

18 JUN. 1982

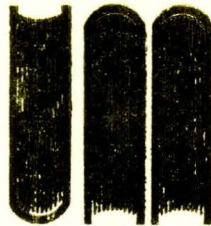
DCNE  
\$500=

2

**UNIVERSIDAD DE MONTERREY**  
DIVISION DE CIENCIAS NATURALES  
Y EXACTAS

*Clasificación*

040.54  
S486e  
1982  
c.1



**UNIVERSIDAD  
DE MONTERREY**

Folio  
801437

*Título*

ESTANDARIZACION DE UN METODO  
PARA LA ELABORACION DEL CARIOTIPO  
HUMANO EN LINFOCITOS SANGUINEOS

REPORTE DEL PROGRAMA DE EVALUACION FINAL  
QUE PRESENTA

*Autor*

SARA ISAURA SERNA BENAVIDES

EN OPCION AL TITULO DE LICENCIADO  
EN QUIMICA CON ESPECIALIDAD  
EN ANALISIS CLINICOS

*Vo. Bo  
Pro. Lourdes Metz-M.*

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 1982

BIBLIOTECA UNIVERSIDAD DE MONTERREY

A Dios nuestro Señor

... por su infinita bondad....

A mis padres y hermanos

... por su apoyo, cariño y comprensión....

A mis maestros, compañeros y amigos

... por sus enseñanzas y valiosa amistad....

Agradezco de una manera especial a mi asesora, Q.F.B. Ma. de Lourdes Martí<sup>ne</sup>z M., su valiosa ayuda durante el proceso de elaboración de este trabajo.

De igual manera agradezco al I.Q. Aureliano García Fernández y a la Srita. L.Q.A.C. Adriana Benavides su apreciable cooperación.

A cada uno que de alguna manera contribuyó a la realización de éste, GRACIAS.

## INDICE

	Página
INTRODUCCION.....	1
MATERIALES Y METODOS.....	16
RESULTADOS.....	21
DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	36
RESUMEN.....	40
BIBLIOGRAFIA.....	41

## INTRODUCCION

El trabajo de Mendel, publicado en 1866, demostró que la herencia está basada en unidades separadas a las cuales Johanssen en 1909 denominó genes (18). Sin embargo, fue sólo hasta 1900 que De Vries, Correns y Tschermak redescubrieron las leyes de Mendel, iniciándose entonces el desarrollo de la Genética como ciencia independiente (9, 38). Por otra parte, desde el trabajo de Sutton y Boveri a principios de siglo se conoció que los genes se encontraban en estructuras específicas dentro del núcleo celular (22). Estas estructuras específicas fueron llamadas cromosomas de (de chrôma, color y sôma, cuerpo) - por Waldeyer en 1888 (22,38) debido a que se tiñen inten

samente con colorantes citológicos.

Los cromosomas están constituidos principalmente de ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA), y proteínas básicas denominadas histonas. Los genes, las unidades funcionales de la herencia, están constituidos por segmentos de DNA de diferentes longitudes (14,36).

Si el material hereditario se encuentra en los cromosomas es esencial que éstos se distribuyan con exactitud, ya que la pérdida de material hereditario en una célula y el exceso en la otra traería como consecuencia un desajuste en el balance de la información que se encuentra en clave en el material hereditario. El proceso responsable de una distribución exacta y ordenada del material genético durante la división celular se denomina mitosis (32).

La mitosis consta de cuatro etapas: profase, metafase, anafase y telofase. Si una célula no se encuentra en división activa se dice que está en interfase. En la etapa de interfase los cromosomas aparecen alargados y delgados y no se pueden apreciar individualmente, el material nuclear presenta un aspecto granuloso y el contenido de DNA en la célula se duplica. Los cromosomas son activos metabólicamente, exceptuando el cuerpo de cromatina sexual que se encuentra condensado e inactivo. En

el momento que se prepara la célula para su división los cromosomas empiezan a condensarse (34,38).

Recientemente se ha sugerido que quizá los cromómeros, cuerpos de cromatina dispuestos a lo largo de los cromosomas, sirven como centros para la condensación de éstos durante la mitosis. Esta condensación está probablemente mediada por una transición sulfhidril-disulfuro de las proteínas de los cromosomas (30).

Al momento de condensarse, los cromosomas se enrollan y se hacen visibles. Cuando esto ocurre se inicia la etapa de la profase.

En la profase, cada cromosoma aparece como dos cordones largos, delgados y paralelos, los cuales reciben el nombre de cromátides y se encuentran unidos por un centrómero. Durante esta fase la membrana nuclear desaparece y el núcleo pierde su identidad. Además los centriolos, dos pequeños cuerpos cilíndricos, empiezan a moverse hacia los polos de la célula separándose uno del otro. Es allí donde se establecen centros mitóticos a partir de los cuales se organizan las fibras del huso acromático, compuestas de microtúbulos, constituídos principalmente de dos proteínas muy similares: alfa y beta tubulinas. Algunos microtúbulos se originan en el centrómero y otros en la zona general de los centriolos (microtúbulos polares).



La metafase se alcanza cuando los cromosomas se han engrosado y se mueven al centro de la célula quedando en el plano ecuatorial. Es esta la fase en la cual se estudian con mayor facilidad los cromosomas individuales, pues las cromátides se encuentran en estado de máxima contracción y se tiñen con mayor intensidad.

Durante la anafase los centrómeros se dividen y las cromátides se separan y se desplazan hacia los polos de la célula. Este proceso se lleva a cabo cuando los microtúbulos polares se alargan y los que se originan en el centrómero se acortan permitiendo con estos movimientos que las cromátides se separen. En este punto se puede designar a las cromátides hermanas separadas como cromosomas hijos (3,34,38).

La última fase de la división nuclear, la telofase, se inicia cuando los cromosomas llegan a los polos de la célula. Posteriormente, aparece una nueva membrana nuclear que limita los cromosomas que en este momento ya no se tiñen como entidades individuales. Simultáneamente el aparato mitótico se desintegra y la célula se constriñe a la mitad del camino entre los dos núcleos, por un proceso llamado citocinesis. Así, aunque la distribución de los componentes citoplasmáticos puede no ser equitativa en las células hijas, si contienen exactamente el mismo tipo y número de cromosomas y por lo tanto igual consti-

tución genética (10,34,38).

A principios de siglo, los especialistas en citogenética comprobaron que el número y los tipos de cromosomas de plantas y animales inferiores eran específicos para cada especie. Mientras que los cromosomas en interfase de estos animales inferiores eran técnicamente fáciles de estudiar, los cromosomas en interfase de los mamíferos, especialmente del hombre, no podían observarse. Incluso si se interrumpía la mitosis de la célula, los cromosomas estaban tan próximos unos a otros que no podía establecerse un recuento seguro.

A pesar de tales dificultades técnicas, los investigadores estuvieron muy cerca de obtener el número correcto de cromosomas en el hombre. Las mejores preparaciones parecían indicar el número de 48 y por muchos años esto fue aceptado (35).

El recuento adecuado de los 46 cromosomas humanos realizado por Tjio y Levan en 1956, se logró mediante técnicas más avanzadas que permitieron dispersar los cromosomas mitóticos (16,22,40).

Teóricamente puede utilizarse cualquier tejido humano para analizar los cromosomas aunque muchas células son difíciles de cultivarse in vitro. Los mejores resultados

se han obtenido mediante el cultivo de médula ósea, piel, leucocitos sanguíneos periféricos, líquido amniótico y - fibroblastos (8,26,28).

Los cultivos de leucocitos sanguíneos periféricos son - los que actualmente se utilizan con mayor frecuencia (23). Tanaka en 1963 demostró que los leucocitos mononu - cleares, específicamente los linfocitos que maduran por influencia del timo, son las células capaces de dividirse en cultivos de sangre humana (37,40).

Para la preparación de cultivos de linfocitos, se ha encontrado que la heparina es un anticoagulante satisfactorio (40). También puede utilizarse como anticoagulante citrato-dextrosa sin que las células pierdan su capacidad mitótica aunque se haya refrigerado la sangre durante dos semanas, lo que no se logra con sangre heparinizada que solo conserva esa capacidad por un período de 12-24 horas (27).

El tiempo de incubación de los cultivos es de 2 a 3 días cuando se utiliza un mitógeno como la fitohemaglutinina (FHA). Sin embargo, en cultivos de pacientes con leucemia frecuentemente se observa que espontáneamente los linfocitos empiezan a dividirse en las primeras 24-48 horas de incubación y sin la ayuda del mitógeno (5,24).

