegible.
- Muestra en frasco no estéril.
- Muestra en jeringa con aguja.

Una vez llegada la muestra al laboratorio clínico, realizar su ingreso en el sistema informático (LIS). Al momento de llegar la muestra al área, rotular el tubo primario y la orden medica con el numero interno y registrar los datos del paciente tanto en el registro de muestras (**APL-RG-GEN-001**) como en el software ***Case date manager (CDM).***

9.2. ETAPA ANALITICA

El proceso debe cumplir con los requerimientos de bioseguridad del laboratorio, indicados en el Manual de Bioseguridad (**APL-MB-DT-02**)

9.2.1. <u>Siembra y cultivo de muestra</u>

9.2.1.1. Para la siembra se considera 1 *flask* por cada 5 mL de muestra. Por ejemplo; si se recepcionan 20 mL de muestra.

$$N° \; de \; flask = \frac{mL \; de \; muestra}{5 \; mL} = \frac{20}{5} = 4 \; flasks$$

Entonces se sembrará en 4 *flasks.*

9.2.1.2. Traspasar la muestra a tubos estériles de 15 mL con tapa rosca y centrifugar a 800 rpm por 10 minutos.

9.2.1.3. Extraer el sobrendante, suavemente con pipeta estéril, dejando aproximadamente 0.5 mL para no alterar el pellet .

9.2.1.4. Añadir 3-4 mL de medio de cultivo BioAMF por cada *flask* a cultivar.

9.2.1.5. Agitar suavemente, para repartir en los *flasks*.

9.2.1.6. Incubar en la estufa a 37°C, 95% humedad relativa y 5% de CO_2, en posición horizontal por 6 días.

9.2.1.7. Al 6to día observa crecimiento celular, si es el adecuado se procede a cambiar el medio para la cosecha.

9.2.1.8. Para el cambio de medio: retirar por aspiración con pipeta estéril y agregar 3 mL de medio fresco a 37°C, sin tocar las paredes. A partir del primer cambio de medio, si no se cosecha la muestra, se reemplaza el medio 3 veces a la semana hasta observar un crecimiento celular adecuado (confluencia mayor o igual al 70%).

9.2.2. Cosecha de muestras

9.2.2.1. El día posterior al cambio de medio a cada *flask* agregar 33uL de Bromuro de etidio 500 ug/mL e incubar 30 minutos en la estufa.

9.2.2.2. Agregar 100uL de Colcemid®, 10ug/mL, mezclar suavemente e incubar durante 2.5 horas (150 minutos) a 37 °C en la estufa.

9.2.2.3. Reservar el medio de cultivo en tubo estéril de 15mL.

9.2.2.4. Realizar 2 lavados con 3 mL de solución Hanks o PBS 1X a 37°C.

9.2.2.5. Agregar al *flask* 5 mL de Tripsina-EDTA a 37°C, asegurando que cubra toda la superficie.

9.2.2.6. Incubar por 5 minutos a 37°C, con platina caliente, agitando suavemente el *flask* varias veces para favorecer el desprendimiento de las células.

9.2.2.7. Detener el proceso agregando el medio de cultivo reservado previamente. Este proceso debe ser rápido.

9.2.2.8. Centrifugar a 800 rpm por 5 minutos.

9.2.2.9. Extraer el sobrenadante y añadir 0-.5-1 mL de solución hipotónica KCl 0.05M a 37°, por goteo suave. Aforar hasta 6mL y dejar actuar durante 15 minutos en baño termorregulado a 37°C.

9.2.2.10. Centrifugar a 800 rpm por 8 minutos y extraer sobrenadante.

9.2.3. Fijación de muestras.

9.2.3.1. Al pellet obtenido, agregar 1 mL de fijador Carnoy (Metanol 3: Ac. Acético 1) recién preparado, frio. Resuspender con pipeteo corto, aforar hasta 6mL, homogeneizar por inversión suave del tubo y dejar actuar por 30 minutos a -20°C.

9.2.3.2. Centrifugar a 800 rpm por 5 minutos

9.2.3.3. Eliminar sobrenadante, agregar fijador hasta 6mL en agitación constante en vortex 1200 rpm.

9.2.3.4. Repetir

9.2.4. Goteo de muestras.

9.2.4.1. Gotear las preparaciones en portaobjetos limpios, sin grasas y fríos. Identificados con numero de tubo y muestra.

9.2.4.2. Controlar en microscopio de contraste de fase.

9.2.4.3. Envejecer las láminas (portaobjetos) durante 24-48 horas en estufa a 60°C.

9.2.5. Preparación y tinción de láminas.

9.2.5.1. Preparar 3 láminas por cultivo, según lo detallado en el instructivo de preparación de láminas y tinciones GTG, CGB y NOR (**APL-IT-GEN-002**).

9.2.5.2. A las tres láminas preparadas se les realizará la tinción GTG. Cuando se sospeche de alteraciones en la heterocromatina constitutiva, se preparará una nueva lámina y se teñirá con el bandeo CBG. Si se requiere estudiar polimorfismos en los satélites de los cromosomas acrocéntricos, se preparará una nueva lámina y se teñirá con el bandeo NOR.

