

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



**DESARROLLO DE TECNICAS CITOGENETICAS EN EL
ANALISIS DE LOS CROMOSOMAS EN HUMANOS**

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR

MARIA LEONOR CALLEJAS

PREVIA OPCION AL TITULO DE

DOCTOR EN QUIMICA BIOLOGICA

MARZO DE 1966

63429

575.8752
C1572
1966
F.O.Q. Qa
Cj. 2

UES BIBLIOTECA CENTRAL



INVENTARIO: 10122944

U N I V E R S I D A D D E E L S A L V A D O R

RECTOR

Dr. Fabio Castillo

SECRETARIO GENERAL

Dr. Mario Flores Macal

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

DECANO

Dr. Víctor Alejandro Berdugo

SECRETARIO GENERAL

Dra. Leticia Calles y. de Romero

JURADOS QUE PRACTICARON LOS EXÁMENES
DE DOCTORAMIENTO PRIVADO

Primer Doctoramiento Privado

Dra. Ana Medrano de Soundy

Dr. Víctor Ortíz

Dra. Ana Teresa Valiente Ibarra

Segundo Doctoramiento Privado

Dr. José Luis Gurdíán de Nueda

Dr. José Alfredo Molina

Dra. Luz Martínez de Miralda

JURADO QUE PRACTICO EL DOCTORAMIENTO

PUBLICO

Dr. Juan Héctor Berríos

Dra. Estella Monterrosa de Marín

Dr. Oscar O. Cuéllar

DEDICATORIA

A MIS PADRES: Dr. Cruz Callejas y Dña. Isabel de Callejas, quienes siempre fueron un aliento en mis días de estudiante.

A LA MEMORIA DE MI ABUELA: Dña. Leonor Sasso de Umanzor.

A MIS HERMANOS: José de la Cruz, Hernany y Efraín, con fraternal cariño.

A MIS PROFESORES Y AMIGOS: Que siempre estuvieron prestos a brindarme su ayuda y colaboración.

INTRODUCCION

AGRADECIMIENTO

I. REVISION BIBLIOGRAFICA

II. OBSERVACIONES

a) Materiales y Métodos

b) Resultados

II. COMENTARIOS

a) Discusión

b) Conclusiones

IV. RESUMEN

V. BIBLIOGRAFIA

A G R A D E C I M I E N T O

Esta tesis se realizó gracias a la ayuda y dirección que en todo momento me brindó el Dr. Juan Héctor Berríos, y a las facilidades ofrecidas por los Departamentos de Anatomía y Bioquímica, a la Señorita Alicia Ascencia, a la Sra. Bertha de Berríos y a la Sra. Mélida de Andino.

DESARROLLO DE TECNICAS CITOGENETICAS EN
EL ANALISIS DE LOS CROMOSOMAS HUMANOS.

Introducción

Es interesante mencionar la importancia del descubrimiento de Lejeune y sus colaboradores (1959) cuando informaron del primer ejemplo de anomalía congénita (Mongolismo) y su estrecha relación con la alteración del número euploide de cromosomas.

Robinson (1961) puntualiza los portadores de los elementos hereditarios de la célula, los cuales tienen afinidad fuerte por ciertos colorantes y de allí su nombre de cromosomas (del griego "cuerpos coloreados"). Los describe como cuerpos en forma de hilo, lineales, morfológicamente distintos sólo durante la fase mitótica del núcleo.

A partir de estas fechas se desarrolla casi imperceptiblemente una disciplina completamente nueva en el laboratorio y en la medicina clínica: la Citogenética, cuyas técnicas están dentro del campo de cualquier laboratorio clínico y cuyos métodos prácticos son de uso general. Esta disciplina se define como la parte de la biología que estudia la herencia a nivel celular, específicamente cromosómico.

La citogenética comprende el estudio de los cromosomas en el análisis de los cariotipos y de la prueba de la sexocromatina de

II

Barr. Las técnicas citogenéticas aplicadas al hombre incluyen el análisis de los cromosomas per se y la prueba de la cromatina de Barr.

Tres son los mojones fundamentales en el desarrollo de la citogenética:

1. El descubrimiento de la sexocromatina en el género Fellus domesticus por Barr y Bertram (1949);
2. el descubrimiento del número preciso de 46 cromosomas de la especie humana por Tjio y Levan (1956); y
3. el descubrimiento de que el mongolismo es una enfermedad debida a aberraciones cromosómicas (Lejeune et al. 1959).

La noticia de estos descubrimientos y la consideración acerca de sus posibilidades me ha estimulado a realizar este trabajo cuyos propósitos son:

1. Revisar ciertas técnicas citogenéticas con el propósito de estudiar los cromosomas tanto en el análisis de los cariotipos como en la prueba de la sexocromatina de Barr.

El presente intento desarrolla la técnica de cultivo de tejidos de sangre periférica descrita por Moorhead et al. (1960), así como la técnica de la sexocromatina descrita por Moore y Barr (1955) .

III

2. Describir la química de la fitohemaglutinina que inicia la mitosis según los principios de Rigas y Osgood y la técnica de Marshall; y de la colchicina que detiene la mitosis y dispersa los cromosomas.
3. Revisar las bases bioquímicas de la herencia.
4. Contribuir de esta manera y con estos estudios a una forma más exacta del diagnóstico y pronóstico de ciertos estados patológicos, anomalías congénitas y otras entidades nosológicas conocidas, tales como los síndromes de Turner, de Klinefelter, de Patau, de Edwards, de Down, de Marfan, etc.

I. REVISION BIBLIOGRAFICA

Barr y Bertram (1949) al distinguir el sexo del gato por la cromatina sexual en los núcleos de las células nerviosas hicieron un descubrimiento importante que más tarde tendría gran significación en citogenética.

Estas diferencias sexuales fueron más tarde comprobadas también en los distintos tejidos de la economía; fué así como los biólogos Moore y Barr (1954) lo demostraron en la biopsia de piel humana. Davidson y Smith (1954) encontraron estas diferencias en leucocitos polimorfonucleares humanos. Graham (1954) demostró en varios tejidos, incluso en la membrana amniótica y en la alantoides, que la diferencia sexual en la morfología nuclear está presente en los embriones en temprana edad, aún antes de la diferenciación de las gónadas, como durante el resto de su vida intrauterina. Moore y Barr (1955) desarrollaron la técnica del frotis del raspado de la mucosa bucal habiéndola transformado en un procedimiento de laboratorio fácilmente aceptado. Shettles (1956) diagnosticó el sexo antes del nacimiento, estudiando las células descamadas del feto en el líquido amniótico de mujeres embarazadas.

Robert Eggen (1963-64) describe que la citogenética es una de las ciencias básicas más intrigantes que cada día alcanza mayor importancia clínica. La citogenética correlaciona estructuras discernibles microscópicamente y anormalidades numéricas de cromosomas con cambios clínicos asociados con ellas. En pocos años se ha aplicado

una serie de técnicas citogenéticas a la enfermedad humana e informado principalmente en revistas británicas. Hirschorn y Cooper (1961) y Sohval (1961) hacen una revisión en la literatura científica del estatus de la citogenética en medicina.

Las técnicas citogenéticas han sido usadas hace más de 50 años desde que Bridge (1916) correlació los cambios en el fenotipo de la drosófila y las alteraciones en la estructura de los cromosomas.

Es así que la citogenética estudia la herencia a nivel celular. Específicamente comprende el estudio de las alteraciones cromosómicas visibles asociadas a enfermedades humanas, estudio que se hace evidente en el análisis de los cariotipos.

También comprende la prueba conocida como de la sexocromatina de Barr, que se usa para demostrar diferencias sexuales en la morfología nuclear.

La observación comprobó que los cromosomas sexuales de algunos saltamontes (Orden Orthoptera) permanecían en la interfase; como la cromatina de estos cromosomas es distinta de la cromatina de los autosomas, en el hecho de no desaparecer en la interfase, recibió el nombre de heterocromatina (heteros, distinto). Barr et al. denominaron a la cromatina de los cromosomas sexuales, cromatina sexual.

La heterocromatina . de los dos cromosomas X de las células de la hembra de los animales superiores es diferente de la heterocromatina de la combinación XY de los cromosomas sexuales en las células de los varones.

Tjio y Levan (1956) establecieron que el número diploide de cromosomas era de 46 y no de 48 como se describía en los trabajos clásicos de Painter (1924); su descubrimiento pronto fué confirmado por otros investigadores; Ford y Hamerton (1956), Chu y Giles (1959).

Entre los 46 cromosomas del género humano, hay 44 autosomas y 2 cromosomas sexuales; 2 cromosomas XX en la hembra y 2 cromosomas X y otro Y (XY) en el hombre. Barr observó que las células de la hembra muestran a menudo una porción de cromatina condensada, con ciertas características que la identifican con el nombre de cromatina sexual, en tal forma que siempre hay 2 cromosomas X en un núcleo de cada célula de una hembra. Los 2 cromosomas X se unen en la interfase de la célula somática y forman una pequeña masa informe de cromatina condensada, la cromatina sexual femenina. Esta marca en forma de punto teñido de oscuro, puede ser vista cerca del nucléolo en las células nerviosas; aparece como una masa oscura de forma plano-convexa o triangular comprimida contra la membrana nuclear en las células del estrato espinoso de la epidermis. En los frotis de sangre periférica la cromatina sexual de la hembra, aunque generalmente contenida en uno de los lóbulos de un núcleo de un neutrófilo maduro, resulta muy difícil o imposible de identificar porque la

cromatina está tan condensada que, a veces, constituye un lóbulo fino condensado en forma de palillo de tambor; según Davidson y Smith (1954) esto ocurre en un neutrófilo de cada 38. En las células obtenidas del raspado de la mucosa bucal se observa de preferencia en los núcleos claros, pálidos y voluminosos de tipo vesicular.

Mientras está presente en cada célula de una hembra, la cromatina sexual sólo puede ser identificada con certeza en aquellos pocos núcleos en los que por casualidad se encuentre en un plano que pase a través del centro del núcleo y perpendicular al eje óptico del microscopio, es decir, que si estos núcleos en interfase son cortados en un plano adecuado, contienen una masa de cromatina sexual suficientemente voluminosa para ser observada en el microscopio de luz ordinario; suele tener una micra de diámetro, aproximadamente.

Barr et al. (1954) encontraron la cromatina sexual en las células masculinas, pero sumamente pequeña para poder identificarla al microscopio ordinario, excepto en circunstancias muy favorables, y en un porcentaje mínimo aunque no despreciable.

Moore y Barr (1955) describieron que la cromatina sexual así como la cromatina en general se tiñe bien con colorantes básicos como la hematoxilina y violeta de cresilo. Barr, Bertram y Lindsay (1950) demostraron que la reacción de Feulgen y el verde de metilopironina indican que su principal ácido desoxirribonucléico DNA del satélite nuclear, es una membrana nucleoproteína cromosómica no nucleolar.

