



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DEL CARIOTIPO HUMANO.
APLICACIÓN EN LA VIDA PRENATAL Y
POSTNATAL EN UNA CLÍNICA DE
REPRODUCCIÓN ASISTIDA.

REPORTE DE TRABAJO PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MARÍA DE JESÚS GAYTÁN GARCÍA



TUTORA

DRA. MABEL CERRILLO HINOJOSA

2009

Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Alumna:</p> <p style="padding-left: 40px;">Teléfono:</p> <p style="padding-left: 40px;">Carrera:</p> <p>Numero de cuenta:</p>	<p>Gaytán García María de Jesús 54 46 20 48 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 9124495-2</p>
<p>2. Tutor:</p> <p style="padding-left: 40px;">Grado:</p>	<p>Doctor Cerrillo Hinojosa Mabel</p>
<p>3. Sinodal 1</p> <p style="padding-left: 40px;">Grado:</p>	<p>Doctor Frías Vázquez Sara</p>
<p>4. Sinodal 2</p> <p style="padding-left: 40px;">Grado:</p>	<p>M. en C. Meneses Pérez Miguel Angel</p>
<p>5. Sinodal 3</p> <p style="padding-left: 40px;">Grado:</p>	<p>M. en C. Abundis Manzano Héctor Martín</p>
<p>6. Sinodal 4</p> <p style="padding-left: 40px;">Grado:</p>	<p>Biól. Yerena De Vega María de la Concepción Adriana</p>
<p>7. Trabajo Escrito</p> <p style="padding-left: 40px;">Título:</p> <p style="padding-left: 40px;">No. páginas</p> <p style="padding-left: 40px;">Año</p>	<p>Estudio del cariotipo humano. Aplicación en la vida prenatal y postnatal en una clínica de reproducción asistida. 93 p 2009</p>

DEDICATORIAS

*A MI MADRE ESTEFANA, QUE DESDE NIÑA HA
CONFIADO EN MI Y ME HA IMPULSADO CON
SUS SABIAS PALABRAS:
"SIEMPRE ADELANTE, TÚ PUEDES"*

*A MI ESPOSO DANIEL QUE SIEMPRE ME HA
APOYADO CON AMOR Y PACIENCIA EN
TODOS MIS SUEÑOS Y PROYECTOS.*

*A MIS HIJOS, LUIS Y SOFIA POR
COMPARTIR ESTA ALEGRÍA.*

*A MIS HERMANOS TOMÁS, FÉLIX, PABLO,
MIGUEL Y SILVERIO, POR LA CONFIANZA
Y APOYO QUE ME HAN DADO EN ESTE
PROYECTO.*

GRACIAS

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. GRUPO DE REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA	2
1.1. HISTORIA.....	2
1.2. MISIÓN.....	3
1.3. ORGANIZACIÓN.....	5
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1. ALTERACIONES CROMOSÓMICAS	8
2.1.1. ALTERACIONES NUMÉRICAS.....	9
2.1.2. ALTERACIONES ESTRUCTURALES.....	13
2.2. EL CARIOTIPO HUMANO	19
2.3. TÉCNICAS DE BANDEO CROMOSÓMICO	21
2.3.1. BANDAS G.....	22
2.3.2. BANDAS Q.....	24
2.3.3. BANDAS R.....	25
2.3.4. BANDAS R CON REPLICACIÓN TEMPRANA.....	26
2.3.5. BANDAS C.....	27
2.3.6. BANDAS NOR.....	28
2.3.7. BANDAS DE ALTA RESOLUCIÓN.....	29
2.3.8. INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS.....	30
2.4. MARCADORES BIOQUÍMICOS	31
2.4.1. MARCADORES BIOQUÍMICOS DEL SEGUNDO TRIMESTRE.....	31
2.4.2. MARCADORES BIOQUÍMICOS DEL PRIMER TRIMESTRE.....	33
3. APRENDIZAJE Y EXPERIENCIA ADQUIRIDA	35
3.1. PRIMERA ETAPA	35
3.1.1. ELABORACIÓN DE UN CARIOTIPO.....	35
3.1.2. BANDEO CROMOSÓMICO.....	36
3.1.3. MANEJO, INFORMACIÓN Y PROGRAMACIÓN DE MUESTRAS.....	39
3.1.3.1. MARCADORES BIOQUÍMICOS.....	39
3.1.3.2. LÍQUIDO AMNIÓTICO.....	40
3.1.3.3. PRODUCTOS DE ABORTO.....	41
3.1.3.4. SANGRE PARA CARIOTIPO.....	41
3.1.3.5. MÉDULA ÓSEA O SANGRE DE PROBLEMAS HEMATOLÓGICOS.....	42

3.1.3.6. CONSERVACIÓN, TRANSPORTE Y FORMA DE ENVÍO AL LABORATORIO.....	43
3.1.4. ENTREVISTA A PACIENTES PARA AMNIOCENTESIS.....	44
3.1.5. ACTIVIDADES RELACIONADAS AL TRABAJO PROFESIONAL.....	46
3.2. SEGUNDA ETAPA.....	47
3.2.1. CULTIVO DE LINFOCITOS.....	47
3.2.2. CULTIVO DE MÉDULA ÓSEA.....	54
3.2.3. ELABORACIÓN SEMIAUTOMÁTICA DE CARIOTIPOS.....	56
3.3. TERCERA ETAPA.....	58
3.3.1. ANÁLISIS AL MICROSCOPIO.....	58
4. RESULTADOS DE REALIZADOS DE JUNIO DE 1998 A NOVIEMBRE DE 2007.....	62
5. COMENTARIOS A LOS RESULTADOS.....	76
6. ANÁLISIS CRÍTICO.....	83
6.1. COMENTARIOS DE MI APRENDIZAJE.....	83
6.2. AGRADECIMIENTOS.....	85
6.3. SUGERENCIAS.....	87
7. FUENTES DE INFORMACIÓN.....	88
8. APÉNDICE.....	91

INTRODUCCIÓN

El estudio de las enfermedades genéticas y en particular las debidas a alteraciones cromosómicas son responsables de un número importante de patología en el feto, en el recién nacido, en la edad preescolar-escolar, en la adolescencia y en el adulto, su estudio está comprendido en una parte de la Genética Humana, la Citogenética ⁽¹⁾. Existen otros estudios que seleccionan embarazos en riesgo de estar afectado por una cromosomopatía, que reciben el nombre de Marcadores Bioquímicos.

El trabajo desarrollado en el área de Citogenética se presentará en tres etapas: Primera Etapa; técnicas empleadas para la detección de alteraciones cromosómicas, Marcadores Bioquímicos Prenatales y Manejo de Muestras. Segunda Etapa: Técnicas de Cultivo Celular. Tercera etapa: Análisis y Diagnóstico de las alteraciones cromosómicas.

Con el presente trabajo se muestra la utilidad del estudio de cariotipo en: a) sangre periférica que en algunos casos permite al médico explicar la causa de la patología que presenta el paciente; b) muestras prenatales (líquido amniótico y biopsia de vellosidades coriales) se detectan alteraciones en el feto (en evolución); c) parejas con riesgo elevado de tener un hijo afectado; d) muestras de productos de aborto (vellosidades coriales, piel fetal, sangre de cordón, etc.)⁽²⁾ y e) muestras con problemas hematológicos (médula ósea y sangre periférica), donde el estudio citogenético es útil en el diagnóstico de la enfermedad, evolución y respuesta a tratamiento ⁽³⁾.

1. REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA

El grupo de Reproducción y Genética, es una institución privada dirigida por el Dr. Alfonso Gutiérrez Nájjar, dedicada al cuidado de la salud reproductiva que comprende la prevención, diagnóstico y tratamiento de las alteraciones que impiden el óptimo desempeño del sistema reproductor, en cada una de las etapas de la vida.

1.1 HISTORIA

El grupo se inició en 1986. El nacimiento del Grupo de Reproducción y Genética marcó el inicio a un servicio médico multidisciplinario, orientado hacia la atención integral de la salud reproductiva, siendo el primer grupo en la historia de la Reproducción Asistida en México.

1988.- Nacimiento de la primer bebé concebida mediante transferencia intratubaria de gametos (GIFT).

1991.- Nacimiento del primer bebé concebido a través de la Fertilización in Vitro (FIV).

1995.- Nacimiento de las dos primeras bebés concebidas gracias a la combinación de dos técnicas; Aspiración Epidídima de Espermatozoides (MESA) e inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides al óvulo (ICSI).

En 1987 se fundó el primer laboratorio privado especializado en **Citogenética**, el cual comenzó ofreciendo únicamente diagnóstico prenatal a pacientes del grupo, pero poco

después médicos externos solicitaron el servicio y comenzó a ofrecerse citogenética prenatal y postnatal a quien lo solicitara.

Hoy en día lleva a cabo el mayor número de exámenes de diagnóstico cromosómico de manera privada, a nivel nacional. La clínica brinda asesoría a diversos centros y laboratorios nacionales e internacionales en el manejo de las diferentes técnicas en infertilidad como: técnicas de ginecología quirúrgica y las técnicas de laboratorio de alta especialidad como la Fertilización in Vitro, Andrología y Citogenética.

En colaboración con la Universidad La Salle desde 1991 y posteriormente con la UNAM en 2005 el Grupo de Reproducción y Genética es el centro de enseñanza en el que médicos gineco-obstetras cursan la subespecialidad en Biología de la Reproducción Humana.

1.2 MISIÓN

La misión institucional del Grupo de Reproducción y Genética AGN y asociados es promover la salud general, elevar la calidad de vida y contribuir al bienestar de cada paciente, mediante la atención médica especializada en salud reproductiva.

El cumplimiento de esa misión y compromiso está sustentado en cuatro sólidos pilares u objetivos:

- La calidad profesional y humana de todas las personas que forman parte de la institución.
- Una amplia experiencia institucional como proveedores de servicios médicos especializados en medicina reproductiva y como centro de enseñanza académica.

- Un sistema de atención integral, el cual combina la labor de un selecto grupo de profesionales especialistas en diversas disciplinas con la infraestructura tecnológica más avanzada.
- Interés en promover la salud y el bienestar a través de la educación y prevención.

1.3 ORGANIZACIÓN

La clínica está organizada de la siguiente manera: un Director general, un Director médico y un Director administrativo. De la dirección médica dependen los médicos gineco-obstetras especialistas en Biología de la Reproducción y los laboratorios como el de Genética, de donde formé parte (Fig.1).

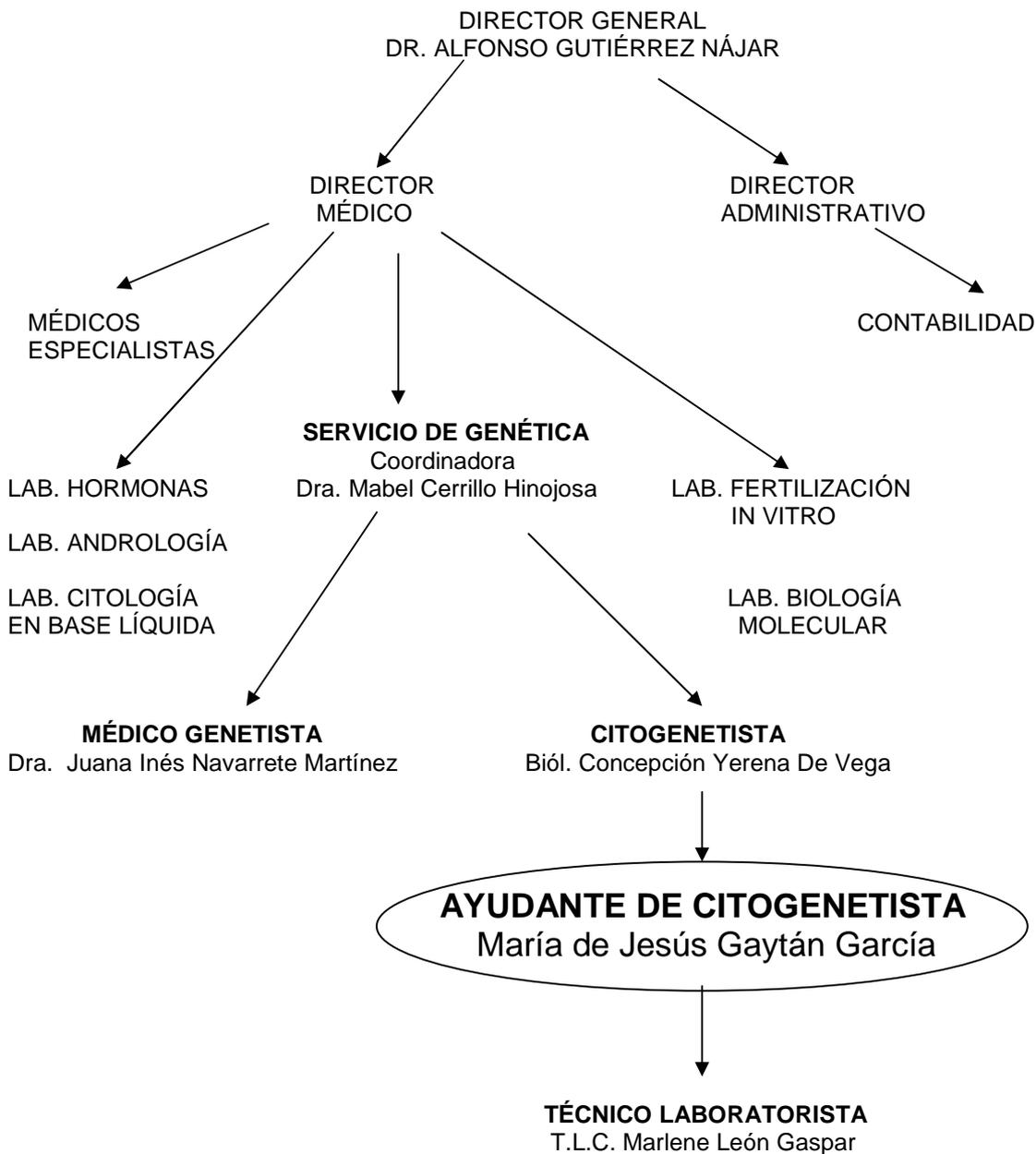


Fig. 1 Organigrama de la Clínica de Reproducción y Genética.

2. MARCO TEÓRICO

En los eucariontes, las células tienen cromosomas y éstos se encuentran en número constante para cada especie. En la especie humana la célula somática normal tiene 46 cromosomas, lo que constituye su número diploide ($2n$). Las células gaméticas (óvulo y espermatozoide) tienen sólo 23 cromosomas, que es el número haploide (n). Los 46 cromosomas se distribuyen en pares homólogos, 22 están presentes tanto en las células masculinas como en las femeninas y se llaman autosomas y el otro par, denominados cromosomas sexuales, son el X y el Y, en la mujer 46,XX y en el varón 46,XY. El número de cromosomas se mantiene constante en las células somáticas por la división llamada mitosis y se reduce a la mitad en la gametogénesis (ovogénesis y espermatogénesis) por la meiosis ⁽⁴⁾.

Los cromosomas y sus alteraciones son estudiados por la Citogenética. Las anomalías cromosómicas son mutaciones de material genético que alteran el número o la estructura de los cromosomas y en la mayoría de los casos son visibles al microscopio óptico, sus efectos son en general consecuencia del desequilibrio producido y dan origen a malformaciones, deficiencia mental e infertilidad ⁽¹⁾.

La Citogenética tuvo un crecimiento explosivo desde el descubrimiento realizado por Tjio y Levan en 1951 sobre el número correcto de cromosomas del cariotipo humano y posteriormente con el descubrimiento del primer síndrome cromosómico por Jerome Lejeune en 1959 ⁽⁵⁾.

El cariotipo es la distribución ordenada de los cromosomas en metafase o prometafase, atendiendo a su tamaño y a su forma. Puede obtenerse de cualquier tejido cuyas células

sean susceptibles de cultivarse y dividirse. También pueden obtenerse directamente sin cultivar, en células con un alto índice mitótico como sucede en algunos procesos hematológicos ⁽⁵⁾.

La obtención del cariotipo requiere de varias etapas, cada una con requerimientos y características específicas. Se inicia con la toma de la muestra, seguida por la siembra y cosecha de la misma, la elaboración de las laminillas y su bandeado cromosómico, para continuar con el análisis de las metafases, la captura de la imagen y elaboración del cariotipo y poder así llegar al resultado que nos dará finalmente un diagnóstico.

Las anomalías cromosómicas se manifiestan en los diferentes períodos de la vida. Durante el periodo prenatal, la mortalidad debida a anomalías cromosómicas, principalmente aneuploidías, es muy alta, siendo la causa del 40 al 60% de los abortos espontáneos del primer trimestre ⁽⁶⁾. En el recién nacido se estima que 1 de cada 156 presenta una alteración cromosómica y en el período perinatal y durante la primera infancia, son un factor importante de mortalidad debido a la presencia de las trisomías 13, 18 y 21 ⁽²⁾. En cuanto a la morbilidad, son la causa de un número importante de los pacientes con retraso mental, que en la mayoría de los casos va acompañado de malformaciones congénitas ⁽²⁾. La adolescencia es el periodo en el cual las alteraciones de los cromosomas sexuales se ponen de manifiesto con los primeros síntomas de diferenciación. Finalmente en la edad adulta, tanto en la mujer como en el varón las alteraciones cromosómicas pueden causar infertilidad, abortos de repetición o descendencia anormal ⁽⁵⁾. En algunos pacientes con problemas hematológicos, se pueden identificar alteraciones cromosómicas adquiridas en alguna etapa de la vida ⁽³⁾.

2.1 ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

Existen dos tipos de anomalías cromosómicas: las alteraciones numéricas y las estructurales y pueden presentarse simultáneamente. Las alteraciones numéricas a su vez se subdividen en poliploides y aneuploides, mientras que las estructurales se subdividen en deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones ⁽⁴⁾.

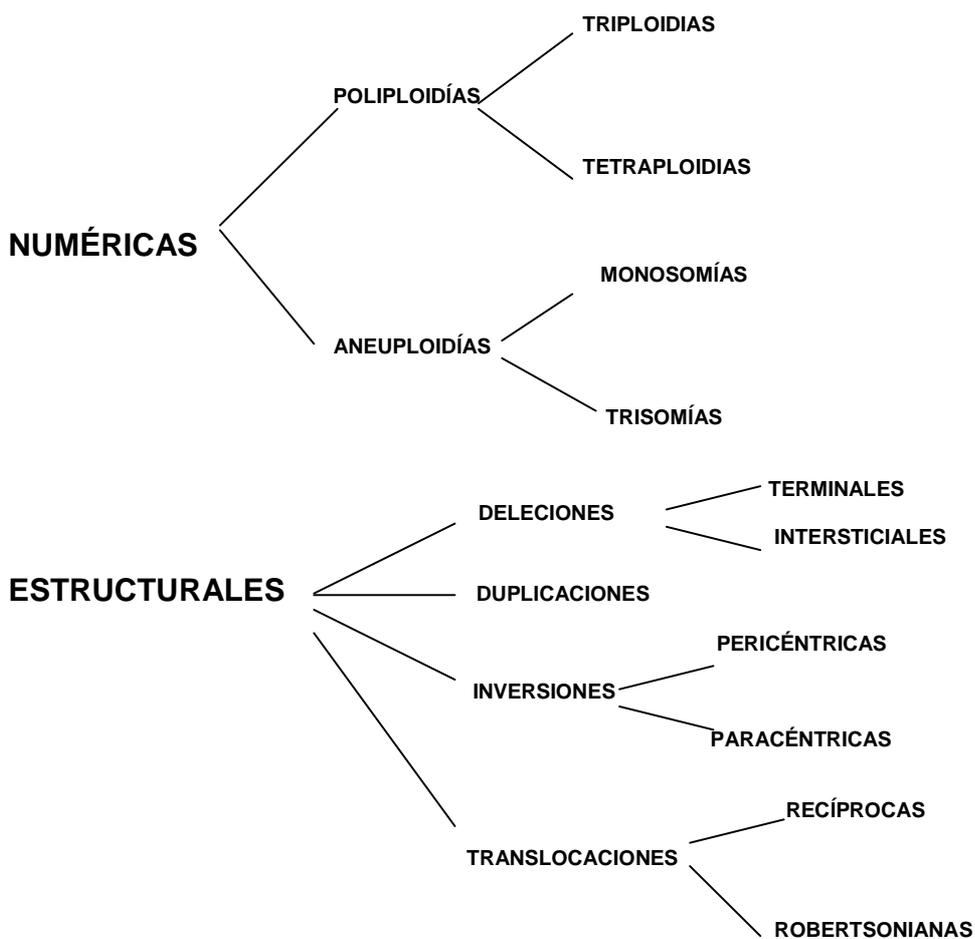


Fig.2. Alteraciones cromosómicas, numéricas y estructurales.

