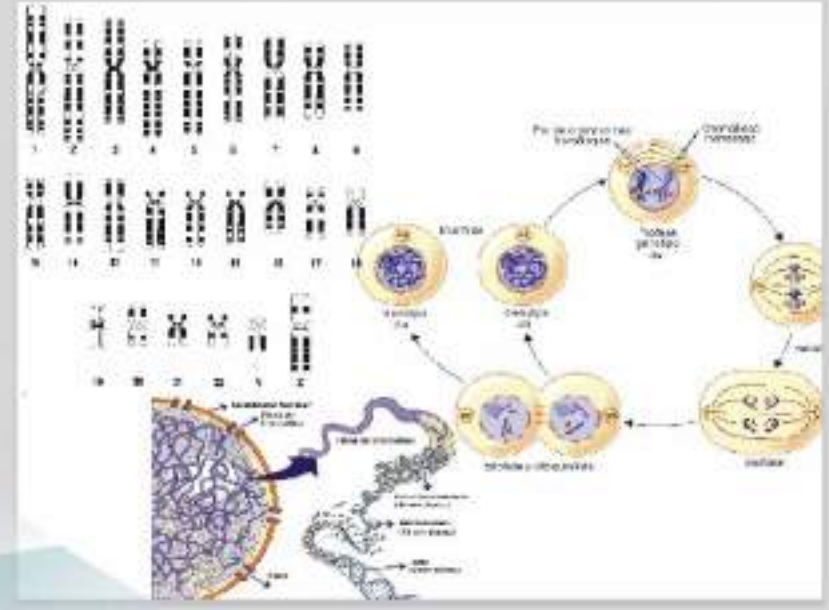
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Citogenética humana

(Manual de laboratorio para BQD)

Sandra Díaz Barriga Arceo
Rosalba Bonilla Sánchez



UNAM
CUAUTITLÁN

FES UNAM
Ediciones Cuautitlán

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA

Sandra Díaz Barriga Arceo

Rosalba Bonilla Sánchez

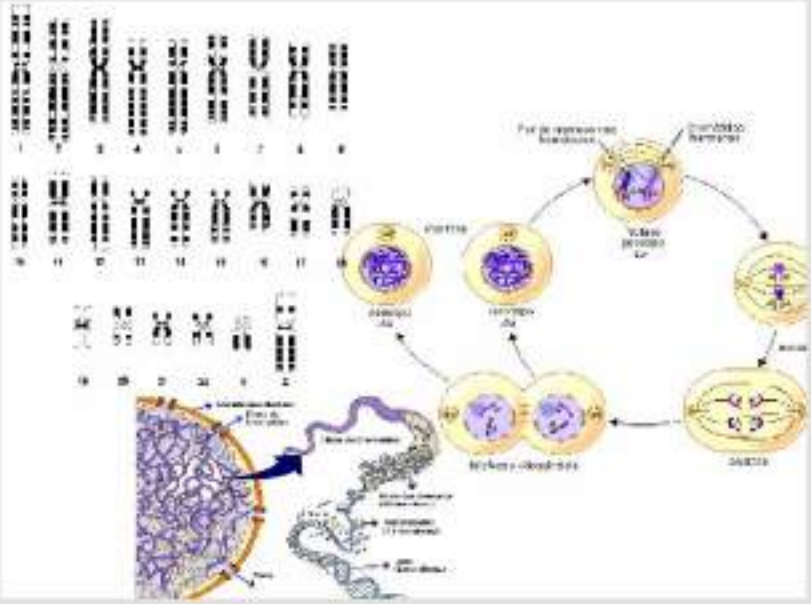
Citogenética humana

(Manual de laboratorio para BQD)

Carrera:
Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Clave de la carrera:
DGAE 1316 FESC 105-39

Clave de la asignatura:
0016



	UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS SECCIÓN DE BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA	
	CALENDARIZACION	Código: FPE-CB-DEX-01-02 Número de Revisión: 02

ASIGNATURA	Citogenética Humana				
GRUPO(S)		GRUPO(S)		GRUPO(S)	

SEMANA	FECHA (SEMANAL)	NUMERO Y/O NOMBRE DE LA PRACTICA, PROYECTO Y/O ACTIVIDAD	CUMPLIO		OBSERVACIONES
			SI	NO	
1		Inscripción y presentación del curso			
1		Introducción al Laboratorio de Citogenética Humana ❖ Explicación teórica			
2		Práctica 1: Manejo de material y medios estériles ❖ Preparación de los medios ❖ Esterilización de los medios			
3		Desarrollo Experimental: Siembra de los medios ❖ Entrega de prelaboratorio ❖ 1er. Examen Parcial			
3		Práctica 2: Elaboración de preparaciones cromosómicas (Explicación teórica) ❖ Entrega del reporte de la práctica 1			
4		Desarrollo Experimental : Siembra de linfocitos ❖ Entrega del prelaboratorio ❖ 2do. Examen parcial			
4		Desarrollo Experimental: Cosecha de linfocitos ❖ Tinción ❖ Análisis cromosómico microscópico			
5		Desarrollo Experimental: Análisis cromosómico microscópico			
5		Práctica 3: Tinción selectiva por bandeo C Y G (Explicación teórica) ❖ Entrega del reporte de la práctica 2			
6		Desarrollo Experimental: Siembra de linfocitos ❖ Entrega del prelaboratorio ❖ 3er. Examen parcial			
6		Desarrollo Experimental: Cosecha de linfocitos ❖ Preparación de material y reactivos para la tinción selectiva por bandeo C y G			
7		Desarrollo Experimental: Tinción selectiva por Bandeo C			
7		Desarrollo Experimental: Análisis cromosómico microscópico			
8		Desarrollo Experimental: Análisis cromosómico microscópico			
9		Práctica 4: Identificación de la cromatina X en células de la mucosa oral (Explicación teórica) ❖ Entrega del reporte de la práctica 3			

9		Desarrollo Experimental: Toma de la muestra e identificación microscópica de la cromatina X ❖ Entrega del prelaboratorio ❖ 4to. Examen parcial			
10		Práctica 5: Análisis microscópico de patologías cromosómicas estructurales (práctica teórica) ❖ Entrega del reporte de la práctica 4			Se evalúa con el análisis microscópico
11		Práctica 5: Elaboración de un cariograma de patologías cromosómicas estructurales (práctica teórica) ❖ Entrega del prelaboratorio			Se evalúa con los cariogramas armados
12		Práctica 6: Análisis microscópico de patologías cromosómicas numéricas (práctica teórica) ❖ Entrega de cariogramas de la práctica 5 ❖ Entrega de prelaboratorio			Se evalúa con el análisis microscópico
12		Práctica 6:Análisis microscópico de patologías cromosómicas numéricas (práctica teórica) ❖ Resolución de problemas			
13		Práctica 6: Elaboración de un cariograma de patologías cromosómicas numéricas (práctica teórica)			Se evalúa con los cariogramas armados
13		Práctica 6: Elaboración de un cariograma de patologías cromosómicas numéricas (práctica teórica)			Se evalúa con los cariogramas armados
13		Práctica 6: Elaboración de un cariograma de patologías cromosómicas numéricas (práctica teórica) Examen final			
14		Discusión de artículos y entrega de cariogramas de la práctica 6			
14		Exposición de trabajos			
15		PELÍCULA			
15		Entrega de calificaciones			
16					

SEM	FECHA (SEMANAL)	EXAMEN	CUMPLIÓ		OBSERVACIONES
			SI	NO	
		Manejo de material y medios estériles			
		Elaboración de preparaciones cromosómicas			
		Tinción selectiva por bandeo C y G			
		Identificación de la cromatina X en células mucosa oral			
		Patologías cromosómicas numéricas y estructurales			

ÍNDICE

Presentación del manual 9
Reglamento general para los laboratorios 11
Reglamento de seguridad en el Laboratorio de Citogenética Humana 13
Introducción 14
Objetivos 16

Práctica 1
Manejo de material y medios para cultivo celular 17

Práctica 2
Elaboración de preparaciones cromosómicas
a partir del cultivo de linfocitos 25

Práctica 3
Técnica de tinción selectiva por bandeo C y G 43

Práctica 4
Identificación de la cromatina "X" y de la cromatina "Y"
en células de la mucosa oral 53

Práctica 5
Aberraciones cromosómicas estructurales (ACE) 63

Práctica 6
Aberraciones cromosómicas numéricas (ACN) 69

Apéndice (Preparación de reactivos) 75
Seguridad y calidad dentro del laboratorio 77
Páginas electrónicas 85
Bibliografía 85
Anexo 1. Técnicas moleculares 97

PRESENTACIÓN DEL MANUAL

Número de práctica	TÍTULO DE LA PRÁCTICA	NÚMERO Y NOMBRE DE LA UNIDAD TEMÁTICA EN EL PROGRAMA DE LA ASIGNATURA
1	Manejo de material y medios para cultivo celular	UNIDAD 2: La célula y el ciclo celular
2	Elaboración de preparaciones cromosómicas	UNIDAD 2: La célula y el ciclo celular
3	Técnica de tinción selectiva C y G	UNIDAD 3: Métodos y técnicas para el estudio de los cromosomas
4	Elaboración e identificación de la cromatina X y el corpúsculo F en células de la mucosa oral	UNIDAD 4: Los cromosomas sexuales
5	Análisis microscópico de patologías cromosómicas estructurales	UNIDAD 5: Aberraciones cromosómicas estructurales
6	Análisis microscópico de patologías cromosómicas numéricas	UNIDAD 6: Aberraciones cromosómicas numéricas

CRITERIOS DE EVALUACIÓN

ASISTENCIA: Es requisito indispensable para acreditar el laboratorio tener el 80 % del total de prácticas y demás actividades realizadas y aprobadas.

PUNTUALIDAD: Se darán 10 minutos de tolerancia para la entrada al laboratorio

PRELABORATORIO: Es un trabajo escrito de investigación previo a cada práctica. Se debe de entregar al inicio de cada sesión de acuerdo a la calendarización y tiene que ser elaborado por computadora

REPORTE: Este trabajo es muy importante y se entrega en las fechas señaladas en la calendarización. Se debe de realizar en computadora, con excelente presentación y debe de cumplir con los siguientes requisitos:

1.**CARÁTULA**: Debe de incluir los siguientes datos:
- Nombre de la Institución y Dependencia (UNAM/FESC)
- Carrera
- Clave de la carrera
- Asignatura
- Grupo
- Reporte de la práctica No.
- Nombre del alumno

Fecha de realización de la práctica y fecha de entrega del reporte

2. **OBJETIVO GENERAL**

3. **METODOLOGÍA**

4. **RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS**

5. **CONCLUSIONES**: Se hacen las deducciones de los resultados y se debe de tomar en cuenta los resultados obtenidos y los objetivos específicos de la práctica.