En los frotis de sangre periférica se tiñe con Wright o Giemsa.

Su incidencia fué de 56 á 87 por ciento para la cromatina sexual femenina y 2.1 á 6.3 por ciento para la cromatina sexual masculina en el estudio de cortes de tejido nervioso de 12 gatos, teñidos con tionina, verde de metilo-pironina, nitrato de plata reducido y hematoxilina férrica según observaciones de Barr, Bertram y Lindsay (1950). Observaciones parecidas fueron comunicadas por Moore y Barr (1954) haciendo autopsias y biopsias humanas en sujetos de 22 á 29 años; coloreando las muestras con hematoxilina eosina, Feulgen, verde de metilo, pironina y concluyendo que la diferencia sexual de la morfología nuclear es un fenómeno general que existe en todos los tejidos y órganos humanos. Prince, Graham y Barr (1955) encuentran que la incidencia de la cromatina sexual es de 76 por ciento en la hembra y hasta el 10 por ciento en el varón en tejido nervioso del *Macacus rhesus*.

Moore, Graham y Barr (1953) utilizaron estos conocimientos al diagnosticar el sexo de un individuo en dos casos de pseudohermafroditismo. Bur (1956) en las biopsias de piel y de la mucosa gingival, se valen de la cromatina sexual de las células para determinar el sexo en pacientes con malformaciones genitales, estados intersexuales, virilización y agenesia gonadal. Sohval et al. (1956) analizando biopsias de piel para determinar el sexo cromosómico en 28 varones y 27 hembras normales y un grupo de 76 sujetos con marcadas alteraciones sexuales e inestabilidad hormonal, concluyen que dicho

método es de confianza (hembras con virilismo, deficiencia estrogénica con síndrome de Cushing y enfermedad de Addison, como también varones con deficiencia androgénica, criptorquidismo, bajo terapia androgénica estrogénica, síndrome de Cushing y Addison, estados intersexuales con pseudohermafroditismo masculino y hermafroditismo verdadero). La edad estaba comprendida desde recién nacidos a individuos de 80 años.

Acción de la Fitohemaqlutina

Ordinariamente, los leucocitos normales no se dividen en sangre periférica, pero hay evidencia de que tienen potencialidad mitótica en el cuerpo. Se trató de determinar qué factores o condiciones específicas en medio de cultivo son responsables de activar este potencial mitótico latente de las células mononucleares circulantes y se halló que un agente mitogénico, aparentemente no fisiológico, era el extracto vegetal fitohemaqlutina estimulando al parecer la alteración de los monocitos y grandes linfocitos a un estado capaz de división.

Al extracto mucoproteico vegetal fitohemaqlutina empleado originalmente como medio de separar leucocitos de sangre total en medios de cultivo (Nowell, 1960), se le encontró la propiedad de iniciar la actividad mitótica, en su presencia se efectúa la división celular, en su ausencia no ocurre mitosis. Los estudios sugieren que

la acción mitogénica de la fitohemaglutinina no afecta la mitosis per se, sino más bien el estado precedente a la mitosis, altera los monocitos y grandes linfocitos circulantes a un estado en el cual son capaces de dividirse. La relación de esta acción mitogénica de la fitohemaglutinina al proceso mitótico y premitótico en el cuerpo quedan por ser investigados. Nowell (1960) demostró que la fitohemaglutinina es la responsable de la iniciación mitótica de cultivos de corto término de leucocitos humanos. Las células en división fueron identificadas como monocitos y grandes linfocitos que se habían vuelto mitóticamente activos in vitro después de dos días de período latente. Creyó que la fitohemaglutinina iniciaba la conversión de monocitos y grandes linfocitos a un estado capaz de división mitótica. Informó que las células presentes en los cultivos consistían en agrupamientos de grandes células mononucleares con linfocitos diseminados y unos pocos granulocitos. La mayoría de grandes células mononucleadas tienen un núcleo uniformemente redondo con cromatina finamente dispersa y uno o más nucléolos prominentes. El citoplasma es intensamente basófilo y granular, a menudo con un área pálida adyacente a uno de los lados del núcleo. Las grandes células mononucleares estuvieron presentes en cultivos, en los cuales, fué evidente la mitosis. Cuando la fitohemaglutinina fué omitida de los cultivos, las células permanecieron visibles, se observaron muy pocas grandes células mononucleares y no hubo actividad mitótica. Se requiere un mínimo de 0.2 ml de fitohemaglutinina por 10 ml de cultivo para la iniciación de la actividad mitótica; no hay ninguna actividad mitótica durante el primero o segundo día de cultivo.

Por muchos años se ha conocido la existencia de hemaglutininas en semillas de muchas especies de plantas, particularmente aquellas de leguminosas. En comunicaciones previas la aplicación de la fitohemaglutinina del Phaseolus vulgaris (frijoles rojos arriñonados) o Phaseolus communis fué descrita como separadora de leucocitos y eritrocitos. En el pasado, los productos parcialmente purificados de Phaseolus vulgaris indicaron que esta era una proteína.

En un informe preliminar de Rigas y Osgood resumieron un procedimiento para obtener esta aglutinina en la forma de una mucoproteína. Observaron que este material, en un ambiente adecuado a pH bajo, se disocia en dos partes a través de patrones electroforéticos, en una proteína hemaglutinina y en un polisacárido inactivo. (+)

Para preparar fitohemaglutinina en estado de mucoproteína se utilizan frijoles secos de Phaseolus vulgaris ó Phaseolus communis, finamente macerados con solución salina isotónica; al sobrenadante se aplican bajas temperaturas, se fracciona con etanol y procedimientos de precipitación y luego se liofiliza. Los títulos de aglutinación fueron determinados por la técnica de Salk (1944).

Propiedades de la Fitohemaglutinina. La mucoproteína obtenida en el análisis electroforético se comporta como una sustancia homogénea

(+) En el presente trabajo se ha utilizado la técnica de Marshall basada en los principios de Rigas y Osgood.

de pH 5.8 á 8.6. Este producto contiene 6.5 de nitrógeno (método micro Kjeldahl) y 50.4 por ciento de sustancias totales reducidas estimadas como glucosa cuando la modificación Nelson es aplicada al método de Somogyi. Es muy soluble en el agua destilada, soluciones salinas y bufferes, es termolábil. Análisis electroforéticos ejecutados a pH 5.8 produjeron patrones progresivamente asimétricos y a pH 2.0 la mucoproteína es completamente descompuesta en sus dos componentes, uno de los cuales permaneció estacionario mientras que el otro emigró como un catión; pruebas en fracciones obtenidas de la célula electroforética mostraron que el componente 2 es un polisacárido inactivo.

El componente 1 es la hemaglutinina, la cual es una euglobulina y puede ser precipitada libre del polisacárido solamente cuando el pH es mantenido a 1.0.

Modo de acción de la Fitohe^maglutinina. La acción aglutinadora de la fitohemaglutinina sobre los eritrocitos, por combinación de hecho con ellos o por alteración de su membrana a través de una acción enzimática, fué investigada por una segunda titulación de la solución sobrenadante, obtenida de cada tubo de titulación. Es evidente que el título de aglutinación ha sido disminuído a un décimo. Al comprobarse que es una acción enzimática diferente, se concluyó que los eritrocitos humanos pueden absorber o de otra manera inactivar cerca de 10 veces la cantidad de la fitohemaglutinina necesaria para dar una aglutinación positiva. Los sitios de acción en la super_

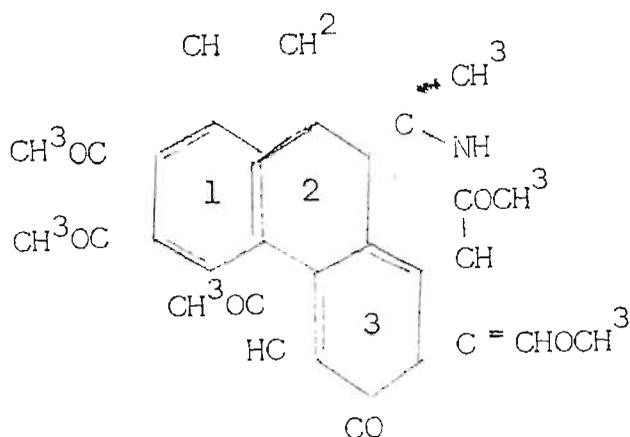
ficie de los eritrocitos son diferentes de sitios de los tipos sanguíneos A, B y Rh, aún cuando todos los tipos de eritrocitos humanos, incluyendo tipo O y Rh negativo, son aglutinados igualmente por la fitohemaglutinina dentro de la exactitud del método.

Titulación y uso de la fitohemaglutinina para la separación de leucocitos. Se ha encontrado que el método del tubo pequeño descrito por Salk es el más conveniente para la titulación de la fitohemaglutinina. La mucoproteína da una aglutinación positiva abajo de 10^{10} */ml y la proteína abajo de 0.1 /ml.

Esta fitohemaglutinina en la forma de mucoproteína no es tóxica, la hemaglutinina es un poderoso hemaglutinante para todos los tipos de eritrocitos humanos y para los del caballo, cerdo, gato, perro, pollo, conejo y sapo (Rigas y Osgood, 1955).

Acción de la Colchicina

La colchicina, es un principio tóxico extraído del bulbo y de los tegumentos de los granos del colchico, Colchicum autumnale, planta común que florece en otoño (familia Liliácea según la clasificación de Linneo). Es una sustancia orgánica nitrogenada cuya fórmula bruta establecida por primera vez por Zeisel es $C_{22}H_{25}NO_6$ que corresponde a la fórmula desarrollada, establecida por Windaus (1924).



De-acetyl-methyl-colchicine

Es, por lo tanto, un derivado aminado y metoxilado del fenantréno; se le reconoce un núcleo tropolónico que permite clasificarlo como tal y presenta un aspecto quinoide de lo que se deriva la gran analogía química con ellos. Esto parece interesante, por el hecho de que el compuesto alemán E39 tiene respuesta antimitótica en la experimentación clínica reciente, el cual posee una función quinónica de la que parecen depender sus propiedades (imino-benzo-quinona).

La colchicina se ha considerado como un alcaloide por sus propiedades fisiológicas generales, por la presencia de su grupo NH y por que es un extracto de una sustancia vegetal. Pero en 1940, Shüller, estudiando el extracto de la colchicina con luz ultravioleta, encontró diferencias notables con un alcaloide de núcleo fenantrénico, como la morfina. Por otra parte, su nitrógeno está fijado a una cadena lateral cuyo comportamiento no es el de un heterocíclico. Por

simplificación terminológica y por utilizarlo así la mayoría de los autores, se le sigue considerando como tal.