Las anomalías numéricas y estructurales se dividen en dos categorías principales: **constitutivas**, aquéllas con las que se nace, y **adquiridas**, que surgen como cambios durante la vida por diversos factores secundarios como enfermedades, teratógenos, un ejemplo de alteraciones adquiridas son las observadas en muestras de médula ósea de pacientes con leucemia ⁽⁴⁾.

2.1.1. ALTERACIONES NUMÉRICAS

Implican la pérdida o la ganancia de uno o varios cromosomas, y pueden afectar a autosomas como a cromosomas sexuales. Las alteraciones en el número cromosómico pueden originarse por no disyunción o por un retraso en la anafase ⁽²⁾.

La ganancia de cromosomas tiene repercusión en un individuo, mientras que la pérdida de cualquier cromosoma, causa la muerte, con excepción de la monosomía X o Síndrome de Turner. Otra regla general es que la pérdida o ganancia de un autosoma tiene consecuencias más graves que la de un cromosoma sexual ⁽³⁾. Las fallas pueden originarse en la meiosis, tanto en la primera como en la segunda o en ambas o presentarse durante mitosis, originando mosaicos celulares ⁽⁷⁾. Las alteraciones numéricas repercuten de manera significativa en la reproducción humana ya que pueden ocasionar abortos tempranos del primer trimestre ⁽⁵⁾.

2.1.1.1. POLIPLOIDÍAS

Son las células que poseen múltiplos exactos del número haploide (n) de 23 cromosomas. Una célula que contenga más de dos conjuntos haploides recibe en términos generales el nombre de poliploide ⁽⁷⁾. Así tenemos a los triploides (3n) y a los tetraploides (4n).

2.1.1.1.1 TRIPLOIDÍA

Es una alteración donde las metafases poseen tres juegos completos de cromosomas ($3n$). Los productos triploides se obtienen cuando un óvulo con 46 cromosomas, no eliminó el corpúsculo polar (diginia) es fecundado por un espermatozoide normal con 23 cromosomas o cuando un óvulo normal es fecundado por un espermatozoide con 46 cromosomas (diandria) o cuando un óvulo es fecundado por dos espermatozoides (dispermia) ⁽²⁾. En los seres humanos se presenta en los productos de aborto los cuales en su mayoría se pierden en las semanas 10 a 11 del embarazo con una frecuencia del 16% ^(4 y 5).

2.1.1.1.2 TETRAPLOIDÍA

En esta cromosomopatía las células poseen cuatro juegos de cromosomas ($4n$). La tetraploidía se produce en la primera división celular que sigue a la fecundación, en este caso la separación de los cromosomas no va seguida de la división del citoplasma, dando lugar a un embrión tetraploide, es decir hay cariocinesis, pero no citocinesis ^(2 y 5). En los seres humanos se presenta en los productos de aborto, los cuales en su mayoría se pierden en las semanas 10 a 11 del embarazo ⁽⁴⁾.

2.1.1.2 ANEUPLOIDÍAS

Se definen como la ganancia o pérdida de uno o varios cromosomas en la célula. Son las anomalías cromosómicas que tiene repercusión clínica. Se producen por una incorrecta segregación de los cromosomas ⁽²⁾ o por un rezago de un cromosoma durante la anafase en la división celular ⁽⁴⁾.

- La anafase retrasada se da porque uno de los cromosomas durante la anafase se retrasa en ir hacia los polos celulares y al terminarse la telofase se pierde y la

pérdida de dicho cromosoma, origina una célula con un cromosoma de menos y otra célula con la dotación cromosómica normal.

- La no disyunción es la separación anormal de los cromosomas o cromátidas hacia los polos opuestos de la célula durante la división nuclear. y finaliza con dos cromosomas emigrando hacia el mismo polo, mientras que hacia el otro no emigra ninguno, lo cual genera una célula con un cromosoma de más y una con un cromosoma de menos ⁽⁸⁾.

2.1.1.2.1. MONOSOMÍA

En esta alteración las células tienen una sola copia de un determinado cromosoma y puede ser letal. En los humanos, las monosomías de un cromosoma completo suelen ser letales con excepción de un 5% de las pacientes con monosomía X, Síndrome de Turner (45,X) que sobreviven ⁽²⁾. Este síndrome se presenta en una de cada 2000 a 3000 recién nacidas vivas; sin embargo, la frecuencia en abortos espontáneos es mucho mayor. Se calcula que el 1.5% de todas las concepciones son 45, X y que 99% de ellas se pierde en el curso de la gestación. Su incidencia no se eleva con la edad materna ^(2, 4 y 7).

Es importante mencionar que en el laboratorio de genética del Grupo se observan pacientes con infertilidad con mosaicos bajos (5-6%) que involucran trisomías y monosomías del cromosoma X: 45,X/46,XX, 45,X/47,XXX, 45,X/47,XXX/46,XX 45,X/47,XXX/48,XXXX/46,XX.

2.1.1.2.2 TRISOMÍA

En esta alteración el individuo posee un cromosoma extra ($2n+1$). Las trisomías en su mayoría se pierden en el primer trimestre del embarazo, siendo las más comunes la 16 y 22. Sólo las trisomías de los cromosomas autosómicos 13, 18, 21 y la 8 por mosaico llegan a sobrevivir hasta el nacimiento. De éstas, las trisomías 13 y 18 son muy severas presentando el recién nacido múltiples malformaciones que los llevan a la muerte en los primeros meses de vida. La trisomía 21 (Síndrome de Down) puede llegar a término y tiene una supervivencia mayor ⁽³⁾. Es la enfermedad cromosómica mejor conocida. Su frecuencia es de 1 en 700 recién nacidos, no depende de factores étnicos, pero sí de la edad materna. Por lo general el diagnóstico clínico no ofrece dificultad y puede hacerse al nacimiento. El retraso mental es constante. Puede presentar malformaciones cardíacas e intestinales. La pubertad es normal en ambos sexos, pero la fertilidad sólo se conoce en la mujer. Desde el punto de vista citogenético, existen tres tipos principales de trisomía 21: a) Trisomía libre (92%), b) Trisomía 21 por translocación robertsoniana (4.8%) y c) Trisomía 21 en mosaico (2.7%) ⁽⁴⁾.

Un ejemplo de trisomía de cromosomas sexuales es el Síndrome de Klinefelter (47, XXY). Su incidencia se estima de 1 en 600-800 recién nacidos masculinos. El cromosoma adicional en estos pacientes a menudo es adquirido por un error de disyunción durante la ovogénesis (56%) o la espermatogénesis (44%). En la mayoría de los casos, el síndrome se diagnostica en la adolescencia o en la edad adulta por presentar testículos pequeños, talla alta e infertilidad ⁽⁵⁾.

Otro ejemplo de trisomía de cromosomas sexuales es el síndrome XXX o triple X. Se observa en casi 1/1000 mujeres y no tiene consecuencias importantes. Rara vez se observan alteraciones físicas manifiestas, aunque estas mujeres suelen presentar

infertilidad, irregularidades menstruales o retraso mental leve. Suelen ser diagnosticadas por primera vez en las clínicas de infertilidad. Aproximadamente 90% de los casos se debe a no disyunción en la madre y como ocurre en otras trisomias el riesgo se incrementa con la edad materna ^(9 y 10).

El síndrome XYY también es una trisomía de los cromosomas sexuales en donde el varón presenta un cromosoma X y dos cromosomas Y, presentan fenotipo normal. La condición es usualmente detectada sólo durante el análisis genético, solicitado por hipogonadismo o infertilidad. El 47,XYY es consecuencia de la no disyunción de la meiosis II paterna ⁽⁵⁾.

2.1.2. ALTERACIONES ESTRUCTURALES

Las aberraciones estructurales son rearrreglos en la estructura de los cromosomas que pueden originar pérdida ó ganancia parcial de uno o varios cromosomas, pueden afectar tanto a autosomas como a cromosomas sexuales. Siendo 4 los rearrreglos más frecuentes: deleciones, duplicaciones translocaciones e inversiones ⁽⁴⁾. Se producen por ruptura de los cromosomas, seguida por reconstitución con una combinación anormal. Los rompimientos de los cromosomas se pueden inducir por una gran variedad de agentes tales como, radiaciones, infecciones virales, drogas y agentes químicos, etc. ⁽⁹⁾.

2.1.2.1. DELECIÓN

Es la pérdida de material genético de un cromosoma. La deleción puede ser terminal o intercalar; cuando la deleción ocurre en los dos extremos del cromosoma, la porción que porta el centrómero une sus extremos rotos y forma una estructura circular o cromosoma

en anillo ⁽⁷⁾. En algunos casos, las deleciones son el resultado de un entrecruzamiento desigual entre cromosomas homólogos o cromatidas hermanas mal alineadas ⁽¹¹⁾. Los fenotipos dependen del cromosoma y de la región afectada, por ejemplo en el caso del síndrome de maullido de gato, en el que se ha producido una deleción del cromosoma 5 en la región terminal del brazo corto. Este síndrome se caracteriza por retraso mental, microcefalia y cara de media luna que se va alargando con la edad. En muchas ocasiones, las deleciones afectan tan solo a algunos genes independientes pero contiguos, situados uno al lado del otro en el mismo cromosoma, deleciones que sólo son detectables por técnicas como la hibridación in situ o la hibridación in situ con fluorescencia. Se habla entonces de microdeleciones. Algunos síndromes asociados a microdeleciones son el síndrome de Prader-Willi, el síndrome de DiGeorge, el síndrome del retinoblastoma y otros muchos más ⁽¹²⁾. Otro ejemplo lo observamos en la oligospermia o la azoospermia que en algunos casos están asociadas a microdeleciones en el cromosoma Y, en la región donde están situados los genes para el factor AZF (factor de la azoospermia) ⁽¹¹⁾.

Otros ejemplos en cromosomas sexuales los encontramos en pacientes con deleciones en el cromosoma X, como la del brazo largo u ocasionalmente con isocromosoma de brazos cortos del X, estas muestran disgenesia gonadal pero no talla baja u otras características somáticas del Síndrome de Turner. También existen pacientes con deleción del brazo corto del cromosoma X que pueden presentar disgenesia gonadal aunque algunos con pequeñas deleciones terminales presentan solamente talla baja. Los síntomas clínicos que acompañan las pequeñas deleciones distales en el cromosoma X, pueden provocar desde amenorreas secundarias, menopausia prematura hasta amenorrea primaria ⁽¹³⁾.

2.1.2.2. CROMOSOMA EN ANILLO

Un cromosoma en anillo puede ocurrir de dos formas. Una, es que el final de los brazos cortos y largos de los cromosomas se pierdan los telómeros pegándose ambos brazos. Segunda, que el final de los brazos cortos y largos estén pegados juntos con pérdida mínima de material. De cualquier manera el anillo puede causar problemas para el individuo, cuando la célula se divide. También es posible tener un anillo y ser aparentemente saludable sin retrasos en el desarrollo. Como en todas las anomalías cromosómicas depende del tamaño del anillo, cuanto material se ha perdido y que cromosoma está implicado. Este tipo de cromosoma anular es bastante frecuente en carcinomas sarcomas y leucemias ⁽⁸⁾. Si el anillo contiene el centrómero, se espera que sea mitóticamente estable. Sin embargo, muchos anillos presentan dificultades en la mitosis y pueden presentarse rupturas del anillo, seguidas de una fusión y entonces se genera un anillo más grande y otro más pequeño. Debido a esta inestabilidad mitótica, no es raro encontrarse cromosomas en anillo en solo una proporción de células ⁽¹¹⁾.

2.1.2.3. DUPLICACIÓN

Se dice que hay duplicación cuando un segmento o una misma secuencia de genes aparecen dos veces en un mismo cromosoma ⁽⁴⁾. Las duplicaciones surgen cuando un segmento cromosómico se replica más de una vez por error en la duplicación del ADN, como producto de una reorganización cromosómica de tipo estructural, o relacionado con un proceso de entrecruzamiento defectuoso ⁽¹¹⁾. Las duplicaciones son más comunes que las deleciones y menos deletereas, ya que no existe pérdida de material cromosómico. Sin embargo en individuos que presentan duplicación cromosómica existe

con frecuencia un efecto clínico de deficiencia mental o anomalías congénitas. La duplicación puede afectar a una parte de un gen, a un gen completo o varios de ellos ⁽¹⁴⁾.

2.1.2.4. ISOCROMOSOMAS

Se denominan isocromosomas a los cromosomas metacéntricos producidos durante la meiosis o mitosis, cuando el centrómero se divide transversalmente en lugar de longitudinalmente originando un cromosoma con los dos brazos largos y otro con dos brazos cortos que generalmente se pierde. Cada uno de estos isocromosomas constituye al mismo tiempo una deleción y una duplicación. Los isocromosomas no se presentan frecuentemente ⁽¹³⁾, el isocromosoma más común es el del brazo largo del X, 46,Xi(Xq) cuyo fenotipo presenta características de Síndrome de Turner. También se han descrito isocromosomas para autosomas, como el del brazo corto del cromosoma i(18p) y del cromosoma i(12)(p10) o Síndrome de Pallister. Este tipo de alteraciones estructurales también se observan en cariotipos de tumores sólidos y de leucemias ⁽¹¹⁾.

2.1.2.5. TRANSLOCACIONES

Implican el intercambio de material entre dos o más cromosomas. Las translocaciones pueden ser *no balanceadas*, cuando el reordenamiento origina una ganancia ó una pérdida de material cromosómico. Las *balanceadas* cuando no hay una ganancia o pérdida de material cromosómico. Las translocaciones balanceadas constituyen una de las cromosopatías más frecuentes en el ser humano, con una prevalencia de al menos 1/500 ó 1000 individuos ^(3 y 12).

Un ejemplo son las ***Translocaciones robertsonianas*** que se genera cuando los brazos largos de dos cromosomas acrocéntricos se fusionan por los centrómeros, con pérdida de ambos brazos cortos. Está restringida a los cromosomas acrocéntricos: 13, 14, 15, 21

y 22. En las translocaciones balanceadas habitualmente el fenotipo es normal porque los brazos cortos de todos los cromosomas acrocéntricos contienen copias redundantes de los genes de RNA ribosómico así que la pérdida de esa región de uno o dos cromosomas no afecta al individuo ^(4 y 9).

Las **Translocaciones recíprocas** se generan por ruptura en dos cromosomas no homólogos con intercambio recíproco de material cromosómico (los cromosomas resultantes se denominan cromosomas derivativos). El portador de una translocación recíproca puede ser fenotípicamente normal. Existe riesgo de gametos no balanceados y de fenotipo anormal en la descendencia ^(4 y 9).

Las **Translocaciones no recíprocas** se generan por ruptura en dos cromosomas no homólogos donde solo pasa material de un cromosoma a otro y el producto final será un cromosoma con falta de material y uno que posee material extra de otro.

2.1.2.6. INVERSIONES

Este tipo de alteración estructural tiene lugar cuando se dan dos rompimientos dentro de un mismo cromosoma y el segmento intermedio gira 180° (se invierte) y se vuelve a unir, formando un cromosoma que estructuralmente tiene la secuencia de genes alterada ⁽³⁾.

La inversión puede ser paracéntrica si el segmento invertido no incluye el centrómero o pericéntrica si el centrómero queda incluido. Normalmente no hay riesgo de problemas para el individuo si la inversión es balanceada y de origen *familiar* (es decir, se ha heredado de uno de los progenitores). En inversiones balanceadas de novo hay un riesgo mayor de que el individuo presente malformaciones o deficiencia mental debido a la interrupción de una secuencia clave de un gen ó pérdida de material. Los portadores balanceados tienen un riesgo ligeramente mayor de producir un embrión con un

desequilibrio cromosómico, originado por la dificultad para emparejarse con su homólogo normal durante la meiosis, lo que produce una aneusomía de recombinación que da lugar a cromosomas no balanceados que tienen pérdida y ganancia de material genético en el mismo cromosoma ⁽³⁾.

2.1.2.7. CROMOSOMAS MARCADORES

Son fragmentos de cromosomas de diferentes tamaños que su patrón de bandeo es muy ambiguo y debido a ello es difícil identificar su origen por técnicas de bandeo convencional. En las preparaciones cromosómicas los observamos como cromosomas no identificados, que suelen presentarse en forma de mosaico. Para lograr su identificación precisa se utiliza la técnica molecular de FISH (Hibridación in situ con fluorescencia) y en ocasiones es necesario utilizar más de una sonda ⁽¹¹⁾.

2.2. EL CARIOTIPO HUMANO

Es el ordenamiento de los cromosomas de acuerdo a su tamaño y localización del centrómero y es importante porque el cariotipo permite examinar cada par cromosómico en busca de alteraciones numéricas o estructurales ^(2 y 4).

Los cromosomas metafásicos humanos presentan tres formas básicas y se pueden clasificar de acuerdo con la longitud de los brazos corto y largo, así como por la posición del centrómero (figura 3). Los cromosomas **metacéntricos** tienen los brazos aproximadamente de la misma longitud, con el centrómero en el punto medio. Los cromosomas **submetacéntricos** tienen los brazos corto y largo de longitudes desiguales, con el centrómero más próximo a uno de los extremos. Los cromosomas **acrocéntricos** tienen el centrómero muy cerca de un extremo, con un brazo corto o pequeño. Con frecuencia tienen constricciones secundarias en los brazos cortos, conectando trozos muy pequeños del DNA, llamados tallos y satélites, al centrómero. Los tallos contienen genes que codifican el RNA ribosómico ⁽⁴⁾.

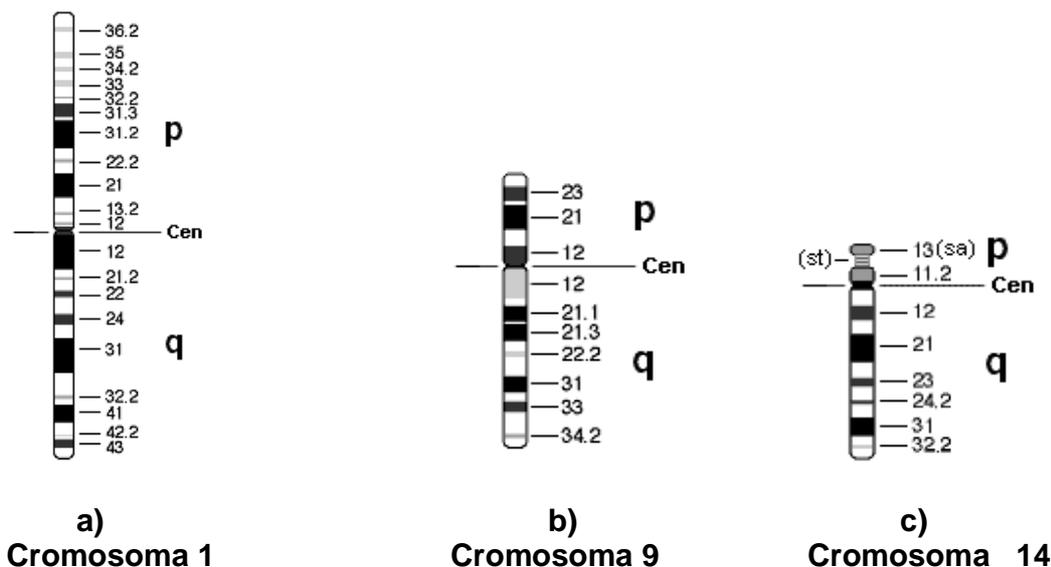


Fig.3 . Morfología de los cromosomas metafásicos según la localización del centrómero a) metacéntrico, b)submetacéntrico, c)acrocéntrico con sus satélites.