6. **BIBLIOGRAFÍA**: Las referencias bibliográficas deben de ser mínimo tres y se escriben, de acuerdo a las normas internacionales, en el siguiente orden: Autor(es), Año, Título del artículo o libro, Edición, Editorial, Volumen, Páginas.

EVALUACIÓN DEL CURSO

Criterios de Evaluación	Porcentaje
Promedio de las Prácticas	65
Examen Final	25
Actividades extras	10
Total	100

	UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS	
	REGLAMENTO GENERAL PARA LOS LABORATORIOS	CODIGO: DOC-CB-DEX-01-00 Nº de REVISIÓN: 01

1. Este reglamento aplicará para personal académico, alumnos y laboratoristas.
2. Para todo trabajo realizado en el laboratorio deberá utilizarse bata blanca con manga larga.
3. La tolerancia para el inicio de la sesión de laboratorio será hasta de 10 minutos a partir de la hora señalada.
4. Por seguridad, no deben cerrarse las puertas del laboratorio con llave durante las prácticas.
5. En todo momento deberá mostrarse una conducta adecuada en el área de trabajo.
6. Queda prohibido en los laboratorios:
a) Tirar basura fuera del cesto.
b) Ingerir alimentos y/o bebidas.
c) Fumar.
d) Recibir visitas.
e) La entrada a los inter laboratorios a toda persona ajena a los mismos.
f) Realizar reuniones o convivios en los laboratorios.
g) Salir del laboratorio en el horario asignado para la sesión experimental.
h) Sentarse sobre las mesas de trabajo.
i) Mover el mobiliario de su lugar.
j) Utilizar las gavetas para guardar material que no corresponda a la asignatura.

Los residuos peligrosos deben depositarse en los contenedores destinados para tal fin, entendiendo por residuo peligroso: elementos, sustancias, compuestos, desechos o mezclas de ellos que en cualquier estado físico representan un riesgo para el ambiente, la salud o los recursos naturales, por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables o biológico-infecciosas (Art. 3º de la Ley General del Equilibrio y Protección del Ambiente).

Dentro del laboratorio no se permite el uso de teléfonos celulares, reproductores de sonido o cualquier medio electrónico de entretenimiento. El uso de las computadoras portátiles queda restringido a temáticas relacionadas con la asignatura.

El acceso al laboratorio se permitirá únicamente cuando esté presente uno de los profesores del grupo.

El uso del laboratorio para trabajo extraordinario, deberá programarse con el profesor responsable en un horario que no interfiera con aquel destinado para el desarrollo de las prácticas.

Para solicitar material y equipo, es requisito indispensable que el alumno llene debidamente el vale de material (FPE-CB-DEX-01-09) y lo entregue a la persona responsable, dejando como depósito la credencial vigente de la UNAM.

El alumno deberá revisar el material y/o equipo al momento de recibirlo indicando cualquier anomalía (faltante o material dañado) y será devuelto en las condiciones en que se recibió, de no hacerlo, se hará acreedor a las sanciones establecidas en cada laboratorio. Es obligación de todos mantener limpio y ordenado el lugar de trabajo y todo el laboratorio.

Vo. Bo. Comité de Calidad del Departamento de Ciencias Biológicas	
Jefe del Comité de Calidad: Dr. Misael Rubén Oliver González	
Jefes de Sección	Responsables de Calidad
Q Arcadia Hernández Beltrán	QFI Guadalupe Koizumi Castro
QFB Martha Patricia Campos Peón	QFB Ladislao Palomar Morales
MC Juana Ortega Mondragón	QFB Juana Alicia Alquicira Camacho
MVZ Esp Hugo César López Farías	MVZ Olivia Adams Vázquez
ME Susana Elvira García Vázquez	MVZ Edna Maribel Legaspi Nuevo

REGLAMENTO DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE CITOGENÉTICA HUMANA

REGLAMENTO INTERNO DEL LABORATORIO DE CITOGENÉTICA HUMANA

1. Uso obligatorio de bata blanca y limpia para cualquier actividad.
2. Uso de guantes de látex, vinilo o de nitrilo y de cubrebocas en los momentos de toma de muestra o manipulación de las mismas y manejo de compuestos de alto riesgo.
3. Usar zapatos adecuados, no sandalias.
4. Mantener las mesas y escritorios siempre limpios y libres de materiales extraños
5. No dejar encima de la mesa del laboratorio ningún tipo de prenda.
6. No usar utensilios ni equipos de vidrio con desportilladuras, grietas o rajaduras.
7. Colocar los residuos, remanentes de muestras, etc., sólo en los lugares destinados para tal fin.
8. Rotular todos los recipientes, aunque sólo se pongan en éstos productos en forma temporal.
9. Retirar de las mesas y colocar en su sitio correspondiente cualquier material que haya sido utilizado para realizar un trabajo.
10. No tirar a las tarjas residuos contaminantes.
11. Depositar objetos rotos de vidrio sólo en recipientes destinados a tal fin.
12. Limpiar inmediatamente cualquier derrame de producto químico.
13. Lavarse las manos antes y después de cada práctica.
14. El cabello debe de estar debidamente recogido.
15. Contar con su diagrama ecológico personal y el material necesario para cada práctica.
16. Conocer la toxicidad y riesgos de todos los compuestos con los que se trabaje.
17. Leer cuidadosamente las indicaciones en la etiqueta de cada reactivo.
18. Si alguna alumna esta embarazada hacérselo saber al profesor encargado del laboratorio.
19. No inhalar, probar u oler productos químicos sí no se está debidamente informado.
20. No pipetear con la boca o ingresarse a la boca cualquier otro material del laboratorio.
21. Verificar el uso adecuado de los equipos que se vayan a utilizar. En caso de desperfectos notifícarlos al profesor o encargado del laboratorio
22. Trabajar en la campana solamente el material necesario. Evitar colocar el rostro dentro de la campana.
23. Calibrar adecuadamente los tubos a centrifugar. No abrir la centrífuga hasta que esté completamente detenida.
24. Evitar ingresar productos inflamables dentro del horno.
25. Las heridas y quemaduras deben de ser tratadas inmediatamente. En el caso de salpicaduras de ácidos sobre la piel lavar inmediatamente con agua abundante, teniendo en cuenta que en el caso de ácidos concentrados la reacción con el agua puede producir calor. Es conveniente retirar la ropa para evitar que el corrosivo quede atrapado entre la ropa y la piel.
26. Las balanzas deben dejarse perfectamente limpias después de finalizar la pesada.
27. Al finalizar cada práctica el material y la mesa de laboratorio deben dejarse limpios y cerrarse las llaves de gas, agua y jaulas en caso de que haya animales de laboratorio.

INTRODUCCIÓN

La elaboración de este manual surge por la inquietud de proporcionarles a los estudiantes de la carrera de QFB y BQD un manual de prácticas actualizado que se ajuste al programa y necesidades del laboratorio de dicha asignatura, así como también que les sirva como herramienta básica de apoyo en su formación profesional.

En este manual, aparecen de manera clara y sencilla cada una de las prácticas que el alumno realizará durante el semestre, las cuales han sido probadas y mejoradas durante el proceso enseñanza-aprendizaje. Cada práctica tiene marcados sus objetivos y cuentan con una introducción en la que se revisan tanto aspectos históricos, teóricos y prácticos; así como los fundamentos y principios generales de la práctica a realizar.

También se abordan diversos puntos de la citogenética los cuales serán estudiados de manera clara y sencilla, teniendo como finalidad, el ser útil y despertar el interés por el área a estudiantes de las carreras de ciencias biológicas (QFB, BQD, Medicina, Farmacia, QBP, QFI, ETC).

La citogenética es el estudio de la estructura y función de los cromosomas. Los estudios citogenéticos han adquirido con el devenir del tiempo una mayor importancia a la hora del diagnóstico, por lo que es importante que el estudiante conozca desde la elaboracion de un cultivo hasta la reciente incorporación de las técnicas de citogenética molecular, FISH, las cuales han mejorado el tiempo de entrega y la exactitud de los resultados y sobre todo han contribuído también a la observación de nuevas anomalías cromosómicas y a la localización de genes específicos.

En el aspecto metodológico, en principio hemos querido abordar los métodos de esterilización que se emplean más comúnmente para preparar al alumno en el manejo del material y medios de cultivo en condiciones estériles; no porque a esta altura de su carrera no se haya adiestrado en este trabajo, sino porque las condiones de cada laboratorio son diferentes.

El manual se centra en la elaboración y estudio de los cromosomas humanos a partir de un cultivo de linfocitos, sin embargo los aspectos metodológicos pueden aplicarse para la obtención de preparaciones cromosómicas de muchas otras especies, haciendo inclusive uso de otros tejidos celulares tanto vegetales como animales. Los aspectos metodólogicos de cada práctica se han enlistado y en los casos que lo amerita se han utilizado fotografías, diagramas de flujo, diagramas ecológicos para la disposición de los residuos de cada práctica, así como dibujos que se han generado por el mismo trabajo del laboratorio de citogénetica.

Por último, el manual incluye dos técnicas de bandeo cromósomico (bandas C y G), sexocromatina, corpúsculo “F” que son parte de los estudios de rutina de todo laboratorio de análisis citogenético. En la introducción de las mismas también se describen de manera breve algunas de las nuevas técnicas moleculares (FISH, CGH, y sus variantes) para que nues-

tros lectores se den cuenta de que la citogenética no sólo se limita a contar cromosomas y a relacionarlos con algún síndrome, sino que ofrece muchas otras perspectivas al utilizar estas técticas más sofisticadas y con ello aprenda la realización del diagnóstico, pronóstico y seguimiento de numerosas cromosomopatías.

Nuestro objetivo final es que el estudiante, al concluír el paquete terminal de citogenética humana, desarrolle la habilidad para poder identificar anomalías cromosómicas tales como: deleciones, inversiones, inserciones, traslocaciones, sitios frágiles y otras reorganizaciones cromosómicas.

La bibliografía y las citas electrónicas que hemos incluido cubren los aspectos históricos, teóricos y de actualización sobre la materia.

Los temas no se tratan con la amplitud y profundidad que se requeriría sí éste fuese un libro teórico sobre la materia; más bién es un manual de prácticas que tiene como finalidad proporcionar las bases metodológicas y despertar el interés por el área a los estudiantes de la carrera de BQD que cursan el paquete terminal de Citogenética humana.