La fitohemaglutinina es una substancia mitogénica, descubierta por Nowell en 1960 (25). Es una mucoproteína obtenida de Phaseolus vulgaris (judía roja ordinaria) o Phaseolus communis (judía blanca). Se desconoce su mecanismo mitogénico (29,40).

Sin embargo a través de un estudio del efecto mitogénico de la FHA, se llegó a la conclusión que tenía una base inmunológica. En esta investigación la FHA se sustituyó por la tuberculina en cultivos de linfocitos de personas sensibilizadas con este antígeno. Al observarse la mitosis de los cultivos los resultados fueron similares a los obtenidos con la FHA. Por esto se ha pensado que el agente mitogénico FHA posee algún antígeno de leguminosa para el cual todos los individuos tendríamos cierto grado de sensibilidad natural (25).

Otras variedades de plantas tales como Phytolacca americana (pokeweed) tienen efectos mitogénicos similares a los de la FHA. Estas observaciones sugieren la posibilidad de una distribución más amplia de fitomitógenos en el reino vegetal de la que ha sido reconocida (6).

Se han utilizado varios medios de cultivo, desde el primero usado por Osgood y Brooke, que han dado buenos resultados tales como el NCTC 109, Parker, Waymouth, y el medio de Eagle ME (40). Otro medio ampliamente usado -

por los buenos resultados obtenidos en establecer varias generaciones de linfocitos en cultivo de individuos normales es el RPMI-1640 (2). Todos estos medios están constituidos por mezclas variadas de aminoácidos y vitaminas en soluciones buffer.

Ninguno de estos medios permite el crecimiento de cultivos sanguíneos sin el suplemento de proteínas séricas. Se requiere agregar del 10% al 40% de suero para mantener el metabolismo de los cultivos. Al parecer cuando se utiliza una mayor cantidad de suero se controla el pH en una forma más adecuada. Tanto el suero humano como el de ternera se han utilizado con éxito.

Algunos de los parámetros que deben controlarse durante el tiempo de incubación son el pH, la temperatura, y la concentración de CO<sub>2</sub> para evitar la alcalinidad del medio. El pH óptimo de multiplicación aún no ha sido establecido, pero un pH alcalino mayor a 7.4 influye adversamente en la salud de los cultivos.

La temperatura de incubación para la máxima actividad mitótica es de 36-37°C. Las temperaturas mayores de 39-40°C generalmente traen como consecuencia la muerte del cultivo.

Se han agregado antibióticos tales como penicilina y es-

treptomycin para prevenir la contaminación bacteriana, aunque en cultivos de 48-72 horas no ha sido problema la contaminación y se ha optado por no agregarlos (40).

Tjio y Levan adoptaron la técnica implantada por Gavau--dan en 1937 de usar colchicina o su derivado diacetil N-metilado, para interferir en el desarrollo del huso mitótico e interrumpir la división celular en la metafase. - Como los cromosomas no pueden unirse al huso quedan distribuidos y dispersos dentro de la célula (3,26,33,40).

Se han observado resultados similares con vinblastina y griseofulvina las cuales logran la destrucción del huso acromático al disolver los microtúbulos (3). En otros - estudios hechos recientemente en cultivo de fibroblastos se ha utilizado diazepam que induce un arresto mitótico en la prometafase inhibiendo la separación centriolar en lugar de afectar la integridad microtubular (1).

Para efectuar el recuento de cromosomas se requiere utilizar generalmente una solución hipotónica, de KCl, que obliga a las células a hincharse y por lo tanto, separa los cromosomas (17,20,26,33).

Los linfocitos en cultivo necesitan de un fijador antes de ser colocados en una laminilla para ser teñidos con co

lorantes tales como Giemsa, azul de unna, azul de metileno, Feulgen, Wright o aceto-orceína, y así lograr una buena observación de la morfología cromosómica. Esta fijación se ha obtenido con resultados satisfactorios usando tres volúmenes de metanol y uno de ácido acético - glacial (40).

Después de la fijación se colocan los linfocitos en portaobjetos y se utiliza una técnica de secado rápido con aire o una de aplastamiento para separar más todavía los cromosomas y colocarlos en un solo plano (4,31).

Se obtiene una fotografía de la preparación y con diligencia los cromosomas se recortan, se ordenan en pares - homólogos y se establece con ellos un cariotipo (4).

Como se mencionó anteriormente durante la metafase se observan los cromosomas formados por las cromátides unidas a nivel del centrómero. Los tipos cromosómicos se diferencian según la posición del centrómero, si une las cromátides por su centro, se dice que el cromosoma es mediano o metacéntrico, si el centrómero se localiza en posición excéntrica dicese que es submediano o submetacéntrico. En algunos cromosomas el centrómero se encuentra situado cerca de un extremo de las cromátides y se les llama acrocéntricos. Algunos cromosomas tienen pequeñas -- proyecciones en sus brazos cortos que se denominan saté-

lites, los cuales se han logrado teñir y llegar así a su fácil identificación (41,46).

Los 46 cromosomas en una preparación de una metafase se presentan en pares homólogos. Existen 22 pares que morfológicamente son idénticos en ambos sexos y se denominan autosomas. Los cromosomas sexuales apareados en la hembra son iguales y se denominan XX, pero los cromosomas sexuales son diferentes en el varón siendo uno de ellos el X y el otro más pequeño el Y. La fórmula cromosómica para varones es 46 XY y para mujeres 46 XX (42).

Según la clasificación de Denver en 1960, perfeccionada en las Conferencias de Londres (1963), de Chicago (1966), y de París (1971), los pares de cromosomas fueron agrupados siguiendo el criterio de su dimensión y la posición del centrómero (9). Esto se efectúa fácilmente numerando los pares en orden descendiente de longitud y separándolos en siete grupos del A al G en base a los parámetros anteriores. Esta clasificación de los cromosomas es la que actualmente se denomina cariotipo celular.

Grupo A (número 1-3). Los cromosomas más grandes, metacéntricos.

Grupo B (número 4-5). Cromosomas grandes pero más pequeños que los del grupo A. Cromosomas submetacéntricos.

Grupo C (número 6-12 y X). Tamaño mediano con cen-



trómeros submetacéntricos.

Grupo D (número 13-15). Tamaño mediano con centrómeros acrocéntricos y satélites en los brazos cortos.

Grupo E (número 16-18). Pequeños con centrómeros submetacéntricos.

Grupo F (número 19-20). Pequeños con centrómeros metacéntricos.

Grupo G (número 21-22 y Y). Muy cortos con centrómeros acrocéntricos, los pares 21 y 22 pueden tener satélites (18).

Actualmente contamos con mejores técnicas para la identificación y apareamiento de los 46 cromosomas humanos. - Estas técnicas incluyen la Autorradiografía, y las técnicas de bandeo de fluorescencia de la quinacrina o Método Q, el Método de Giemsa o G y el Método C (13,18,38,42).

Por medio del Método de bandeo Q se demostró la existencia del cromosoma Filadelfia que es un cromosoma del grupo G con una deleción del brazo corto. Este cromosoma se ha encontrado en células de pacientes con leucemia -- mielocítica crónica y se cree está relacionado con la -- misma enfermedad (38).

Además de las técnicas de bandeo se han utilizado métodos como el descrito por Vause y McKougall en 1973 quie-

nes encontraron que ciertos virus pueden inducir aberraciones en cromosomas específicos in vitro y esta técnica está siendo explotada para la identificación de los cromosomas (13).

Todos estos métodos, estudios y descubrimientos han permitido el desarrollo de la citogenética. Por medio de ellos se han llegado a conocer las causas de enfermedades genéticas que antes se desconocían, por ejemplo los errores en la distribución de los cromosomas pueden conducir a las células a presentar una pérdida o una ganancia de cromosomas como es el caso del síndrome de Down, donde existen tres copias del cromosoma 21 (trisomía 21). Otras trisomías autosómicas se observan en recién nacidos e incluyen los cromosomas 13 y 18. Las malformaciones en estos síndromes son severas y causan casi siempre la muerte temprana. Estas trisomías se producen por la no disyunción materna durante la meiosis (35); proceso en el cual el número cromosómico de una célula reproductiva se reduce a la mitad del número diploide (34).

La no disyunción de los cromosomas sexuales permite una variedad de estados aneuploides. Entre éstos se encuentra el síndrome de Klinefelter, que es una condición hipogonadal en varones con una fórmula cromosómica de 47 XXY.

Las mujeres con el síndrome de Turner presentan un cariotipo 45 X0. La mayoría de estos casos se originan debido a la pérdida post-cigótica de un cromosoma X ó Y y muchos son mosaicos para complementos de cromosomas sexuales.