Imágenes de Dynagene Cytogenetics Laboratory por Dave McDonald.

Los cromosomas de acuerdo a la información que portan se dividen en autosomas y cromosomas sexuales. Tenemos 46 cromosomas, organizados en 23 pares. De estos, 22 son iguales para mujeres y hombres, (autosomas). El par 23 corresponde a los cromosomas sexuales, estos definen el sexo genético de un organismo ⁽⁴⁾.

El cariotipo humano está formado por 7 grupos designados con letras A, B, C, D, E, F y G:

Grupo A: Son los cromosomas más grandes del cariotipo e incluyen los pares 1,2 y 3. El 1 y el 3 son metacéntricos, mientras que el 2 es submetacéntrico.

Grupo B: Comprende los pares 4 y 5 que son submetacéntricos y de morfología muy similar.

Grupo C: A este grupo pertenecen los pares autosómicos 6 al 12, que son submetacéntricos. El cromosoma sexual X es de tamaño similar a los de este grupo.

Grupo D: Corresponden a este grupo los pares 13, 14 y 15, los cuales son acrocéntricos y presentan, satélites en sus brazos cortos.

Grupo E: Forman este grupo los pares 16, 17 y 18, que son submetacéntricos, pero el 16 presenta su centrómero más próximo a la parte media.

Grupo F: Los pares 19 y 20 pertenecen a este grupo, son cromosomas metacéntricos y pequeños.

Grupo G: Está integrado por los pares 21 y 22, que son los cromosomas más pequeños del cariotipo, son acrocéntricos y presentan satélites. El cromosoma sexual Y, es de tamaño similar a los de este grupo y no presenta satélites.

2.3. TÉCNICAS DE BANDEO CROMOSÓMICO

Para poder identificar los cromosomas es necesario bandearlos. El descubrimiento de las técnicas de bandeo cromosómico ha significado un considerable progreso tanto en citogenética humana ya que, al poder obtenerse imágenes reproducibles de la existencia de estructuras cromosómicas transversales (bandas) de diferente tamaño a lo largo de los cromosomas, ha sido posible disponer de una herramienta de identificación de cada cromosoma humano. Adicionalmente, esta metodología ha permitido localizar con certeza los puntos de fractura observados en la mayoría de los reordenamientos estructurales y establecer qué cromosomas están involucrados en dichas aberraciones. Estas posibilidades citológicas han sido de gran ayuda a nivel clínico ya que se ha logrado diferenciar y caracterizar citogenéticamente un elevado número de nuevos síndromes de malformación y retraso mental congénitos ⁽¹⁵⁾.

Existen diferentes sistemas de tratamiento y de tinción de los cromosomas. Los protocolos de bandeo cromosómico utilizan las características propias de las bandas específicas para revelarlas de manera que se considera que las técnicas usadas ponen en evidencia un patrón básico de organización del cromosoma que se considera especie específico ⁽³⁾. Existen bandas que identifican todos los pares cromosómicos y bandas que identifican solo algunos pares o parte de un cromosoma. Las bandas C, G, Q y R las encontramos en los 46 cromosomas, mientras que las bandas de replicación, identifican particularmente los cromosomas sexuales y las bandas NORs identifican regiones de cromosomas acrocéntricos ⁽⁶⁾.

2.3.1.1. BANDAS G

Aquí los cromosomas son sometidos a digestión con la enzima Tripsina de manera controlada y posteriormente teñidos con Giemsa que es un colorante químico que se une a ADN apareciendo regiones densamente teñidas y regiones menos densamente teñidas. Se origina un patrón de bandas claras y oscuras típico de cada cromosoma. El número de bandas depende del grado de desespiralización de los cromosomas y cada cromosoma tiene un patrón de bandas característico (figura 4), lo que hace posible identificar con mayor precisión las distintas alteraciones ⁽¹¹⁾. Las Bandas G son las que de inicio utilizan la mayoría de los laboratorios. Esta técnica ha sido utilizada de rutina en el laboratorio de Reproducción y Genética..

BANDAS G

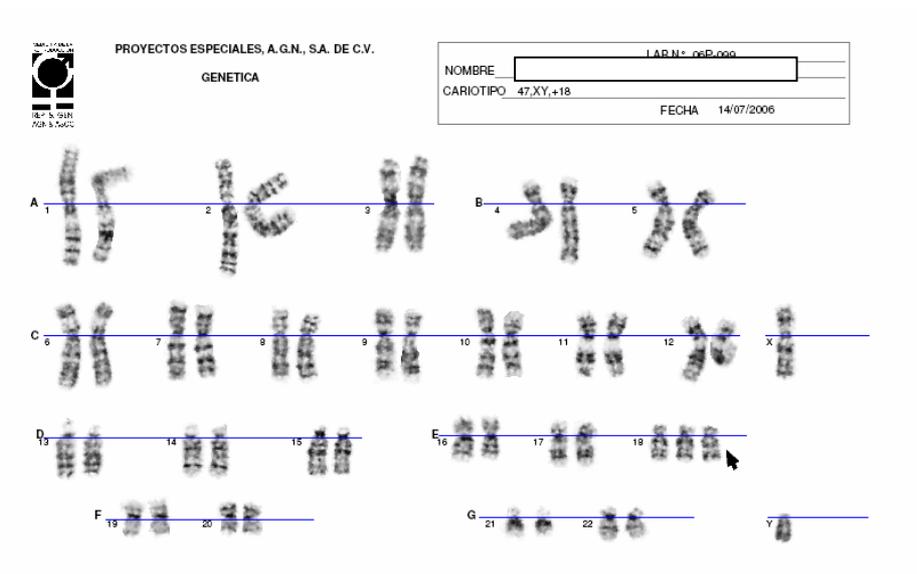


Fig. 4. Cariotipo masculino con trisomía 18 (Síndrome de Edward) con bandas G.
Imagen del laboratorio de Genética de Reproducción y Genética.

NIVEL DE BANDAS

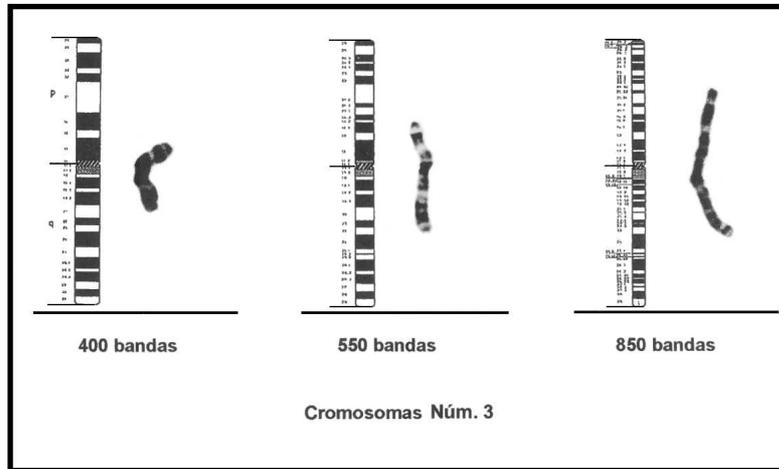


Fig. 5. Se muestra al cromosoma 3 con tres diferentes niveles de bandeo.
Imagen de Guizar-Vázquez J. Jesús. 2001. Genética Clínica. Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias.

2.3.1.2. BANDAS Q

Se tiñen los cromosomas con un colorante fluorescente (mostaza de Quinacrina) que se une preferentemente a ADN abundante en AT y se observan mediante fluorescencia ultravioleta. Las bandas fluorescentes se corresponden con segmentos oscuros de las bandas G, es decir se observa el mismo patrón de bandeo (figura 6). Debido a la fluorescencia de las bandas en las regiones ricas en adenina-timina, son útiles en la identificación de polimorfismos. Es muy evidente la región distal de Yq y las regiones centroméricas de los cromosomas 3 y 4, así como los satélites y regiones centroméricas de los cromosomas acrocéntricos. En la práctica actual se utilizan en la identificación específica del cromosoma Y y de polimorfismos. Un ejemplo es la identificación de polimorfismos en muestras de líquido amniótico hemáticas con resultado del cariotipo 46,XX. Para descartar si las células son del feto o de la madre, se toma muestra de sangre de la madre y del padre y se comparan los polimorfismos con los observados en las células del líquido amniótico. Si son células fetales deberían tener algún polimorfismo de los observados en el padre ^(4 y 15).

BANDAS Q

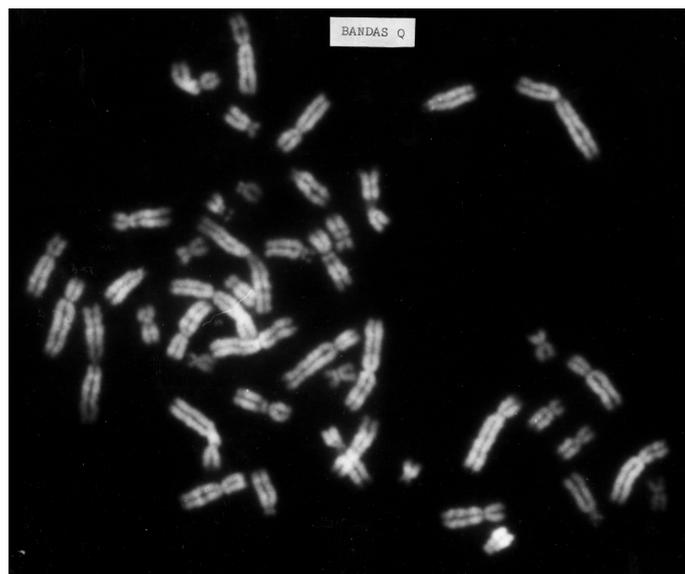


FIG. 6. Metafase con bandas Q. *Cortesía Dra. Mabel Cerrillo.*

2.3.1.3. BANDAS R

Esta técnica produce un patrón de bandas opuesto al patrón de bandeado G o Q así, las bandas que no son bien teñidas por el bandeado G o Q (figura 7), son intensamente teñidas por el proceso de bandeado R. Para este tipo de bandeado se requiere tratar las muestras a temperaturas elevadas. La desnaturalización selectiva del ADN rico en AT es teñido con naranja de acridina después del tratamiento con calor. El tratamiento con calor induce la desnaturalización de proteínas cromosómicas, así como de las secuencias nucleotídicas enriquecidas con AT, dejando el ADN rico en G C de las bandas R con una configuración natural. Se pueden utilizar para detectar las deleciones de los extremos de los cromosomas que son bandas brillantes (15, 16 y 17).

BANDAS R



FIG. 7 Metafase con bandas R.
Imagen de Dr. Marshall Horwitz, Univ. Washington

2.3.2.1. BANDAS R DE REPLICACIÓN

El bandeo R-replicativo, se realiza mediante el uso de pulsos terminales de un análogo a la timidina, el 5-Bromo2'-deoxiuridina (BrdUrd) para determinar la cronología de la duplicación del genoma a través de la fase S. El tiempo de aplicación de BrdUrd, varía según la duración del ciclo celular y espera marcar las células que estén pasando o vayan a pasar por la fase S desde su adición. Durante la fase S la cadena de ADN se separa para duplicarse y es ahí donde el BrdUrd se incorpora en lugar de la T, ya que su concentración en el medio de cultivo es mucho mayor que la de la base nitrogenada producida por la célula ⁽¹⁴⁾. Para revelar las zonas del cromosoma donde se incorporó el BrdUrd se utilizan fluorocromos como Hoechst 33258 o la naranja de acridina y se incuban con luz (lámpara *Sylvania Capsylite* 75w, 120w PAR 30, a 65 °C durante 30 minutos) en solución salina citratada (2xSSC). El fluorocromo que es afín a las regiones ricas en A-T, en presencia de esta luz, fotoliza el halógeno del BrdUrd dejando en su lugar un precursor del Uracilo (U) que no revela tinción al ser tratado con giemsa. El resultado es un patrón de bandas donde las R opacas son regiones ricas en C-G y de duplicación temprana y las R brillantes formadas por regiones A-T de replicación tardía. Esta técnica permite reconocer el comportamiento replicativo de la cromatina, de tal forma que es posible identificar con exactitud regiones inactivas o de replicación tardía de mucha utilidad en la detección de los cromosomas sexuales y regiones activas de replicación temprana, importantes para la expresión génica. Una utilidad práctica de este patrón de bandas es valorar los rearrreglos balanceados y no balanceados donde el cromosoma X esté involucrado, Un ejemplo sería la translocación X-autosoma y X-Y. En rearrreglos balanceados se inactiva el X normal y en rearrreglos no balanceados se inactiva el X junto con la parte autonómica del cromosoma translocado, todo esto para mantener el equilibrio de complemento cromosómico ⁽¹⁴⁾.

2.3.3.1. BANDAS C

La técnica de Bandas C (Sumner 1972), produce una tinción oscura selectiva sobre la heterocromatina constitutiva (de aquí el nombre de bandas C), la cual está localizada en las regiones centroméricas de todos los cromosomas (figura 8), en los brazos largos de los cromosomas 1, 9 y 16 en las regiones que sigue al centrómero y en la parte distal de los brazos largos del cromosoma Y. Un patrón de bandas C más detallado en cada cromosoma se realiza en prometafase mitótica debido al menor grado de condensación cromosómica que existe en esta fase. Un ejemplo de su utilidad es la identificación de cromosomas dicéntricos y acéntricos ⁽¹⁵⁾.

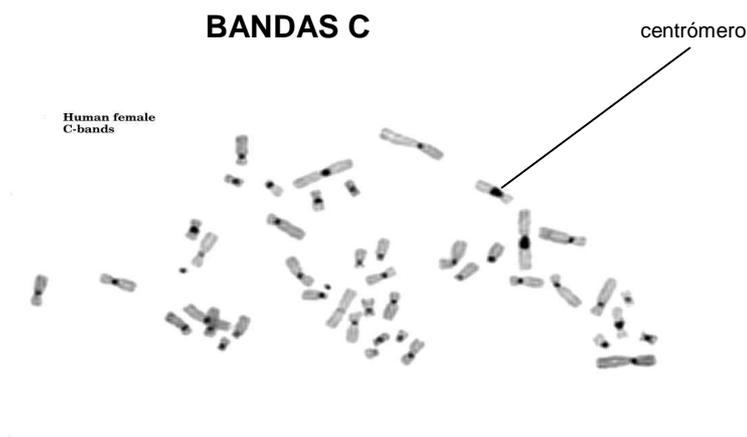


Fig. 8. Metafase con bandas C, donde se indica centrómero de un cromosoma.
Imagen de Dr. Marshall Horwitz, Univ. Washington

2.3.3.2. BANDAS NOR

Es la técnica que identifica los organizadores nucleolares (NOR) de los cromosomas que se localizan en los tallos o constricciones secundarias de los cromosomas acrocéntricos (figura 9). Los organizadores nucleolares forman y mantienen el nucleolo en núcleos en interfase y consisten en cientos de copias de genes del ARN ribosómico 18S y 28S, se pueden poner en evidencia con una técnica de impregnación de plata que identifica con precisión los rearrreglos de brazos cortos de cromosomas acrocéntricos, también pueden identificar cromosomas marcadores ^(4 y 16).

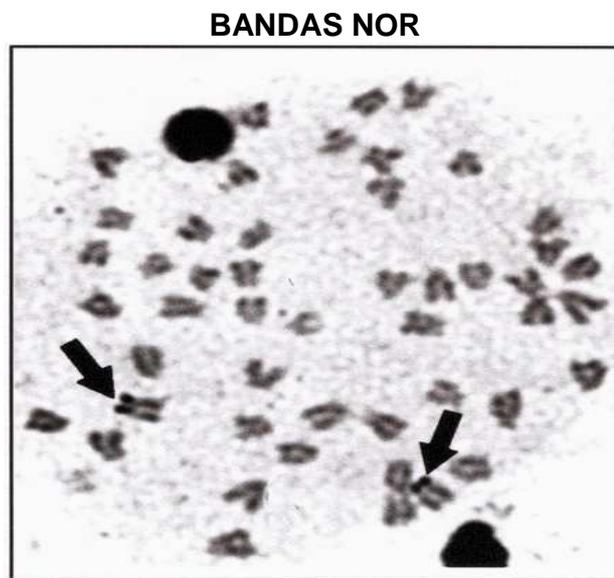


FIG. 9. Metafase con bandas NOR donde se muestra los organizadores nucleolares de dos cromosomas acrocéntricos.
Imagen de Carlos Muñoz. Universidad Arturo Prat, Iquique, Chile.

2.3.3.3. BANDAS DE ALTA RESOLUCIÓN

Permiten identificar alteraciones finas con una resolución de más de 550 bandas. La técnica consiste en detener las células en la profase o prometafase de la división celular, cuando los cromosomas no están totalmente condensados. Para lograrlo, se emplean métodos de sincronización del ciclo celular, lo más utilizado es el bloqueo en fase S por medio de un exceso de timidina o por exposición a metrotexate y después de un tiempo se desbloquea cambiando el medio con el bloqueador por medio fresco que puede contener BrdU. El bandeo en profase solo se utiliza cuando se sospecha una anomalía estructural de un cromosoma en particular ⁽⁴⁾.

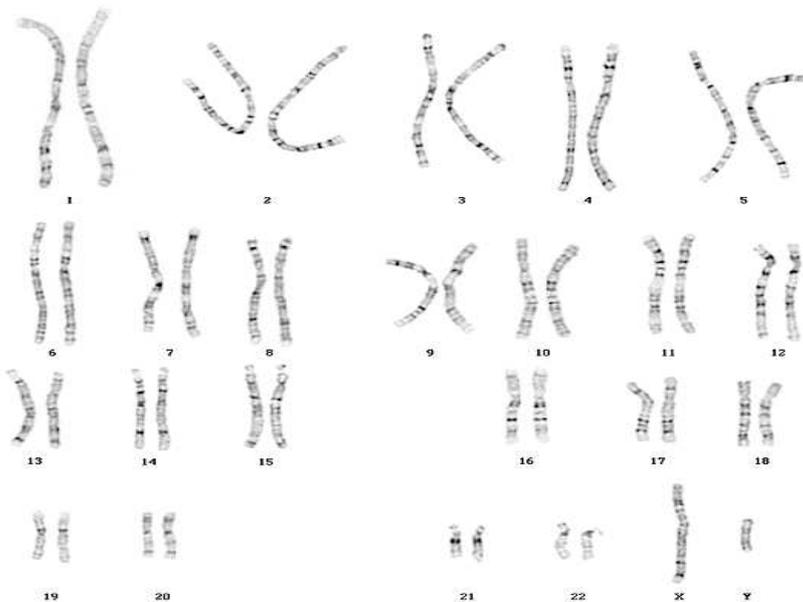


Fig.10. Cariotipo con bandas de Alta Resolución. *ImageShack.com Corp.*

El American College of Medical Genetics (ACMG) recomienda que el bandeo de alta resolución debe reservarse para casos donde un síndrome de microdelección/microduplicación, en el cual su diagnóstico generalmente requiere de cromosomas con una resolución superior a 550 bandas (figura 10). Además, debido a la gran dificultad y cantidad de trabajo que requiere el análisis de cromosomas de alta

resolución, en la rutina el cariotipo de Alta Resolución de 850 bandas sólo debe ser indicado para mapear regiones cromosómicas específicas ^(4,6, y 18).

2.3.3.4. INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS (ICH)

Con esta técnica se evidencian en cromosomas mitóticos los intercambios que se producen entre las cromátidas de un cromosoma y que se detectan mediante tinción diferencial de las cromátidas (figura 11). Esta tinción diferencial se logra por la incorporación, durante la replicación, de un análogo de timina del DNA como la bromodesoxiuridina (BrdU) por dos ciclos celulares consecutivos y después se somete a fotodegradación. En la práctica médica esta técnica se utiliza para valorar intercambios de cromátidas hermanas en el Síndrome de Bloom así como intercambios adquiridos por exposición a agentes externos como radiación, solventes, sustancias alquilantes, etc. ⁽⁴⁾.