Debido a que en los últimos años la sociedad se ha preocupado y enfocado en reducir la contaminación del medio ambiente, el cual ha sido afectado por la generación de cientos y hasta miles de agentes contaminantes que son enviados a la Tierra indiscriminadamente y que año tras año han colaborado al deterioro de nuestro planeta, que en todas y cada una de esta serie de prácticas se les ha incluido sus respectivos diagramas de flujo ecológicos, con la finalidad de indicarle al alumno cuál será el procedimiento a seguir durante y después de la práctica realizada y, sobretodo, el manejo preciso y adecuado de los residuos generados dentro del laboratorio, para que el alumno desarrolle una nueva cultura sobre el cuidado del medio ambiente y de esta manera se contribuya a la disminución de estos re-siduos que tienen tanto impacto ambiental.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL DE LA ASIGNATURA

Proporcionar al alumno los conocimientos básicos sobre Citogenética humana para que comprenda, analice y pueda explicar cómo la estructura y comportamiento de los cromosomas garantizan la conservación de la información genética de una generación a otra, por medio de la aplicación de métodos de citología y genética, para que, pueda aplicar estos conocimientos en el diagnóstico citogenético y logre establecer una relación entre la herencia y la patología cromosómica.

OBJETIVO DEL CURSO EXPERIMENTAL

Aplicando los conocimientos básicos en citogenética humana, el alumno adquirirá la habilidad en el estudio de los cromosomas humanos, su clasificación y, por tanto, en la interpretación de un cariotipo, utilizando diversas técnicas citogenéticas que le permitirán adquirir experiencia en el diagnóstico citogenético para que la aplique en su campo laboral.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Brindar las herramientas que sirvan de prevención y control en el impacto del medio ambiente a través de diagramas ecológicos.

- Mostrar en forma ilustrativa las técnicas y procedimientos de laboratorio más comúnmente utilizadas en ésta área.

- Que el alumno sea capaz de identificar y diagnosticar a través de las técnicas aquí descritas, las cromosomopatías más comunes en el ser humano.

- Apoyar la formación del estudiante del paquete terminal de genética en la carrera de BQD.

PRÁCTICA 1
Manejo de material y medios para cultivo celular

OBJETIVO

Que el alumno aprenda la correcta utilización de los diversos métodos de esterilización para el material y medios empleados en su cultivo celular y el manejo correcto de los mismos en condiciones estériles al realizar su manipulación en una campana de flujo laminar, para que adquiera destreza y habilidad en el manejo de los mismos.

INTRODUCCIÓN

En cualquier laboratorio, particularmente en un laboratorio de Citogenética donde se realizan cultivos celulares, existen situaciones en que la sola limpieza no es suficiente, es por ello que se requiere la total garantía de la eliminación de los microorganismos (bacterias vegetativas o esporuladas, virus, hongos, parásitos, priones) para lo cual es necesario utilizar técnicas como: asepsia, esterilización y desinfección (**De La Rosa 2003**).

La sepsis, palabra derivada del griego que significa degradación, descomposición o putrefacción, indica contaminación bacteriana (Tórtora, 2007). Así, la asepsia, también conocida como la técnica estéril, consiste en mantener un ambiente estéril y evitar la transmisión de enfermedades, al reducir el número de patógenos o agentes contaminantes. Para el mantenimiento de la asepsia es importante una técnica adecuada de lavado de manos o una buena higiene de las mismas, además de un control ambiental, conocimiento de las precauciones universales, utilización de guantes y otros equipos de protección personal (**Fulcher, 2007**).

La esterilización se define como la eliminación o la destrucción de todas las formas de vida microbiana por medio del uso de agentes químicos o físicos. El calor es uno de los métodos más comúnmente utilizados para eliminar microorganismos, incluyendo las formas más resistentes (**Tórtora, 2007**). Todos los métodos de esterilización están diseñados para matar o impedir la reproducción de microorganismos potencialmente peligrosos para los seres humanos (**Martin, 2001**).

Estos métodos se pueden emplear para la esterilización del área de trabajo y del material y reactivos usados en el cultivo celular. Para un cultivo celular, los métodos que se utilizan frecuentemente para esterilizar el material incluyen el uso de altas temperaturas. La esterilización por calor seco (~ 180 a 200 °C) se puede utilizar para la preparación del material

de vidrio (botellas, tubos, pipetas, etc.), metal (latas, tapas, etc.) y algunos materiales de base fenólica (tapas de botellas) **(Martin, 2001)**.

El calor seco se logra en un horno alcanzando temperaturas de 180 °C por hora. Otra manera de esterilizar por calor seco, es la flama directa o el calor directo. Al quemar un objeto se incinera, no dejando ninguna bacteria viva, y queda el objeto esterilizado. El aire caliente también es una forma de calor seco, aunque es poco usado, porque no es muy práctico **(Romero, 2007)**.

La esterilización más utilizada y confiable es con calor húmedo, la cual requiere de temperaturas superiores a la de la ebullición del agua **(Tortora, 2007)**. Debido a la alta energía calorífica liberada, las bacterias la absorben y mueren coaguladas, y con ello, sus enzimas son desnaturalizadas (**Romero, 2007**). Estas temperaturas elevadas se alcanzan mediante vapor bajo presión en un autoclave **(Tórtora, 2007)**, utilizado en los laboratorios para esterilizar cultivos y soluciones que no formen emulsiones con el agua y que no se desnaturalicen a tempe-raturas mayores de 100 °C. Una temperatura de 121 °C (una atmósfera de sobrepresión) con un tiempo de exposición mayor a 15 minutos sirve para destruir organismos formadores de esporas (**www.microbiologia.com**).

La concentración ideal de vapor de agua para esterilizar es del 100 %, por lo que todo el material debe estar sumergido en vapor sin aire alguno (vapor saturado), y para ello se debe evacuar todo el aire. Esto se puede conseguir por desplazamiento o vacío. La extracción del aire por desplazamiento consiste en dejar hervir el agua en el autoclave cerrada, sin bloquear la espita de salida de vapor durante un tiempo necesario para que el vapor de agua expulse y sustituya todo el aire que había inicialmente; después se cierra la espita y el vapor actúa a presión y alta temperatura **(De la Rosa, 2003)**. Otras formas de calor húmedo es el vapor fluente o corriente, que cuando se ponen en contacto los microorganismos con el vapor, éstos son quemados por la alta temperatura (**Romero, 2007**).

La esterilización por medio de radiaciones emplea dos tipos de radiación: la ionizante y la no ionizante. Entre las radiaciones no ionizantes está la luz ultravioleta de longitud de onda entre 240 y 280 nm. Es un método importante ya que produce mutaciones letales. En tanto que las radiaciones ionizantes, como los rayos, producen cambios estructurales de los ácidos nucleicos y las proteínas. El ultrasonido también se emplea en la esterilización, debido a que destruye algunas estructuras de los microorganismos como la membrana plasmática y esto conduce a su inactivación **(González, 2005).**

La filtración es un método útil para esterilizar medios de cultivo celular termolábiles. Se pueden eliminar las bacterias y los hongos de las soluciones mediante filtros de partículas de alta eficiencia, HEPA; no obstante, estos filtros no consiguen eliminar los virus, esporas, ni algunas otras bacterias de tamaño muy pequeño **(Murray, 2005)**.

La desinfección es un proceso con el que se destruyen microorganismos patógenos, aunque no necesariamente todos los microorganismos, ni todas las esporas. Los métodos de desinfección comprenden:

- Físicos: Ebullición, vapor, calor seco, la pasteurización, radiaciones.
- Agentes químicos: alcoholes, aldehídos halógenos, metales pesados, compuestos de amonio cuaternario, fenoles, colorantes, etc. (**Forbes, 2009**).

Existen diversos factores que influyen en la actividad de los desinfectantes, por ejemplo:

- Temperatura y pH
- Concentración del desinfectante
- Carga microbiana
- Cantidad de compuestos orgánicos
- Naturaleza de la superficie a desinfectar
- Duración del contacto
- Tipos de microorganismos presentes (**Forbes, 2009**).

Los laboratorios de cultivo celular por lo general tienen la función de hacer crecer y mantener las células vivas. En consecuencia, la exposición humana a productos químicos peligrosos, radiaciones o material biológico es mayor que en los procedimientos rutinarios. Sin embargo, la posible exposición a estos agentes puede representar un cierto riesgo en la salud de la persona que ahí labora, por lo cual él o ella debe estar consciente de los requisitos de seguridad que se necesitan para laborar en ellos **(Martin, 2001)**.

CUESTIONARIO PREVIO

1.- Explica el fundamento bajo el cual funciona una autoclave.-
2.- Define los siguientes términos: esterilizar, desinfectar, asepsia, sepsis.
3.- Describe cinco métodos de esterilización
4.- ¿Cómo funciona una campana de esterilidad y cómo se usa?
5.- ¿Qué se utiliza para verificar que la autoclave está funcionando perfectamente bien?
6.- Cómo desinfectarías o esterilizarías el siguiente material: medios de cultivo celular, material de vidrio, bata, pinzas, tijeras, tapones de hule, área de trabajo, medios bacteriológicos.

MATERIAL REQUERIDO PARA LA PRÁCTICA

Material por alumno

2 frascos para cultivo
2 tapones para los frascos
2 pipetas serológicas de 10 ml
1 pipeta Pasteur
1 pinza Adson sin dientes

Material por grupo

Medio líquido #1 (caldo nutritivo)
Medio líquido #2 (Extract Broth)
Horno de calor seco
Estufa bacteriológica
Perilla de goma
Algodón, papel estrasa, papel aluminio, masking tape
Autoclave
Campana de esterilidad
Cloruro de benzalconio
Aparato de filtración
Mechero

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. Preparación del material

a) Lavar el material con detergente común. Enjuagar repetidas veces con agua corriente hasta eliminar todo resto de detergente.

b) Empacar en la forma acostumbrada y esterilizar el material de vidrio, los medios de cultivo bacteriológico y demás material termolábil en el autoclave.

2. Técnica de manipulación

a) Limpiar el área de trabajo con agua y jabón. Por último, pasar un algodón impregnado con cloruro de benzalconio u otro desinfectante dentro de la campana de esterilidad.

b) Encender el mechero con flama de regular tamaño.

c) Vaciar 8 ml del medio # 1 a cada frasco de cultivo.

d) Adicionar con la pipeta Pasteur 10 gotas del medio líquido #2

e) Mezclar bien el contenido de los frascos y taparlos.

f) Incubar en la estufa a 37 ^{0}C durante 48 horas. Observar si hay o no contaminación microbiana.

g) Reportar resultados y conclusiones.

1.1 MICROSCOPIO ÓPTICO

INTRODUCCIÓN

Los microscopios (del griego mikros: pequeño y skopein: observar) son instrumentos de óptica que nos permiten ver objetos muy pequeños o detalles estructurales imposibles de distinguir a simple vista, porque están por debajo del límite de resolución del ojo humano (**Montengua, 2009**).