Tiene dos propiedades biológicamente muy notables. Los biólogos por mucho tiempo han utilizado la colchicina para improvisar la dispersión de los cromosomas en el estudio de las células vegetales, interrumpiendo la mitosis en la metafase (Mangenot, 1941), (Eigsti y Dustin, 1955), (Dustin, Havas y Lits, 1937). Esto es de particular interés para biólogos, histólogos, citólogos y genetistas; retrasando la división de los centrómeros de los cromosomas, el retraso de la división de los centrómeros causado por la colchicina proporciona mayor tiempo para que las cromátidas adopten forma especial y se acorten. Por lo tanto los cromosomas se hacen más cortos que de ordinario y hasta disminuyen su desigualdad.

De la acción de la colchicina sobre los tejidos normales y patológicos deriva su importancia en la medicina clínica ya que ejerce efecto curativo muy notable sobre las articulaciones afectadas de artritis gotosa, tratamiento usado por centurias (Eigsti y Dustin, 1955), así como en el tratamiento mitótico del cáncer (Huant, 1957). La colchicina sirve para modificar la mitosis: este alcaloide provoca en los tejidos de los tumores o en las zonas germinativas de tejidos normales una acción de paro o inhibición de la cinésis que afectan las dos fases terminales, metafase y anafase (Payron et al.).

Administrando colchicina durante cierto tiempo, se puede de terminar la intensidad con que se dividen las células en cualquier tejido u órgano en animales de experimentación. En esta forma todas las células que inician la mitosis por entonces, sólo alcanzan la etapa de metafase (Laboratorios Leblond, Histología de Ham).

Además, parece muy probable que este bloqueo citotóxico sea precedido de una fase óxito-mitótica de duración e intensidad variables, que dependen de la concentración del alcaloide y de la naturaleza del tejido del tumor. La lesión celular elemental y constante consiste en una degeneración aplásica de las fibras del huso cromosomal, es decir, parece inhibir la formación del huso y sus fibras que se transforman en una masa acidófila desprovista de polaridad, de estructura fibrilar y de condrosomas (centrosomas) incapaces, por lo tanto, de provocar la migración de los cromosomas. Así, después que los centrómeros de los cromosomas se dividen y los cromosomas se separan en cromátides, estos no se alejan hacia los extremos opuestos de la célula como lo hacen normalmente, sino que quedan apelotonados a nivel de la placa ecuatorial. Además de esta lesión esencial, puede manifestarse una hipertrofia de los nucléolos y, aún más, hasta una picnosis del núcleo, impidiendo desde la profase la individualización de los cromosomas.

Estas protuberancias de la cinosis se establecen, según Dustin, de 4 a 24 horas después de la absorción del veneno carioclásico y parecen bastante distintas de las provocadas por los rayos X, que no paran la formación del huso, pero que aglomeran los cromoso

mas en una masa compacta; a pesar de ésto, hay cierta analogía entre los dos modos de acción.

Estructura de los cromosomas.

" En el pasado se creía que los cromosomas sólo existían como tales durante la mitosis, y que una vez completada ésta y entrada las células nuevamente en interfase, los cromosomas se desintegraban para formar gránulos de cromatina; cuando la mitosis volvía a empezar, los gránulos de cromatina se reunían constituyendo cromosomas. Hoy sabemos que los cromosomas siguen intactos durante toda la interfase, pero en forma diferente. En la interfase, los cromosomas adoptan la forma de largos filamentos delgados. Sin embargo, a lo largo de cada filamento hay muchos lugares donde el hilo se apelotona, igual que un segmento de alambre puede arrollarse formando un resorte espiral. En estos lugares el material del filamento se halla suficientemente apelotonado para resultar visible en preparaciones teñidas. Probablemente son estos segmentos fuertemente apelotonados a lo largo de los cromosomas filamentosos los que aparecen como gránulos de cromatina en el núcleo de interfase. En los lugares donde los filamentos no se hallan apelotonados, no tienen sustancia suficiente para ser vistos utilizando el microscopio de luz ordinaria".

Funciones de los cromosomas. " Los genes de las células se hallan contenidos en los filamentos cromosómicos, a lo largo de toda o ca

si toda su longitud. En la última instancia, los genes son unidades que rigen la naturaleza y actividades de una célula. Cuando una célula se divide en dos células hijas, cada una de éstas es copia exacta de la otra y de la célula madre que se dividió. Para que estas células hijas sean idénticas, se necesita que cada una de ellas tenga exactamente el mismo surtido de genes en sus cromosomas. Por lo tanto, antes que pueda producirse la división celular tiene que haber una duplicación de los genes, de manera que haya una colección de los mismos para que cada una de las dos células hijas que van a formarse . En realidad, los genes se duplican en la interfase. Por lo tanto, los cromosomas de una célula que entra en profase de mitosis tienen una doble colección de genes. Sin embargo, las dos colecciones de genes no se hallan en el mismo filamento, porque llegado este momento el cromosoma se ha hendido longitudinalmente en dos filamentos denominados cromátides, cada uno de los cuales contiene una colección completa de genes. Los dos cromátides de cada cromosoma quedan colocados uno al lado de otro y firmemente unidos entre sí en un punto, el centrómero, hasta que ocurren etapas posteriores de la mitosis según vamos a ver."

En etapas tardías de la interfase sólo se hallan apelotonados en espiral algunos segmentos de los cromátides filamentosos; éstos al igual que los segmentos espirales del filamento cromosómico original, aparecen como gránulos de cromatina. Sin embargo, cuando la célula entra en profase, los dos largos filamentos de cromátides de cada cromosoma se apelotonan formando una espiral apretada en toda

su extensión. Ello, claro está, acorta los cromátides y, por lo tanto, los cromosomas, al punto que estos últimos aparecen ahora como pequeños bastoncillos. Sin embargo, en buenas preparaciones se observa que cada bastoncillo está formado por dos cromátides. El apilamiento espiral apretado de los filamentos concentra tanta sustancia teñible en un pequeño volumen que los cromátides en este estado de acumulación aparecen como cuerpos teñidos intensamente."

"Digamos aquí que si bien hemos descrito el cromátide como formado por un filamento, cosa que es cierta, se trata de un filamento, constituido por dos(o múltiplo de dos) filamentos más finos todavía que se denominan cromonemas. El apilamiento de los haces de cromonemas que constituyen un cromátide puede demostrarse muy bien tratando preparaciones por aplastamiento de algunos cromátides mitóticos con reactivos que hacen que las espirales se separen lo suficiente para poder ser observadas."

Forma y duplicación de la molécula de DNA

"Según Watson y Crick, la molécula de DNA tiene la forma de una hélice de dos tiras. Las dos tiras de la molécula de DNA se hallan íntimamente unidas una a otra en diversos puntos a lo largo de su trayecto."

"Para explicar cómo las dos tiras se adaptan una a otra es necesario señalar que la configuración química de la adenina es tal

que podría formar una estructura de enlace de hidrógeno con la timina, mientras que la de la guanina podría efectuarlo con la citosina. Este hecho guarda relación con la forma en la cual las dos tiras de la molécula de DNA probablemente se adapten una a otra, porque se corresponden siempre la adenina de una tira por medio de enlace de hidrógeno con la timina de la tira vecina. Análogamente, la guanina de una tira siempre corresponde a la citosina de la otra. Por lo tanto, las dos tiras de la molécula de DNA son réplicas complementarias una de otra; para que la mitosis proporcione a cada futura célula hija una colección completa e idéntica de genes, claro está que debe haber una duplicación exacta de todo el DNA en los cromosomas; esto ocurre en la interfase de la mitosis. La primera etapa en el proceso probablemente estriba en que las dos tiras de DNA en cada molécula se desarrollan y se separan. Después, cada tira de DNA sirve como plantilla o modelo para que se sintetice una tira nueva a lo largo de todo su trayecto. En la nueva tira se sintetizará una base de timina donde había una base adenina en la tira original, y así sucesivamente; en consecuencia, cada una de las dos nuevas tiras de la molécula de DNA tiene una sucesión de nucleótidos idéntica no a la de su modelo, sino a la del compañero de su modelo. La síntesis origina dos moléculas de doble tira, una de las cuales proviene de la molécula original y la otra es sintetizada de nuevo. Las dos moléculas de doble tira son duplicaciones exactas una de otra; por lo tanto, cada uno de los cromátides que se separan en la anafase siguiente puede tener moléculas de DNA idénticas".^(*)

(*) HAM, W.A. y LESSON, T.S. Tratado de Histología. 4a.ed. dirigida por el Dr. Alberto Folch y Pi. México, Editorial Interamericana, 1964, 916 p.

Técnicas citogenéticas y su aplicación

Taylor (1962) señala que Flemming en 1879 demostró que los cromosomas se reproducen dividiéndose longitudinalmente y que el tiempo y modo de reproducción han sido materia de interés y controversia entre biólogos.

Hamerton (1961); Spence y Greefer (1963), informan que el desarrollo de diversas técnicas citológicas que permiten el estudio de los cromosomas ha sido factor determinante en el descubrimiento de varias condiciones debidas a defectos cromosómicos; y es un factor importante en el diagnóstico de errores del desarrollo sexual, intersexualidad y algunos tipos de deficiencia mental. Eggen (1964) menciona: " las pruebas citogenéticas, el análisis cromosómico (cariotipo) o la prueba de la sexocromatina (o ambas), tiene un valor clínico significativo en un número de situaciones que incluyen:

1. Diagnóstico diferencial de defectos congénitos en algunos recién nacidos.
2. Consejo familiar y pronóstico genético.
3. La investigación de intersexos.
4. Evaluación de la amenorrea primaria.
5. La investigación de la esterilidad en la mujer.
6. La investigación de la esterilidad en el hombre.
7. Estudios médicos legales.
8. Diagnóstico diferencial de la leucemia mielocítica crónica.
9. Evaluación de disproteinemias oscuras.

A esta lista se pueden añadir investigaciones, las cuales, aún cuando todavía se encuentran en estado de exploración, son facetas en las que el patólogo debe familiarizarse y cuyo desarrollo debe conocer. Estas son:

10. Determinación prenatal del sexo.
11. El "dosímetro biológico".
12. Detección de células neoplásicas en derrames.
13. Investigación del aborto habitual.

Existen pocos procedimientos individuales de laboratorio clínico, para los cuales pueda citarse una lista más impresionante de aplicaciones" (+)

De acuerdo con el criterio de Eggen, las anomalías de los cromosomas puede agruparse según que la anormalidad dependa del número, de la morfología o de la combinación de ambas.