Por otra parte, el rompimiento de un cromosoma provoca una variedad de anormalidades estructurales que podemos notar en un cariotipo. Estas anormalidades estructurales incluyen: deleciones, cromosomas en forma de anillo, inversiones, translocaciones y cromosomas dicéntricos, así como también los isocromosomas que se originan cuando ocurre una división transversal del centrómero.

Un ejemplo típico de una deleción es el síndrome de Cri-du-chat en el cual se observa una pérdida de una porción importante del brazo corto de un cromosoma del grupo B, el número 5.

Se ha asociado la inestabilidad cromosómica con el cáncer en algunos síndromes tales como el de Bloom y la anemia de Fanconi. Esto sugiere que la pérdida de la integridad estructural del cromosoma puede algunas veces contribuir a una transformación maligna.

Muchas aberraciones, tanto numéricas como estructurales, se observan solamente en fetos espontáneamente abortados.

Se ha encontrado que del 30% al 50% de los abortos espontáneos presentan complementos cromosómicos anormales (35).

Como se ha expuesto anteriormente, en la actualidad se conoce que muchas de las enfermedades que existen son de origen genético y es por esto que la elaboración del cariotipo es importante, ya que permite establecer el diagnóstico de las enfermedades genéticas originadas por una aberración cromosómica numérica o estructural.

El propósito de este trabajo es estandarizar un método que brinde la oportunidad de realizar un estudio numérico y estructural de los cromosomas humanos en un laboratorio clínico.

## MATERIALES Y METODOS

Para la realización de este trabajo se emplearon muestras de sangre venosa de donadores voluntarios. Las muestras se obtuvieron en condiciones estériles por punción en el pliegue del codo con aguja calibre 21 y jeringa conteniendo 0.1 ml de heparina de amonio.

Las muestras fueron cultivadas y procesadas en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Monterrey, durante los meses de Febrero a Abril de 1982.

## METODO

### Microcultivo con Sangre Completa.

- 1.- Se colocan de 6-8 gotas de sangre heparinizada en tubos de cultivo estériles de 18 x 150 mm con tapón de rosca, conteniendo 5 ml del Medio RPMI-1640\*, 1 ml de suero fetal de ternera\*\* y 0.2 ml de fitohe maglutinina\*\*.
- 2.- Se incuban los tubos de cultivo a 37°C por 48 horas.
- 3.- Al final de la incubación se agrega 1 ml de colchicina y se continúa la incubación de los cultivos por 2 horas.
- 4.- Se suspenden las células en el medio, se transfieren a un tubo cónico de centrifuga calibrado y se centrifugan por 5 minutos a 500-800 rpm.
- 5.- Se elimina el sobrenadante y se agregan 4 ml de solución hipotónica de cloruro de potasio (R-1). Se continúa la incubación por 20 minutos.
- 6.- Se resuspenden las células y se centrifugan en las mismas condiciones anteriores.

\* Gibco

\*\* Microlab

- 7.- Se descarta el sobrenadante y se agregan 3 ml de fijador recién preparado (R-2).  
El fijador debe cubrir la superficie de las células y el paquete celular se resuspende en el fijador por agitación moderada con una pipeta Pasteur.
- 8.- Se repiten los pasos 6 y 7 hasta que el paquete celular y el sobrenadante se encuentren claros.
- 9.- Se resuspenden las células en unas gotas de fijador. Debe resultar una suspensión fina.
- 10.- Se vierten 2 gotas de las células fijadas sobre un portaobjetos muy limpio desde una distancia de aproximadamente 50 cm en un extremo y la mitad de la lámina. Se sopla suavemente sobre el portaobjetos para favorecer la extensión y se deja secar al aire. Se fija la preparación con metanol por 3 minutos, se tiñe con colorante Giemsa (R-3) por 30 minutos. Se lava con agua y se deja secar al aire.
- 11.- La preparación se observa con el objetivo seco débil, de un microscopio de luz ordinaria para buscar mitosis dispersas preferentemente y que no tengan sobreposición de las ramas de los cromosomas.

- 12.- Se cuentan los cromosomas de 20 células registrando su número y morfología.
- 13.- Se toma una fotografía de una célula que sea representativa de la población celular de la preparación.
- 14.- Se monta la preparación con resina.
- 15.- Se hacen ampliaciones de 8 x 10 pulgadas de las fotografías para preparar los cariotipos.
- 16.- Se recortan los cromosomas y se aparean de acuerdo a la clasificación de Denver.



## REACTIVOS

(R-1). Solución hipotónica de Cloruro de Potasio,  
0.075 M.

Cloruro de Potasio.....	1.1175 g
Agua destilada.....	200.0000 ml

Disolver el Cloruro de Potasio en el agua. Con-  
servar en frasco ámbar con tapón esmerilado.

(R-2). Fijador.

Metanol.....	3 volúmenes
Acido Acético Glacial.....	1 volumen

(R-3). Tinción Giemsa.

I Solución stock.

Giemsa en polvo.....	3.8 g
Glicerina.....	200.0 ml

Se calienta a 60°C durante 2 horas y se agregan  
312.0 ml de Alcohol Metílico.

II Solución de Trabajo.

Se diluye 1 ml de la solución stock en 10 ml de  
agua destilada.

## RESULTADOS

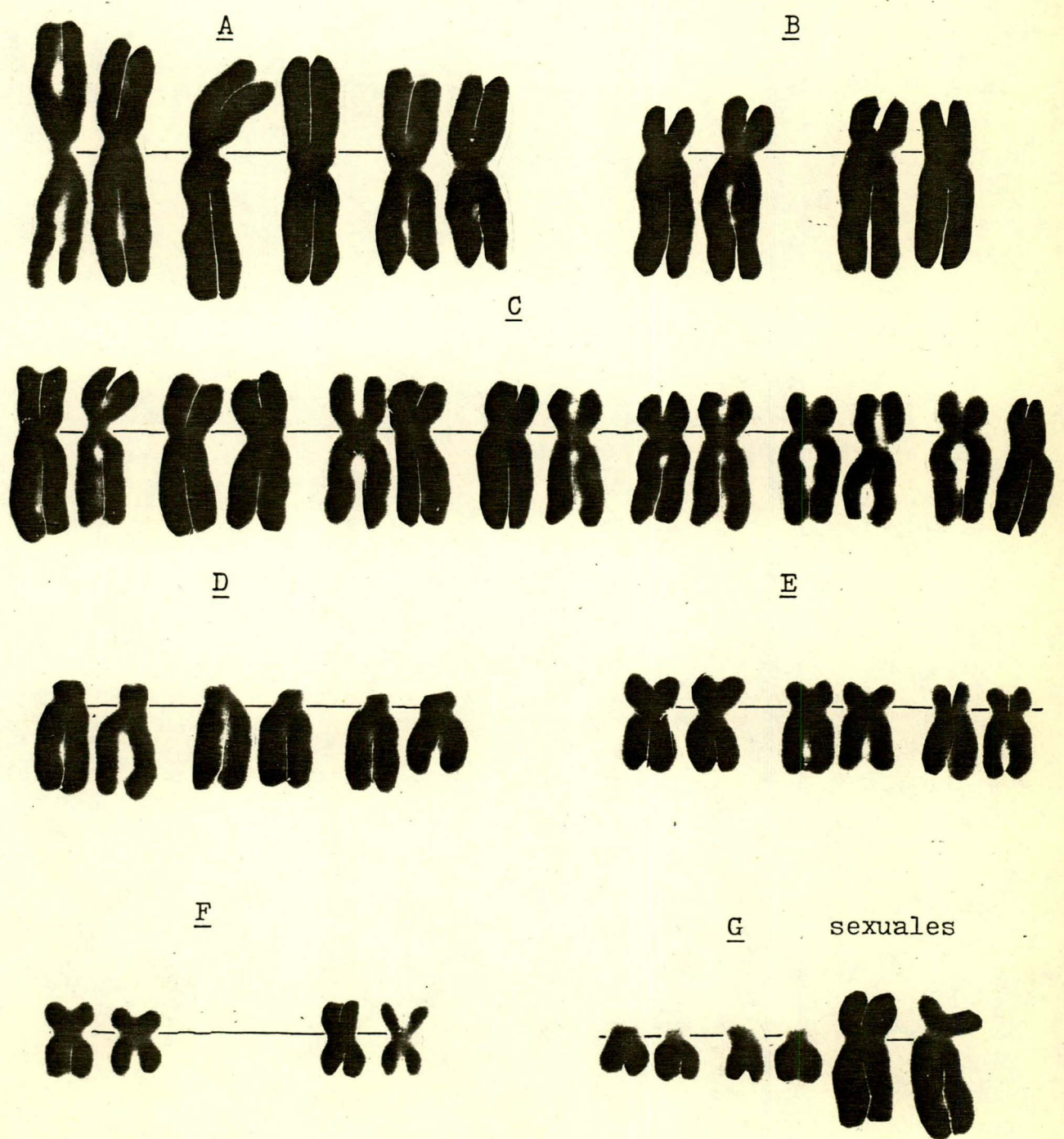
En el presente estudio se obtuvieron 14 cariotipos humanos a partir del cultivo de linfocitos sanguíneos periféricos, de los cuales 11 corresponden a mujeres y 3 a varones.