El microscopio compuesto se describió por primera vez en el siglo XVI. En el año de 1665, Antonio Leeuwenhoek (1632-1723) fabricó los primeros microscopios que llegaban hasta unos 270 aumentos y los cuales no fueron superados durante mucho tiempo, hasta el siglo XVIII. En el año de 1665, Robert Hooke (1635-1703) construyó un microscopio compuesto con enfoques macro y micro que le permitió observar las células del saúco en 1667 y por lo cual, se le considera como la primera persona que observó las células de las plantas (**Valencia, 2004**).

El desarrollo del microscopio está estrechamente relacionado con la evolución de la Biología Celular y la Medicina. Los microscopios son un instrumento muy valioso para cualquier investigador, ya que proporcionan al observador una resolución mejorada (capacidad de observar dos objetos cercanos como objetos distintos), contraste (capacidad para detectar las diferentes regiones de la muestra sobre la base de la intensidad o color) y amplificación (capacidad de hacer visibles los objetos pequeños). El ojo humano puede resolver objetos del orden de 0,1 mm, mientras que el microscopio de luz puede resolver objetos del orden de 0,2 m (200 nm) con una ampliación de 1000 ×. **(Masters, 2008).**

CONSTITUCIÓN FUNDAMENTAL

Un microscopio óptico común está conformado por tres sistemas:

- **Sistema mecánico**. Constituido por piezas en las que van instaladas las lentes que permiten el movimiento para el enfoque. Este sistema comprende: pie, tubo, revólver, columna platina, carro, tornillo macro y micrométrico. Estos elementos sostienen la parte óptica y de iluminación, y además permiten los desplazamientos necesarios para el enfoque del objetivo.
- **Sistema óptico**. Formado por un conjunto de lentes dispuestas de tal manera que produce el aumento de las imágenes (oculares y objetivos). Es el encargado de reproducir y aumentar las imágenes mediante el conjunto de lentes que lo componen.
- **Sistema de iluminación**. Partes del microscopio que reflejan, transmiten y regulan la cantidad de luz necesaria para efectuar la observación (foco de luz condensador y diafragma), con la finalidad de dirigir la luz natural o artificial de tal manera que iluminen la preparación u objeto que se va a observar en el microscopio (**Vives, 2006**). Ver Figura 1.

Figura 1. Esquema general de las partes del microscopio (**Tórtora, 2007**)

FUNDAMENTO BÁSICO

El microscopio óptico cuenta con tres sistemas de lentes: el condensador, que enfoca los rayos de luz sobre la muestra; los objetivos, que magnifican la imagen; y los oculares, que agregan una mayor magnificación y permiten la visualización directa del preparado (**Montengua, 2009**).

La luz de la fuente luminosa incorporada en la base del microscopio atraviesa el preparado histológico, el cual se coloca sobre la platina y el sistema de lentes del microscopio.

La imagen aumentada que producen los objetivos se amplifica todavía más por la acción del ocular, éste se encuentra situado en la parte superior del microscopio, por donde se observa. (**Sobotta, 2009**). Ver figura 1.

RECOMENDACIONES DE USO

a) Transportar el microscopio empleando ambas manos, sosteniéndolo de la base y del brazo.
b) Colocar el microscopio cuando menos a 20 cm del borde de la mesa como al inicio.

c) Limpiar el microscopio con un paño y los lentes con papel seda o cebolla.
d) Asegúrate que el primer objetivo sea el 10 X.
e) Al cambiar de objetivo con el revólver asegúrate de no golpear los lentes con la preparación.
f) Al terminar de observar, apagar el microscopio, enrollar el cable, retirar la preparación y limpiar la platina y los lentes como al inicio.

1.2 MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA

INTRODUCCIÓN

Con el afán de fabricar y mejorar cada vez más los microscopios ópticos, se llegó a la conclusión de que el siguiente problema a resolver era cómo lograr mayor especificidad y contraste en la microscopía óptica. Después de una serie de arduos trabajos e investigaciones se encontró una solución, la cual consistió en la aplicación de la fluorescencia (luz incidente de longitud de onda corta causada por una molécula fluorescente que emite luz de una longitud de onda más larga) a la microscopía. El desarrollo del microscopio de fluorescencia se logró gracias a una serie de avances técnicos en el diseño del microscopio, así como la utilización de moléculas de fluorescencia intrínseca y moléculas sintéticas de fluorescencia. Augusto Köhler (1866-1948), desarrolló en 1893 un nuevo sistema de iluminación para el microscopio (llamado más tarde la iluminación Köhler) con fines fotomicrográficos. En 1904 inventó el microscopio de luz ultravioleta que precedió al microscopio de fluorescencia **(Masters, 2010)**.

Fluorescencia. El fenómeno de la fluorescencia se produce cuando un electrón de un átomo absorbe toda la energía de una determinada longitud de onda de la luz, saltando a otros orbitales. Es una situación inestable durante la cual se emite la mayor parte de la energía que se ha absorbido (con mayor longitud de onda) y vuelve a desplazarse a su orbital.
A medida de que las moléculas excitadas regresan a su estado normal, liberan el exceso de energía en forma de luz visible de mayor longitud de onda que la radiación excitante. Los objetos fluorescentes aparecen brillantemente iluminados contra un fondo oscuro, según el color del colorante usado **(morfoudec.blogspot.col)**

CONSTITUCIÓN FUNDAMENTAL

Fuente luminosa. Las fuentes de luz que se utilizan para la microscopía de fluorescencia incluyen, por lo general, las lámparas de mercurio y de arco de xenón, así como las lámparas incandescentes halógenas. Los láseres son utilizados principalmente para la microscopía de fluorescencia confocal y microscopía de reflectancia total interna (TIRF) **(Jacobson, 2010).**

Objetivos. Suelen ser de cuarzo o fluorito Esto amplía el rango útil del objetivo en el espectro UV, ya que el vidrio absorbe la radiación ultravioleta.
Filtros. Los filtros están diseñados para "pasar" o transmitir ciertas longitudes de onda de la luz, mientras bloquea a las demás. También es posi-

ble observar múltiples emisiones de diferentes colores simultáneamente con filtros de paso multibanda más complicados (**Jacobson, 2010**).

Filtros de fluorescencia y caja de filtros de fluorescencia. Retienen la radiación ultravioleta, peligrosa para el ojo humano, dejando pasar solamente la radiación visible, que no es peligrosa. Existen un gran número de juegos de filtros de excitación y de emisión para los diferentes fluorocromos.

El filtro de excitación. Ubicado entre la fuente de luz y el preparado. Permite el paso de ondas de luz con longitud que cae en el rango azul con el fin de que el preparado sea alcanzado exclusivamente por la luz azul y produzca emisión de luz fluorescente.

El filtro de emisión. Ubicado antes del ocular, previene daños a la retina que podrían ser causados por rayos ultravioleta que escapan del espejo dicrómico. Corta completamente la luz de excitación no deseada, es decir selecciona la longitud de onda de emisión del fluorocromo.

El espejo dicrómico. Permite la separación de la luz de excitación y la fluorescencia. Posicionado en 45° respecto al eje óptico, la longitud de onda más corta es reflejada y la longitud de onda más larga lo atraviesa (**morfoudec.blogspot.com**).

Epiiluminación. La luz empleada para la excitación es reflejada sobre el objeto que debe observarse a través del objetivo que actúa como condensador **(Vives, 2006).**

PRÁCTICA 2
Elaboración de preparaciones cromosómicas a partir del cultivo de linfocitos

OBJETIVO

Que el alumno aprenda todos los pasos a seguir para realizar una adecuada siembra y cosecha de linfocitos por medio de la elaboración de preparaciones cromosómicas, así como el procesamiento posterior de las mismas, lo cual le conducirá al análisis y elaboración de un cariotipo, permitiéndoles desarrollar la habilidad y destreza necesarias para hacer un buen diagnóstico citogenético.

INTRODUCCIÓN

Las técnicas básicas de cultivo celular se desarrollaron en su mayor parte a mediados del siglo XX y aún siguen evolucionando. Los principales avances se hicieron en los inicios de la historia del cultivo celular mediante la aplicación de conocimientos derivados de las observaciones histológicas, fisiológicas y anatómicas. A mediados del siglo XX, los avances en bioquímica permitieron un desarrollo más preciso de los medios de cultivo. En los últimos 25 años, los avances en los conceptos y la disponibilidad de reactivos mediante las técnicas de Biología Molecular, han permitido la sustitución de suero en el medio de cultivo y una apreciación de la complejidad de las necesidades celulares. Esto ha conducido al cultivo de una gran variedad de tipos de células que anteriormente eran imposibles de realizar **(Mericko, 2002).**

Un análisis cromosómico se puede realizar en una gran variedad de tejidos, pero el tejido de elección es el cultivo de linfocitos de sangre periférica, un método rápido y económico que provee un número adecuado de células en división (**Solari, 2004**), para lo cual se requiere heparinizar las jeringas evitando así la coagulación. Este procedimiento se debe realizar en condiciones de absoluta esterilidad para evitar el crecimiento bacteriano, por lo cual se agrega al medio de cultivo una mezcla de antibióticos (**Rodríguez, 2005**). La cantidad de sangre necesaria para un cultivo es de 1.0 ml y puede variar entre 0.1 y 0.8 ml en función de la técnica utilizada y de la edad de los donantes (menor cantidad en niños pequeños) (**Blennow, 2006a**).

La proliferación espontánea de las células se encuentra en la médula ósea, gónadas, tumores sólidos y la capa del citotrofoblasto de las vellosidades coriónicas, mientras que los linfocitos de sangre periférica, las muestras de líquido amniótico y biopsias de tejido deben ser cultivadas para obtener células que se dividan (**Blennow, 2006a**), éstas deben ser estimuladas mediante la adición

de agentes mitogénicos en el momento en el que se inician los cultivos celulares. El mitógeno más comúnmente empleado es la fitohemaglutinina (PHA) para la estimulación de los linfocitos de células T CD4. Para detener las células en metafase se utilizan agentes mitostáticos los cuales inhiben la formación del huso acromático como la colchicina o el colcemid (**Moore, 2001a**).

El colcemid es un análogo sintético de la colchicina, sumamente activo.
El colcemid se añade a las 70 hrs de cultivo celular para el arresto de las células en metafase por degradación de los microtúbulos del huso; esenciales para el correcto proceso mitótico (**www.genycell.com**). El tiempo de exposición a colcemid varía dependiendo de la actividad proliferativa de las células. La exposición prolongada a colcemid o el uso de altas concentraciones aumenta la proporción de cromosomas en la metafase final, dando por resultado el acortamiento de los cromosomas. La exposición óptima establece un equilibrio entre estos parámetros (**Pack, 2002**).