(+) Eggen, R.R.: Manual para trabajo en citogenética. Editado por: The American society of clinical pathology. (Trabajo mimeografiado), 1964.

Clasificación de anomalías cromosómicas(+)

A. Aneuploidia (Anormalidades de número)

1. Monosomía aislada ($2n=45$)-ausencia de un miembro de un par de cromosomas; ninguna otra anomalía cromosómica
 - a. Autosomas
 - b. Cromosomas sexuales
2. Trisomía aislada ($2n=47$)-1 cromosoma aparece triplicado; ninguna otra anomalía cromosómica
 - a. Autosomas
 - b. Cromosomas sexuales
3. Polisomía aislada ($2n=48$ ó más) 1 cromosoma está representado cuatro veces o más; ninguna otra anomalía cromosómica
 - a. Autosomas
 - b. Cromosomas sexuales
4. Complejo aneuploide-variación numérica que afecta dos o más cromosomas; ninguna anomalía estructural asociada
 - a. Autosomas
 - b. Combinación de autosomas y cromosomas sexuales
5. Mosaicos aneuploides- aneuploidia de una porción de células, más bien que de todas las células del cuerpo
 - a. Autosomas
 - b. Cromosomas sexuales

(+) Eggen, R.R.: Cytogenetics. Review of recent advances in a new field of clinical pathology. Amer. J. Clin. Path. 39(1):3-37, 1963.

B. Anormalidades morfológicas

1. Translocaciones

- a. Autosomas
- b. Cromosomas sexuales

2. Deleciones

- a. Autosomas
- b. Cromosomas sexuales

3. Duplicaciones (trisomia parcial)

- a. Autosomas
- b. Cromosomas sexuales

4. Isocromosomas

- a. Autosomas
- b. Cromosomas sexuales

5. Inversiones

- a. Autosomas
- b. Cromosomas sexuales

6. Anomalías morfológicas raras y complejas

- a. Anomalías raras envolviendo un solo cromosomas
- b. Anomalías morfológicas sin relación que afectan simultáneamente dos o más cromosomas

C. Aneuploidias morfológicamente anómalas- cambio morfológico en un cromosoma asociado con aneuploidia de otro

- a. Autosomas
- b. Combinación de autosomas y cromosomas sexuales

D. Mosaicos morfológicamente anómalos- anomalías morfológicas que afectan los cromosomas en una porción de células, más bien que de todas las células del cuerpo.



- a. Autosomas
- b. Cromosomas sexuales

E. Clonos- anomalías morfológicas o aneuploidia que afecta una sola línea de células (dentro de un tejido) que es, morfológicamente y a menudo fisiológicamente, independiente del resto de las células corporales y de las células restantes del mismo tejido.

Técnicas citogenéticas

Para el estudio de los cromosomas en el hombre, se han utilizado cinco tipos principales de material: 1) túbulos seminíferos para preparaciones por aplastamiento; 2) examen directo de células de tumores o derrames, sin cultivo; 3) cultivos de larga duración, de piel y fascia lata; 4) preparaciones de células de médula ósea con cultivo o sin él; 5) cultivo de corta duración de leucocitos de sangre periférica. Estos son los tejidos tomados por biopsia.

Tjio y Puck (1958) describen técnicas de cultivo de tejidos humanos normales cancerosos: piel de voluntarios normales y de carcinoma cervical.

Axelrad (1958) refiere que células de algunas cadenas cultivadas in vitro tienen una tendencia pronunciada a desprenderse del vidrio durante la mitosis. Cuando las células están próximas a dividirse se vuelven esféricas y disminuye el área de adherencia. Las células alteradas en cultivos continuos tienen tendencia a perder su adherencia al vidrio. Si la división celular se interrumpe en metafase por tratamiento con colchicina, muchas células se liberan y flo-

tan en el medio. Esta propiedad permite coleccionar gran número de células suspendidas en metafase. Utilizando técnicas de aplastamiento se pueden analizar los cromosomas. En esta forma se obtienen suspensiones del 50 al 90 por ciento de células que están en metafase por acción de la colchicina (2.5×10^{-7} molar) de 18 á 24 horas.

Moorhead et al.(1960) informan de una técnica de cultivo de leucocitos de corto período, a través de la obtención de plasma de sangre heparinizada . Otros investigadores han informado sobre éxitos con ligeras modificaciones a esta técnica (Edwards y Young,1961), (Berríos,Callejas y Arita, 1965a y b).

Bottura y Ferrari (1960)y Kinlough y Robson (1961) informan de una técnica simplificada consistente en inyectar 1 mg de colchicina endovenosa 2 horas (Bottura), 1 hora (Kinlough) antes de la aspiración de las células de la médula ósea, según técnica de Ford y Hamerton en mamíferos aplicada al humano.

Kinlough y Robson (1961) y Baikie et al.(1961) informaron de anomalías en el número y morfología de los cromosomas en células leucémicas de cultivo de médula ósea o sangre periférica o de preparaciones hechas sin cultivo. Kinlough(1961) aplica la técnica de la inyección de la colchicina endovenosa in vivo en condiciones tales como la leucemia donde los resultados de las técnicas de cultivo pueden no ser verdaderamente representativas.

En ese mismo año desarrollaron una técnica para hacer preparaciones directamente de las células leucémicas humanas de sangre periférica o de médula ósea, sin cultivo previo.

Froland (1962) describe una técnica en recién nacidos usando un micrométodo basado en los principios de Moorhead et al.

Baker (1962) y Lumb(1965) informan de la técnica de suspensión celular de linfonodos, bazo, timo, en el estudio de los cromosomas en la reticulosis.

Tjio y Whang (1962) informaron del estudio de cromosomas de células de la médula ósea con la administración previa de colchicina por el método de aplastamiento o del secamiento al aire(Berríos, Alvaronga y Arita, 1963).

Cestari y Perondini (1963) estudiaron los cromosomas de mamíferos en cultivo de tejidos de diferentes órganos (riñón, hígado, pulmón, piel, etc.); combinando la tripsinización con la técnica de la suspensión.

Hirschorn (1965) y Huang (1965) describen un procedimiento de microcultivo con sangre total, basado en la técnica de Moorhead et al.

Birdwell (1965) utilizando la técnica descrita por Baker, hace cultivos con muestras enviadas hasta 30.000 millas con intervalo de 75 horas y con temperatura entre 50 y 104°F.

II. OBSERVACIONES PERSONALES

a) Materiales y Métodos

El desarrollo de técnicas citogenéticas (cultivo de tejidos) en el análisis de los cromosomas humanos se acompaña de procedimientos básicos rutinarios siguiendo técnicas cuidadosas pre-establecidas.

Estas condiciones óptimas son;

1. Preparación del equipo

En el lavado del material, los mejores resultados se obtienen si se pone atención a las siguientes normas:

- 1.a- Conocer el grado de dureza del agua (exceso de Ca, Mg, Fe, Cu);
- 1.b- no usar jabón;
- 1.c- emplear algún detergente que no contenga álcalis libres; que ablande el agua; que sea rápido y completamente soluble en agua tibia ;
- 1.d- que no precipite en el agua caliente o hirviendo (95 á 100°C); que no precipite en agua fría (1 á 0°C); que limpie con facilidad;
- 1.e- que disminuya la tensión superficial; que tenga buenas propiedades humectantes y que no irrite las manos.

El detergente más indicado para estos casos es el "Haemosol" o el "B-D Yale Cleaner". El enturbamiento que resulta de la precipitación de las sales de Ca y Mg y a veces de materias orgánicas insolubles con el detergente se elimina con la mezcla crómica que se prepara de la manera siguiente:

Bicromato de Potasio comercial 100 gr

Agua de chorro 200 ml

Disuélvase calentando. Luego enfríese y póngase el recipiente en baño de agua fría y añádase poco a poco, deslizándose por las paredes y agitando constantemente, 800 ml de ácido sulfúrico comercial.

2. Material nuevo

Cuando el material a usarse sea nuevo, enjuáguese con agua para retirar el polvo; luego, sumérjase en solución detergente (1 cucharada de "Haemosol" o una bolsita de "B-D Yale Cleaner" para 4 litros de agua) y manténgase así durante toda la noche.

3. Material usado

Cuando haya que ~~preparar~~ material usado, debe esterilizarse y al salir del autoclave limpiarse con agua, jabón y cepillo. Luego continúese como si el material fuera nuevo. El recipiente para el

material debe ser de acero inoxidable o de hierro esmaltado. Los frascos, jeringas, etc. deben estar llenos con la solución detergente. Manténgase así durante toda la noche.

Todo esto póngase en un autoclave a 120° C y a 15 libras de presión durante 30 minutos. Con el material aún todavía caliente enjuáguese de 7 a 8 veces con agua destilada corriente y termínese enjuagando de 1 a 2 veces con agua bidestilada.

Colóquese el material sobre papel limpio y séquese al horno. Evítese tocar la parte interna del material con los dedos.

Después de secar el material taponar con gasa y algodón (empléese algodón hidrófilo).

Cada recipiente (frascos de cultivo, probetas, jeringas, beakers, cajas de petri, instrumentos, etc), debe ser envuelto con papel craft, escribiendo sobre éste la capacidad de cada uno. Las agujas son montadas individualmente en tubitos de vidrio, de cuello corto. Los tapones son tratados en la misma forma que la cristalería y colocados en grupos en recipientes de vidrio de boca grande.

Las pipetas son más difíciles de preparar. El trabajo de lavado debe iniciarse de preferencia con las pipetas nuevas de 2 capacidades solamente y del mismo tipo y marca. Si no se tienen pipetas nuevas escójanse entre las existentes en el laboratorio aquellas que tengan las características, principalmente las dimensiones de la boca para facilitar el pipeteo con bulbo.

Siempre que las pipetas sean usadas con material no infectante y no radioactivo deben colocarse inmediatamente después del uso en solución detergente contenida en las bandejas largas de hierro esmaltado. Si el material es infectante, la bandeja tendrá ácido fénico al 5 por ciento. Si el material es radioactivo, deben tomarse precauciones especiales, usando preferentemente cilindros altos de vidrio o de nalgone claramente rotulados: material radioactivo.

Después de esterilizadas en el autoclave retírense los tapones de algodón; un buen sistema para removerlos es el de emplear una aguja de acero inoxidable con gancho en la punta (aguja de crochet).

La esterilización de las pipetas en autoclave con detergente, desprende la suciedad y las proteínas coaguladas. Remuévase hasta donde sea posible esta suciedad con agua corriente, adaptando un tubo de latex al extremo de la pipeta y al chorro de agua corriente.