Para la preparación de cada cariotipo se observaron 20 células estudiando el número y la morfología de sus cromosomas. Se encontró que todos presentaban una fórmula cromosómica normal, 46 XX ó 46 XY.

A continuación se presentan los cromosomas obtenidos y ordenados siguiendo la clasificación de Denver.

FORMULA CROMOSOMICA:

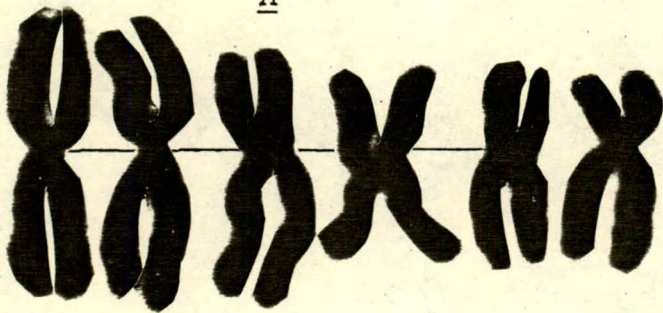
46, XX



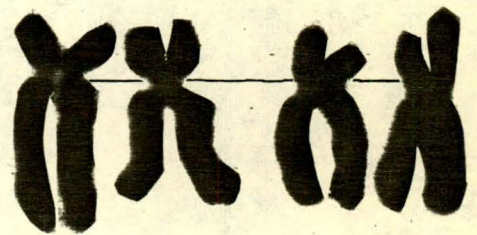
FORMULA CROMOSOMICA:

46,XX

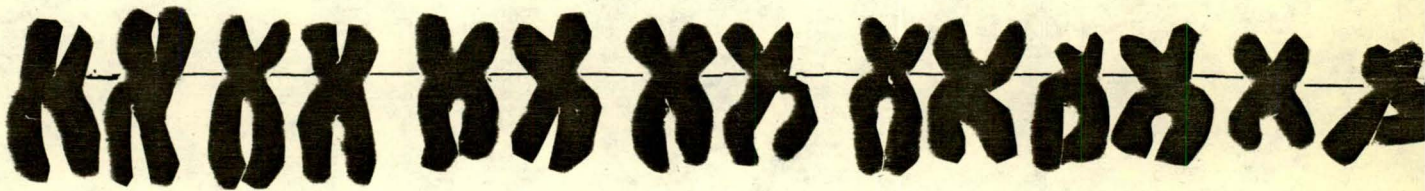
A



B



C



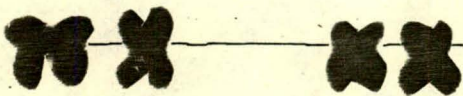
D



E

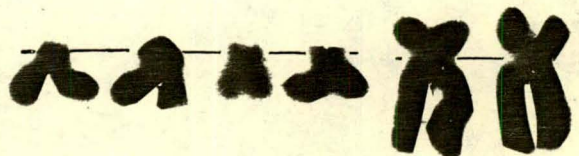


F



G

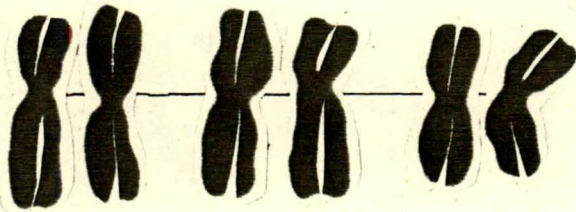
sexuales



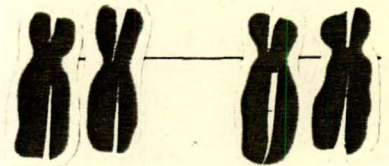
FORMULA CROMOSOMICA:

46,XX

A



B



C



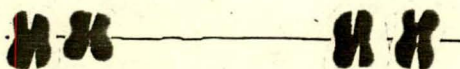
D



E



F



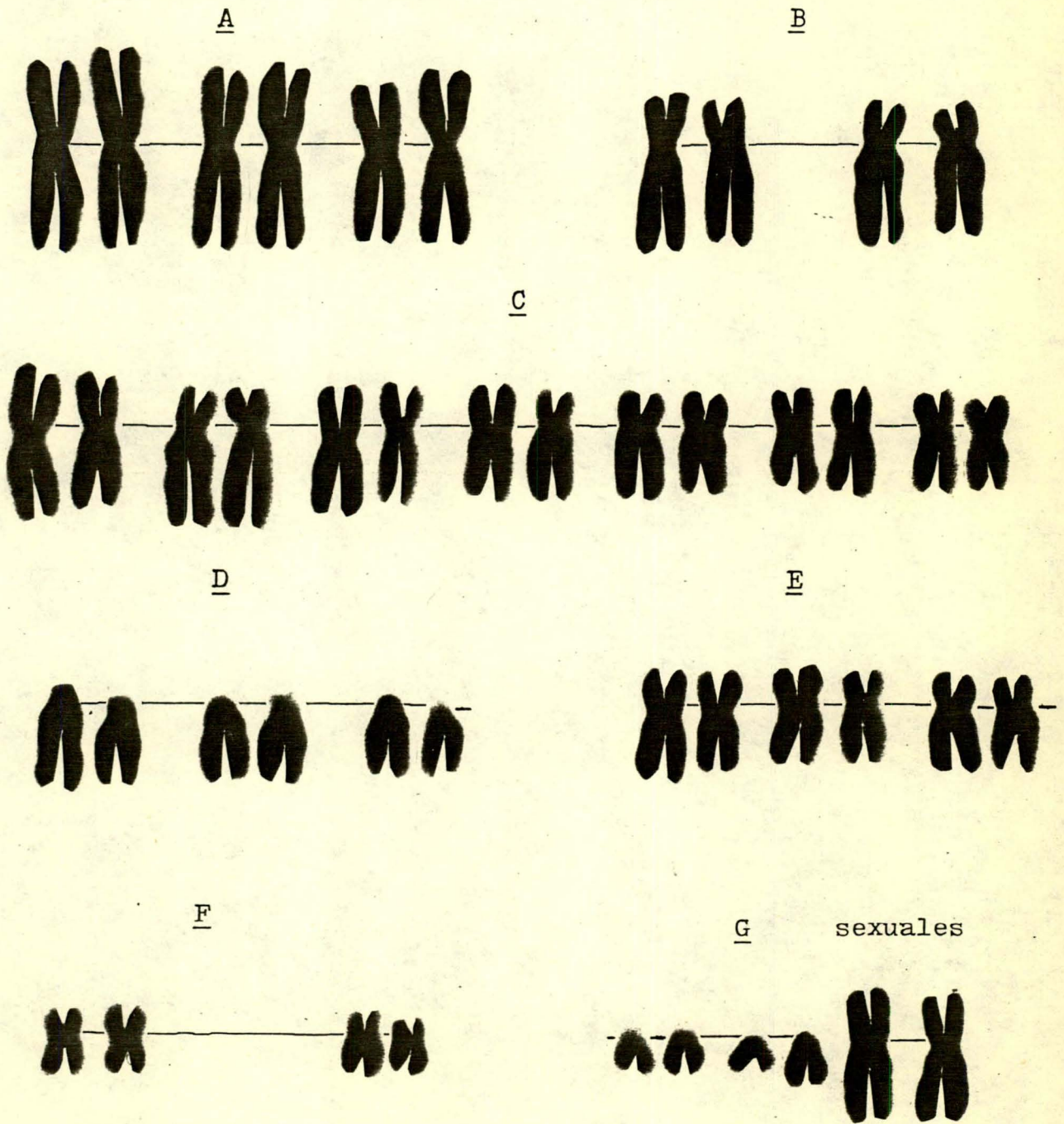
G

sexuales



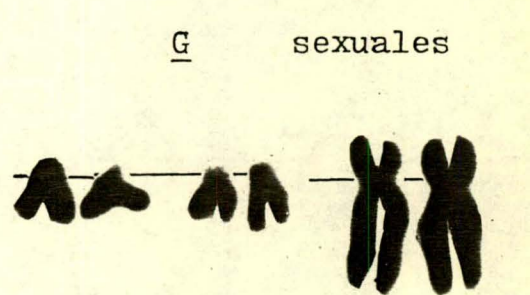
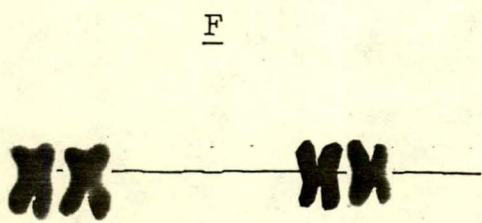
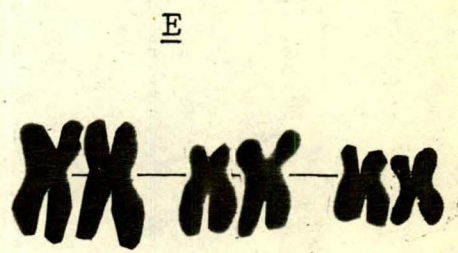
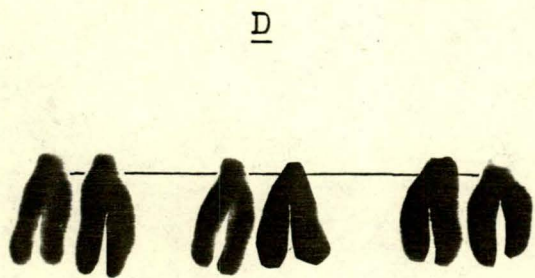
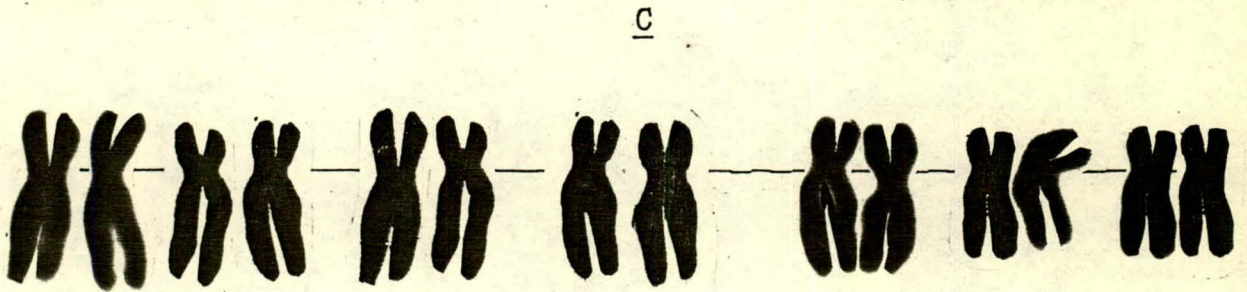
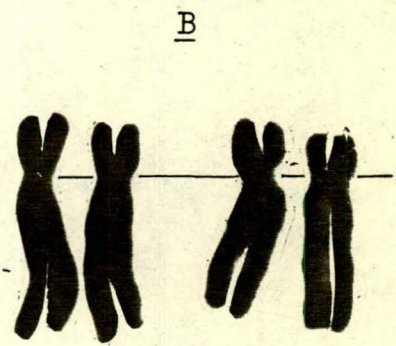
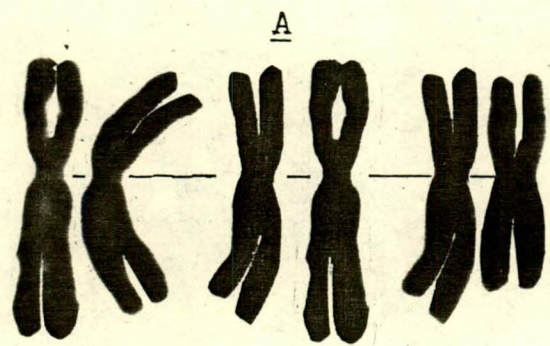
FORMULA CROMOSOMICA:

46, XX



FORMULA CROMOSOMICA:

46,XX



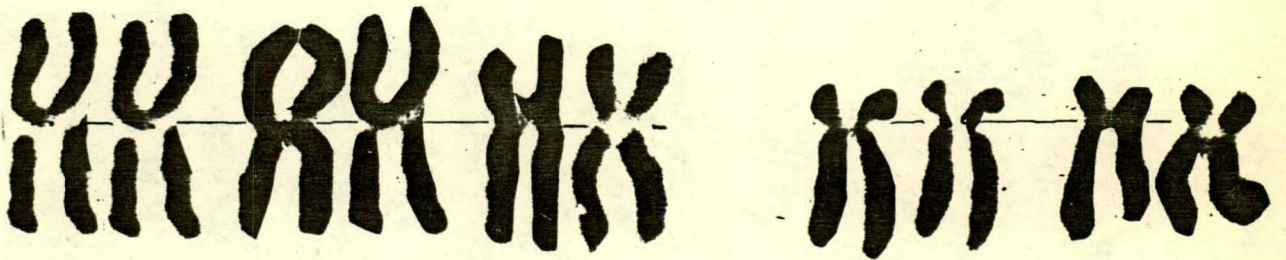
FORMULA CROMOSOMICA:

46, XX

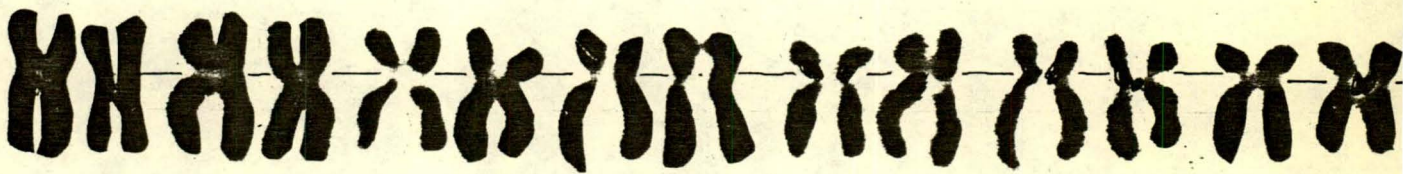
---

A

B



C



D

E



F

G

sexuales

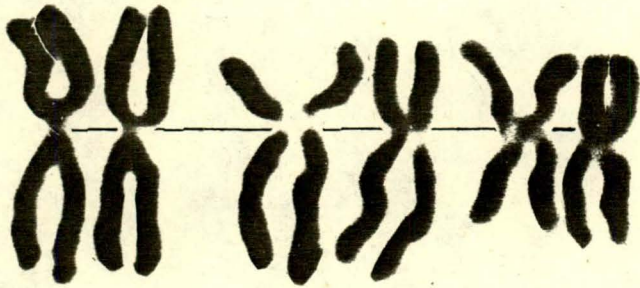




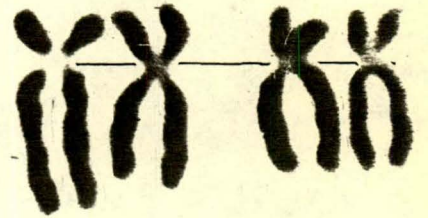
FORMULA CROMOSOMICA:

46,XX

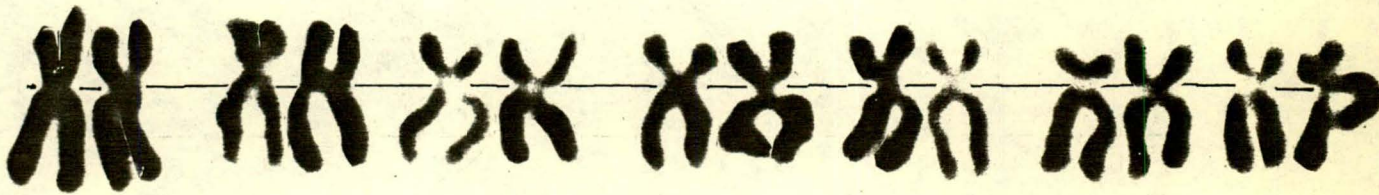
A



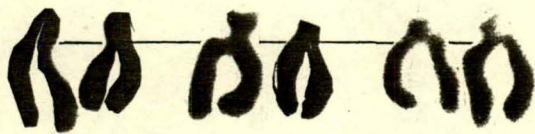
B



C



D



E

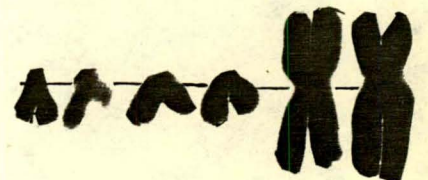


F



G

sexuales

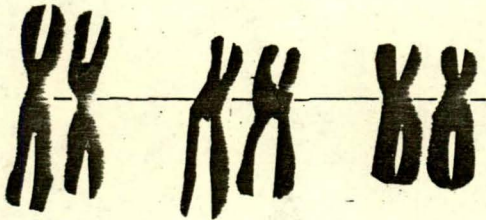


FORMULA CROMOSOMICA:

46, XX

---

A



B



C



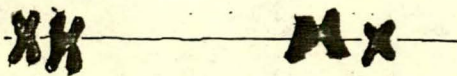
D



E

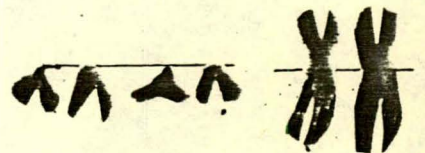


F



G

sexuales



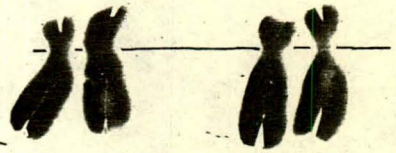
FORMULA CROMOSOMICA:

46,XX

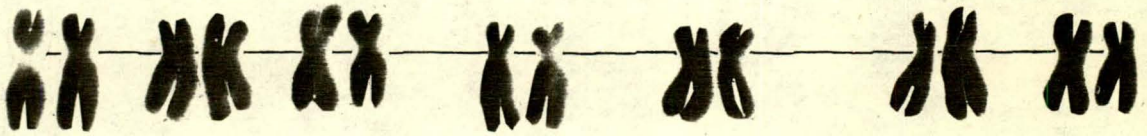
A



B



C



D



E

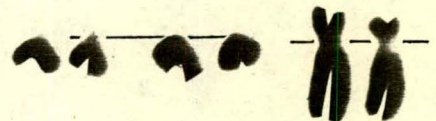


F



G

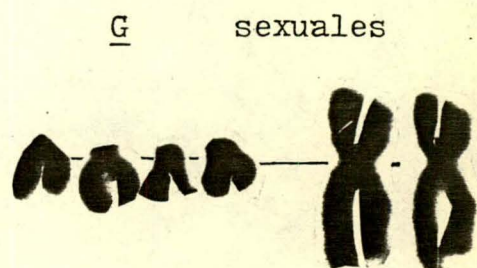
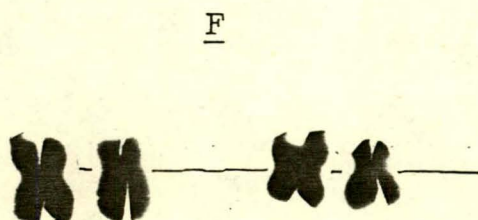
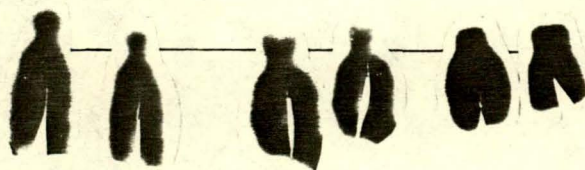
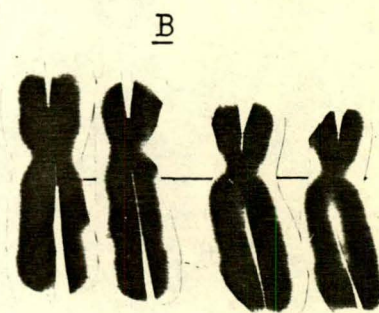
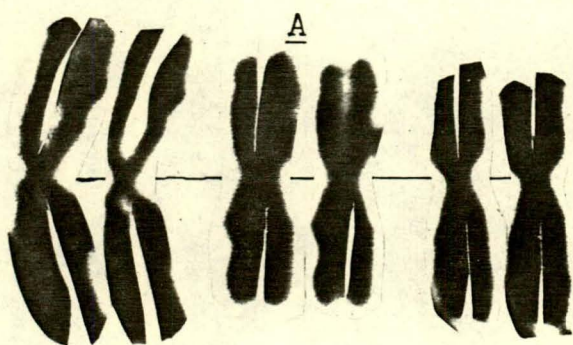
sexuales



FORMULA CROMOSOMICA:

46, XX

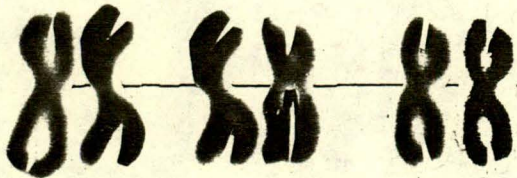
---



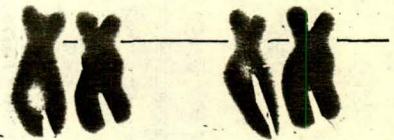
FORMULA CROMOSOMICA:

46, XX

A



B



C



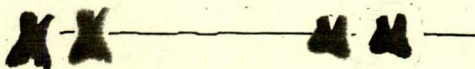
D



E



F



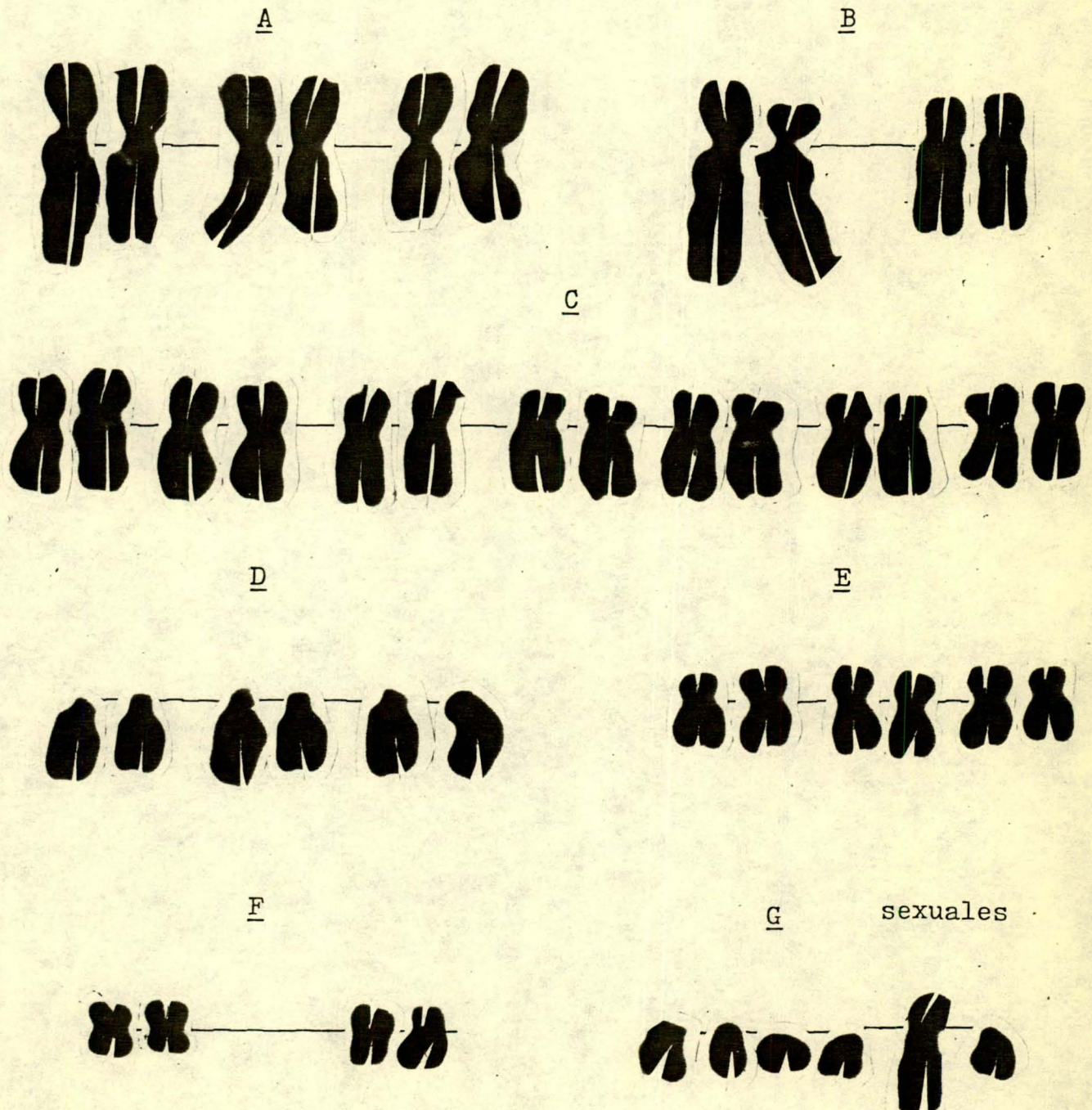
G

sexuales



FORMULA CROMOSOMICA:

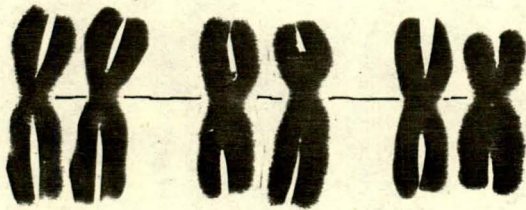
46,XY



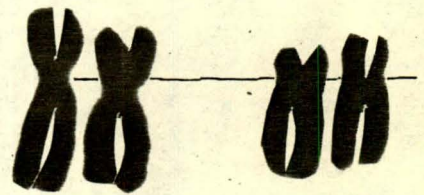
FORMULA CROMOSOMICA:

46,XY

A



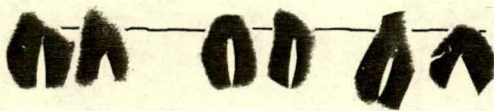
B



C



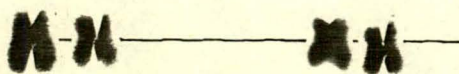
D



E



F



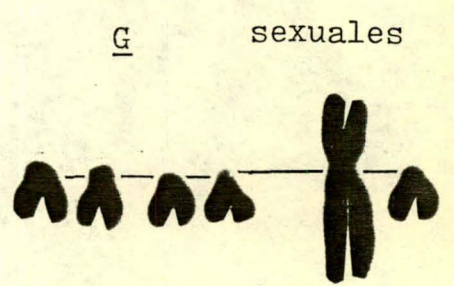
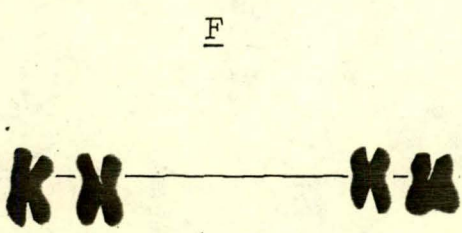
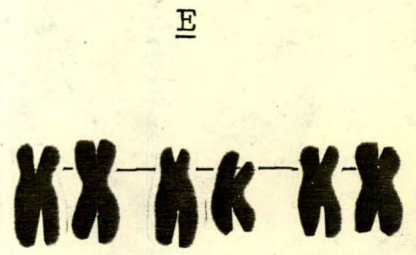
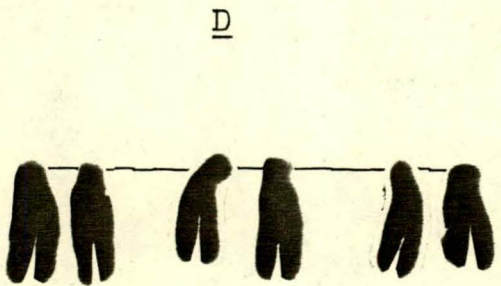
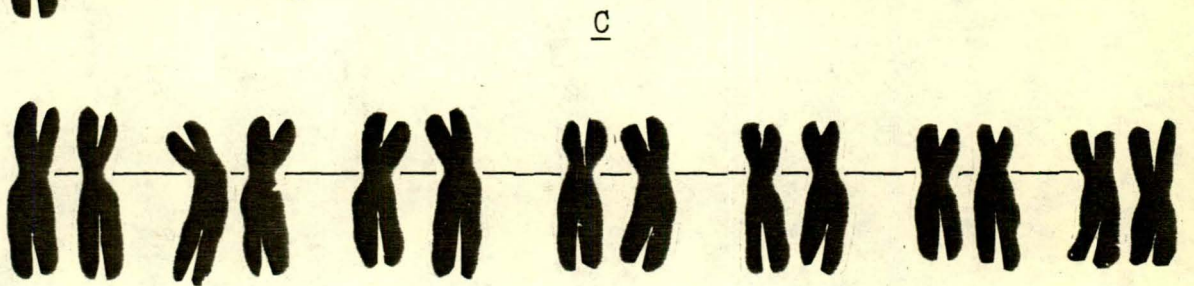
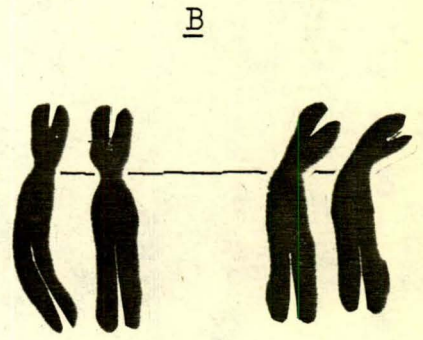
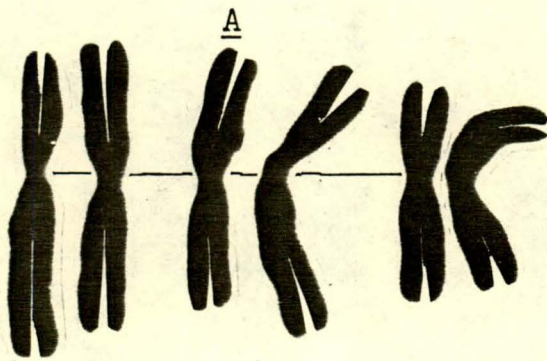
G

sexuales



FORMULA CROMOSOMICA:

46,XY





## DISCUSION Y CONCLUSIONES

En el estudio se logró estandarizar un método para la elaboración de cariotipos humanos a partir del cultivo de linfocitos sanguíneos periféricos.

Para llegar a lo anterior, se requiere un estricto control de los siguientes parámetros: temperatura, pH y concentración de  $\text{CO}_2$  durante el tiempo de incubación de los cultivos y así al término de este período obtener linfocitos en mitosis.

Como se mencionó anteriormente un pH mayor a 7.4 influye adversamente en la salud del cultivo, por esta razón se

deben revisar frecuentemente los cultivos y en el momento en que el indicador del medio vire, se afloja un poco el tapón del tubo para eliminar el exceso de CO<sub>2</sub> y poder mantener el pH normal.

Por otra parte, la inoculación del cultivo debe realizarse en condiciones rígidas de esterilidad ya que la contaminación bacteriana ocasiona una competencia en el reparto de nutrientes entre estos microorganismos y los linfocitos durante el período de incubación del cultivo. Esta competencia resulta desfavorable para los linfocitos pues el tiempo de generación de las bacterias es menor y además de disminuirles el aporte de nutrientes sus metabolitos resultan tóxicos para ellos.

Se pueden agregar antibióticos como la penicilina y la estreptomina para prevenir la contaminación bacteriana sin embargo hay evidencia de que los cultivos de células de los mamíferos pueden ser sensibles a ciertos antibióticos, por lo que se recomienda tomar precauciones debidas de esterilidad (40).

La concentración de la fitohemaglutinina es también un factor importante para efectuar este método. Una concentración mayor a la adecuada ocasiona la excesiva aglutinación de los glóbulos rojos los cuales de esta manera atrapan a los linfocitos y evitan así su reproducción.

Por otra parte se recomienda que la solución hipotónica sea recién preparada para obtener resultados más satisfactorios pues los cromosomas se podrán observar más dispersos en la célula lo que facilitará su estudio morfológico y numérico.

La técnica estandarizada en este estudio es reproducible y establece cariotipos de una manera sencilla y en los cuales se puede hacer el diagnóstico de aberraciones numéricas cromosómicas.

Un estudio más adecuado de la estructura del cromosoma se logra con métodos más sofisticados como el de la Autorradiografía, y las técnicas de bandeo por los Métodos Q, G ó C.

Por medio de las técnicas de bandeo se ha llegado a la identificación individual de los cromosomas lográndose así el diagnóstico de aberraciones estructurales y un apareamiento más efectivo de los cromosomas.