El tratamiento con una solución salina hipotónica justo antes de la cosecha permite la hinchazón de los núcleos (**Moore, 2001a**). Las preparaciones deben de tener una adecuada dispersión de los cromosomas, los cuales no deben de aparecer amontonados o sobrepuestos, esto se logra con el uso de soluciones hipotónicas, como la solución de citrato de sodio al 0.7% o del cloruro de potasio 0.075M (Rodríguez, 2005). El tratamiento de la solución hipotónica permite la dispersión y separación de los cromosomas (**Moore, 2001a**).

Los preparados se realizan con un fijador para la cromatina de las células (metanol-ácido acético 3:1), para que posteriormente la suspensión sea goteada sobre un portaobjetos (permitiendo el estallido celular) y se secan al aire. Dichos preparados pueden teñirse con Giemsa (**Solari, 2004**).

CUESTIONARIO PREVIO

1.- ¿Qué tipo de sustancia es la fitohemaglutinina, de donde se obtiene, cuál es su función y su mecanismo de acción?

2.- ¿Cuál es la función de la solución hipotónica y en qué concentración se usa?

3.- Define el término ideograma y cariotipo y menciona cuál es la diferencia entre ellos.

4.- ¿Por que se utiliza sangre entera como tejido de rutina en los laboratorios de citogenética?

5.- ¿Qué función tiene la solución fijadora, cuál es la que se utiliza y en qué concentración?

6.- Menciona otros tejidos de los cuales se pueden obtener cromosomas y señala en que casos se indica su uso.

7.- Menciona otros medios de cultivo celular, qué contienen y a qué pH deben de estar.

8.- ¿Qué clase de sustancia es la colchicina, su fórmula química, de dónde se obtiene, cuál es su función y su mecanismo de acción?

9.- ¿Por qué se debe utilizar heparina y no otro anticoagulante?

10.¿Qué crees que pasaría si se prolonga el tiempo de incubación de los cultivos, si se deja actuar más de dos horas la colchicina, si te excedes en la cantidad de fitohemaglutinina, si colocas poco medio en relación a la cantidad de sangre?

EQUIPO, REACTIVOS Y MATERIALES PARA LA PRÁCTICA

Material y equipo por persona

2 frascos de cultivo
1 pipeta serológica de 10 ml
2 tapones para frascos de cultivo
1 pinza Adson sin dientes de 14 cm.
2 pipetas Pasteur
2 tubos de centrífuga de vidrio punta V.
2 bulbos de hule ámbar para pipeta Pasteur

Material por equipo

Centrífuga clínica
Incubadora a 37oC
Agitador tipo Vórtex
Bomba de vacío con trampa
Refrigerador
Campana de esterilidad o flujo laminar
Caja de portaobjetos
Caja de cubreobjetos de 24 X 50 mm
Perilla de goma para pipeta serológica
Jeringa desechable de 5 ml

Reactivos, soluciones y material biológico

Cloruro de benzalconio
Cloruro de potasio 0.075 M
Colorante de Giemsa en solución.
Medio de cultivo (Ham F-10 o McCoy 5A modificado)
Heparina 10000 UI
Colchicina 0.04 %
Sangre fresca heparinizada
Alcohol como desinfectante
Solución fijadora Metanol: Ácido Acético 3:1

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

A) Lavado del material para el cultivo celular

1. Remojar el material de 2 a 12 horas, dependiendo de lo sucio que se encuentre, en una solución del jabón extrán Merck. Este jabón puede prepararse al 1 % o incluso concentrarle un poco más dependiendo también de qué tan sucio esté el material.
2. Cepillar con escobillón perfectamente todos los objetos a lavar, por fuera y por dentro.
3. Comenzar los enjuagues del material con agua corriente y continuar cepillando los objetos.
4. Enjuagar 10 veces al chorro de agua o hasta la apreciación de que no exista más detergente.
5. Enjuagar 3 veces en tinas diferentes de agua destilada.
6. Dejar escurrir y secar en el horno.
7. Envolver y esteriizar el material como se le indique.
8. El material se puede dejar sumergido en esta mezcla durante toda la noche, para que al día siguiente se proceda al lavado con extrán.

B) Obtención de la muestra

1. Obtener de 1.5 a 2 ml de sangre venosa por medio de una jeringa heparinizada (éste es el único anticoagulante que se puede usar).
2. Limpiar perfectamente la zona de venopunción con agua y jabón y desinfectar con, por lo menos, tres torundas humedecidas con alcohol.

3. Ligar el antebrazo y realizar la punción. Una vez obtenida la sangre mezclar muy bien rotando la jeringa. No olvidar que toda la operación se debe de realizar dentro de la zona estéril donde se está trabajando.

C) Siembra de linfocitos

1. Adicionar a cada frasco de cultivo limpio y estéril:

Medio de cultivo	8 ml
Fitohemaglutinina	0.4 ml
Sangre entera	0.5 ml

2. Mezclar bien el contenido de los frascos e incubar en la estufa a 37º C durante 70 horas.
3. Cumplidas las 70 horas agregar con una pipeta Pasteur a cada frasco de cultivo 25 µl de colchicina al 0.04 %. Ya no son necesarias las condiciones de esterilidad.
4. Mezclar bien y continuar la incubación por 2 horas más.

D) Cosecha de linfocitos

1. Una vez completado el periodo de incubación, sacar los frascos de la estufa y transferir su contenido a tubos de centrífuga punta cónica centrifugándolos a 3000 rpm., durante 10 minutos.
2. Retirar el sobrenadante y adicionar 8 ml de KCl 0.075 M a 37 ºC. Resuspender muy bien con ayuda de un vórtex el paquete celular e incubar durante 30 minutos a 37 ºC.
3. Centrifugar los tubos durante 5 minutos a 3000 rpm. y desechar el sobrenadante. Resuspender el paquete celular.
4. Con agitación constante agregar lentamente 8 ml de la solución fijadora de etanol o metanol/ácido acético proporción 3:1 recientemente preparada y fría. Evitar la formación de grumos.
5. Dejar actuar la solución fijadora durante 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Repetir el proceso de fijación 2 veces más a tiempos de 15 minutos cada uno.
7. Después de la tercera fjación centrifugar 5 minutos y dejar un poco de solución fijadora para hacer una suspensión celular adecuada.
8. Resuspender el paquete celular y dejar caer 3 gotas de esta suspensión sobre un porta objetos limpio y frío desde una altura aproximada de 20 cm. Dejar secar.

E) Tinción de cromosomas

1. En un vaso de Coplin preparar el colorante Giemsa con agua destilada en proporción 1:10.
2. Sumergir los portaobjetos en el vaso de 10 a 30 minutos dependiendo de la capacidad tintorea del colorante.
3. Enjuagar con agua corriente y secar al aire.

F) Observación al microscopio

1.Observar al microscopio óptico con los objetivos 10x, 25x y 40x. Localizar las mejores metafases y anotar las coordenadas.
2.Montar los portaobjetos con resina sintética que deberá dejarse secar por lo menos 2 días.
3.Estudiar las metafases seleccionadas con el objetivo de inmersión (100x), siguiendo los procedimientos descritos en el tema "Análisis cromosómico".

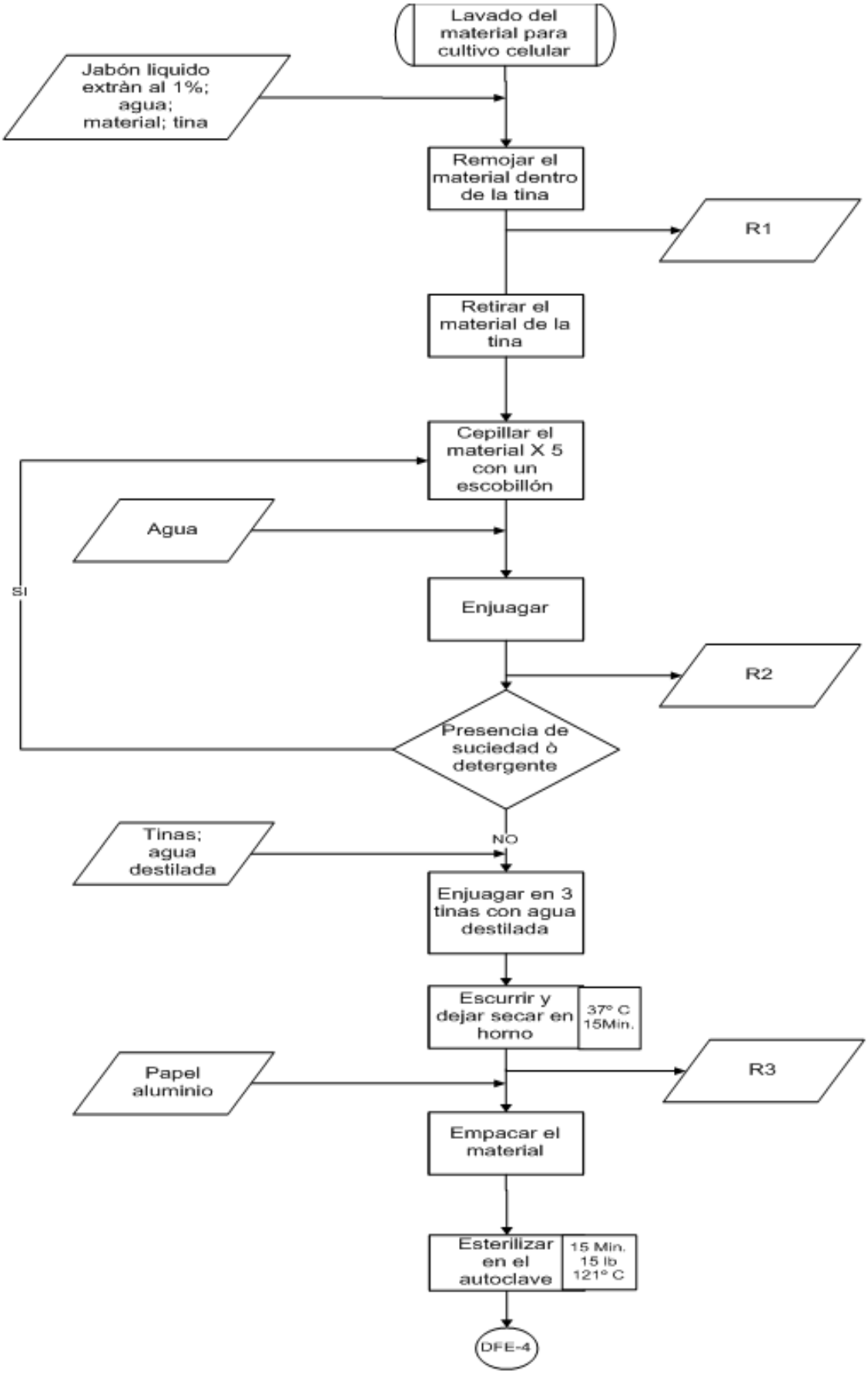

Lavado del material para cultivo celular
Jabón liquido extràn al 1%; agua; material; tina
Remojar el material dentro de la tina
R1
Retirar el material de la tina
Cepillar el material X 5 con un escobillón
Agua
SI
Enjuagar
R2
Presencia de suciedad ò detergente
NO
Tinas; agua destilada
Enjuagar en 3 tinas con agua destilada
Escurrir y dejar secar en horno
37° C 15Min.
R3
Papel aluminio
Empacar el material
Esterilizar en el autoclave
15 Min. 15 lb 121° C
DFE-4