INTERCAMBIO DE CROMATIDAS

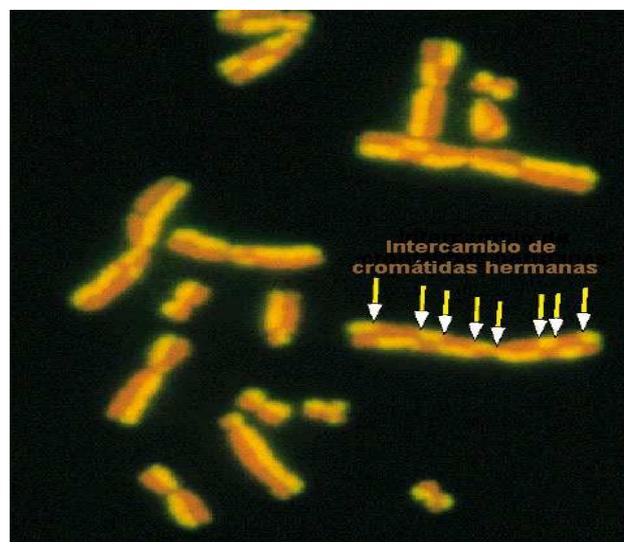


FIG. 11. Se muestran cromosomas con intercambio de cromátidas por tinción diferencial.
Imagen tomada de www.ucm.es/info/genetica/grupod/tetradas

2.4. MARCADORES BIOQUÍMICOS

En los últimos años ha crecido el interés por lograr mayor información sobre la salud del feto desde las primeras semanas de embarazo. Los marcadores bioquímicos y ultrasonográficos del primero y segundo trimestres, son una herramienta que permite conocer qué embarazos están en riesgo de tener un feto con alguna patología ⁽¹⁹⁾.

En 1984 Merkatz ⁽²⁰⁾ reportó que la disminución de AFP (alfafetoproteína) en suero materno se encontraba asociada a Síndrome de Down, a partir de ese descubrimiento se buscaron otros marcadores que en conjunto fueran más sensibles para detectar a las parejas en riesgo de tener un hijo afectado. Los marcadores bioquímicos más utilizados son el Triple y el Cuádruple Marcador, los cuales se realizan en el segundo trimestre entre las 14 a 22 semanas de gestación. Recientemente se implementaron los marcadores del Primer Trimestre, tanto bioquímicos como ultrasonográficos que se realizan en la semana 11 a 13 del embarazo y que tienen la misma utilidad que los anteriores ^(20 y 21). Los marcadores de primero y segundo trimestre se pueden realizar a toda mujer embarazada de salir positivos entonces se sugiere discutir la posibilidad de una prueba diagnóstica como son la Biopsia de Vellosidades Coriales o la Amniocentesis.

2.4.1. MARCADORES EN EL SEGUNDO TRIMESTRE DEL EMBARAZO

El estudio de Triple Marcador se realiza en suero materno y se analizan la alfafetoproteína), (α -FP), el estriol no conjugado (E-3) y la fracción β (β -hCG) y en el Cuádruple además de las tres anteriores se agrega la Inhibina A.

Los resultados de estas sustancias se transforman a múltiplos de la mediana (M.O.M.) * que junto con la edad materna, peso y semana de gestación mediante la utilización de un algoritmo matemático calculado con un programa de cómputo, permite valorar las probabilidades de que el feto presente:

- Síndrome de Down y Trisomía 18
- Defectos del Cierre del Tubo Neural (DCTN)
- Defectos de Pared Ventral
- Patología del embarazo (preeclampsia)

Las ventajas de su utilización son calcular el riesgo de fetos con defectos del cierre del tubo neural (DCTN), de algunas cromosopatías como el Síndrome de Down y el Síndrome de Edward y contribuyen a disminuir el número de pacientes que deban someterse a procedimientos invasivos ⁽²²⁾. La sensibilidad depende del número de sustancias analizadas, siendo el cuádruple marcador más sensible que el triple marcador.

Sensibilidad

Triple Marcador

DCTN: 95%
Sx. Down: 65%
Sx. Edward: 50%

Cuádruple Marcador

DCTN: 95%
Sx. Down: 75%
Sx. Edward: 50%

* Los (MoM), se obtienen dividiendo el valor del marcador por la mediana propia del centro para ese marcador y para la edad gestacional de la embarazada (22).

2.4.2. MARCADORES BIOQUÍMICOS EN EL PRIMER TRIMESTRE DEL EMBARAZO

En 1985 se describió en el segundo trimestre del embarazo la asociación entre el incremento del pliegue nucal con las alteraciones cromosómicas. Posteriormente se observó que ocurría lo mismo en el primer trimestre, llamándolo Translucencia Nucal (TN) ⁽²¹⁾. La prueba permite calcular riesgo de cromosopatías basándose en la medición de la translucencia nucal (por ecografía) y en la determinación en suero materno del valor de la Proteína A Plasmática Asociada al Embarazo secretada por el trofoblasto (PAPP-A) y de la subunidad β libre de HCG (β -HCG) en las semanas 11 a 13 de gestación ^(20 y 21).

Los marcadores bioquímicos PAPP-A y β HCG libre se pueden utilizar en combinación (o no) con la medida de la Traslucencia Nucal (TN) para obtener el riesgo estadístico de anomalías cromosómicas fetales: TRISOMÍA 18 y TRISOMÍA 21. Los marcadores bioquímicos del primer trimestre tienen una **sensibilidad del 68% y si se incluye la TN la sensibilidad se incrementa a 84%**. Es importante aclarar que las determinaciones bioquímicas sólo se pueden realizar en embarazo único (no gemelar). La ventaja de la medición de la TN es que puede utilizarse en embarazos gemelares en los cuales no se puede realizar el tamiz bioquímico ⁽²³⁾.

FACTORES PARA EVALUAR EL RIESGO EN LOS MARCADORES BIOQUÍMICOS

Para evitar falsos positivos es importante tener todos los datos correctos de la paciente para calcular el riesgo:

- Nombre completo
- Fecha de nacimiento (día, mes y año)
- Peso al momento de la toma

- semanas de gestación por ultrasonido
- Número de fetos
- Fecha última de menstruación
- Si es diabética insulino-dependiente o no
- Raza
- Antecedentes heredofamiliares

1. Peso de la madre, influye en la concentración sérica de la α -FP en la circulación materna, mientras más elevado sea el peso materno más baja es la concentración de α -FP materna.
2. Diabetes de la madre, insulino-dependientes tienen niveles significativamente más bajo que las mujeres no diabéticas.
3. Raza. En la población negra es 10 % más elevado que en otras poblaciones.
4. Número de fetos. Se observan valores elevados en embarazos múltiples.

Para que un resultado de marcadores bioquímicos se considere positivo, el valor obtenido debe estar por debajo de los límites de corte siguientes:

- Síndrome de Down es de 1:270 embarazos
- Trisomía 18 es de 1:100 embarazos
- DCTN es de 1 a 2 por 1000 embarazos

Cuando se obtiene un resultado positivo, se tiene que checar que los datos de edad y semanas de gestación por ultrasonido sean los correctos para obtener menor número de falsos positivos, se recomienda hacerlo en base a la semana de gestación por ultrasonido y no por amenorrea.

3. APRENDIZAJE Y EXPERIENCIA ADQUIRIDA

En este capítulo se describen las actividades realizadas a lo largo de nueve años distribuidas en tres etapas.

3.1. PRIMERA ETAPA

Esta etapa muestra los pasos para la elaboración de un cariotipo en forma manual, para la técnica de bandas G y el manejo de las diferentes muestras para la obtención del cariotipo

3.1.1. ELABORACIÓN DE UN CARIOTIPO

En el entrenamiento para elaborar un cariotipo en forma manual se utilizaron fotografías impresas de casos ya terminados. El primer paso fue contar los cromosomas de la metafase y en seguida recortarlos. Una vez recortados todos los cromosomas, el segundo paso era acomodarlos de acuerdo al Sistema Internacional de Nomenclatura en Citogenética Humana (ISCN 1995,2005)⁽²⁴⁾. A cada par cromosómico se le asigna un número de acuerdo a su tamaño, posición del centrómero y patrón de bandas. El tercer paso, una vez ordenados, era pegarlos en una cartulina membretada y anotando su fórmula cromosómica, nombre del paciente y fecha de elaboración (figura 12). Finalmente el cariotipo ya completo se enmicaba.

CARIOTIPO MANUAL

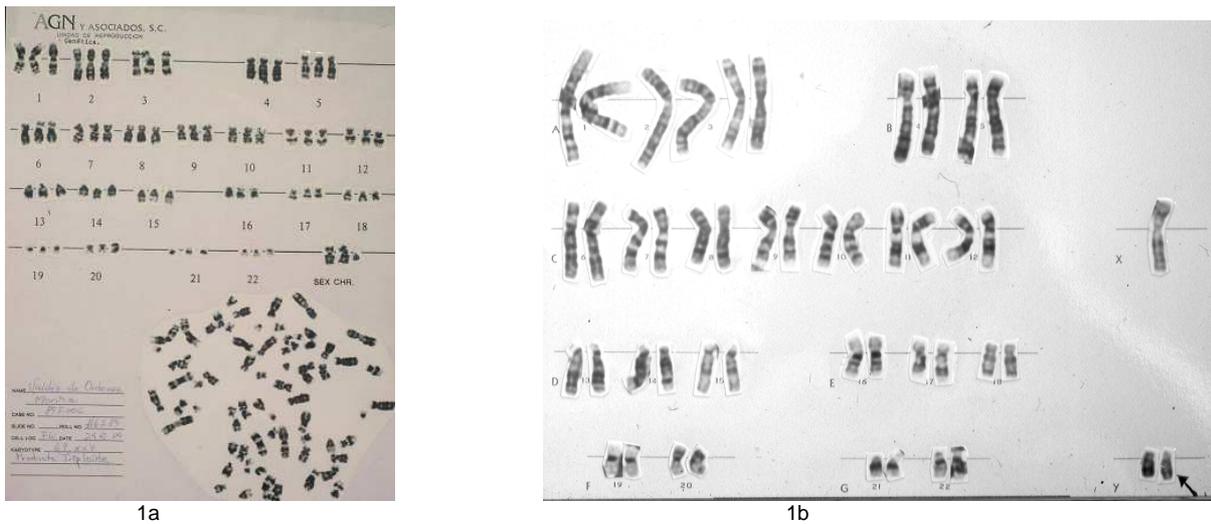


Fig.12. Muestra dos cariotipos recortados manualmente, 1a) cariotipo triploide masculino, con la metafase antes de ser recortada. 1b) cariotipo masculino con síndrome XYY. *Imágenes del laboratorio de Genética de Reproducción y Genética.*

3.1.2. BANDEO CROMOSÓMICO

Las bandas G son la técnica base para obtener el patrón de bandeo y realizar un cariotipo. Para poder realizar el bandeo G se procede a 1) preparar las soluciones “stock” de los diferentes reactivos: solución salina, tripsina, colorante Giemsa, “Buffers” de Fosfatos y después llevar acabo la técnica.

3.1.2.1. SOLUCIONES

Para preparar las soluciones trabajo para las bandas G, se utilizan 7 frascos de koplín con las siguientes soluciones:

Tripsina

- 1) Disolver 0.5 g de tripsina en 10 ml de H₂O destilada.
- 2) Hacer alicuotas de 0.5 ml y congelar.
- 3) Solución trabajo: disolver una alicuota en 50 ml de solución salina, poner el pH a 8 con Bicarbonato de sodio al 7.5%.

Colorante Giemsa

5 ml de Giemsa
2.5 ml de Buffer A
2.5 ml de Buffer B
42.5 ml de Agua destilada

“**Buffer**” **A**: 45.36 g de K_2HPO_4 y aforar en 1 litro de agua destilada

“**Buffer**” **B**: 59.32 g de Na_2HPO_4 y aforar en 1 litro de agua destilada

Colorante “Wright”

12.5 ml de colorante Wright
12.5 ml de Buffer

“Buffer” para “Wright”

K_2HPO_4	6.63 g
Na_2HPO_4	2.56 g

Aforar a un litro con agua destilada

Tren de bandeo (figura 13)

- Frasco 1: Solución salina al 0.9%
- Frasco 2: Solución de tripsina
- Frasco 3: Agua corriente
- Frasco 4: Colorante Wright
- Frasco 5: Agua corriente
- Frasco 6: Colorante Giemsa
- Frasco 7: Agua corriente

3.1.2.2. TÉCNICA MODIFICADA DE BANDAS G (Dretts, 1971)

- a) En una estufa bacteriológica a 60°C se maduran las laminillas 24 horas antes.
- b) Se pasan las laminillas 1 minuto por solución salina de Cloruro de Sodio al 0.9%.
- c) En seguida se colocan a la solución de tripsina (0.00025 grs/ml) a pH 8 por 1 ó 2 minutos.
- d) Posteriormente se enjuagan por 10 segundos en agua corriente
- e) Se tiñen en colorante Wright por 2 segundos.
- f) Después se pasan al colorante Giemsa por 5 a 10 minutos y se checa la tinción al microscopio y si ya está teñida,
- g) Se enjuagan en agua por 5 a 10 segundos.
- h) Se dejan secar al aire y se montan con Entellan.

REACTIVOS PARA BANDAS G

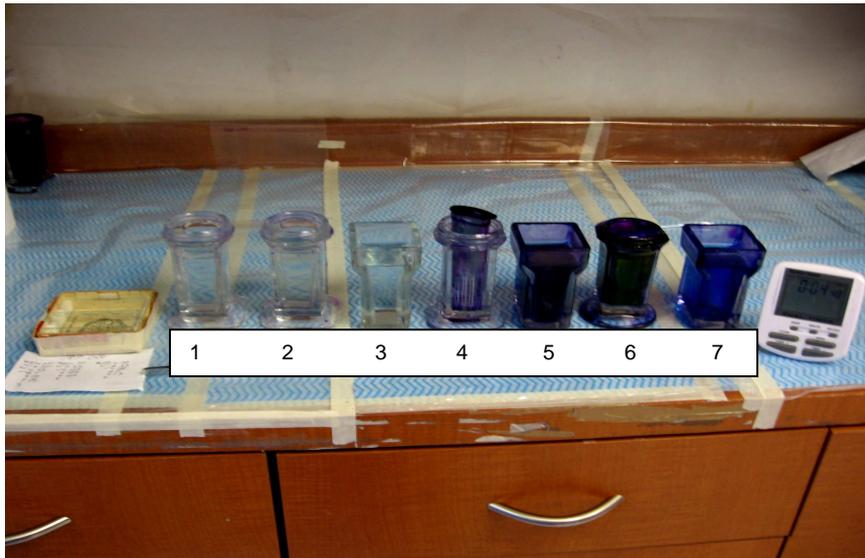


FIG. 13. Se observa el tren de bandeado con las diferentes soluciones utilizadas para bandas G. *Imagen del laboratorio de Genética de Reproducción y Genética.*

3.1.3. MANEJO DE INFORMACIÓN Y PROGRAMACIÓN DE MUESTRAS

Se recomienda que la realización de cualquier prueba genética deba ir acompañada de un asesoramiento genético previo.

De acuerdo al problema del paciente o la pareja, es el tipo de muestra y las condiciones para solicitar el cariotipo, se describe a continuación la forma de obtener, conservar y transportar las diferentes tipos de muestras que se procesan en este laboratorio.

La Clínica al ser un grupo de referencia en reproducción y genética se reciben muestras para estudios citogenéticos y para marcadores bioquímicos, de otros hospitales y de consultorios de la Ciudad de México y del interior del país.

3.1.3.1. MANEJO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS

INDICACIONES:

- Se puede realizar a toda mujer embarazada sin importar edad o antecedentes

ESPÉCIMEN REQUERIDO:

- 3 ml de suero materno

OBTENCIÓN

- Con una jeringa desechable marca Plastípak de 3 ml (otras marcas son citotóxicas) mediante venopunción obtener 5 ml de sangre o con vacutainer en un tubo sin anticoagulante.

PROCESO

- Se capturan datos de la paciente y su embarazo para calcular el riesgo de que el feto esté afectado: edad, peso, semanas de gestación por ultrasonido, si es o no diabética insulina dependiente y número de fetos.
- Se centrifuga la sangre total a 1000 rpm x 5 minutos, se separa el suero y se deposita en dos tubos estériles, los cuales se etiquetan con el nombre completo de la paciente y fecha de toma de la muestra. Se congelan dentro de las dos primeras horas después de la toma, para conservar la estabilidad de los marcadores que se analizan en la muestra.

3.1.3.2. MANEJO DE MUESTRAS DE LÍQUIDO AMNIÓTICO PARA ESTUDIO PRENATAL

INDICACIONES:

- Edad de la mujer \geq 35 años
- Progenitor portador balanceado de una translocación o una inversión
- Triple ó Cuádruple marcador positivo
- Parejas con un hijo previo con Síndrome de Down o cualquier otra cromosomopatía
- Parejas que han tenido uno o más hijos con malformaciones de causa desconocida
- Mujeres embarazadas cuya gestación manifieste por ultrasonido signos indirectos de malformación fetal
- Angustia materna

ESPÉCIMEN REQUERIDO:

- Se requieren de 10 a 15 ml de líquido amniótico obtenido mediante una amniocentesis con jeringas plastipak ya que otras marcas (Jelco, Terumo, Omnifix

y Monojet) han sido asociadas con fallas del cultivo celular debido a la toxicidad de las mismas.

- La jeringa debe traer el protector en la aguja y tela adhesiva para fijar el émbolo (para evitar que el líquido se derrame).
- Esta muestra es obtenida por un gineco-obstetra bajo guía ultrasonográfica.

3.1.3.3. MANEJO DE PRODUCTOS DE ABORTO

INDICACIONES PARA REALIZAR EL CARIOTIPO

- Pacientes con pérdidas recurrentes.
- En programa de reproducción asistida.
- Cuando el estudio ultrasonográfico muestre que el feto presente malformaciones.

ESPÉCIMEN REQUERIDO:

- Vellosidades coriales, piel, sangre, o cualquier otro tejido fetal.
- Se debe obtener en condiciones asépticas 20 a 30 mg de muestra (sin disecar)
- La muestra se debe lavar con solución salina y depositar en un frasco estéril de boca ancha y con tapón de rosca, que contenga 10 ml de medio de cultivo (HAM, MEN, McCoy, RPMI) y 0.5 ml de heparina de 1000 U e inmediatamente cerrar y sellar muy bien con tela adhesiva. Etiquetar el frasco con el nombre completo de la paciente y fecha de obtención de la muestra.
- La sangre de Cordón Umbical se debe obtener en las mismas condiciones que se usan para cariotipo en sangre.
- Todas las muestras son obtenidas por el gineco-obstetra en quirófano.

3.1.3.4. MANEJO DE MUESTRAS DE SANGRE PARA CARIOTIPO

INDICACIONES PARA EL CARIOTIPO

- Múltiples malformaciones congénitas
- Retraso mental de etiología desconocida
- Crecimiento o desarrollo anormal
- Genitales ambiguos
- Falta de desarrollo de caracteres primarios o secundarios.
- Historia familiar con anomalías cromosómicas.
- Mujeres con amenorrea primaria
- Parejas expuestas a mutágenos o carcinógenos
- Donadores en caso de inseminación artificial

TOMA DE LA MUESTRA

- Con una jeringa desechable marca Plastipak de 3 ml (otras marcas son citotóxicas) se toman 0.3 ml. de heparina sódica de 1000 U (estéril) y mediante venopunción obtener 2 a 3 ml de sangre
- Colocar el tapón a la aguja y con tela adhesiva fijar el émbolo a la jeringa (para evitar que se derrame).
- También se puede tomar con vacutainer con un tubo con heparina, limpiar el tapón con una torunda de alcohol y obtener de 3 a 5 ml de sangre.
- Etiquetar la jeringa o vacutainer con el nombre completo de la paciente y la fecha de obtención de la muestra y depositarla en un sobre y sellarlo.