El extraordinario desarrollo de la citogenética en los últimos 20 años ha sido el resultado del descubrimiento de nuevas y más avanzadas técnicas. Los adelantos efectuados en los estudios de citogenética en mamíferos se deben principalmente al desarrollo de las técnicas de cultivos que permiten obtener gran número de células.

La introducción de la colchicina que detiene la división celular en metafase y el pretratamiento de las células - con soluciones hipotónicas que producen la separación de los cromosomas entre sí, también han contribuído. Y por último el perfeccionamiento de los métodos de secado al aire a partir de fijadores alcohólicos sitúan a los cromosomas sin superposiciones y extendidos en un solo plano.

Desde entonces, la metodología ha avanzado considerablemente, llegándose a una simplificación de las técnicas - rutinarias que están al alcance de cualquier persona entrenada. Sin embargo, también se ha abierto el camino a técnicas más complejas y por lo tanto más sofisticadas. Lo importante es que han permitido un conocimiento profundo de los cromosomas y del mecanismo del control genético, patogenia de neoplasias y malformaciones. Aún más importante el diagnóstico prenatal de enfermedades hereditarias.

Por todo lo anteriormente expuesto, se puede concluir -- que el método estandarizado en este estudio podría ser - implantado en un laboratorio clínico y ser de gran beneficio para el diagnóstico de aberraciones numéricas en - cromosomas humanos.

## RESUMEN

Se estandarizó un método para la elaboración de un estudio numérico y estructural de los cromosomas de linfocitos sanguíneos periféricos.

Estas células se cultivaron en el medio RPMI-1640 enriquecido con suero fetal de ternera, en presencia del mitógeno fitohemaglutinina y se incubaron durante 72 horas a 37°C.

Las células cultivadas se trataron con una solución hipotónica, se fijaron, tiñeron y colocaron en portaobjetos. Se contaron 20 células registrando el número y morfología de los cromosomas.

Se obtuvieron fotografías de los cromosomas y se establecieron los diferentes cariotipos de acuerdo a la clasificación de Denver.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Anderson, L.C., V.P. Lehto, S. Stenman, R.A. Badley, and I. Virtanen. 1981. Diazepam induces mitotic arrest at prometaphase by inhibiting centriolar separation. *Nature*. 291:247-248.
- 2.- Choi, K.W., and A.D. Bloom. 1970. Cloning human - lymphocytes in vitro. *Nature*. 227:171-173.
- 3.- Dustin, P. 1980. Microtubules. *Scientific Am.* - 243:67-76.

- 4.- Egozcue, J. 1971. Técnicas en Citogenética. Editorial Espaxs, España.
- 5.- Elves, M.W., and J.F. Wilkinson. 1963. The effects of phytohaemagglutinin on normal and leukaemic leucocytes when cultured in vitro. Exp. Cell Res. 30:200-207.
- 6.- Farnes, P., B.E. Barker, L.E. Brownhill, and H. - Fanger. 1964. Mitogenic activity in Phytolacca americana (pokeweed). Lancet II. 1100-1101.
- 7.- Ford, C.E., and J.L. Hamerton. 1956. The Chromosomes of man. Nature. 178:1020-1023.
- 8.- Ford, C.E., P.A. Jacobs, and L.G. Lajtha. 1958. Human somatic chromosomes. Nature. 181:1565--1568.
- 9.- Gardner, E.J. 1979. Principios de Genética. Editorial Limusa, México.
- 10.- Guyton, A.C. 1975. Fisiología Humana. 4a. Ed.- Nueva Editorial Interamericana, México.

- 11.- Holland, N.H., and P. Holland. 1965. Haemagglutinating precipitating and lymphocyte-stimulating factors of phytohaemagglutinin. Nature. 207: 1307-1308.
- 12.- Knudson, A. 1965. Genetics and Disease. McGraw-Hill Book Company, New York.
- 13.- Livingstone, Ch. 1979. Elements of Medical Genetics. 5th. Ed. T & A Constable Ltd., Great Britain.
- 14.- MacKinney, A. A., F. Stohlman, and G. Brecher. - 1962. The kinetics of cell proliferation in - cultures of human peripheral blood. Blood. 19: 349-358.
- 15.- Market, C.L. y U. Heinrich. 1971. Genética del Desarrollo. Editorial Hispano-Americana, México.
- 16.- McCombs Winchester, A. 1979. Human Genetics. - 3rd. Ed. Charles E. Merrill Publishing Company, Ohio.
- 17.- McKermott, A. 1975. Outline Studies in Biology -



Cytogenetics of Man and Other Animals. John -  
Wiley & Sons, Inc., New York.

- 18.- McKusick V.A., and F.H. Ruddle. 1977. The status  
of the gene map of the human chromosomes. --  
Science. 196:390-402.
- 19.- Mellman, W.J., H.D. Klevit, and P.S. Moorhead. -  
1962. Studies of phytohemagglutinin-stimulated  
leukocyte cultures. Blood. 20:103-104.
- 20.- Moody, P.A. 1969. Genetics of Man. 3rd. Ed. W.  
W. Norton & Company, Inc., New York.
- 21.- Moorhead, P.S., P.C. Nowell, W.J. Mellman, D.M. Bat  
tips, and D.A. Hungerford. 1960. Chromosome -  
preparations of leukocytes cultured from human  
peripheral blood. Exp. Cell Res. 20:613-616.
- 22.- Nora, J.J., and F. Clarke Fraser. 1974. Medical  
Genetics, Principles and Practice. Lea & Febi-  
ger, Philadelphia.
- 23.- Nowell, P.C. 1960. Phytohemagglutining: An ini-  
tiator of mitosis in cultures of normal human -  
leukocytes. Cancer Res. 20:462-466.

- 24.- Oppenheim, J.J., J. Whang, and E. Frei. 1965. Immunologic and cytogenetic studies of chronic - lymphocytic leukemic cells. Blood. 26:121-132.
- 25.- Pearmain, G., R. R. Lycette, and P.H. Fitzgerald. 1963. Tuberculin-induced mitosis in peripheral blood leucocytes. Lancet I. 637-638.
- 26.- Penrose, L.S. 1961. Recent Advances in Human Genetics. Little, Brown and Company, Boston.
- 27.- Petrakis, N.L., and G. Politis. 1962. Prolonged survival of viable, mitotically competent mono nuclear leukocytes in stored whole blood. N. Engl. J. Med. 267:286-289.
- 28.- Rajendra, B.R., and L.J. Sciorra, and M. Lee. 1980. A new and simple technique for chromosomal preparations from peripheral blood lymphocytes, amniotic cell cultures, skin fibroblasts, bone marrow and single cells clones when the yields - from harvests are low. Human Genetics. 55:363-365.
- 29.- Rigas, D.A., and E.E. Osgood. 1955. Purification and properties of the phytohemagglutinin of Phaseolus vulgaris. J. Biol. Chem. 212:607-609.

- 30.- Ronne, M. 1980. Human Cell in Suspension 2: The effect of in vitro aging on metaphase chromosome structure in human lymphoid cells. Human Genetics. 54:55-62.
- 31.- Rothfels, K.H., and L. Siminovitch. 1958. An air drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown in vitro. Stain Technol. 33:73-77.
- 32.- Rothwell, N.V. 1977. Human Genetics. Prentice-Hall, Inc., New Jersey.
- 33.- Shaw, G.M. 1973. Heinemann Investigations in Biology Chromosome Studies. Heinemann Educational Books Ltd., London.
- 34.- Stansfield, W.D. 1971. Genética. Libros McGraw-Hill de México, México.
- 35.- Sutton, H.E. 1975. An Introduction to Human Genetics, 2nd. Ed., Holt, Rinehart and Winston, U. S.A.
- 36.- Swanson, C.P., T. Merz, and W.J. Young. 1981. - The Chromosome in Division, Inheritance, and Evolution. 2nd Ed. Prentice-Hall, Inc., U.S.A.

- 37.- Tanaka, Y., L.B. Epstein, G. Brecher, and F. Stohlman. 1963. Transformation of lymphocytes in - cultures of human peripheral blood. Blood. 22: 614-629.
- 38.- Thomson, J.S. y M.W. Thomson. 1975. Genética Médica. 2a. Ed. Salvat Editores, España.
- 39.- Tjio, J.H., and A. Levan. 1956. The Chromosome - number of man. Hereditas. 42:1-6.
- 40.- Yunis, J. 1974. Human Chromosome Methodology. 2nd. Ed. Academic Press, New York.
- 41.- Yunis, J. and ME. Chandler. 1977. The chromosome of man-clinical and biologic significance. Am. J. Pathol. 88:467-495.

801437