En seguida, las pipetas son colocadas punta arriba en cilindros de vidrio, suficientemente alto para contenerlas completamente. Este cilindro debe ser resistente al autoclave y estar lleno con solución detergente. Las pipetas pasan allí una noche. Luego, colóquese el cilindro en el autoclave a 120° C. durante 30 minutos. Después enjuáguese en agua destilada corriente 7 á 8 veces adaptando el extremo a la punta del tubo de látex que viene del recipiente que contiene agua destilada.

Finalmente, dese un a última enjuagada con agua bidestilada. Si no se tienen cilindros de vidrio en las condiciones señaladas, la

preparación puede hacerse en las bandejas largas pero la remoción de la suciedad no es tan eficiente.

Las pipetas son colocadas sobre papel craft limpio e introducidas al horno para secar. Solamente después de esto son taponadas con algodón hidrófilo o algodón en rama beneficiado (de joyero). Evítese tocar las pipetas con los dos dedos en su mitad inferior.

Las pipetas son colocadas en cilindros metálicos, rigurosamente en grupos del mismo tipo, con la punta hacia abajo (sobre gasa nueva y limpia). Las bocas orientadas hacia abertura del cilindro.

Los cilindros se marcan claramente en la parte externa y se esterilizan en horno a 120° durante 2 horas. Las pipetas no son envueltas en papel.

Todo el material restante será esterilizado en autoclave a 120° C a 15 libras de presión, durante 40 minutos; al salir del autoclave, colóquense en el horno solamente para secar.

Además de estar estéril, todo el material deberá protegerse contra el polvo y colocarse en armarios cerrados.

4. Técnica de cultivo

4.a- Humedézcanse completamente las paredes de una jeringa estéril de 10 ml con 0.2 á 0.8 ml de solución de heparina sódica acuosa (1000 U/ml de Liquemina Sódica, Casa Roche) halando el émbolo unas 2 á 3 veces.

4.b- Extraer 10 ml de sangre periférica por venipuntura (de las venas del pliegue del codo en pacientes adultos o en la vena femoral para niños recién nacidos; de ser posible se puede extraer de la yugular externa). El paciente debe estar en ayunas por lo menos durante 3 horas. Normalmente, el número de leucocitos en 10 ml de sangre es de 7-15 millones de leucocitos (Moorhead y Nowell, 1961).

Pase asépticamente la sangre a un frasco colector de 10 ml con tapón de rosca; déjese reposar la sangre a la temperatura del cuarto durante 1 a 1½ horas, luego los eritrocitos se sedimentan dejando los leucocitos en el plasma. Si la sangre tiene un índice poco común de baja sedimentación, la aglutinación de los eritrocitos puede efectuarse por la adición de una mezcla débil de 0.2 ml de fitohemaglutinina. En caso necesario, centrifúguese suavemente a 200 rpm (11 RCF) durante 1 a 2 minutos (habitualmente proporcionará los 4-6 ml de suspensión plasma-leucocitos deseados sin la presencia del coágulo).

4.c- Preparación del medio de cultivo

Trabajando asépticamente en una campana que previamente ha recibido durante 2-3 horas los efectos de una lámpara de rayos ultravioleta instalada en su interior, prepárense en frascos Erlenmeyer de 50 ml con tapón de rosca

un medio de cultivo mezclando 4 ml de medio TC-199 (Difco Laboratory, Detroit, Michigan) con rojo de fenol como indicador, Penicilina 100 u/ml y Estreptomina 100^u/ml del medio, 0.2 ml de fitohemaglutinina y, luego, agréguese 1.5 á 2.5 ml de la suspensión plasma-leucocitos del frasco colector de sangre. Estas transferencias se ejecutan con jeringa estéril y aguja No.19.

4.d- Incubación

Incúbase el Erlenmeyer del medio de cultivo de leucocitos inoculados, durante 65-72 horas a 37° C en una estufa con mezcla de gases, 5 por ciento de CO₂, aire y vapor de agua. Es muy importante mantener la tasa del pH del cultivo durante todo el tiempo; el indicador no debe volverse más amarillento que un ligero ámbar ni más rojo que un ligero rosado. Ajustar el pH entre 7.0 á 7.2 con HCl 0.1 N. ó el 5 por ciento de CO₂ para acidificar y CO₃HNa para alcalinizar. Nunca es bueno dejar los cultivos descansando por 3 días sin algún tipo de atención. El período crítico parece estar en las primeras 4 á 5 horas de incubación, cuando el cambio brusco en el pH puede dañar un porcentaje de los leucocitos del cultivo y que más tarde aún ajustándolo no obtendrá buenos resultados.

Al parecer el mantenimiento del pH es de primera importancia. Es por esto recomendable agitarlo cuidadosamente

cada 4 horas durante el período de incubación . Esta acción repetida en el transcurso del período de incubación estabiliza el pH del medio y, al parecer también asegura la máxima producción de figuras mitóticas. Otra sugerencia también relacionada por alguna razón con la estabilidad del pH es que la sangre debe ser de individuos en ayunas siempre que sea posible. Nuestra experiencia ha sido que las sangres quillosas hacen más difícil mantener el pH y, por lo mismo, obtener cultivos satisfactorios (Walter S. Fisher- Technical Service, July, 1965).

4.e- Aplicación de colchicina

Después de 72 horas agréguese . al cultivo colchicina 0.1 μ gr/ ml de cultivo (0.1 ml x 10^{-5} x ml de cultivo) terminando así con la mitosis en el período de la metafase. Incúbese nuevamente a 37° C durante 6 horas. Agítese cuidadosamente el erlenmeyer.

4.f- Cosecha de leucocitos

Pásese el cultivo a un tubo de centrífuga, graduado y cónico de 12 ml y centrífuguese a 800 rpm (190 RCF). Así pírese el sobrenadante y descártese.

4.g- Lavado de células

Agréguese 5 ml de una solución isotónica de ClNa a

37° C y resuspéndanse las células del tubo de centrífuga burbujeando con una pipeta Pasteur con bulbo.

Centrifúguese a 800 rpm (190 RCF) durante cinco minutos.

Aspírese el sobrenadante con una pipeta Pasteur con bulbo dejando 0.5 ml del mismo.

Resuspéndanse las células en los 0.5 ml restantes.

4.h- Tratamiento hipotónico (expansión osmótica de las células)

Agréguense lentamente mientras agita 1.5 ml de agua destilada a 37° C (solución hipotónica).

Incúbese la suspensión en Baño María a 37° durante 15 á 20 minutos, resuspendiendo constantemente con una pipeta Pasteur con bulbo.

Centrifúguese a 600 rpm (110 RCF) durante 5 minutos.

Aspire el sobrenadante con una pipeta Pasteur con bulbo.

4.i- Fijación de las células

Para no destruir las células añádanse lentamente de 2 á 3 ml de fijador fresco (1 parte de ácido acético glacial y 3 partes de metanol solamente calidad reactivo) ; déjese que las células absorban bien el fijador durante 30 minutos o toda la noche.

Resuspéndase con una pipeta Pasteur.

Centrifúguese a 600 rpm (110 RCF) durante 5 minutos.

Aspírese el sobrenadante con una pipeta Pasteur con bulbo.

Resuspéndanse las células con 2 á 3 ml de fijador fresco con una pipeta Pasteur y déjense descansar durante 5 minutos.

Centrífuguese a 600 rpm durante 5 minutos.

Si es necesario dispersar los racimos de células repítase la operación. Aspírese el sobrenadante y luego añádanse de 0.25 á 0.5 ml de fijador fresco al paquete de células; y resuspenda con una pipeta para obtener una suspensión homogénea.

5. Técnica de la preparación de los frotis en las láminas.

Usense láminas de 75 x 25 x 1.1 mm

Enjuáguense con agua para retirar el polvo, luego sumerjáanse en solución sulfocrómica, después lávense con agua destilada, enfríense en un recipiente de vidrio, bien tapado, con agua bidestilada y colóquense en el refrige_rador.

Quítese el exceso de agua fría de la lámina escurrién_dola por inclinación sobre una toalla absorbente, déjense caer sobre su superficie 2 á 3 gotas de la suspensión de

células con una pipeta Pasteur, dejándola extenderse so
bre la lámina húmeda y exponiendo la lámina inmediatamen
te a una corriente de aire caliente de un secador de pe
lo (Oster)

6. Tinción

Antes de colorear fíjese la lámina en alcohol-éter durante 30 minutos. Coloréese con un colorante Wright du
rante un minuto y dilúyase con Buffer de Wright pH 6.4 durante 4 minutos. Enjuáguese con agua destilada, láve
se brevemente con agua corriente y déjese secar. Cúbran
se con Permunt (Fisher S.C.), luego con la laminilla No. 1. Cuando se obtenga un buen cultivo, coloréense los nuevos frotis con Feulgen-orceína al 1 por ciento; háganse las preparaciones permanentes y estarán listas pa
ra la microfotografía.

7. Microfotografía

Examine la lámina usando sistema óptico de campo cla
ro con el diafragma cerrado, buscando adecuada dispersión de los cromosomas; si ésta no es adecuada, resuspenda nuevamente las células en fijador fresco, centrifugue du
rante 5 minutos a 600 rpm(110 RCF) y decante. Prepárese otra lámina y examínese; esta operación hasta que los cro
mosomas estén adecuadamente desparramados (Moorhead et al. 1960).

Prepare 5 ó más láminas. Pueden usarse Giemsa (Moorhead y Nowell, 1961), Acetato-orceína (Moorhead et al. 1960) ó Feulgen-orceína.

Examine el frotis con el objetivo 10x para localizar buenas metafases. La buena calidad de los cromosomas y su dispersión pertinente puede determinarse con el objetivo de inmersión. Márquense con una pluma.

Un buen criterio para marcar buenas metafase para fotografía comprende: coloración oscura con alto contraste, adecuada dispersión sin traslape de cromosomas o con muy pocos, fina definición de la centrómera y satélites, todos los cromosomas en un sólo plano de foco, cromátides paralelas y no sobre-contraídas.

Para la microfotografía se usó un microscopio Ortholux (14.5.81 FSA 255/ 602) con óptica periplanática (objetivo PI 100/1.32 de aceite de inmersión, ocular 10x, condensador acromático de lente abatible 602 con abertura 0.95 , con una gota de aceite de inmersión sobre el condensador , en contacto con la lámina) y un filtro verde oscuro. Se usó una cámara fotográfica Leitz (M1 1085427), una película blanco y negro Agfa 200 ASA (24 DINAS) y un fotómetro.