3.1.3.5. MANEJO DE MÉDULA ÓSEA O SANGRE EN PACIENTES CON PROBLEMAS HEMATOLÓGICOS

INDICACIONES PARA EL CARIOTIPO

- En pacientes con sospecha de alguna enfermedad hematológica, como leucemia.

ESPÉCIMEN REQUERIDO:

- Médula ósea, sangre

Muestra de la médula ósea:

- Con una jeringa desechable marca Plastipak de 3 ml. (otras marcas son citotóxicas) con 0.3 ml de heparina sódica de 1000 U (estéril) el hematólogo debe obtener mediante punción de 2 a 3 ml de médula ósea de la cresta iliaca o el esternón.

3.1.3.6. CONSERVACIÓN, TRANSPORTE Y FORMA DE ENVÍO AL LABORATORIO

- La muestra debe venir etiquetada con el nombre completo de la paciente y la fecha de obtención de la muestra.
- Debe de CONSERVARSE Y TRANSPORTARSE a temperatura ambiente.
- Muestras obtenidas en fin de semana refrigerar a 4°C hasta su envío.
- NO DEBE DE CONGELARSE
- Las MUESTRAS DEL INTERIOR DEL PAÍS, deben llegar en un máximo de 48 horas después de la toma.

- La muestra debe acompañarse con una HOJA DE SOLICITUD con los siguientes datos : Nombre completo y fecha de nacimiento de la paciente, fecha de obtención de la muestra, indicación del estudio, antecedentes familiares y de la pareja, fecha de la última menstruación o las semanas de gestación por ultrasonido, nombre completo del médico o ó laboratorio solicitante, domicilio, teléfono, fax y/o correo electrónico.
- En las muestras de Médula Ósea también debe indicarse si se trata de una muestra previa a tratamiento y si es posterior al mismo se debe indicar.

3.1.4. ENTREVISTA A PACIENTES PARA AMNIOCENTESIS

Otra actividad de mi aprendizaje en esta primera etapa, fue entrevistar a las pacientes que acudían al consultorio para realizarse una amniocentesis (toma de muestra de líquido amniótico). Les explicaba los riesgos-beneficios, así como las limitaciones del procedimiento y con esta información les solicitaba su consentimiento por escrito.

Les informaba:

- a) Que la amniocentesis es un procedimiento invasivo que se realiza con guía ultrasonográfica insertando dentro del útero una aguja fina especial para obtener una muestra de líquido amniótico de 15 a 20 ml (figura 14).
- b) Los beneficios del estudio citogenético prenatal de líquido amniótico es su carácter diagnóstico. El objetivo de la amniocentesis es diagnosticar precozmente anomalías cromosómicas en el feto para que en caso de que existan, puedan tener la opción de interrumpir el embarazo y si no las presenta, la pareja disfrute lo que resta de su embarazo con mayor tranquilidad.
- c) Que la prueba tiene limitaciones, ya que no se detectan enfermedades génicas. Si la paciente tiene antecedentes familiares o hijos con alguna enfermedad génica, se le

informaba que necesitaba un asesoramiento genético con el médico genetista valorara el tipo de estudio adicional de ser necesario ya sea enzimático ó molecular para detectar la patología.

d) Que existe riesgo de pérdida del embarazo, pero que este es mínimo (menor del 0.2%), siempre y cuando el procedimiento lo realice un médico gineco-obstetra experimentado y utilice el equipo apropiado

AMNIOCENTESIS

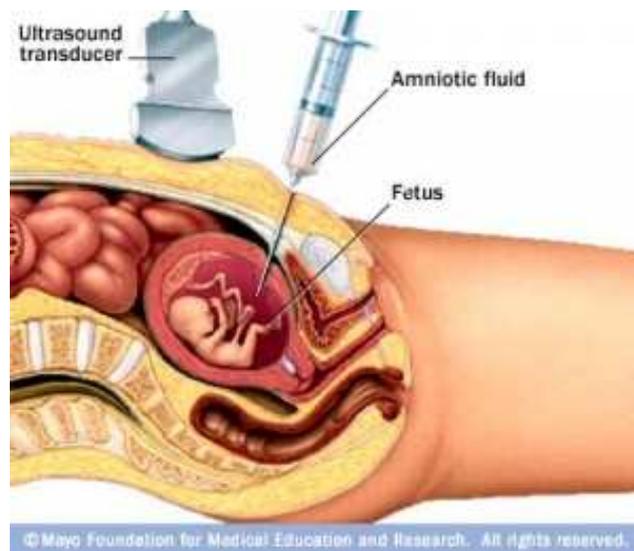


FIG. 14. En la amniocentesis se introduce una aguja por vía transabdominal en la cavidad amniótica y se obtienen de 15 a 20 ml con una jeringa, para estudios de cariotipo, bioquímicos o moleculares. La ecografía se lleva a cabo de manera sistemática antes, durante y después del procedimiento. *Imagen de la Clínica Mayo.*

3.1.6. ACTIVIDADES RELACIONADAS AL TRABAJO PROFESIONAL

El aprendizaje de otras actividades relacionadas al trabajo profesional fué importante para comprender el proceso que sigue el paciente desde que llega hasta obtener su resultado.

- Información vía telefónica a pacientes y médicos sobre todos los estudios que se realizaban y todo lo referente al envío de sus muestras.
- Coordinación y programación de citas para los estudios citogenéticas y marcadores bioquímicos.
- Recepción de muestras cuidando que llegaran en las condiciones adecuadas para su proceso
- Entrega de resultados a médicos y pacientes
- Programación del mantenimiento preventivo y correctivo de los equipos.

3.2. SEGUNDA ETAPA

En esta etapa el aprendizaje se centró en el proceso de los cultivos de muestras de sangre y médula ósea, así como del uso de un software para la elaboración semiautomática de cariotipos.

La primera regla para cultivar muestras biológicas es evitar la contaminación por lo que es de suma importancia la limpieza del área, la manipulación de las muestras y reactivos a utilizar. El proceso de siembra de la muestra se hacía en una campana de flujo laminar horizontal, en un cuarto de cultivo con aire filtrado con 99.9% de pureza, temperatura a 24° C con los equipos funcionando y conectado a planta eléctrica de emergencia del hospital.

3.2.1. CULTIVO DE LINFOCITOS

Para cultivar muestras biológicas es necesario evitar la contaminación, es importante la limpieza del área, la manipulación de las muestras y reactivos a utilizar. El proceso de siembra de la muestra se hace en una campana de flujo laminar horizontal, en un cuarto de cultivo que tiene aire filtrado con 99.9% de pureza, temperatura a 24° C con los equipos funcionando y está conectado a planta eléctrica de emergencia del hospital.

Para el cultivo de linfocitos se necesita tomar la muestra con heparina, posteriormente se hace la siembra con fitohemaglutinina, se incuban a 37°C por 72 h, se cosecha, se elaboran laminillas y al final se maduran.

3.2.1.1. TOMA DE LA MUESTRA

La enfermera toma la muestra en condiciones asépticas, limpia el área y con una jeringa de 5 ml (la cual tiene 0.3 ml de heparina de 1000 U) o con vacutainer, en un tubo (previa limpieza con alcohol) que contenga heparina (tapón verde), se obtienen 3 ml de sangre venosa (figura 15).



FIG. 15 La toma de la muestra, la enfermera limpia el tubo con alcohol.
Imagen del laboratorio de Reproducción y Genética.

3.2.1.2. SIEMBRA

En una campana de flujo laminar cerca de un mechero a tres diferentes frascos de cultivo desechables de 50 ml se le adicionan 10 ml de medio de cultivo Ham F10 con 15% de suero fetal (fig. 17) y 0.1ml de fitohemaglutinina para estimular el crecimiento (fig.18) de los linfocitos y de 0.5 ml. de sangre total (figura 19). Los frascos se etiquetan con el número correspondiente al paciente y se anota el número 1 a un frasco, número 2 al siguiente y número 3 al frasco restante. Se incuban 72 horas a 37°C en una incubadora de CO₂ ó en una estufa bacteriológica (fig. 20).

SIEMBRA DE LINFOCITOS Y MÉDULA ÓSEA

Imágenes del laboratorio de Genética de Reproducción y Genética.



FIG. 16. Reactivos que se utilizan para el cultivo de linfocitos, en médula ósea, se utiliza medio de cultivo Marrowmax y no se utiliza fitohemaglutinina.



FIG.17 Se utilizan 10 ml de medio de cultivo con 15% de suero fetal.



FIG. 18 Se adiciona 0.1 ml de fitohemaglutinina a los cultivos de sangre. A los cultivos de médula ósea no se le adiciona



FIG. 19 En linfocitos y médula ósea se agregan de 0.5 ml de muestra a cada frasco.



FIG.20 Los linfocitos se incuban a 37°C por 72 horas y en médula ósea dependiendo del problema de 24 a 96 horas.

3.2.1.3. COSECHA

- a) Pasando las 72 horas para detener las células en metafase se le adicionan 30 minutos antes de la cosecha dos gotas de colchicina (1 ng/ml) a cada frasco y se vuelven a incubar (fig.21)
- b) Una vez pasados los 30 minutos se vierte el contenido de cada frasco a 3 tubos de ensaye de 15 ml, se centrifuga a 1000 rpm por 7 minutos (fig. 22).
- c) Después del centrifugado se les agrega la solución hipotónica (3ml de Cloruro de Potasio al 0.4% y 3ml de Citrato de Sodio al 0.4%) a temperatura ambiente de 5 a 10 minutos. Este paso es muy importante para obtener preparaciones de alta calidad. Esto hace que las células se expandan, de modo que los cromosomas se extiendan y puedan examinarse individualmente. El tiempo que se exponen las células a la solución hipotónica es crucial (fig.23).
- d) Pasados los 5 a 10 minutos se les agrega el fijador Carnoy (metanol-ácido acético 3:1) y se resuspende con una pipeta Pasteur para desintegrar grumos (fig.24). Para eliminar todos lo eritrocitos se alterna centrifugación con cambio de fijador de 3 a 4 veces hasta que el botón celular esté blanco (libre de eritrocitos) (fig.25).

COSECHA DE LINFOCITOS Y MÉDULA OSEA

Imágenes tomadas de la cosecha en el laboratorio de Genética del Grupo de Reproducción y Genética.



FIG. 21. Se adicionan dos gotas de colchicina 30 minutos antes de las 72 horas en linfocitos y en médula ósea 30 minutos antes del tiempo que que se incubó la muestra.



FIG. 22. Después de los 30 minutos en colchicina se centrifugan a 1000 rpm X 7 min.



FIG. 23 Una vez centrifugado sin el sobrenadante se le agrega la solución hipotónica aprox X 10 minutos y se Resuspende



FIG. 24 Pasados los 10 minutos se le adiciona fijador y se resuspende para que no queden grumos.



FIG. 25 Se alterna centrifugación con cambio de fijador hasta que el botón celular esté blanco.

3.2.1.4. ELABORACIÓN DE LAMINILLAS DE LINFOCITOS Y MÉDULA ÓSEA

El paquete celular sin eritrocitos se resuspende con 0.2 ó 0.4 ml de fijador para lograr la mejor dilución. Aquí la dilución de la muestra es el paso más importante. Con las laminillas previamente lavadas y conservadas en agua corriente, se toma una de ellas con pinzas de disección, se escurre el exceso de agua de la laminilla y se pone en posición horizontal para colocar en el centro una gota de la muestra (fig. 26), se deja secar, en seguida se marca con lápiz diamante con la letra y número del caso, después se observa al microscopio en contraste de fases, si las metafases se observan muy juntas, se agrega fijador para diluir más el botón celular y se le da un pequeño soplido para que se extiendan las metafases. La elaboración de las laminillas es importante porque entre más extendidos estén los cromosomas, más fácil será el bandeo y sobre todo el análisis al microscopio. Se elaboran de 15 a 20 laminillas por caso.

ELABORACIÓN DE LAMINILLAS



FIG. 26. La elaboración de laminillas se hace poniendo una gota de muestra en el centro de la laminilla. *Imagen de laboratorio Genética del Grupo de Reproducción y Genética.*

3.2.1.5. MADURACIÓN DE LAMINILLAS DE LINFOCITOS Y MEDULA ÓSEA

Para poder bandear las laminillas, es necesario que se maduren (deshidraten) en una estufa bacteriológica a 60°C (fig. 27) por lo menos 8 horas para que se deshidraten y el bandeo sea óptimo.

MADURACIÓN DE LAMINILLAS



FIG. 27. La maduración se hace a 60°C en una estufa bacteriológica.
Imagen de laboratorio Genética del Grupo de Reproducción y Genética.

3.2.2. CULTIVO DE MÉDULA ÓSEA

En el cultivo de médula ósea, la toma y la siembra son distintas a las de sangre, variando los tiempos de hipotónica y el número de laminillas que se hacen es mayor.

3.2.2.1. TOMA DE LA MUESTRA

Las muestras de médula ósea son obtenidas de la cresta iliaca (fig.28) o esternón, por un médico hematólogo, se utiliza heparina para que no se coagule la muestra.

TOMA DE MEDULA OSEA

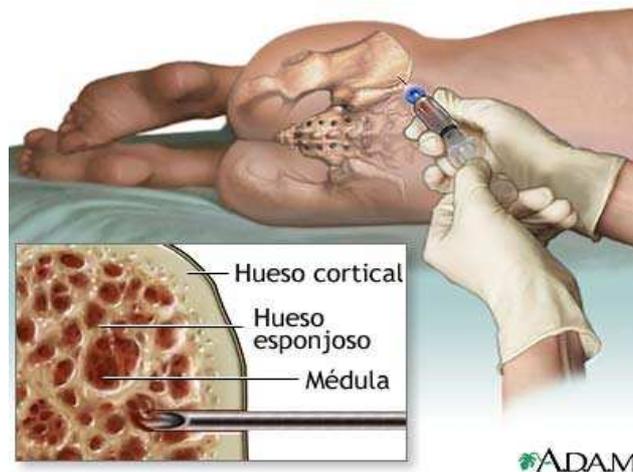


FIG. 28. Se muestra la toma de médula ósea de la cresta iliaca.
Imagen tomada de Nidus Information Services 2009. A.D.A.M., Inc.

3.2.2.2. SIEMBRA

Cuando la muestra se recibe dentro de las primeras dos horas de haberse tomado, se siembra y se cosecha de manera directa, sin cultivar. Si no es así, la muestra se siembra en 10 ml de Medio de Cultivo Marrowmax especial para médula ósea y lo más importante se cultiva **sin fitohemaglutinina** debido a que no necesita ser estimulada por su naturaleza de crecimiento continuo.

Para poder sembrar las muestras, primero se tienen que lavar una o dos veces con medio de cultivo de la siguiente manera: se divide la muestra en dos tubos de centrifuga desechables, se le agrega medio de cultivo HAM F10 hasta 10 ml y se centrifugan a 1000 rpm X 5 minutos. Después de centrifugado se retira el sobrenadante para quitar el exceso de grasa, que en ocasiones es muy visible, esto se repite una ó dos veces más si es necesario y así lograr un buen desarrollo celular.

El número de frascos que se siembran depende primero de la cantidad de muestra enviada, si es muy poca se hace lo posible por sembrar al menos dos frascos. El tiempo de cultivo puede ser de 24, 48, 72 y 96 horas dependiendo del tipo de problema hematológico que se trate:

- 24 horas Leucemia Granulocítica Crónica
- 48 horas Leucemia Linfoblástica Aguda
- 72 horas Síndromes Mielodisplásicos
- 96 horas Anemias

3.2.2.4. ELABORACIÓN DE LAMINILLAS

La elaboración de laminillas se hace inicialmente como en el cultivo de linfocitos pero además se intentan otras formas hasta lograr el mejor material para trabajar, debido a que en estas muestras generalmente hay pocas metafases y no todas son de buena calidad. El número de laminillas que se hacen es mucho mayor al del cultivo de linfocitos y va a depender de la calidad y cantidad de la muestra (figura 26).

3.2.3. ELABORACIÓN SEMIAUTOMÁTICA DE CARIOTIPOS

La elaboración de cariotipos se hizo con la ayuda de un software, el “Karyotype Builder”.

Como se mencionó en la primera etapa para elaborar un cariotipo, una vez analizados los casos, se tomaban de 6 a 8 fotografías y se elegían las mejores fotos y de estas se elaboraban de forma manual dos cariotipos.

El “Karyotype Builder” es un equipo en el cual se elaboran cariotipos de manera semiautomática con fotografías digitales, que tiene las ventajas de que los resultados pueden estar en menor tiempo y la información puede ser resguardada de manera digital (fig.29).

El programa consiste en que a partir de una fotografía digital de una célula en metafase tomada directamente de un microscopio óptico se construye un cariotipo de forma semiautomática.

1.- Primero el programa pide que se llene una hoja de reporte que contiene: número de caso, nombre del paciente, nombre del médico, tipo de muestra, indicación del estudio, resultado y el diagnóstico citogenético que se obtuvo.

2.- Se elige la fotografía y de manera automática el programa recorta los cromosomas que se encuentran separados, dejando los que se encuentran juntos o sobrepuestos para recortarlos de manera individual con las herramientas de corte del programa.

3.- Una vez recortados todos los cromosomas, se pueden visualizar en otra ventana alineados por tamaño, ahí se les asigna el número correspondiente a cada par cromosómico.

4.- Una vez asignados los números, se abre otra ventana donde se visualiza el cariotipo terminado y en donde cada cromosoma se puede acomodar de manera más precisa de acuerdo a su centrómero. Como los cromosomas pudieran variar en su tinción, existen algunas herramientas que te permiten dar un mejor contraste de manera individual y recortarlos más finamente si es necesario, además de señalar con una flecha si existiera alguna aberración numérica ó estructural.

7.- Finalmente se revisa el reporte y el cariotipo en una vista previa a imprimir y si todo esta correcto se imprime todo junto o por separado, si existiera algún error se puede regresar al paso anterior y se hace la corrección.

KARYOTYPE BUILDER



FIG. 29. Equipo de cómputo con el programa Karyotype Builder para elaborar cariotipos.
Imagen del laboratorio de Reproducción y Genética.

3.3. TERCERA ETAPA

En esta etapa se describen los criterios que hay que tomar en cuenta al analizar los cromosomas de las diferentes muestras.

3.3.1. ANÁLISIS AL MICROSCOPIO

La observación de los cromosomas se realizó en un microscopio óptico con campo claro (ver apéndice). Se localizaban las metafases con un aumento 10X y se llevaban a cabo la identificación de los cromosomas con un aumento de 100X.

El análisis se hace en las laminillas con bandas G para bandas de rutina, cuando fue necesario se hicieron bandas de alta resolución o bandas Q. En casos particulares cuando el análisis mostró una alteración, que no pudo ser determinada con las técnicas de bandeo antes mencionadas, se solicitó a otros laboratorios un estudio molecular de FISH (Hibridación in situ por fluorescencia).

El control de las muestras en todas las etapas del estudio es muy importante y aquí cada metafase observada se registra en una hoja de lectura que lleva el nombre del paciente y el número de caso que indica que tipo de muestra se está analizando (fig.30).

Para el análisis de los diferentes tipos de muestras se toman en cuenta el origen y la indicación por la cual fueron enviadas. En todas las muestras se tiene que analizar un mínimo de 30 metafases bandeadas, cuando es posible analizar tres diferentes frascos de cultivo, se debe hacer la lectura de 10 metafases por frasco. Se cuenta el número de cromosomas y se identifican los cromosomas sexuales. Se identifica el patrón de bandeo descrito para cada par cromosómico (fig. 31), de acuerdo al ISCN, 1995,2005 ⁽²⁴⁾, se

comparan los pares buscando discrepancia en el patrón de bandas que nos indiquen que hay una alteración. Cada metafase se registra en una “hoja de lectura” (fig. 30) anotando sus coordenadas del microscopio. Tras el análisis al microscopio, se toman de 6 a 8 imágenes, bien mediante fotografía o por digitalización de imagen computarizada, de aquellas células en metafase que representen el cariotipo del paciente y tengan mejor calidad, se seleccionan metafases con cromosomas largos y separados y en los casos alterados aquellas metafases donde alteración se identifique más claramente. Los cromosomas pueden entonces disponerse en pares de acuerdo con su tamaño y su patrón de bandas, formando un cariotipo.