Figura 2

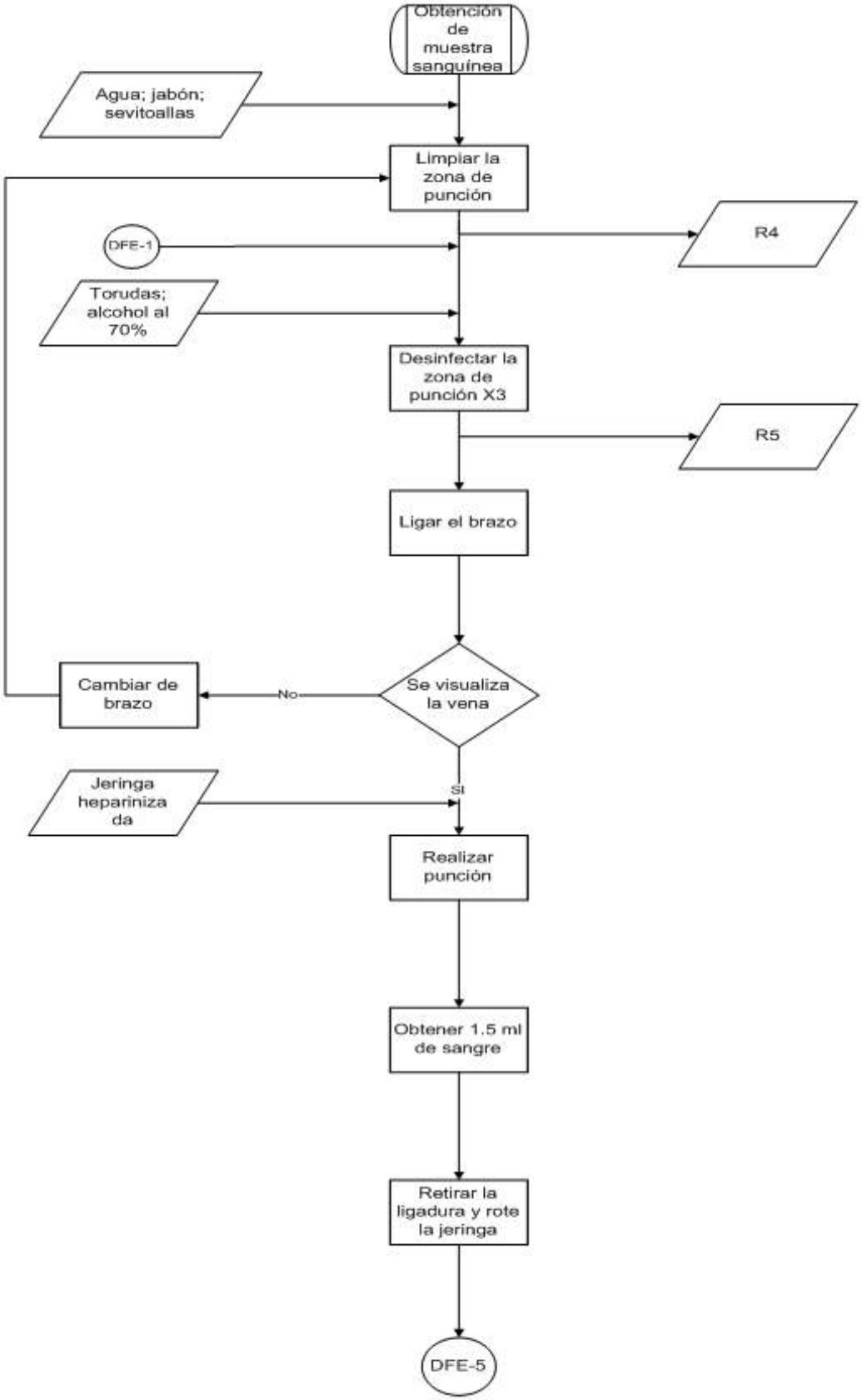

Obtención de muestra sanguínea
Agua; jabón; sevitoallas
Limpiar la zona de punción
R4
DFE-1
Torudas; alcohol al 70%
Desinfectar la zona de punción X3
R5
Ligar el brazo
Cambiar de brazo
No
Se visualiza la vena
Jeringa heparinizada
SI
Realizar punción
Obtener 1.5 ml de sangre
Retirar la ligadura y rote la jeringa
DFE-5

Figura 3

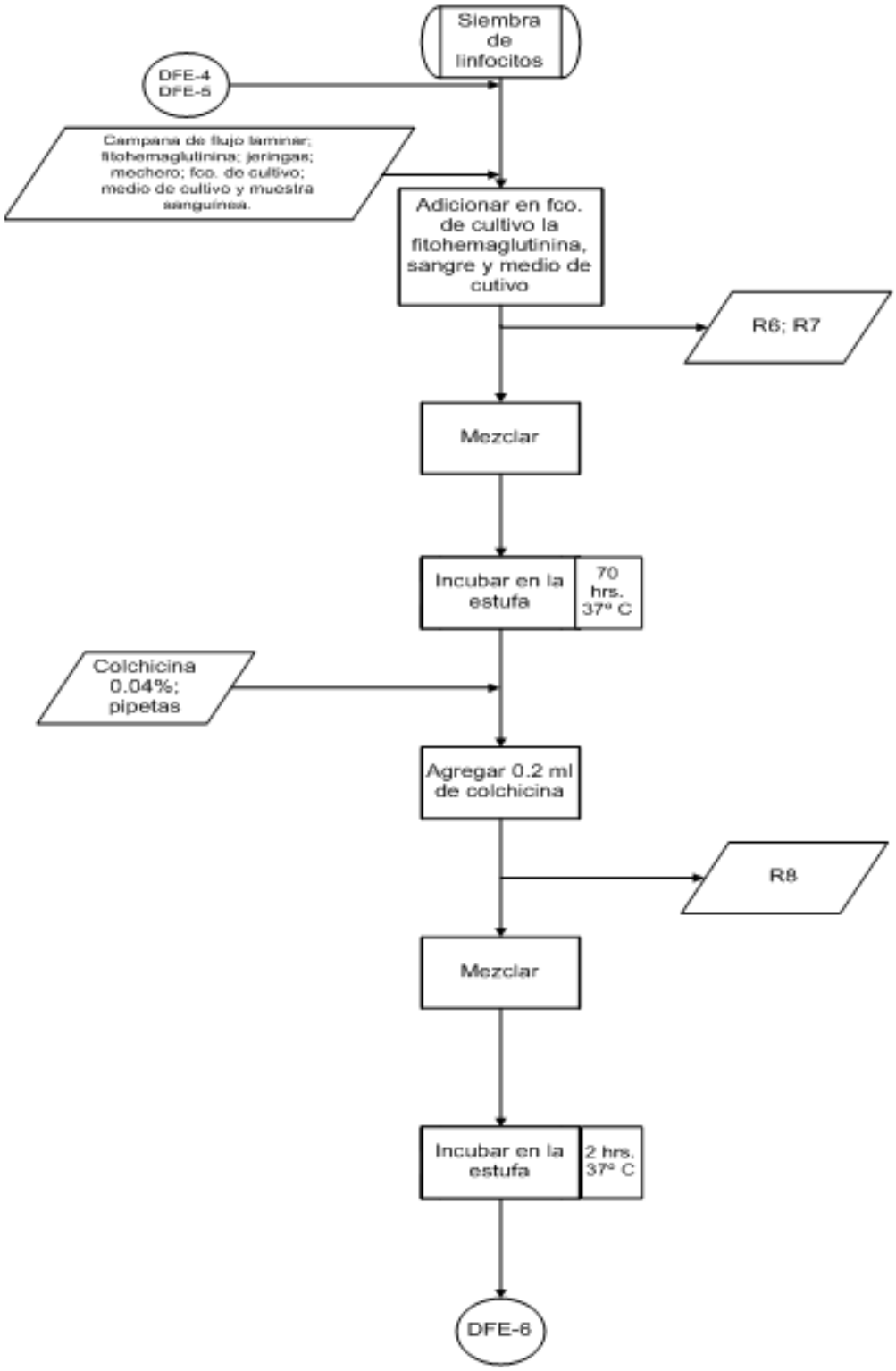

Siembra de linfocitos
DFE-4
DFE-5
Campana de flujo laminar; fitohemaglutinina; jeringas; mechero; fco. de cultivo; medio de cultivo y muestra sanguínea.
Adicionar en fco. de cultivo la fitohemaglutinina, sangre y medio de cutivo
R6; R7
Mezclar
Incubar en la estufa
70 hrs. 37° C
Colchicina 0.04%; pipetas
Agregar 0.2 ml de colchicina
R8
Mezclar
Incubar en la estufa
2 hrs. 37° C
DFE-6