Para calcular el tiempo de exposición se utilizó un fotómetro MICROSIX-L que comprende: 1) un disco selector

en el que se ajustan los valores de la sensibilidad DIN y ASA de la película blanco y negro o de color rosada, 2) una escala indicadora de los valores de intensidad lumínica proveniente de efectuar la medición con el pequeño ojo medidor en el lugar elegido del microscopio, haciendo que la aguja indicadora se desvíe y señale un determinado valor en las gamas de oscuridad (Dunkel : D), y claridad (Hell : H); 3) este valor se traslada a la escala giratoria sobre fondo amarillo obteniendo así un valor lumínico en cifras rojas que corresponde en la escala del tiempo al correspondiente valor de calibración enfrente del tiempo exacto de exposición.

Graduése la iluminación a 10 D, ajustando convenientemente el diafragma del condensador. Una vez obtenidas estas condiciones se toman las microfotografías con medio segundo de acuerdo con los cálculos obtenidos.

Las microfotografías fueron expuestas en película de 35 mm de alto contraste, Agfa 200 ASA, blanco y negro. La amplificación total del negativo es de 1000 x . El negativo se desarrolló con revelador de grano fino y compensador "Final Agfa" durante 10 minutos a 68°F (20°C), luego se enjuagó en agua corriente a 20° C y se fijó con solución de 76 30-40 "Sal fijadora ácida sica" Agfa, durante 3 minutos.

Luego los negativos son lavados con agua de chorro corriente durante 45 minutos y por último secados al aire.

Los negativos fueron ampliados usando 5 y 3 segundos de exposición sobre un papel Drovira Agfa, grado 3, extra blanco brillante, con una ampliación total de 13000 x. Se duplicaron las fotografías de cada metafase, una para análisis del cariotipo y otra guardada para referencia.

8. Preparación del cariotipo

De estas fotografías ampliadas se cortaron los cromosomas individuales usando la nomenclatura Denver. Se colocaron en pares homólogos los 22 autosomas y el par de cromosomas sexuales de acuerdo a la posición del centrómero, al tamaño relativo de cada cromosoma y a los índices respectivos.

9. Nomenclatura y característica de identificación de los cromosomas humanos.

El criterio propuesto en Denver, Colorado (1960) para clasificar los cromosomas humanos se basó en su longitud relativa, la relación de sus brazos, y el índice centromérico; esto permitió agrupar los autosomas en pares del 1 al 22, en orden decreciente de longitud. Los cromosomas del sexo se clasificaron de acuerdo a lo establecido clá

sicamente con la designación de X y Y (Böök 1960).

Pueden recocerse 7 grupos cromosómicos mayores (Patou 1960 y 1961), con las letras del alfabeto de la A a la G:

Grupo A (1 á 3)-Grandes cromosomas con centrómeros medianos ó aproximadamente medianos.

Grupo B (4 á 5)-Grandes cromosomas con centrómeros submedianos.

Grupo C (6 á 12 X)-Cromosomas de mediano tamaño con los centrómeros submedianos.

Grupo D (13 á 15)- Cromosomas de mediano tamaño acrocéntricos, que pueden llevar satélite en sus brazos cortos.

Grupo E (16 á 18)- cromosomas más bien cortos con centrómeros medianos o submedianos.

Grupo F (19 á 20)-Cromosomas pequeños con centrómeros medianos.

Grupo G (21 á 22 y Y)- Cromosomas muy pequeños, acrocéntricos, que pueden llevar satélites en sus brazos cortos.

b) Resultados

La técnica del cultivo de leucocitos de Moorhead et al. (1960) siguiendo cuidadosamente todos los pasos metodológicos proporciona un buen número de figuras mitóticas adecuadas para demostrar el complemento de cromosomas humanos. La experimentación nos ha demostrado que el colorante de Wright es más sencillo que el colorante Giemsa y que la aceto-orceína, dando el contraste necesario para la fotografía. El contraste fué resaltado utilizando filtro verde oscuro y particularmente cerrando el diafragma del condensador hasta donde fuera posible para conservar el valor de iluminación requerido.

Las preparaciones de los cromosomas de los leucocitos fueron cultivados de sangre periférica de pacientes adultos y lactantes, varones y hembras.

Las láminas fueron teñidas y las mejores metafases fotografiadas. En las figuras 1, 2 y 3 se muestran ejemplos del cariotipo femenino y en la figura 4 del cariotipo masculino. Se observó que el complemento cromosómico de las células masculinas contenía 22 pares homólogos de cromosomas y 2 cromosomas sexuales heterólogos, un pequeño acrocéntrico semejante al grupo 21 y uno mediano o submediano semejante al grupo 6, suponiendo así el par heterólogo sexual de cromosomas sexuales XY. En el femenino el par homólogo de cromosomas sexuales corresponde a cromosomas tamaño mediano o submediano semejante al grupo 6 suponiendo así la pareja XX de cromosomas homólogos sexuales femeninos.

Hemos tratado hasta donde ha sido posible hacer las mediciones correctas de cada uno de los cromosomas . Su clasificación por pares homólogos no ha sido muy difícil, reparando particularmente en su longitud total decreciente, y en la posición del centrómero. Sin embargo, en ciertos momentos se ha hecho bastante difícil, de acuerdo a lo reportado por Patau (1961).

III COMENTARIOS

a) Discusión

Las diversas técnicas de cultivo de tejidos en sangre periférica descritas en la literatura comprenden los cultivos in vivo de corta duración, 72 horas , bien de la suspensión plasma-leucocitos y los microcultivos de sangre total, así como la administración de colchicina in vivo- que evita el manejo de cultivos en estufa a 37° C(por 72 horas , el período largo de 6 horas de interrupción de la mitosis en la estufa a 37°C, reduciendo el procedimiento, in vivo, a una o dos horas, previas a la punción esternal.

El procedimiento utilizado es básicamente el mismo en cultivos de 72 horas. Está basado en el inicio de la mitosis de los monocitos y grandes linfocitos por acción mitogénica de la fitohemaglutina. Kinlough y Robson (1961) colectan sangre venosa con la sal dipotásica de ácido tetracético (Etileno dinitril EDTA) utilizada como anticoagulante y con una acción como la de la colchicina sobre

los cromosomas produciendo metafases bien diferenciadas.

La colchicina interrumpe la mitosis y utilizada adecuadamente mejora la dispersión de los cromosomas y la conservación de su morfología.

El tratamiento hipotónico con agua bidestilada permite la expansión osmótica de las células.

Becker describe que el tratamiento hipotónico tiene un nivel crítico, ya que la sub-exposición produce metafases apretadas y la sobre-exposición las rompe.

La fijación de las células se hace por medio de la solución de Carnoy. Después de 24 horas las células deben transferirse a alcohol a 70 por ciento ya que un período mayor produce reblandecimiento de los cromosomas y le da una apariencia borrosa.

La técnica de preparación de las láminas descrita por muchos autores (Rothfell y Siminovich, Moorhead, Spencer, Becker, etc.) sufre innovaciones en cada laboratorio, con el objeto de provocar una mayor dispersión de cromosomas.

En la tinción de los cromosomas puede utilizarse cualquier coloración básica. Se ha descrito que el Feulgen -aceto-orceína al 1 por ciento da mayor claridad y distinción precisa de las cromátides. Algunos autores hidrolizan las preparaciones antes de la coloración, disminuyendo así la visibilidad del citoplasma y aumentando el con

traste de los cromosomas en el fondo del campo del microscopio.

Estas técnicas permiten el recuento y el estudio de cromosomas de acuerdo a la clasificación de Denver (1960) y Patau (1960).

Microfotografía

Las microfotografías se tomaron en un microscopio Ortholux con óptica periplanática y una cámara fotográfica Leitz SM 1 de 35 mm., equipado con filtro verde. Las microfotografías fueron expuestas en películas de 35 mm., blanco y negro. Agfa 200 ASA y ampliadas en pa pel copia Brovira Agfa, grado 3.

b) Conclusiones

1. De la información obtenida en la literatura se desprende la importancia de los métodos empleados en el estudio de los cromosomas. El procedimiento de Moorhead et al. modi ficado es recomendable y permite el estudio de un número de meta fases adecuadas para hacer un diagnóstico.
2. Las técnicas citogenéticas aplicadas al hombre incluyen el análisis de los cromosomas per se y la prueba de la cromatina de Barr.
3. La citogenética es una ciencia básica que cada día alcan_za mayor importancia clínica.

4. Las técnicas citogenéticas se pueden desarrollar en cualquier laboratorio y sus métodos prácticos son de uso general.

IV. RESUMEN

Se han estudiado cultivos de leucocitos de sangre periférica, obtenida por venipuntura de personas normales y de pacientes del Hospital de Maternidad y de Pediatría de San Salvador.

La técnica de cultivo de tejidos en sangre periférica por el método de Moorhead et al. modificado, y teñido con Wright, nos ha dado buen resultado.

Se obtuvo buen número de metafases que permitieron contar los cromosomas y enumerar algunos detalles estructurales.