Existen casos que presentan más de una línea celular normal y una línea anormal. A estos individuos se les denomina *mosaicos* y en la inmensa mayoría de los casos la línea celular anormal tiene una anomalía cromosómica numérica. Los mosaicos de alteraciones estructurales son poco frecuentes. En los casos con sospecha de mosaicismo se valoran un mínimo de 50 a 100 metafases. En pacientes con mosaicismo el grado en el cual un individuo resulta afectado clínicamente, depende del porcentaje de células anormales presentes. El diagnóstico de mosaicismo verdadero es cuando la alteración se encuentra mínimo en 2 diferentes frascos analizados y se considera un pseudomosaico cuando se observa una o varias células en sólo uno de los frascos de cultivo ⁽²⁾.

3.3.1.1. MUESTRAS DE LÍQUIDO AMNIÓTICO

Para tener mayor certeza de diagnóstico se analizan los tres cultivos que se procesan. Se estudian al menos 10 metafases de cada cultivo, con un nivel mínimo de 425 a 450 bandas. Cuando se hace diagnóstico prenatal de líquido amniótico el hallazgo de células con cariotipo normal y alterado en la misma muestra de líquido, representa un dilema

para distinguir entre el verdadero mosaicismo (feto con la alteración) y el pseudomosaicismo (feto normal, la alteración se origina *in vitro*, o en el tejido placentario). El diagnóstico de mosaicismo verdadero es cuando la alteración se encuentra mínimo en 2 diferentes frascos analizados y se considera un pseudomosaico cuando se observa una o varias células en sólo uno de los frascos de cultivo.

3.3.1.2. MUESTRAS DE PRODUCTOS DE ABORTO

En algunos casos se pueden observar dos tipos de metafases: extendidas y de cromosomas largos y metafases con cromosomas más cortos, estas últimas son las que representan al feto y las otras son de origen materno. Se hace esta aseveración por la experiencia observada en un gran número de metafases en productos de aborto. Por lo tanto hay que analizar de todos los tipos celulares que presente dicha muestra y hay que leer 30 células de al menos dos diferentes frascos de cultivo, 15 metafases de cada frasco.

Cuando en muestras de vellosidades coriales el cariotipo que encontramos es femenino normal, es importante descartar contaminación con tejido materno. En estos casos es importante estudiar un mayor número de metafases para detectar si hubiera mezcla de células fetales y maternas.

Estos tejidos pueden presentar más de una alteración cromosómica en un mismo caso, por ejemplo una célula puede tener 48 cromosomas por doble trisomía, otro ejemplo sería que una célula fuera triploide y presentara una alteración estructural. Las alteraciones que más se encuentran en productos de aborto son las trisomías 16 y la 22

(25).

3.3.1.3. MUESTRAS DE SANGRE

En los casos de pacientes con infertilidad y abortos de repetición, es necesario poner énfasis en los cromosomas sexuales y posibles translocaciones. Si se sospecha de un mosaico se debe incrementar la lectura de 50 ó 100 metafases de dos diferentes frascos de cultivo, con un nivel mínimo de 425 a 450 bandas. Cuando el médico sospecha de una alteración cromosómica fina en el paciente, solicita un cariotipo de alta resolución con un nivel de 550 bandas en adelante ⁽⁴⁾.

3.3.1.4. MUESTRAS DE MÉDULA ÓSEA

La meta en estos casos es estudiar 30 metafases pero no siempre es posible, ya que hay muestras en donde es difícil obtener tantas metafases, por ejemplo en los pacientes con Anemia. Aquí se registran todas las alteraciones observadas y se reportan si es que una misma alteración se repite mínimo 3 veces, lo que indicaría que es una alteración clonal. Se fotografían todas las alteraciones encontradas y se elaboran los cariotipos de estas. Cuando se analizan muestras en problemas hematológicos, se hace uso del código de nomenclatura para este tipo de muestras, ISCN, 1995, 2005 ⁽²⁴⁾.



Fig. 30. Observación al microscopio con la hoja de registro de metafases analizadas.
Imagen del Laboratorio de Genética del Grupo de Reproducción y Genética.

METAFASE

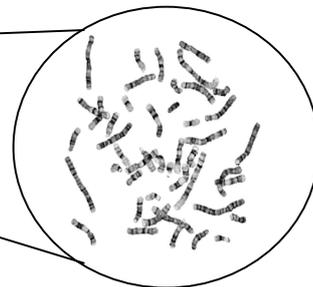


Fig.31. Se cuentan los cromosomas y se comparan las bandas.
Imagen del Laboratorio de Genética del Grupo de Reproducción y Genética.

4. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS DE JUNIO DE 1998 A NOVIEMBRE DE 2007

De junio de 1998 a noviembre de 2007 participé en 6525 estudios los cuales se muestran en la tabla 1. El mayor número de muestras estudiadas fueron de Marcadores Bioquímicos con 2467 casos (38%). En segundo lugar de frecuencia estuvieron los estudios de cariotipo en Líquido Amniótico, 2131 casos (32.4%) y en tercer lugar el Cariotipo en Sangre Periférica en 1037 muestras (16%), con menor frecuencia se hicieron estudios de cariotipo en Productos de Aborto, 787 (12%) y cariotipo en Médula Ósea 105 casos (1.6%). Las muestras estudiadas fueron de pacientes de la clínica y de otros hospitales, así como del interior del país.

Tabla 1. ESTUDIOS CITOGENÉTICOS REALIZADOS DESDE JUNIO DE 1998 A NOVIEMBRE DEL 2007

ESTUDIOS CITOGENETICOS					MARCADORES BIOQUIMICOS			
Año	Líquido amniótico	Productos De Aborto	Sangre Periférica	Médula Ósea	Triple Marcador	Cuádruple Marcador	Marcadores 1er Trimestre	
1998	120	44	44	0	77	0	0	
1999	213	86	99	0	184	0	0	
2000	208	97	93	0	135	48	0	
2001	230	76	90	0	183	102	0	
2002	274	83	134	5	202	94	0	
2003	239	79	100	30	229	88	0	
2004	252	91	57	12	187	103	0	
2005	208	82	169	32	121	111	0	
2006	195	64	149	17	157	125	7	
2007	192	85	104	9	117	143	54	TOTAL
	2131	787	1039	105	1592	814	61	6525
	32.4%	12%	16%	1.6%	38%			100%

4.1. MARCADORES BIOQUÍMICOS

En los Marcadores Bioquímicos, 2467 muestras estudiadas 2406 (97.5%) fueron del segundo trimestre (Triple y Cuádruple Marcador) y 61 muestras fueron del Marcadores de Primer Trimestre (2.5%). El 10% de los resultados fueron positivos, 250 resultados, de estos 241 estudios fueron del segundo trimestre y 9 del primer trimestre, tabla 2a. De estos resultados 197 fueron positivos para Síndrome de Down (8 del primer trimestre), 33 para un DCTN, 12 para Trisomía 18 y 8 para Síndrome de Down y además para un DCTN (1 del primer trimestre).

De los 250 resultados positivos, solo se realizó el cariotipo fetal en 84 pacientes, 77 de los cuales tuvieron un cariotipo normal (91.6%) y 7 un cariotipo alterado (8.4%). Los cariotipos alterados fueron: 4 con Síndrome de Down, 1 Síndrome de Klinefelter, un mosaico 46,XX/47,XX,+16 y un producto triploide 69,XXY, como se muestra en la tabla 2b, así como el tipo de estudio, el riesgo que indicó la prueba, edad de la paciente y resultado del cariotipo fetal.

Tabla 2a. 250 MARCADORES BIOQUÍMICOS POSITIVOS

No de ESTUDIOS		POSITIVOS PARA:
2do Trimestre	1er Trimestre	
189	8	Síndrome de Down
33	0	Defectos del Cierre del Tubo Neural (DCTN)
12	0	Trisomía 18 ó Síndrome de Edward
7	1	Síndrome de Down y DCTN

Tabla 2b. 7 RESULTADOS POSITIVOS CONFIRMADOS POR CARIOTIPO FETAL DE LÍQUIDO AMNIÓTICO

MARCADOR POSITIVO	RIESGO	POSITIVO PARA:	CONFIRMACIÓN	EDAD
Triple	1 en 10	Trisomía 18	69,XXY	32
Triple	1 en 152	Síndrome de Down	46,XX,+21	36
Triple	1 en 10	Síndrome de Down	46,XX,+21	40
Triple	1 en 12	Síndrome de Down	46,XX,+21	44
Triple	1 en 25	Síndrome de Down y DCTN	mos47,XX,+16[10]/46,XX[148]	44
Cuádruple	1 en 87	Síndrome de Down	47,XXY	30
Cuádruple	1 en 32	Síndrome de Down	46,XX,+21	37

4.2. ESTUDIOS EN LÍQUIDO AMNIÓTICO

En 2131 pacientes la principal indicación para solicitar el cariotipo fetal, fue la edad materna (mujeres ≤ 19 y ≥ 35 años) con un total de 1236 casos (58%), seguido de 389 (18.5%) casos por un marcador bioquímico positivo, 202 (9.4%) por angustia o ansiedad materna, 118 (5.5%) por tener un ultrasonido alterado y los 186 (8.6%) restantes por otra indicación (antecedentes familiares por alguna cromosomopatía, hijo malformado, toma de medicamentos en el embarazo, por varicela, síndromes génicos, pérdidas reproductivas y onfalocela). La edad de las pacientes al momento de la amniocentesis fue de 13 a 49 años, con una media de 36.02 años, el grupo donde se hicieron la mayoría de los estudios fue de mujeres entre 37 y 40 años. La amniocentesis se realizó en las semanas 11 a 36 del embarazo, sin embargo la semana 16 fue en donde más amniocentesis se hicieron, 547 pacientes (25.6%).

Se identificó un cariotipo alterado en 102 fetos (4.8%) de los 2131 casos estudiados. En la tabla 3a se muestran las alteraciones numéricas y en la tabla 3b las estructurales. Las alteraciones numéricas fueron más frecuentes en 83 casos (81.3%) que las estructurales

en 19 casos (18.7%). Las alteraciones numéricas fueron: 70 de autosomas (68.6%) y 13 de cromosomas sexuales (12.8%). Dentro de las cromosopatías de autosomas las trisomías más frecuentes fueron la trisomía 21 ó Síndrome de Down con 45 casos (44%), siendo 2 de ellos por mosaico, seguida de la trisomía 18 con 17 casos (16.6%).

En las alteraciones de los cromosomas sexuales, el Síndrome de Turner (45,X) fue el más frecuente (7 casos), seguido por los Síndromes de Klinefelter (47,XXY) en dos casos y el Síndrome XYY también en dos casos.

Tabla 3a. ALTERACIONES NUMÉRICAS EN LÍQUIDO AMNIÓTICO

	Productos Femeninos	Productos Masculinos	Total 83
AUTOSOMAS			70
Trisomía 13	1	2	3
Trisomía 18	9	8	17
Trisomía 21 Libre	15	28	43
Trisomía 21 por Mosaico			2
mos47,XX,+21[188]/46,XX[4]	1		
mos47,XX,+21[4]/46,XX[80]	1		
Triploidías			1
69,XXX	1		
OTRAS TRISOMIAS POR MOSAICO			4
mos47,XX,+13[3]/46,XX [147]	1		
mos47,XX,+16[10]/46,XX [148]	1		
mos47,XY+7[84]/46,XY[6]		1	
mos47,XY+20[9]/46,XY[115]		1	
CROMOSOMAS SEXUALES			13
Síndrome de Turner	7	0	7
Síndrome de Klinefelter	0	2	2
47,XXX	1	0	1
47,XYY	0	2	2
Mosaicos	1	0	1
mos45,X[31]/46,XX[129]			

Tabla 3b. ALTERACIONES ESTRUCTURALES EN LÍQUIDO AMNIÓTICO

	Productos Femeninos	Productos Masculinos	Total 19
TRANSLOCACIONES			8
ROBERTSONIANAS			5
Balancedas			
45,XX,der(13;14)(q10q10)mat	1		
45,XY,der(13;14)(q10q10)mat		1	
45,XX,der(13;14)(q10q10)	1		
45,XY,der(14;21)(q10;q10)		1	
No Balanceadas			
46,XX,der(14;21)(q10q10)+21	1		
RECÍPROCAS			3
46,XY,t(5;18)(q11;q11)		1	
46,XY,t(14;18)(q13;q21)		1	
46,XX,der(13),t(13;16)(q12q22)mat	1		
INVERSIONES BALANCEADAS			3
46,XX, inv(2)(p21q35)	1		
46,XY,inv(1)(p12q12)		1	
46,X,inv(Y)?		1	
MOSAICOS			6
mos47,XX,+r(15)[70]/46,XX[45]	1		
mos47,XY,+r(?) [72]/46,XY[56]		1	
mos46,XY,t(5;14) [80]/46,XY [20]		1	
mos45,XX,t(15;18)(p11;q11)[88]/46,XX,del(18)(p11.1) [12]	1		
mos45,X[12]/46,X,r(Y?) [26]		1	
mos45,XX,rob(13;13) [58]/46,XX,rob(13;13)+mar [32]	1		
OTROS			2
47,XX,+mar	1		
46,XY,add(4)		1	

Dentro de las alteraciones estructurales se identificaron: 8 translocaciones (7.8%), 5 robertsonianas (4 balanceadas y 1 no balanceada Sx de Down) y 3 recíprocas. Se observaron tres inversiones pericéntricas (2.9%), 6 rearrreglos cromosómicos (6%) por mosaico, y dos pacientes presentaron otra alteración (2%), uno con un marcador extra y

otro con un cromosoma que presenta material extra en brazos largos del cromosoma 4. Una descripción más detallada del cariotipo se presenta en la tabla 3b.

4.3. ESTUDIOS EN PRODUCTOS DE ABORTO

De las 787 muestras de productos de aborto estudiadas 779 fueron del primer trimestre y 8 fueron fetos malformados perdidos en el segundo y tercer trimestre del embarazo. La indicación para solicitar el cariotipo en producto de aborto fue en la mayoría de los casos por más de una pérdida gestacional, 756 casos (96%). Hubo 31 casos (4%) con alguna otra indicación (obitos, embarazos ectópicos, embarazos molares, higromas, agenesia renal y confirmaciones de líquidos amnióticos alterados). La información clínica de los productos de aborto se tuvo solo en 350 casos, fueron huevo muerto retenido (HMR) 262 pacientes, 49 fetos anembrionicos y 8 fetos malformados. La edad de las pacientes estuvo entre 18 y 46 años, con un promedio de 31.8 años, aunque de 18, 20 y 46 años solo hubo una paciente.

Se recibieron un total de 808 muestras de productos de abortos, de las cuales en 21 muestras (2.5%) no se obtuvo resultado debido a varias causas que se comentarán más adelante. Las 787 muestras restantes fueron estudiadas y tuvieron un resultado normal 342 (43.5%) y 445 (56.5%) presentaron una alteración cromosómica. Las alteraciones más frecuentes fueron las alteraciones numéricas en 412 casos (92.5%). Se observaron 43 monosomías (9.6%): Síndrome de Turner se identificaron en 39 casos (8.7%); monosomías del cromosoma 21 en 4 casos (4.7%). Se observó una trisomía en 242 fetos valorados (54.3%), la trisomía 16 fue la más observada en 74 casos (16.6%), seguida de la trisomía 22 en 32 casos (7.19%). Las 79 restantes (17.7%) fueron trisomías de los cromosomas: 2(3 casos), 3(5casos), 4(7casos), 5(2casos), 6(5 casos), 7(8casos), 8(3 casos), 9(11casos), 10(2casos), 11(2casos), 12(3casos), 13(18 casos),14(4 casos),

15(18casos), 17(3 casos), 19(1 caso), 20(1 caso). Hubo 5 trisomías (1.12%) por mosaico: 46,XX/47,XX,+22 en dos casos, 46,XY/47,XY,+9 46,XY/47,XY,+7 46,XY/47,XY,+4. Las otras alteraciones numéricas observadas fueron 28 aneuploidías múltiples (6.2%). Productos Triploides se identificaron en 61 muestras (13.7%), 23 femeninos (69,XXX) y 38 masculinos (69,XXY). Las tetraploidías se observaron en 27 casos (6%), 17 fueron productos femeninos (92,XXXX) y 10 productos masculinos (92,XXYY). Hubo 10 muestras (2.24%) que presentaron un mosaico con dos líneas celulares. En la tabla 4a se muestran detalles de las alteraciones numéricas en productos de aborto.

Se observaron 34 alteraciones estructurales (7.7%), dentro de estos encontramos translocaciones 16 no balanceadas (6 recíprocas y 10 robertsonianas)(3.5%), 5 deleciones (1%), 5 casos con material extra de origen desconocido (1%), 3 mosaicos (0.6%) (una línea celular normal y una línea alterada: una translocación, una deleción y un anillo). Se observaron 3 casos (0.6%) con doble alteración (numérica y estructural) y los 2 restantes (0.4%) presentaron, un isocromosoma del cromosoma Y, otro con un marcador (Tabla 4b).

Tabla 4a. ALTERACIONES NUMÉRICAS EN PRODUCTOS DE ABORTO

	Productos Femeninos	Productos Masculinos	TOTAL 412
MONOSOMÍAS			44
45,X	39	0	39
MONOSOMIA 21	3	1	4
TRISOMÍAS			242
TRISOMIA 13	8	9	17
TRISOMIA 16	40	34	74
TRISOMIA 18	7	6	13
TRISOMIA 21	9	9	18
TRISOMIA 22	16	16	32
OTRAS TRISOMIAS 2,3,4,5,6,7,8,9, 10,11,12,14,15,17,19,20	46	42	88
ANEUPLOIDÍAS MÚLTIPLES			28
46,X,+2	1		
46,X+13	1		
48,XX,+3,+14	1		
48,XY,+5,+7		2	
48,XY,+7,+14		1	
48,XY,+7,+21		1	
48,XY,+8,+22		1	
48,XX,+9,+22			
48,XX,+13,+18	1		
48,XX,+15,+22	2		
48,XY,+16,+21	1		
48,XY,+16,+22		1	
48,XX,+21,+22	1		
49,XX,+6,+7,+22	1		
68,XX	1		
68,XXY,-1		1	
70,XXX,+5	1		
70,XXX,+8	1		
70,XXY,+9		2	
70,XXY,+14		1	
70,XXY,+15		1	
70,XXX,+16	2		
91,XXYY,-3		1	
91,XXXX,-21	1		
TRIPLOIDÍAS			61
69,XXX 69,XXY	23	38	
TETRAPLOIDÍAS			27
92,XXXX 92,XXYY	17	10	
MOSAICOS			10
mos47,XX,+22[81]/46,XX[19]	2		
mos47,XY,+5[85]/46,XY[15]		1	
mos47,XY,+9[15]/46,XY[85]		1	
mos47,XY,+7[5]/46,XY[46]		2	
mos49,XXX,+12,+18[13]/46,XX[87]	1		
mos47,XX,+2[32]/48,XX,+2,+20[8]	1		
mos47,XX,+16[56]/48,XX,+2+16[7]	1		
mos47,XY,+21[35]/48,XXY,+21[65]		1	
45,X[12]/46XY[32]		1	1

Tabla 4b. ALTERACIONES ESTRUCTURALES EN PRODUCTO DE ABORTO

ALTERACIONES ESTRUCTURALES			
	Productos Femeninos	Productos Masculinos	TOTAL 34
TRANSLOCACIONES NO BALANCEADAS			16
RECIPROCAS			6
46,XY,t(1;3)(q42;p21)		1	
47,XY,der(1),t(1;9)(q23;q22.3),+der(9)t(1 ;9)		1	
46,XY,der(2),t(2;15)		1	
47,XY,der(8),t(8;22)(q24.1q11),+der(22) t(8 ;22)		1	
47,XX,der(13),t(13;16),+der(16) t(13;16)	1		
45,X,der(X)t(X;22)(q22;q10)	1		
ROBERTSONIANAS			10
46,XY,+13,der(13;14)(q10q10),		1	
46,XX,+13,der(13;14)(q10q10)	1		
46,XX,rob(13;14)(q10q10),+14	3		
46,XY,rob(13;14)(q10q10),+14		1	
46,XX,rob(14;14)(q10q10),+14	1		
46,XX,+15,rob(15;15)(q10q10)	1		
46,XX,rob(14;21),+21	1		
46,XX,+22,rob(22q)	1		
DELECCIONES			5
46,XX,del(4)(p15.2)	1		
46,XX,del(8)(p?)	1		
46,XY,del(8)(p21)		1	
46,XX,del(13)(p?)	1		
46,XX, del(14)(q14.1)	1		
MATERIAL EXTRA			5
46,XY,add(1)(p36)		1	
46,XX,add(7)(p32)	1		
46,XY,add(7)(p22)		1	
46,XX,add(8)(q21)	1		
46,XY,add(15)(q23)		1	
MOSAICOS			3
mos46,XX,t(7?)[25]/46,XX[75]	1		
mos46,XY,del(18)(q?) [10]/46,XY[90]		1	
mos46X,r(18)(p11q23)[24]/46,XX[81]	1		
DOBLE ALTERACIÓN			3
47,X,inv(Y?)+22		1	
68,XXY,t(13;14)(q10q10)		1	
47,XY,+14,add(17)(p11)		1	
OTROS			2
46,XX+mar	1		
69,XX,i(Y)	1		
			34

4.4. CARIOTIPOS EN SANGRE

En estas muestras, la indicación más frecuente para hacer el estudio, fue por Infertilidad con 422 casos (40.6%), seguido del grupo de aborto de repetición (dos ó más pérdidas) en 337 casos (32.4%), familiar o hijo con alguna cromosomopatía 44 casos (4.3%), confirmar un Síndrome de Down en 38 casos (3.6%), múltiples malformaciones en 21 casos (2.1%), descartar Síndrome de Turner en 20 casos (2%) y por alguna otra indicación en 157 casos (15%) (desarrollo psicomotor anormal, descartar polimorfismos, dismorfias, mielomeningocele, donadoras de óvulos, donadores de espermatozoides, descartar translocaciones, síndromes génicos, etc.). Las edades en las que se hicieron los estudios estuvieron en un rango muy amplio, desde recién nacidos hasta 58 años.