Figura 4

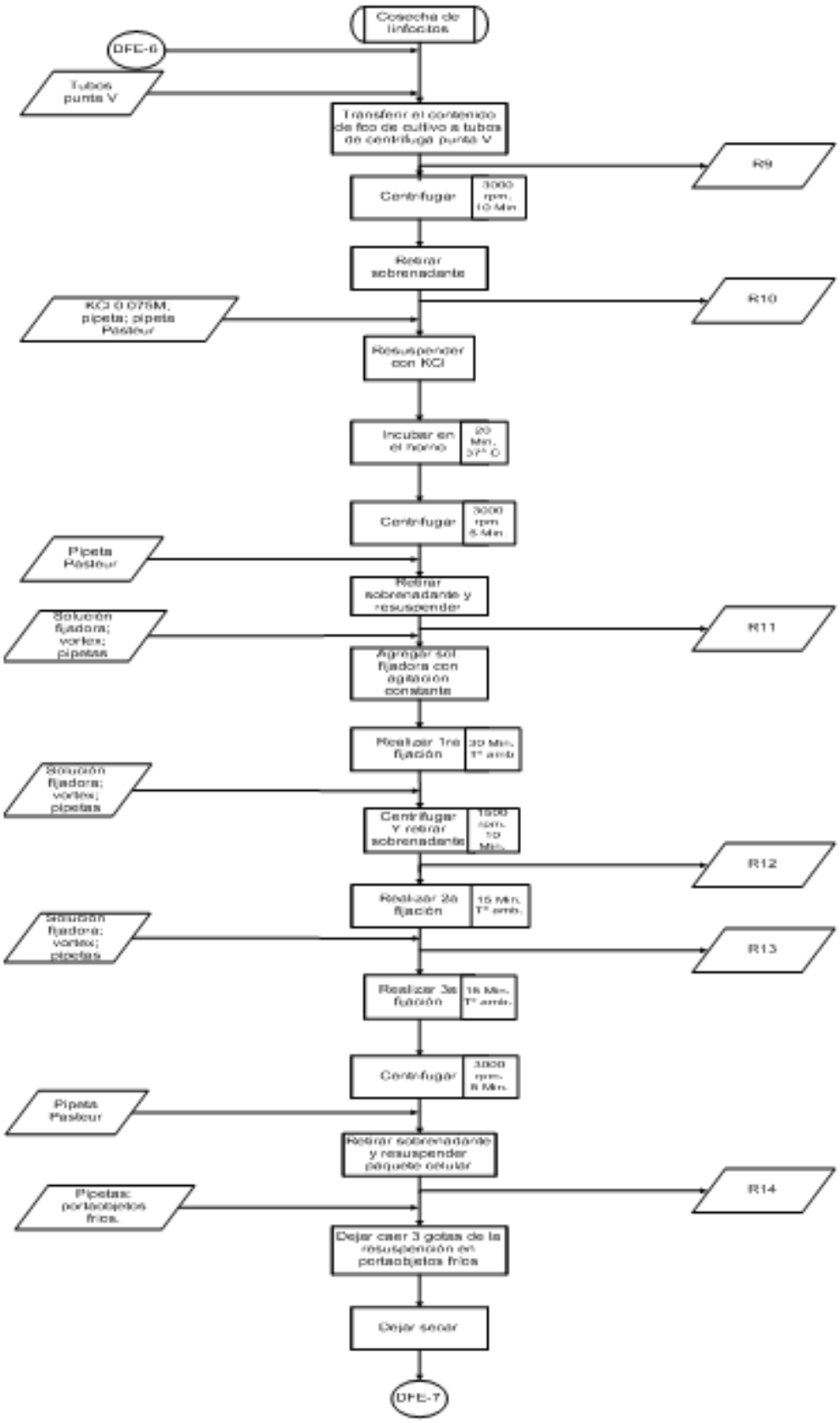

Cosecha de linfocitos
DFE-6
Tubos punta V
Transferir el contenido de foo de cultivo a tubos de centrífuga punta V
R9
Centrifugar
3000 rpm. 10 Min.
Retirar sobrenadante
R10
KCl 0.075M, pipeta; pipeta Pasteur
Resuspender con KCl
Incubar en el horno
20 Min. 37° C
Centrifugar
3000 rpm 5 Min
Pipeta Pasteur
Retirar sobrenadante y resuspender
Solución fijadora; vortex; pipetas
R11
Agregar sol fijadora con agitación constante
Realizar 1ra fijación
Solución fijadora; vortex; pipetas
Centrifugar Y retirar sobrenadante
R12
Realizar 2da fijación
15 Min. T° amb.
Solución fijadora; vortex; pipetas
R13
Realizar 3a fijación
Centrifugar
3000 rpm. 5 Min.
Pipeta Pasteur
Retirar sobrenadante y resuspender paquete celular
R14
Pipetas; portaobjetos fríos.
Dejar caer 3 gotas de la resuspensión en portaobjetos fríos
Dejar secar
DFE-7

Figura 5

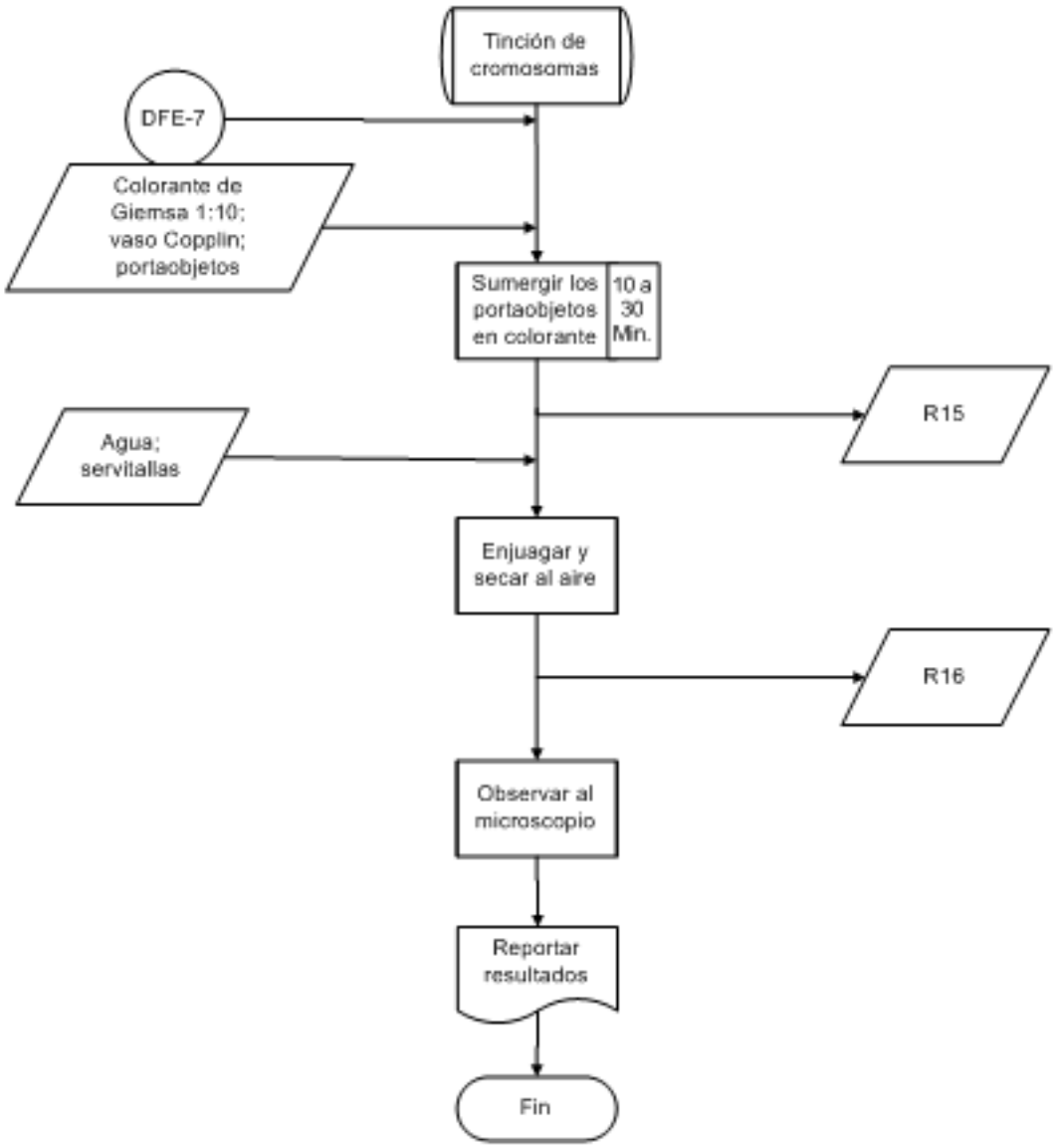

Tinción de cromosomas
DFE-7
Colorante de Giemsa 1:10; vaso Copplin; portaobjetos
Sumergir los portaobjetos en colorante
10 a 30 Min.
R15
Agua; servitallas
Enjuagar y secar al aire
R16
Observar al microscopio
Reportar resultados
Fin

Figura 6

Tabla 1

Número de residuo	Residuo	Norma que regula su recolección o almacenamiento	Disposición
R1	Agua jabonosa	NOM-002-ECOL-1996	Tarja o desagüe
R2	Agua sucia	NOM-002-ECOL-1996	Tarja o desagüe
R3	Agua jabonosa.	NOM-002-ECOL-1996	Tarja o desagüe
R4	Servitoallas sucias.	NOM-087-ECOL-SSA1-2002.	Bolsa de basura negra, basurero municipal.
R5	Torundas de alcohol.	NOM-087-ECOL-SSA1-2002.	Bolsa de basura negra, basurero municipal.
R6	Jeringa con sangre.	NOM-087-ECOL-SSA1-2002.	Almacenamiento en recipiente hermético rojo para su posterior recolección.
R7	Pipeta con trazas de fitohemaglutinina.	NOM-002-ECOL-1996	Lavado común
R8	Pipeta con trazas de colchicina	NOM-002-ECOL-1996	Inactivación en cloro y lavado común
R9	Frasco con medio de cultivo	NOM-087-ECOL-SSA1-2002	Bolsa de basura negra, basurero municipal.
R10	Sobrenadante	NOM-087-ECOL-SSA1-2002.	Inactivación en cloro y lavado común
R11	Sobrenadante con KCl	NOM-087-ECOL-SSA1-2002	Inactivación en cloro y lavado común
R12	Sobrenadante con metanol: ác. acético	NOM-087-ECOL-SSA1-2002	Almacenamiento en recipiente para su posterior recolección
R13	Sobrenadante con metanol: ác. acético	NOM-002-ECOL-1996	Almacenamiento en recipiente para su posterior recolección
R14	Sobrenadante con metanol: ác. acético	NOM-002-ECOL-1996	Almacenamiento en recipiente para su posterior recolección
R15	Solución de Giemsa	NOM-002-ECOL-1996	Almacenamiento en recipiente para su posterior recolección
R16	Agua con trazas de Giemsa	NOM-002-ECOL-1996	Tarja o desagüe

2.1 ANÁLISIS CROMOSÓMICO
(INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA)

INTRODUCCIÓN

Hasta 1956 se creía que cada célula humana contenía 48 cromosomas. En esa fecha Tjio y Levan concluyeron correctamente, a partir de sus estudios, que cada célula somática humana normal contenía únicamente 46 cromosomas. Los métodos que utilizaron, con ciertas modificaciones, se emplean hoy en día universalmente en los laboratorios de citogenética para analizar la constitución cromosómica de un individuo, lo que se conoce como cariotipo (**Turnpenny, 2009**).