9.2.6. <u>Análisis de las láminas</u>

9.2.6.1. Se deben contar como mínimo 35 metafases, con el fin de asegurar detectar posibles mosaicismos. En aquellos casos que se detecten, aumentar el recuento a 50 metafases. Por cada cultivo registrar: Coordenadas de la metafase analizada (Eje X, Eje Y), número modal e identificación de los cromosomas sexuales (XX, XY, etc.). Se deben registrar las coordenadas de las metafases que se consideren susceptibles a ser analizadas y cariotipadas. Toda información debe quedar registrada en el formulario respectivo (**APL-RG-GEN-002**) o debe ser almacenada en el software genASIs (**APL-IT-GEN-005**).

9.2.6.2. Se deben analizar como mínimo 5 metafases, cuyo resultado presuntivo debe anotarse en el registro mencionado en el punto anterior.

9.2.6.3. Se debe cariotipar al menos 2 metafases por caso, incluyendo 1 cariograma por cada línea celular en aquellos casos que se detecte presencia de mosaicos (**APL-IT-GEN-005**). Cuando se realice cultivo en triplicado o duplicado, se deberán seleccionar las 2 mejores metafases (resolución mayor a 550 bandas, buena calidad de bandeo y tinción).

9.2.6.4. En el caso que se requiera evaluar regiones qh o satélites, se procederá a realizar bandeos CBG o NOR respectivamente.

9.2.6.5. Las láminas teñidas serán almacenadas por un periodo mínimo de 3 años. Con fines académicos se podrán almacenar las láminas teñidas por más tiempo, siempre y cuando se resguarde la identidad de los pacientes.

9.3. Etapa post-analítica

9.3.1. El informe final deberá contener los siguientes elementos:

a) Nombre y dirección del laboratorio.
b) Nombre completo del paciente.
c) Número de orden generada en el LIS.
d) Fecha de nacimiento del paciente.
e) Nombre del médico solicitante.
f) Fuente de la muestra (Sangre Total)
g) Fecha de recepción de la muestra en el laboratorio.
h) Fecha de emisión del reporte.
i) Indicaciones clínicas del test (Diagnóstico presuntivo).
i) Número de metafases contadas y analizadas.
k) Fotografía del o los cariogramas armados.
1) Resolución del bandeo.
m) Métodos de bandeo.
n) Nomenclatura según ISCN.
o) Comentarios e Interpretación.
p) Firma del citogenetista y del médico genetista.

9.3.2. Una vez realizado los cariotipos, se procederá a escribir la nomenclatura del mismo según las recomendaciones de la última versión del ISCN disponible en el laboratorio. Se deberán describir todas las alteraciones halladas, es decir, cromosomas extras o faltantes, presencia marcadores, presencia de alteraciones estructurales (translocaciones, inversiones, deleciones, duplicaciones, cromosomas dicéntricos, isocromosomas, anillos o rearreglos cromosómicos complejos).

9.3.3. El médico genetista será el encargado de dar la última revisión al informe final y agregar comentarios adicionales como correlaciones con información clínica o con estudios previos, así como también sugerir estudios adicionales cuando sea apropiado.

9.3.4. El reporte final será almacenado en el disco duro del software cariotipador, así como en el LIS del laboratorio de manera indefinida.

9.3.5. El tiempo de respuesta máximo entre la llegada de la muestra al laboratorio hasta la emisión del informe final, será de 30 días hábiles.

9.3.6. En el caso de que se requiera dar un reporte preliminar ya sea de manera verbal o escrita, éste debe ser consignado en el informe final. Además, se deberá registrar (**APL-RG-GEN-006**), la fecha en que se realiza el reporte preliminar, profesional que lo informa, médico a quien se informa.

10. DOCUMENTOS ASOCIADOS

N° Documento	Identificación	Ubicación	Tiempo Almacenamiento
APL-RG-GEN-001	Registro de muestras procesadas	Área de Genética	
APL-MB-DT-02	Manual de Bioseguridad	Área de Genética	
APL-IT-GEN-002	Instructivo de preparación de láminas y tinciones CTG, CGB y NOR	Área de Genética	
APL-IT-GEN-005	Instructivo de uso de software cariotipador genASIs	Área de Genética	
APL-RG-GEN-006	Registro de lectura de laminas	Área de Genética	

11. Referencias

11.1. Arsham, M. S., M.S., M. J. B. C., B.S., H. J. L., & CG(ASCP)CM. The AGT Cytogenetics Laboratory Manual. En *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. (2017)

11.2. Barraza, X., Fernandez, M., Estrada, C., & Sanchez, M. *Manual citogenetica Procedimientos HBV*. (2021).

11.3. McGowan-Jordan, J., Simons, A. & Schmid, M. An International System for Human Cytogenomic. Nomenclature, ISCN. (2016).

11.4. Kuffel, D., Carlson, A., Stupca, P & Jalal, S. Training Guide for Chromosome Recognition. (2007)