Se identificaron 139 (13.2%) alteraciones cromosómicas en 1039 muestras estudiadas. Se observaron 97 alteraciones numéricas (69.7%) las que se muestran en la tabla 5a. La alteración más frecuente fue el Síndrome de Down, con 39 casos (28.2%), 35 casos por trisomía libre y 4 por mosaico (3 mosaicos de trisomía libre y uno de translocación 21;21). En 18 pacientes (13%) se identificaron alteraciones de cromosomas sexuales, Síndrome de Klinefelter 9 (6.5%), Síndrome de Turner 5 (3.6%), un Síndrome XXX (0.7%) y un Síndrome XYY (0.7%). Mosaicos cromosómicos se observaron en 35 pacientes, siendo por cromosomas sexuales 34 (24.6%) en 21 pacientes (15.2%) se observó un mosaico con dos líneas celulares, en otros 12 (8.6%) el mosaico involucró 3 líneas y un paciente presentó un mosaico con 4 líneas celulares. Dentro de esta gama de mosaicismos, 15 pacientes (10.8%) con aborto de repetición, presentaron un mosaico bajo, en estos casos predominó la línea con cariotipo normal, mientras que la línea alterada fluctuó en un rango de 3 a 5 % de células alteradas.

Tabla 5a. ALTERACIONES NUMÉRICAS EN SANGRE PERIFÉRICA

	Femeninos	Masculinos	Total 97
AUTOSOMAS			43
TRISOMÍA 13	2	1	3
TRISOMÍA 18	1		1
TRISOMÍA 21 LIBRE	12	23	35
TRISOMÍA 21 POR MOSAICO			4
mos47,XX,+21[36]/46,XX[75]	1		
mos47,XY,+21[75]/46,XY[2]		2	
mos47,XX,+21[3]/48,XX,(2)21[1]/46,XX[198]	1		
CROMOSOMAS SEXUALES			18
45,X	5		5
47,XXX	1		1
47,XXY		9	9
47,XYY		1	1
49,XXXY		2	2
MOSAICOS			35
mos45,X[3]/46,XX[83]	10		10
mos45,X[27]/47,XXX[29]	3		3
mos47,XXX[1]/46,XX[85]	1		1
mos47,XYY[2]/46,XY[171]		1	1
mos45,X[27]/47,XXX[29]	3		3
mos47,XXX[1]/46,XX[85]	1		1
mos45,X[70]/47,XX,+mar[5]	2		2
mos45,X[82]/47,XXX[4]/46,XX[103]	10		10
mos48,XXX[1]/49,XXXX[1]/46,XX[90]	1		1
mos45,X[10]/47,XXX[1]/48,XXXX[2]/46,XX[80]	1		1
mos45,X[15]/47,XXX[5]/49,XXXXX[1]/46,XX[85]	1		1
mos47,XX,+16[56]/46,XX[5]	1		1
TRIPLOIDÍAS			1
69,XXX	1	0	1

Hubo 42 alteraciones estructurales (30.3%) observándose 22 translocaciones (16%), 20 de las cuales fueron balanceadas (7 robertsonianas y 13 recíprocas) y 2 no balanceadas. En 9 casos (6.5%) se observó alguna delección: de brazos cortos de un cromosoma X, 13 y 21, de brazos largos de un cromosoma 9 y 10, 3 con cromosomas en anillo de cromosomas sexuales y una delección de brazos largos del X y un isocromosoma de brazos largos del X. Se observaron 5 casos con material extra de origen desconocido (2.2%) y 6 pacientes presentaron mosaico (4.4%) uno de ellos Síndrome de Down por t(21;21). Los cariotipos se presentan en la tabla 5b.

Tabla 5b. ALTERACIONES ESTRUCTURALES EN SANGRE PERIFÉRICA

	Femeninos	Masculinos	Total 42
TRANSLOCACIONES			22
BALANCEADAS			20
ROBERTSONIANAS			7
45,XX,der(13;14)(q10q10)	2		
45,XX,der(14;21)(q10q10)	1		
45,XY,der(13;14)(q10q10)		2	
RECÍPROCAS			13
46,XY,t(1;7)(q31;2;q36)		1	
46,XY,t(2;14)(q31;q24.3)		1	
45,XX,t(3;15)(q27;q15)	1		
46,XX,t(5;11)(p15q23)	1		
46,XY,t(5;12)(p11;q24.4)		1	
46,XX,t(5;18)(q11;q11)	1		
46,XY,t(8;22)(q11;q11)		1	
46,XY,t(9;21)(p24;q22)		1	
46,XX,t(9;18)(p22;q21)	1		
46,XX,t(13;15)(q32;q22.3)	1		
46,XX,t(13;16)(q12;q22)	3		
NO BALANCEADAS			2
46,XX,+13,der(13;14)(q10;q10)	1		
46,XY,der(14;21),+21		1	
DELECCIONES			9
46,XY,del(9)(q?)		1	
46,X,del(10)(q34.1)	1		
46,XY,del(13)(p?)		1	
46,XY,del(21)(p?)		1	
46,X,del(X)(p11)	1		
46,i(X)(q10q10)	1		
47,X,+r2(X)(?)	1		
47,XX,+r(?)	1		
46,X,r(Y)(?)		1	
MATERIAL EXTRA			5
46,XX,add(11)(p18)	1		
46,XX,add(20)(q?)	1		
46,XX,add(22)(q?)	3		
MOSAICOS			6
mos45,XX,der(21;21)(q10q10)[70]/46,XX,der(21;21)+21[30]	1		
mos46,XX,add(20)(p13) [10]/46,XX[80]	2		
mos45,X[70]/46,X,del(X)(q21.1)[3]	1		
mos45,X[85]/46,X,r(X)(?) [5]	2		

4.5. CARIOTIPOS EN MÉDULA ÓSEA

Las muestras de Médula Ósea se estudiaron en pacientes que en su mayoría presentaron Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), 50 casos (47.6%) que están el grupo de edad de niños y jóvenes. Con Leucemia Granulocítica Crónica (LGC) se estudiaron 20 pacientes (19.4%) en adultos y personas de la tercera edad. Los 35 casos restantes (33%) llegaron por otra indicación (linfoma Hodking, linfoma No Hodking, síndrome Mielodisplásico, mieloma múltiple, anemias, otro tipo de leucemia, policitemia Vera, bicitopenia y trombocitopenia).

Se recibieron 105 muestras, de las cuales 16 no tuvieron resultado (15.2%) y en 89 casos (84.7%) si se obtuvo un resultado, 21 de estas presentaron una alteración (23.5%). En tres pacientes se observó una alteración numérica (13.5%) y en 19 pacientes una alteración estructural (86.5%). Las alteraciones numéricas observadas fueron 3 mosaicos cromosómicos donde se observan células normales y poliploides (2 casos) y un caso con células con tetrasomía del cromosoma 8 y células normales.

Alteraciones estructurales se observaron: un cromosoma filadelfia en 3 pacientes, uno de ellos por mosaico, 8 presentaron translocaciones recíprocas, 3 deleciones, 5 mosaicos y 2 pacientes presentaron otras alteraciones. Una descripción detallada se muestra en la tabla 6.

**Tabla 6. 21 ALTERACIONES CITOGENÉTICAS EN
MÉDULA ÓSEA**

ALTERACIONES NUMÉRICAS				
FEMENINOS	pacientes	MASCULINOS	pacientes	
MOSAICOS				3
48,XXX,+8[15]/46,XX[7]	1	46,XY[15]/ 98~100,s[10]	1	
46,XX[12]/98~100,s[19]	1			
ALTERACIONES ESTRUCTURALES				
TRANSLOCACIONES				8
46,XX,der(22)t(9;22)(q34;q11.2)	1	46,XY,der(22)t(9;22)(q34;q11.2)	2	
		46,XY,t(8;21)(q22;q22)	1	
		46,XY,t(15;17)(q22;q11)	1	
		46,XY,t(6;14)(p?q?)	1	
		46,XY,t(10;11)(p11;p15)	1	
		46,XY,t(9;15)(p10;q10)	1	
MOSAICOS				5
mos46,XX,inv(2)(p11q22?) 16]/46,XX[17]	1	mos46,XY,der(22)t(9;22)(q34;q11.2)([15]/46,XY[5]	2	
mos46,XX,del(7)(p15),t(7;10)(q22;q24)	1			
[29]/46,XX[5]	1			
mos46,XX,del(7q),del(20p) [15]/46,XX[5]	1			
DELECCIONES				3
46,XX,del(5)(q13;q33)	1	46,XY,del(2)(p?)	1	
		46,XY,del(5)(q23.3;q32.2, t(7;21)(p15q21)	1	
OTROS				2
47,XX,+mar	1	46,XY,add(12)(p ?),t(21;?)+mar	1	
				TOTAL
	9		13	21

5. COMENTARIOS A LOS RESULTADOS

5.1. MARCADORES BIOQUÍMICOS

Dentro de los 6525 estudios que se hicieron en el laboratorio de Junio de 1998 a noviembre de 2007 la mayoría fueron estudios de Marcadores Bioquímicos en 2467 casos (37.8%). Esto debido a que al surgir las pruebas de escrutinio en la década de los ochenta ⁽²³⁾ empezaron a reemplazar a las pruebas diagnósticas. En la Clínica se observó una situación semejante, de 1998 al 2001 la prueba prenatal más solicitada fue la amniocentesis (36%) en 771 casos y a partir del 2002 al 2007 fueron los Marcadores Bioquímicos (39.5%) en 1738 casos.

Los marcadores del primer trimestre se empezaron a ofrecer a finales del 2006, debido a esto hubo más casos estudiados del segundo trimestre 97.5% (2406 casos) que del primer trimestre, con solo el 2.5% (61 muestras).

De los resultados obtenidos, el 10% (250 resultados) tuvo un resultado positivo, en su mayoría para Síndrome de Down y se realizó el cariotipo fetal solo en 84 pacientes, teniendo cariotipo normal 77 y cariotipo alterado 7. Teniendo así (3.12%) de resultados falsos positivos (es decir, un resultado de riesgo elevado en un embarazo con un feto normal). En este tipo de estudios se han calculado falso positivos del 3% ⁽²⁶⁾ al 5% ⁽¹³⁾ ⁽²⁶⁾ para algunos autores y del 8% para otros, ^(23 y 26). El porcentaje de falsos positivos obtenido en este laboratorio se encuentra dentro del rango de lo reportado por otros autores.

Los estudios comprenden mujeres de todas las edades y en mujeres mayores de 35 años el riesgo para aneuploidías es mayor, y la tasa de falsos positivos puede aumentar, porque con la edad aumenta el riesgo de cromosomopatías. El solo estudio positivo de marcador no es diagnóstico indiscutible de defectos del nacimiento ⁽²²⁾.

En 5 de 7 casos positivos, la edad de la paciente fue mayor de 35 años y en 6 de 7 resultados positivos se observa que entre más cercano a 1 esté el riesgo, este resultado se confirma con alguna alteración.

Es importante resaltar que en 3 estudios de los confirmados con cariotipo fetal la alteración identificada fue diferente a la que se indicaba que existía un riesgo en los marcadores, esto nos muestra que los marcadores son útiles, aunque no sean tan específicos. Debido a ello se sugiere que pacientes con una prueba positiva para cromosomopatías se realicen una amniocentesis y un ultrasonido de alta resolución cuando el resultado sea positivo para un DCTN.

La mayoría de las mujeres embarazadas prefieren un estudio de marcadores bioquímicos, por no ser invasivo, esto les permite tener un resultado más rápido y si el resultado es negativo disfrutan de todo lo que resta de su embarazo, explicándoles por nuestra parte y la de su médico, que tengan siempre en cuenta la sensibilidad del estudio. Cuando el resultado está alterado, surge la necesidad de realizar otro estudio para descartar alguna alteración. Depende del criterio médico-paciente y se hace nuevamente un estudio bioquímico o directamente un estudio diagnóstico (amniocentesis o biopsia de vellosidades coriales).

De manera rutinaria, cuando los marcadores salían positivos lo recomendable era que con un resultado positivo para cromosomopatías (Trisomía 18 o Trisomía 21) se realizara directamente un estudio diagnóstico ⁽¹¹⁾ para descartarlo, con los riesgos que implican estos métodos invasivos ⁽¹⁹⁾ y cuando se obtenía un resultado positivo para un DCTN se realizaba un ultrasonido de alta resolución y posiblemente una amniocentesis ^(14, 19 y 22).

Al igual que ocurre con cualquier prueba de detección en medicina, es imprescindible informar a las parejas que las pruebas que se aplican para la detección de trisomías mediante marcadores séricos maternos y mediante ecografía no representan herramientas diagnósticas definitivas. También es muy importante el consejo genético en mujeres cuyas pruebas de detección se consideran *negativas* en el sentido que su riesgo de tener un hijo con alguna trisomía o con un DCTN no es nulo ⁽¹³⁾.

5.2. ESTUDIOS DE LÍQUIDO AMNIÓTICO

Existen tres pruebas diagnósticas: la Amniocentesis, la cordocentesis (extracción de sangre de cordón umbilical) y la Biopsia de Vellosidades Coriales. En el laboratorio y en las muestras enviadas, la amniocentesis fue el estudio solicitado para la toma de líquido amniótico. La Biopsia de Vellosidades Coriales en embarazos en evolución no se realizó ya que no había ginecólogo que realizara la toma de la muestra y lo mismo puede decirse de la cordocentesis que en contadas ocasiones fue solicitada.

Los estudios de líquido amniótico son las pruebas que se solicitaron con mayor frecuencia después de los estudios de marcadores bioquímicos. La indicación más frecuente para solicitar el estudio de líquido amniótico fue la edad materna en 1236 casos (58%) que es la semana ideal para realizar esta prueba ⁽¹³⁾, seguido de 389 casos (18.5%) por un marcador bioquímico positivo, 202 (9.4%) por angustia ó ansiedad

materna, 118 (5.5%) por tener un ultrasonido alterado, lo cual es similar a lo reportado en la literatura ⁽²⁷⁾.

La frecuencia de alteraciones cromosómicas observadas fue de 4.8% como lo reportado por Francisco Alvarez en 2003 4%, Westrom en 1995, 5.8% y Silvia E y Giraldo en 1997, 4.7% ^(27,28 y 29).

El Síndrome de Down fué la cromosomopatía más frecuente (44%), seguida de la trisomía 18 (16.6%) y la monosomía para el cromosoma X (6.8%), similar a lo reportado en la literatura por Francisco Alvarez en 2003 y Westrom, en 1995 ^(27 y 28). Los dos primeros hallazgos se pueden explicar porque estas anomalías se encuentran en relación con la edad materna avanzada y la mayoría de los estudios se hicieron por esta indicación. Las alteraciones estructurales se identificaron en 19.6% de los fetos, siendo diferente a lo observado por Tseng (30%)⁽³⁰⁾ y Karaoguz (31%)⁽³¹⁾.

Las diferencias observadas pueden ser debido a los criterios para seleccionar a las pacientes. Algunos autores consideraron la edad materna desde los 34 años, otros a partir de los 38 años, algunos incluyeron mayor número de parejas por angustia materna, o portadoras de translocaciones, o con embarazos que por ultrasonido mostraron alteración.

5.3. PRODUCTOS DE ABORTO

La importancia del estudio del cariotipo en productos de aborto es que permite a la pareja conocer si tiene riesgo de tener un hijo con alguna cromosomopatía en embarazos posteriores.

En muestras de Productos de Aborto es bien conocido que del 40 al 60% de las pérdidas del primer trimestre son causadas por anomalías cromosómicas ⁽⁶⁾. En nuestros datos la

frecuencia de alteraciones encontrada fue de 56.5% en 445 pacientes. Las alteraciones más frecuentes fueron las alteraciones numéricas 92.3% en 411 casos de estas se observaron trisomías 55.5% en 247 casos. Siendo la 16 y la 22 las más frecuentes (16.6%) en 74 casos y 32 casos (7.19%) respectivamente. La monosomía X se presentó en 39 casos (8.7%), los productos Triploides en 61 muestras (13.7%), tetraploidías en 27 casos (6%). Alteraciones estructurales se observaron 34 casos (7.7%), dentro de estos hubo 15 translocaciones no balanceadas (6 recíprocas y 9 robertsonianas), 5 deleciones, 3 mosaicos, estas frecuencias son similares a lo reportado en la literatura ^(32 y 33).

En estas muestras un 2.5% (21 muestras) no tuvieron resultado, debido a: a) contaminación (hongos ó bacterias), por no tomarse de manera estéril o debido a que la madre presentaba una infección al momento de la recolección, b) otra causa fue que el medio de transporte utilizado no fuera medio de cultivo o el recipiente fuera citotóxico o estuviera contaminado, c) se fijara la muestra en formol. Sin embargo este porcentaje es menor al 11.8% reportado en otros laboratorios ⁽³²⁾.

5.4. CARIOTIPOS EN SANGRE

La mayoría de los Cariotipos en Sangre Periférica se hicieron en parejas con Infertilidad 40.6% (422 casos) y aborto de repetición 32.4% (337 casos).

Se identificó un 13.4% de alteraciones cromosómicas de 1039 muestras estudiadas, aunque en la literatura se reportan frecuencias más altas, esto es debido a que son cifras de hospitales infantiles y por lo tanto la población de estudio es diferente ⁽³⁴⁾. En la clínica la mayoría fueron pacientes con fenotipo normal pero con problemas de fertilidad, 40.6% por infertilidad y 32.4% por presentar abortos de repetición.

En la clínica Las Condes, de Santiago de Chile ⁽³⁵⁾ el laboratorio de citogenética reporta un 16.7% de alteraciones cromosómicas en pacientes referidos con aborto de repetición, con algún problema de infertilidad, con sospecha de Síndrome de Down, retraso mental, malformaciones congénitas. Al igual que en este trabajo, la indicación más solicitada fue en parejas con abortos de repetición.