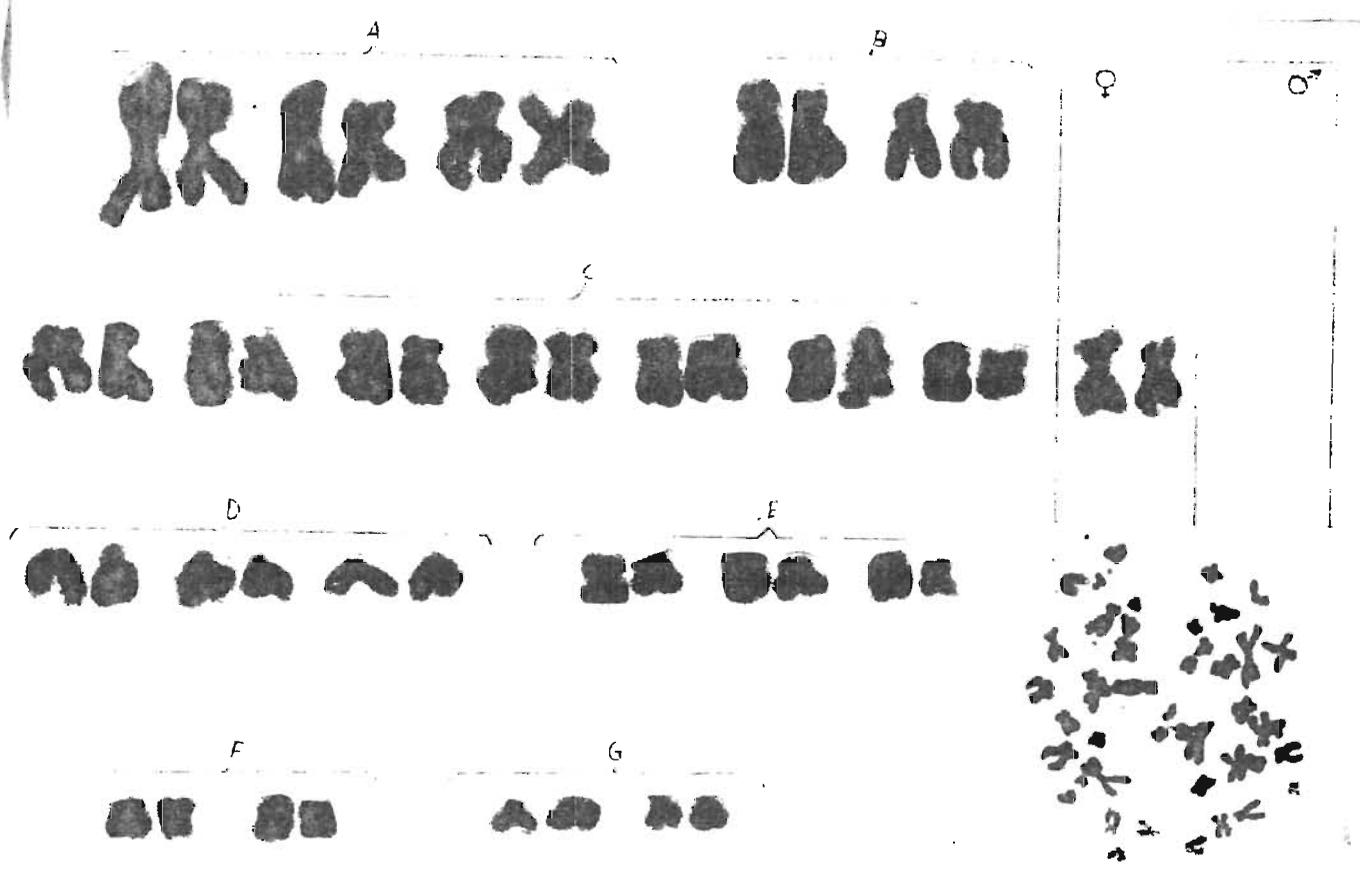


Fig. No. 1 Cariotipo normal femenino mostrando 22 pares de autosomas y 2 cromosomas sexuales XX.

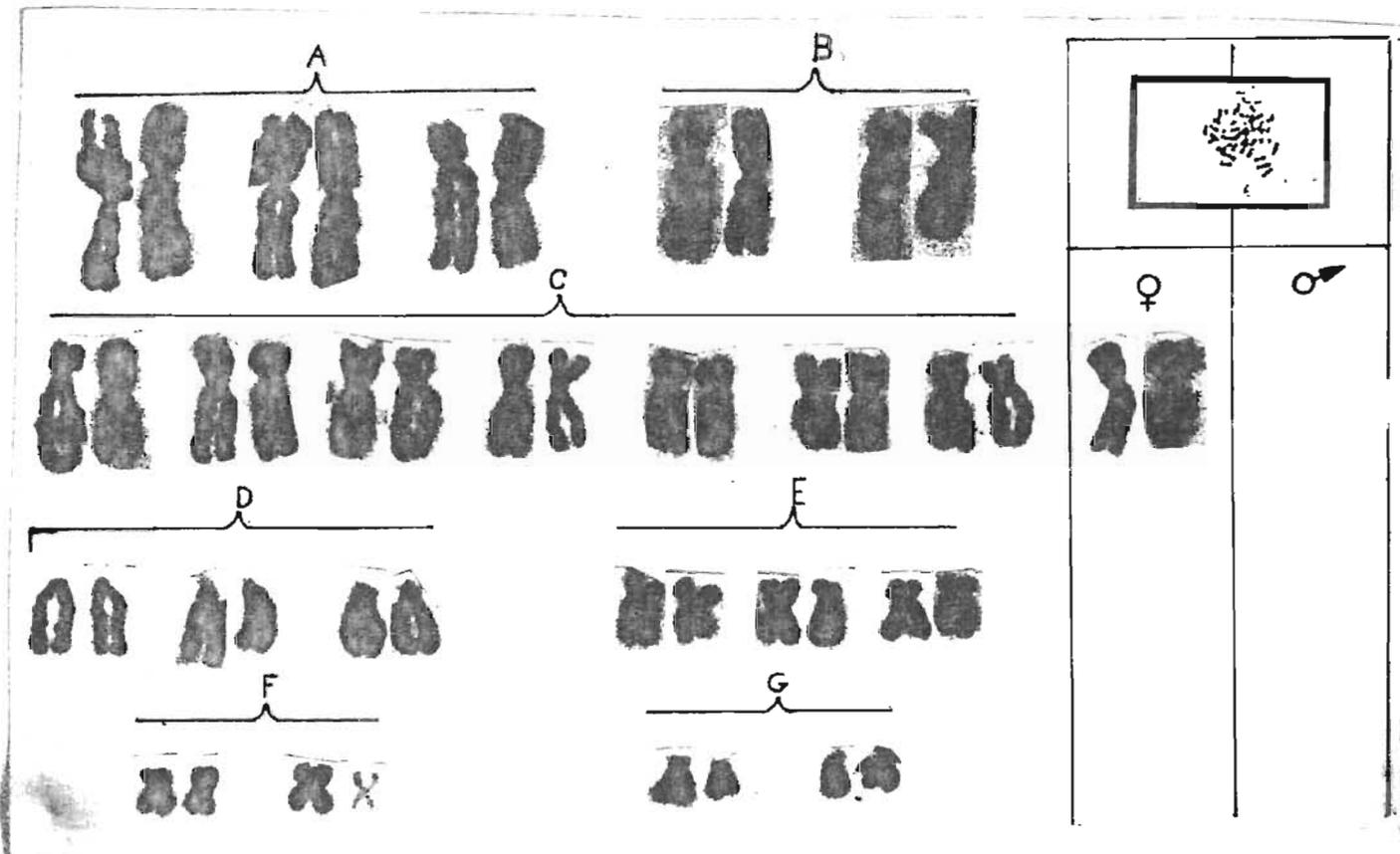


Fig. No. 2 Cariotipo normal femenino mostrando 22 pares de autosomas y 2 cromosomas sexuales XX.

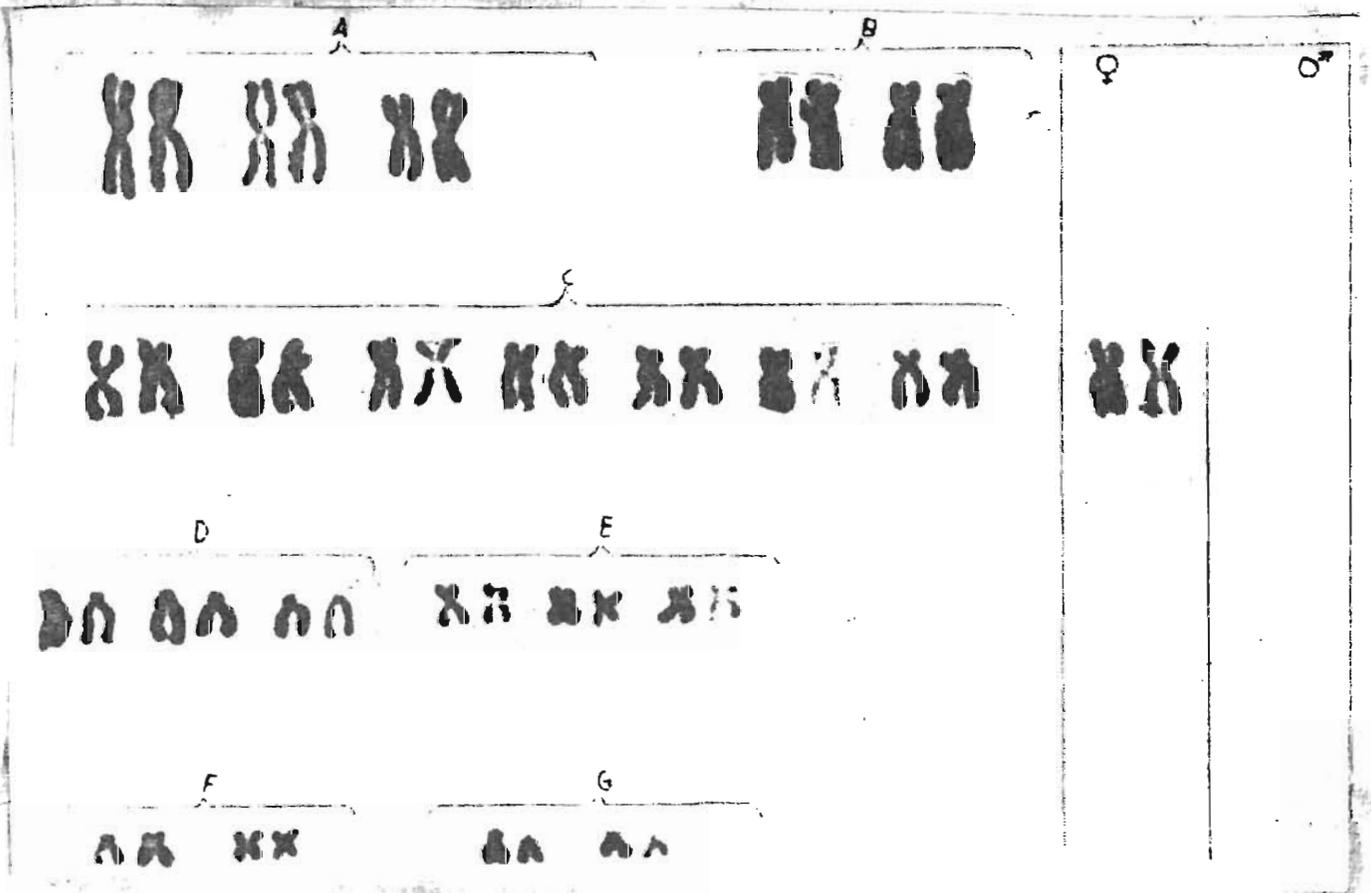


Fig. No. 3 Cariotipo normal femenino mostrando 22 pares de autosomas y 2 cromosomas sexuales XX.

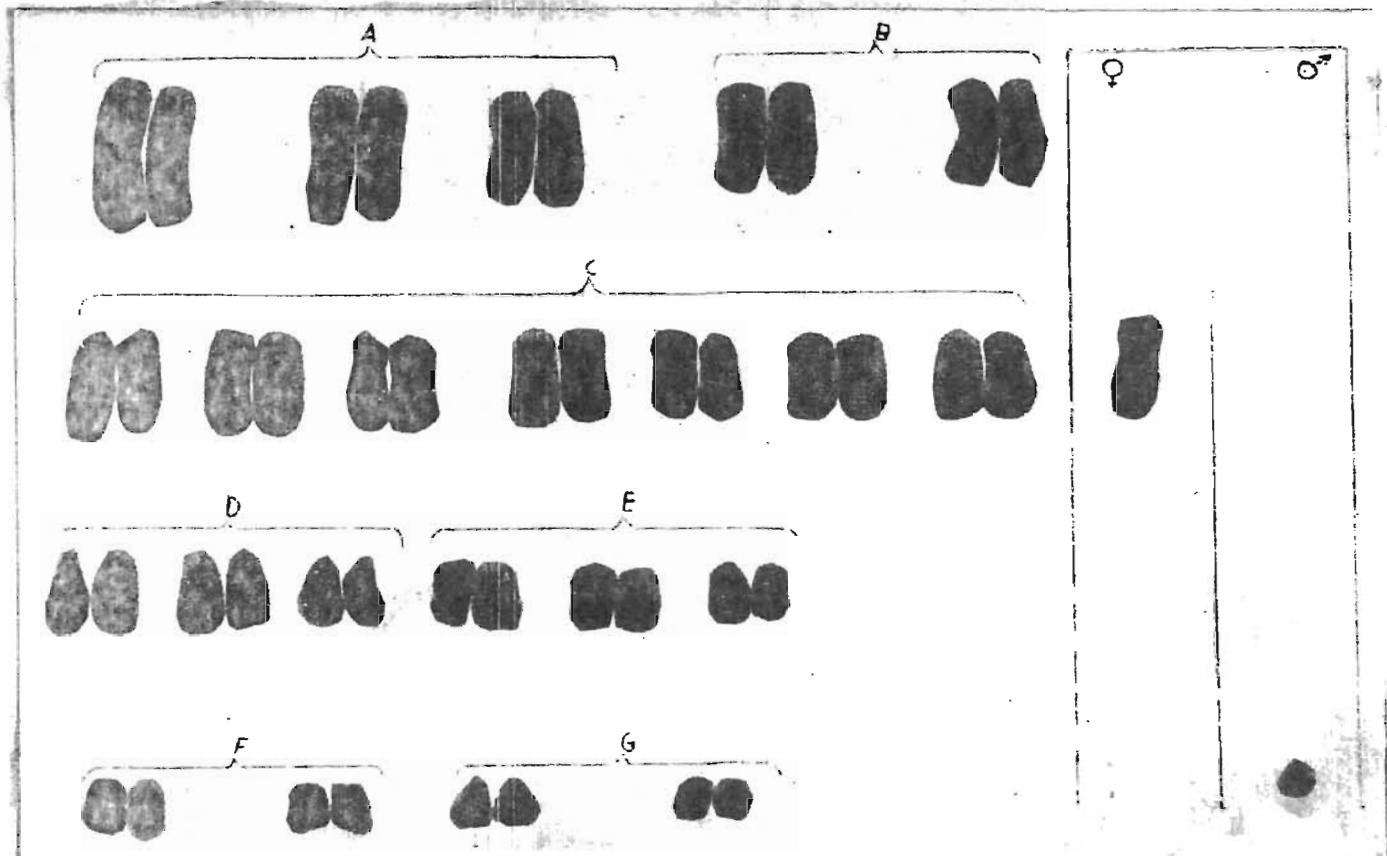


Fig. No. 4 Cariotipo normal masculino mostrando 22 pares de autosomas y 2 cromosomas sexuales XY.

V. BIBLIOGRAFIA

1. AXELRAD,A.A.,and McCulloch,E.: A obtaining suspensions of animals cells in metaphase from cultures propagated in glass. Stain Techn. 33:67-71, 1958.
2. BAIKIE,A.G. et al.: Cytogenetics studies in acute leukaemia. Brit.M.J. 1: 1564, 1961.
3. Barr,M.L. and BERTRAM,E.G.: A morphologic distinction between the neurones of the male and female, and the behavior during accelerated nucle oprotein syntesis. Nature, 163: 676,1949.
4. BARR,M.L.,BERTRAM,L.F. and LINDSAY,H.A.: The morphology of the nerve cell nucleus,according to sex. Anat.Rec.107: 283-297,1950.
5. BERRIOS,J.H.,ALVARENGA,J.R.,ARITA,D.L.: Reporte preliminar de la citología de los cromosomas. Trabajo presentado en el X Congreso Centroamericano de Medicina. El Salvador,1963.
6. BERRIOS,J.H.,CALLEJAS,M.L.,ARITA,D.L.: Estudio citogenético del síndrome de Down. Trabajo presentado en el XI Congreso Centroamericano de Medicina, Guatemala, 1965a.
7. BERRIOS,J.H.,CALLEJAS,M.L.,ARITA,D.L.: Desarrollo de la técnica de cultivo de tejidos en sangre periférica y su aplicación en el análisis de cromosomas humanos. Trabajo presentado en el I Congreso Centroamericano y II Nacional de Micro_ biología. Costa Rica, 1965b.

8. BIRDWELL, T.R. et al.: Leucocyte chromosome cultures by post. Lancet 2(7406):291, 1965.
9. BOTTURA, C. and FERRARI, I.: A simplified method for the study of chromosomes in man. Nature 186 (4728):904-905, 1960.
10. BRIDGES, C.B.: Nondisjunction as proof of the chromosome theory of heredity. Genetics 1:107, 1916.
11. BOOK, J.A. et al.: Proposed standard system of nomenclature of human mitotic chromosomes. Lancet, 1: 1063-1065, 1960.
12. BUR, G.E.: Valor de la biopsia de piel en el diagnóstico del sexo. Revista de la Asociación Médica Argentina 70:825-826, 1956.
13. CESTARI, A.N. and PERONDINI, A.L.: Una técnica simplificada de cultura de tejidos para estudio cromosómico. Rev. Brasil Biol. 23:69-74, 1963.
14. CHU, E., H.Y. and GILES, N.H.: Human chromosome complement in a case of the male Turner. Lancet 1:786-788, 1961.
15. DAVIDSON, W.M. and SMITH, D.R.: A morphological sex difference in the polymorphonuclear neutrophil leucocytes. Brit. M. J. 2:6-7, 1954.
16. FORD, C.E. and HAMERTON, J.L.: The chromosomes of man. Nature, London, 178:1020-1023, 1956.
17. FORD, C.E. and HAMERTON, J.L.: A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosome. Stain Techn. 31: 247-251, 1956b.
18. FROLAND, A.: A micromethod for chromosome analysis on peripheral blood cultures. Lancet, 2 (7268): 1281-1282, 1962.

19. GRAHAM, M.A.: Sex chromatin in cell nuclei of the cat from the early embryo to maturity. *Anat. Rec.* 119:469-485, 1954.
20. HAMERTON, J.L.: Sex chromatin and human chromosomes. En: Bourne, G.H and Danielli, J.F., eds. *International Review of Cytology*. New York, Academic Press, 1961, vol. 12-1.
21. HIRSCHORN, K. and COOPER, H.L.: Chromosomal aberrations in human disease a review of the status of cytogenetics in medicine. *Am. J. Med.* 31; 442-470, 1961.
22. HIRSCHOEN, K.: (Artículo personal para la *Grand Island Biological Company*. Grand Island, New York), Abril, 1965.
23. HUANG, Sh. W.: Microtechnique for culturing leukocytes for improved spread of chromosome. *Lancet* 1(7337):707, 1965.
24. HUANT, E.: Les traitements mitotiques du cancer; colchicine et thiocolchicine. *Enzymes acide désoxiribonucléique*. Paris, G. Doin & C^{ie}, 1957, 179 p.
25. KINLOUGH, M. A. and ROBSON, H.N.: Chromosome preparations obtained directly from peripheral blood. *Nature*, 192: 684, 1961.
26. KINLOUGH, M.A. and ROBSON, H.N.: A simplified method for the study of chromosomes in man. *Nature* 189:420, 1961.
27. LEJEUNE, J., TURPIN, R. and GAUTIER, M.: Le mongolisme, premier exemple d'aberration autosomique humaine. *Ann. Genet.* 1:41, 1959.
28. MANGENOT, C.: Substances mitoclasiques et cellules végétales. *Revue de cytol et cytophys. Veget.* Tome V fasc.3-4, 1941.

29. MARSHALL,R.and CAPON,B.: Factor stimulating cell division in cultured leucocytes. *Lancet*, 2 (7193): 103-104,1961.
30. MOORHEAD,P.S. et al.: Chromosomes preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp.Cell Res.*20: 613-616, 1960.
31. MOORE,K.L. and BARR,M.L.: Smear from the oral mucosa in the detection of chromosomal sex. *Lancet*, 2: 57-58, 1955.
32. MOORE,K.L. and BARR,M.L.: Nuclear morphology, according to sex, in man tissue. *Act.Anat.* 21:197-208, 1954.
33. NOVELL,P.C.: Phytohemagglutinin* an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Research* 20 (4): 462-466, 1960.
34. PATU,K.: The identification of individual chromosomes, specially in man. *Am.J. Human Genet.* 12:250-276,1960.
35. PATU,K. ;Chromosome identification and Denver Report.*Lancet* 1(7183):933-934,1961.
36. PRINCE,P.H.,GRAHAM,M. and BARR,M.L.; Nuclear morphology according to sex, in *Macacus rhesus*. *Anat.Rec.* 122:153-171-,1955.
37. RIGAS,D. and OSGOOD,E.E.: Purification and properties of the phytohemagglutinin of *Phaseolus vulgaris*.*J.Biol. Chem.* 212 (2):607-615, 1955.
38. ROBINSON,A.: The human chromosomes. *Amer. J. Dis. Child.* 101 (3):379-398, 1961.
39. SHETTLES,L.B.: Nuclear morphology of cells in human amniotic fluid in relation to sex of infant. *Am. J.Obst.& Ginec.* 71: 834-~~838~~,1956.

40. SPENCE, H.A. and GREFFER, C.C.: A simple method for demonstration of human chromosomes. *The American Journal of Medical Technology*. 29(5):281-290, 1963.
41. SOHVALL, A.R., GAINES, J.A., GAVRILONE, J.L.: Clinical experiences with the skin biopsy method of detecting chromosomal sex. *Am. J. Obst. & Gynec.* 70:1074-1082, 1956.
42. TJIO, J.H. and LEVAN, A.: The chromosomes number of man. *Hereditas* 42:1, 1956.
43. TAYLOR, J.H.; Chromosome reproduction. En: Bourne, G.H. and Danielli, J.F. eds. *International Review of Cytology*. New York, Academic, Press. vol. 13, 39-70, 1962.
44. TJIO, J.H. and PUCK, T.T.: Genetics of somatic mammalian cells. II Chromosomal constitution of cell in tissue culture. *J. Exp. Med.* 108 (2):259-268, 1958.
45. TJIO, J.H. and WHANG, J.: Chromosome preparations of bone marrow without prior in vitro culture or in vivo colchicine administration. *Stain Techn.* 37:17, 1962.

bdb.