En pacientes con infertilidad la alteración cromosómica más observada fueron los mosaicos de cromosomas sexuales 2.21% (16 pacientes).

Dentro de las pacientes que llegaron por síndromes conocidos o por malformaciones la alteración más frecuente fue el Síndrome de Down 40 casos (29%).

Tres pacientes con fenotipo femenino que solicitaron el cariotipo en sangre por amenorrea (2 casos) y por infertilidad (1 caso) presentaron cariotipo 46,XY. En los pacientes con fenotipo femenino y cariotipo 46,XY su patología se debe a mutaciones en genes relacionados con la diferenciación sexual ⁽³⁶⁾. Una de estas pacientes era de la clínica, la intervinieron quirúrgicamente para retirarle los testículos y recibió apoyo psicológico junto con sus padres.

5.5. CARIOTIPO EN MÉDULA ÓSEA

En las muestras de Médula Ósea se observaron más alteraciones estructurales que numéricas como se presentó en las muestras de líquido amniótico y productos de aborto. Se hicieron muy pocos estudios debido a la orientación de la Clínica en el Área de la Reproducción Humana. Las muestras de Médula Ósea se estudiaron en 105 casos, donde 50 (47.6%) presentaron Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) en niños y jóvenes, Leucemia Granulocítica Crónica (LGC) 20 pacientes (19%) en adultos, 35 casos restantes (33%) llegaron por otra indicación.

De los 105 casos procesados, 22 tuvieron una alteración (21%). En 16 muestras no se obtuvo un resultado (15.2%) y esto pudo deberse a: que la muestra llegó coagulada, la calidad de los cromosomas obtenidos, no se detectaron células en división, quizá debido a una muestra pobre de médula ósea. El trabajo de la Clínica Las Condes ⁽³⁵⁾ reporta que de 209 estudios realizados el 44% tuvieron un cariotipo alterado correspondiendo la mitad de ellos a leucemia mieloide crónica. Otro trabajo reporta 17% de alteraciones en LLA ⁽³⁶⁾.

El análisis se convierte en un verdadero reto el tratar de encontrar aberraciones en los cromosomas de medula ósea. Hoy en día se han desarrollado técnicas mucho más sensibles, como es el FISH (Hibridación in situ por fluorescencia) donde se ha detectado que las células que habían sido informadas como normales, presentaban aberraciones cromosómicas que no fueron detectadas por la citogenética convencional para lograr dar una terapia más segura y eficaz al paciente con leucemia ⁽³⁶⁾.

6. ANÁLISIS CRÍTICO

En este apartado haré un análisis de mi aprendizaje en el laboratorio de Genética durante el tiempo que estuve laborando, dando mis comentarios, sugerencias y agradecimientos al respecto.

6.1 COMENTARIOS DEL APRENDIZAJE

Durante la estancia de 9 años en el laboratorio la enseñanza fue en: la metodológica de los procesos técnicos de las diferentes muestras del laboratorio y el análisis y diagnóstico de los estudios citogenéticas, así como las consecuencias biológicas de las diferentes aberraciones cromosómicas.

En realidad las pruebas genéticas ofrecen información del padecimiento y no siempre se correlacionan directamente con la clínica, ya que nuestros genes interactúan con el ambiente de formas muy diversas.

6.1.1. METODOLOGÍA

El control de calidad se debe manejar en todas las etapas de los estudios, en la recepción de las muestras donde tienen que estar bien identificadas para evitar confusiones y revisar que la muestra mantenga las condiciones adecuadas para ser procesada (cantidad mínima requerida, recipiente adecuado, etc) y en la elaboración de laminillas que estén marcadas de manera permanente.

Las técnicas de Cultivo Celular para Cariotipo en Sangre y Médula Ósea y el manejo de los medios de cultivo utilizados y los criterios de toma de decisiones para lograr metafases extendidas y realizar las técnicas de tinción de Bandas G y Q para poder posteriormente hacer el análisis y el diagnóstico de las muestras.

Es necesario trabajar de manera ordenada llevando todos los registros de las muestras que llegan al laboratorio en una bitácora, de los resultados de todos estudios y de su correcto almacenamiento siendo más fácil el manejo de la información. Para poder llevar acabo todo esto, hay que considerar que es necesario contar con una infraestructura adecuada: un cuarto especial para cultivo celular, equipo adecuado para el procesamiento de las muestras y que este tenga un mantenimiento preventivo o correctivo cuando sea necesario, además del manejo de reactivos para conservar su estabilidad y efectividad.

6.1.2. ANÁLISIS Y DIAGNÓSTICO

Reconocer todos lo pares cromosómicos e identificar, las anomalías numéricas o estructurales en todo tipo de muestras, así como a describirlas utilizando el Sistema de Nomenclatura en Citogenética Humana, 1995 y 2005 ⁽²³⁾. Los criterios para saber distinguir mosaicos verdaderos de pseudomosaicos y si una alteración cromosómica era *invitro* o lo presentaba el paciente.

6.2. AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Grupo de Reproducción y Genética y al Servicio de Genética de manera particular por haberme dado la oportunidad de incorporarme a su equipo de trabajo inmediatamente después de terminar la carrera, debido a que con esto tuve la fortuna de tener experiencia laboral de manera temprana.

Me quedo con el conocimiento y la experiencia donde estuve laborando por más de 9 años y comencé mi desarrollo como profesionista debido a que es un lugar altamente profesional con una amplia experiencia en Citogenética por parte de la Dra. Mabel Cerrillo, pionera en el Diagnóstico Prenatal en México, coordinadora y citogenetista de esta área y la Biól. Concepción Yerena responsable del cultivo de líquido amniótico y productos de aborto.

Desde el inicio me sorprendió la calidad y el prestigio con que contaba el grupo y por su vanguardia en el área de la reproducción humana, esto es gracias a que el director del grupo el Dr. Alfonso Gutiérrez Nájjar es una persona visionaria y que exige a su grupo lo mejor en su área.

Afortunadamente en este grupo pude desarrollarme como bióloga y aplicar los conocimientos adquiridos durante la carrera y reafirmarlos.

El grupo siempre se ha caracterizado por organizar eventos académicos, pláticas y simposios esto ha sido un estímulo a actualizarme y acudir a los cursos, simposios y congresos cuando me ha sido posible. En este campo como en otros es necesario seguir estudiando y actualizándose.

CURSOS, SIMPOSIOS Y CONGRESOS A LOS QUE ASISTI DURANTE MI ESTANCIA EN EL LABORATORIO

Simposio Serono de Medicina Reproductiva
Fecha: del 28 al 30 de Enero de 1999
DIPLOMA

RECONOCIMIENTO
Seguridad en Manejo de Gases Especiales
Fecha: 18 de diciembre del 2000

XXXIII Curso Teórico de Genética Humana
Asociación Mexicana de Genética Humana A.C.
Fecha: del 25 al 29 de Junio del 2001
CONSTANCIA

Simposio de Reproducción Asistida “De Gametos a Nuevo Ser: 0¿Blastocisto?”
Fecha: del 15 al 17 de Octubre del 2001
CONSTANCIA

II Simposium de Reproducción Asistida “De Gametos a Nuevo Ser:
“Aplicaciones, Alternativas y Futuro de la Reproducción Asistida”
Fecha: del 16 al 18 de Mayo del 2002
CONSTANCIA

2do. Curso. Temas Selectos de Genética Humana
Fecha: 7 al 11 de Abril del 2003
30 horas
Constancia

III Simposio de Reproducción Asistida
“Dónde Estamos y Hacia Dónde Vamos en Medicina Reproductiva”
Fecha: del 22 al 24 de Mayo del 2003
CONSTANCIA

XXVIII Congreso Nacional de Genética Humana. Asociación Mexicana de Genética
Humana A.C. Del 19 al 22 de Noviembre del 2003 en Morelia Michocán.
CONSTANCIA

Curso Teórico Pre- Congreso en el marco del XXX Congreso Nacional de Genética
Humana. Asociación Mexicana de Genética Humana A.C. “ Genética Humana y Bioética”
Del 14 al 16 de Noviembre del 2005 en Monterrey, Nuevo León.
CONSTANCIA

6.3. SUGERENCIAS

Por cuestiones internas del laboratorio ese momento no fue posible implementar la técnica de FISH (Hibridación In situ por Fluorescencia) que es una técnica de citogenética molecular, que es un complemento y apoyo al trabajo de Citogenética convencional.

Sería recomendable para el Servicio de genética contar con una estrategia de venta para promocionar todos los estudios que ahí se hacen y sobre todo la experiencia que se tiene y así generar un crecimiento rápido.

A nivel académico, se recomienda realizar 1) sesiones bibliográficas en las que se discutieran artículos científicos, 2) Sesiones con el equipo de de trabajo en las que se discutieran los casos relevantes que se dan en el laboratorio y se dieran comentarios al respecto en equipo.

7. FUENTES DE INFORMACIÓN

- 1.- Juan Ramón Lacadena. **Citogenética**. Edit. Complutense. 1996. 927 pp
- 2.- E. Galán Gómez **Aplicaciones del laboratorio de citogenética a la clínica**. *Pediatr Integral* 2002;6(9):820-830.
- 3.- Salamanca **ALTERACIONES CROMOSOMICAS EN EL CANCER HUMANO** Salud Pública Méx 1995; Vol. 37(2):162-170).
- 4.- Guizar-Vázquez J. Jesús. **Genética Clínica. Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias**. 3era. Edición. 2001. México. El Manual Moderno. 985 pp
- 5.- Oliva Rafael **Genética Médica**. Edit. Universitat. 3ª. edición. 2004. Barcelona España. 305 pp).
- 6.- Larsen, William J. **Embriología Humana**. 3era. Edición. Elsevier. 2003. España 548 pp.
- 7.- Grupo Gen. Grupo de Estudios al Nacimiento A.C. **Los Defectos al Nacimiento. Prevención... para un mejor futuro**. 1era. Edición. 2003. Grupo Editorial Grupo de Estudios al Nacimiento A.C. México. 272 pp
- 8.- Chávez-Pastor, Miguel , E. Zigelboim. **Genes que intervienen en la no disyunción cromosómica**. *Rev Per Ginecol Obstet*. 2008;54:175-178.
- 9.- Lynn B. Jorde Carey. **Genética Médica**. Elsevier 3ª edición. 2004. España. 366 pp
- 10.- Martínez González, C. Sánchez Pina, L., Fernández Menéndez. **De la ética del diagnóstico, al diagnóstico ético**. *Rev Pediatr Aten Primaria*. 2008;10:81-7
- 11.- Margaret Thompson, R. Nussbaum, R. McInnes, J Thompson. **Genética en Medicina**. Elsevier España 2004. 5ta. Edición 470 pp.
- 12.- M.M Recasens, X. Estivill Pallejá: **Anomalías cromosómicas. En Medicina Interna**. Farrera y Rozman, Ed. 1995 1222 pp
- 13.- Venegas Patricia , M. Sánchez. **Anormalidades estructurales del cromosoma X y su relación clínica**. *Rev. méd. Hosp. Nac. Niños* 1998 v.33 n.1-2 San José Costa Rica.
- 14.- Camargo, M y Cervenka, J. **Pattern of Chromosomal Replication in Synchronized Lymphocytes : I. Evaluation and Application of Methotrexate Block**. *Human Genetics*, 54 :47-53. 1980.

15.-Drets, Máximo E. **Una saga citogenética: El descubrimiento de los métodos de bandedo cromosómico. Significado y proyección bio-médica.** Rev Med Uruguay 2002; 18: 107-121

16.- Imágenes metafases

http://images.google.com.mx/imgres?imgurl=http://sebbm.bq.ub.es/BioROM/contenido/biomodel/citogene/horwitz/qbandspr.jpg&imgrefurl=http://sebbm.bq.ub.es/BioROM/contenido/biomodel/citogene/horwitz/cytogen1.htm&usq=__lkcwiZr7pYDgQ7TWCGEVgp4hzP8=&h=750&w=1000&sz=34&hl=es&rom=24&um=1&tbnid=KdD9wwSXBVDU1M:&tbnh=112&tbnw=149&prev=/images%3Fq%3Dbandas%2BQ%26ndsp%3D20%26hl%3Des%26safe%3Doff%26sa%3DN%26start%3D20%26um%3D1

17.- Verma, R.S; Babu, A. **Human Chromosome Manual of basic techniques.** Pergamon Press, New York, U.S.A. 1989. 200 pp

18.- Cummings, M. ; **“Herencia Humana: principios y conceptos”** – Ed. Interamericana Mc Graw – Hill.1995 3ª Edición.

19.- Bosch, Tomás y col. **Posibilidades y limitaciones de una ecografía en la semana 12-13 de gestación: la translucencia nucal en el cribado del síndrome de Down.** Prog Obstet Ginecol 2003;46(2):75-90.

20.- Merkatz IR, Nitowsky HM, Macri JN, Johnson WE. **An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosomal abnormalities.** Am J Obstet Gynecol. 1984;148:886-894.

21.- Nicolaides KH, et al. **Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal in first trimester of pregnancy.** BMJ. 1992Apr 4;304(6831):867-869.

22.- Solari, A.J.; **“Genética Humana: fundamentos y aplicaciones en medicina”** – Ed. Panamericana, 1999. 3ª Ed.

23.- Salazar L,R., Ibarra G, Iduma M. M., Leyva B.R. **Especificidad de marcadores bioquímicos del segundo trimestre del embarazo.** Ginecol Obstet Mex 2007;75(10):608-14

24.-ISCN. An International System for Human Genetics Nomenclature, Lisa G. Shaffer, Niels Tommerup. 1995 y 2005

25.-Boué A, Boué J, Gropp A. **Cytogenetics of pregnancy wastage.** Advances in Human Genetics. Vol 14, 1985:1-57

26.- Salamanca Andrés. **TAMIZAJE PRENATAL: ANÁLISIS DE RIESGO DE ANEUPLOIDÍA.** REVISTA COLOMBIANA DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA VOL. 54 NO 4 . 2003

- 27.- Alvarez, Francisco, Soto, M. Padron, T. **Cribado prenatal sérico materno para la detección de anomalías cromosómicas fetales: importancia clínica de la tasa de falsos positivos.** *Invest. clín*, set. 2003, vol.44, no.3, p.195-207. ISSN 0535-5133.
- 28.- Wenstrom KD, Desai R, Owen J, Du Bard , Boot L. **Comparison of multiple-marker screenig with amniocentesis for the detection of fetal aneuploidy in women > or =35 years old.** *Am J Obstet Gynecol* 173(4):1287-92 (1995 oct)
29. -Silvia E, Giraldo A. Bermudez A. **Diagnóstico Prenatal Citogenético: Líquido amniótico versus Velloidades Coriónicas.** *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología.* 1997;47:169.
- 30.-Tseng JJ, Chou MM, Lo FC, Lai HY, et al. **Detection of chromosome aberrations in the second trimester using genetic amniocentesis: experience during 1995-2004.** *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2006 Mar; 45(1):39-41
- 31.- Karaoguz MY, Bal F, Yakut T, Ercelen NO, et al. **Cytogenetic results of amniocentesis materials: incidence of abnormal karyotypes in the Turkish collaborative study.** *Genet Couns* 2006;17(2):219-30.
- 32.Hogge W, Byrnes A, Lanasa M, Urvashi S. **The Clinical use of karyotyping spontaneous abortions.** *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:397-402.
- 33.- Gilmore DH. **Spontaneous fetal loss rate in early pregnancy.** *Lancet* 1985,107-11.
- 34.-Andrés Estay , Parra R, Benitez H. **Alteraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica** *Rev Chil Pediatr* 2007; 78 (4): 363-368
35. Cecilia Bee, Velásquez P, Youlton R. **Laboratorio de Citogenética: experiencia de 15 años. Clínica Las Condes.** Vol. 10 N°1 Abril.1999.
- 36.- Venegas, Patricia , Rivera, Julio. **Estudios citogenéticos en niños con Leucemia Linfocítica Aguda-B en Costa Rica.** *Rev. biol. trop*, set. 2004, vol.52, no.3, p.551-558. ISSN 0034-7744.

8. APÉNDICE

8.1. EQUIPO

- Campana de flujo laminar horizontal
Marca Vecco
Serie FL 1869
- Estufa Bacteriológica
Marca Lab-Line. Mod. 120
No. de Serie 0029
- Incubadora de CO₂
Marca Heraeus
F1-16
No. de Serie 8612224
Typ B 5060 EK-C02
Bestell Nr 26139055
Fabrik Nr 86122244
Nenntemp 50°C 100-110 V
I/N/PE 50/60Hz 6.4-7A 0.7 Kw
Schutzart IP 20 Schaltplan 26139175
Temp Schutz DIN12880
Klasse 3.1 Heraeus D-6450 Hanau
- Incubadora de CO₂ y O₂
Marca Heraeus
Typ B 5061 EK /02
B Nr 50004587 F- Nr 8607754
50°C 60Hz 120 V
6.4 A 0.77 Kw
- Congelador American
Modelo Fiorami C255
- Refrigerador
Marca HUSSMANN
Modelo RC-604 WA
- Baño María
Marca JM. ORTIZ
B8037 S.I.C.-D.G.E. 774
- Balanza analítica
Marca Sartorius
R-160 P-WR-6003
- Autoclave- Esterilizador
Marca Amsco Eagle Ten
Modelo E-10 sp

- Microscopio con Epifluorecencia
Marca Zeiss, Modelo 7k
Con Fototubo y cámara Olympus
- Fotomicroscopio Carl Zeiss con óptica
para campo claro, contraste de fases y
fluorescencia, con filtros para FISH.
- Una computadora
- Un programa de computo "Karyotipe Builder" para elaborar cariotipos
- Dos Pipeteadores eléctricos para pipetas de 5 y 10 ml
- Un agitador magnético Lab-Line 1266
- Reloj de intervalos Radio Shack 63898

8.2 MATERIAL

- Frasco de cultivo de 50 ml, desechable	Falcon	353014
- Pipeta 10 ml, envuelta individualmente, desechable.	Falcon	356551
- Tubo de centrífuga de 15 ml con punta cónica con tapón de rosca, desechable.	Falcon	352097
- Tubo de 10 ml con punta redonda desechable, envuelto individualmente	Falcon	352057
- Viales de 2 ml con tapón de rosca	Corning	25702
- Filtros Miller-GV poro 0.22 mm, diámetro 25 mm	Millipore	SLGV 025LS
- Portaobjetos 75 x 25 mm	Corning	
- Cubreobjetos 50 x 24 mm del #1	Corning	2935
- Vaso de precipitados de 250 ml	Pyrex	
- Probetas graduadas de 50 y 100 ml	Pyrex	
- Pipetas pasteur de vidrio	BD	4642
- Tubo de centrífuga de 15 mm, punta cónica graduado de cristal	Pyrex	8100
- Termómetro de 10 a 100 °C	Vilsa	
- Lápiz diamante	Bel-Art	F44150
- Pinzas de disección punta roma		

8.3. REACTIVOS

Reactivos	Marca / catalogo
- Medio de cultivo HAM-F10 con L-glutamina, sin bicarbonato de sodio	Sigma N-6635
- Fitohemaglutina Forma M Liofilizada	Gibco 10576-015
- Suero fetal de ternera	Alen Dist. S/N
- Glutamina 200 Milimolar	In Vitro S/N
- Bicarbonato de sodio	Sigma S-5761
- Cloruro de Potasio	Merck 4936
- Cloruro de Sodio	J.T Baker 3624-01
- Citrato de Sodio	J.T Baker 3646-20
- Fosfato de Potasio	Merck 1.04873.025
- Fosfato de Sodio	Merck 6586
- Metanol	J.T Baker 9070-02
- Etanol	Merck 1.00983 1000
- Ac. Acético Glacial	Merck 1.00063.1000
- Etellan	Merck 7961
- Colorante Wright	Merck 1383
- Giemsa en polvo	Merck .09203.0025
- Heparina	PISA S/N
- Glicerina	Merck 1.04094.1000
- Aceite de inmersión	Merck 1.04699.0100
- Sol. Salina de NaCl al 0.9%	PISA