El cariotipo es el término usado para describir el complemento cromosómico de una célula; y éste varía considerablemente de una especie a otra (**Puerto. 2001**). El cariotipo humano está formado por 22 pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales, XX o XY. Cada cromosoma humano contiene un determinado número de genes y de pares de bases en función a su tamaño. (**Bickmore, 2001**).

El análisis cromosómico consiste en contar el número de cromosomas presentes en un número específico de células, seguido por un análisis cuidadoso del patrón de bandeo de cada cromosoma individual en las células seleccionadas. Dicho análisis se realiza en ambos miembros de cada par de homólogos (Turnpenny, 2009). Se suguiere analizar de 20 a 25 metafases para dar un buen diagnóstico (**Swansbury, 2003**).

Los cromosomas en metafase tienen dos cromátidas (también llamadas cromátidas hermanas), que se mantienen unidas por medio del centrómero. El centrómero divide a cada una de las cromátidas en dos brazos. El brazo corto se representa con la letra p, el brazo largo con la letra q. Las regiones en ambos extremos de los cromosomas corresponden a los telómeros (**Speicher, 2006**), ver figura 7.

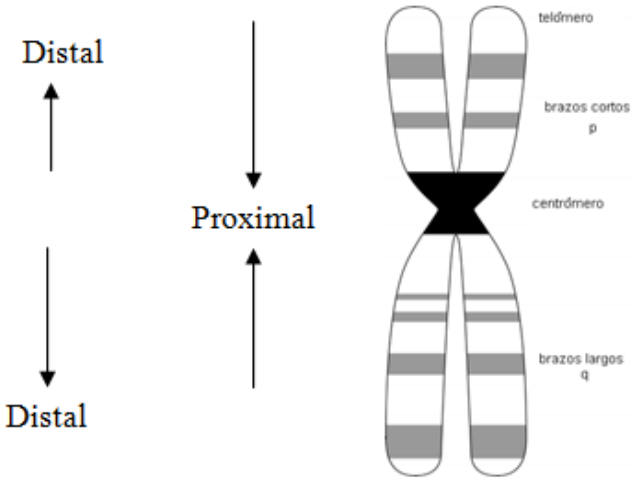


Figura 7. Partes de un cromosoma en metafase

Los cromosomas con base en su posición centromérica se clasifican en: metacéntricos, cuando el centrómero divide al cromosoma en brazos cortos y largos casi de igual longitud. Submetacéntricos, en donde, el centrómero no está situado en el centro y divide al cromosoma en brazos cortos y largos de diferente longitud (como se muestra en la figura 8); y acrocéntricos, cuando desplazado hacia un extremo y divide al cromosoma en brazos muy cortos y brazos largos, lo cual generalmente les da un aspecto de "herradura" con unas estructuras denominadas satélites, colocadas arriba de los brazos cortos.

Los cromosomas telocéntricos no existen en la especie humana. Son aquellos cuyo centrómero se encuentra en el extremo y carecen de brazos cortos **(Speicher, 2006)**.

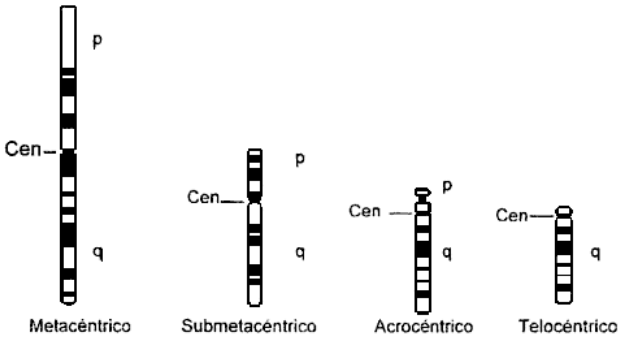


Figura 8. Tipos de cromosomas (Rodríguez, 2005)

La representación gráfica simplificada del cariotipo se llama ideograma (ver figura 9). Para hacer una representación gráfica y cuantitativa de los cromosomas se utilizan valores de longitud relativa (relación entre la longitud del cromosoma en cuestión y la longitud del complemento haploide), el índice centromérico (i.c. relación entre la longitud del brazo corto del cromosoma y la longitud total del mismo), cuyos valores oscilan entre cero (telocéntrico) y 0.5 (metacéntrico) y, el índice de brazo (i.b. relación entre las longitudes del brazo corto y el largo del cromosoma), cuyo valores oscilan entre cero (telocéntrico) y 1 (metacéntrico) (**Lacadena, 1996**).

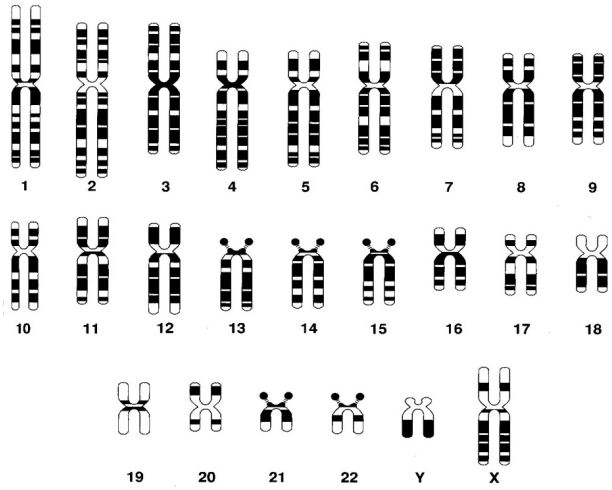


Figura 9. Ideograma de los cromosomas humanos por medio de bandeo G

Cuando los cromosomas se tiñen por métodos los cuales no producen bandas, éstos se pueden ordenar fácilmente en 7 grupos (A-G), de acuerdo al orden descendente por tamaños y posición del centrómero **(Shaffer, 2005)**. Como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 2. Clasificación de los cromosomas humanos sin técnicas de bandeo. (Wyandt, 2004)

GRUPO	DESCRIPCIÓN
Grupo A 1-3	El par 1 es el par metacéntrico más grande del cariotipo, su i.c. es de 48-49, presenta una constricción secundaria en la región pericentromérica lo que lo hace ser polimófico en cuanto a tamaño. El par 2 es submetacéntrico y un poco más corto que el par 1, con un i.c. de 45-46. El par 3 es metacéntrico y es aprox. 20% más corto que el par 1, su i.c. es de 38-40
Grupo B 4-5	Son cromosomas submetacéntricos. Estos son difíciles de distinguir uno del otro sin una técnica de bandeo, pero el cromosoma 4 es ligeramente más largo que el cromosoma 5. El i.c. es de 24-30
Grupo C 6-12 incluyendo al cromosoma “X”	Es el grupo más difícil de identificar. Los pares 6,7,8 y 11 son relativamente metacéntricos con un i.c. de 35-40, mientras que los pares 9,10 y 12 son relativamente submetacétricos con un i.c. menor de 27-35. El cromosoma 9 también tiene una constricción secundaria que lo hace ser polimórfico. El cromosoma “X· se incluye en este grupo por su tamaño y posición centromérica. Tiene el tamaño entre los pares 6 y 7, requiere de alguna técnica de bandeo para su correcta identificación
Grupo D 13-15	Son los seis cromosomas acrocéntricos más grandes del cariotipo humano, tienen una forma característica de herradura. Estos tres pares poseen unas estructuras denomimadas satélites encima de sus brazos cortos. Su i.c. es de 15 y su correcta identificación sólo se logra con métodos de bandeo cromosómico
Grupo E 16-18	El par 16 es el más metacéntrico en comparación a los otros 2 pares del grupo. Su i.c. es de 40 y también presenta una constricción secundaria que lo hace ser polimórfico. El par 17 es submetacéntrico, su i.c. es de 31, su tamaño es intermedio entre el par 16 y 18. El par 18 es el más pequeño de los tres de este grupo, es submetacéntrico, su i.c. es de 21-26. Sus brazos cortos de los pares 17 y 18 son tan pequeños que a veces dan la apariencia de ser acrocéntricos.
Grupo F 19-20	Los pares 19 y 20 son los cromosomas más metacéntricos del cariotipo humano. Nos son distinguibles entre sí, sólo por técnicas de bandeo cromosómico. Su i.c. es de 40.
Grupo G 21-22 incluyendo al cromosoma “Y”	Los pares 21 y 22 son cromosomas acrocéntricos muy cortos, tienen satélites, sus brazos largos son divergentes, fáciles de reconocer por su tamaño y no se distinguen el uno del otro, sólo por técnicas de bandeo cromosómico. El cromosoma “Y” se incluye en este grupo porque su morfología es similar a éstos, pero tiene ciertas diferencias; ya que no tiene satélites, sus brazos largos tienden a permanecer paralelos en comparación a la posición divergente de los pares 21 y 22, se tiñe de diferente manera y es polimórfico. Las mujeres normales tienen sólo 4 cromosomas de este grupo y los varones 5, por la presencia del cromosoma “Y".

ARMADO DE UN CARIOGRAMA (FOTOCARIOTIPO)

(PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL)

Para armar un cariograma se sugiere hacer lo siguiente:

1. Proporcionar a cada alumofotografía del cariotipo de una célula donde se ven individualizados los cromosomas.
2. Traer una regla, tijeras, pegamento, hoja blanca tamaño carta y cinta adhesiva
3. Contar el número total de cromosomas.
4. Recortar las imágenes fotografiadas de todos y cada uno de los cromosomas, dando un cierto margen a la figura, nunca recortarlos por el contorno.
5. En una hoja blanca tamaño carta, trazar las líneas donde se clasificarán los cromosomas por grupos de acuerdo a las normas establecidas.
6. Escribir debajo de las líneas las letras correspondientes a cada grupo.
7. Clasificar por grupos y pares a los cromosomas homólogos. Una vez ordenados así, reubicar los cromosomas ya ordenados sobre la línea recta imaginaria, de acuerdo a dos criterios: 1) colocar los cromosomas alineados sobre la línea que pase por los centrómeros o bien 2) alinear los cromosomas sobre la línea recta, de manera tal, que el extremo inferior de los brazos cromosómicos quede por encima de ella.
8. Pegar por grupos en orden de mayor a menor tamaño de acuerdo a las normas internacionales de nomenclatura establecidas.
9. Proceder a numerarlos. El número más pequeño para el cromosoma más grande y viceversa.
10. Identificar y señalar los cromosomas sexuales.
11. Por último, fijar definitivamente todos los cromosomas en la hoja, colocando una cinta adhesiva transparente encima de cada grupo.
12. Escribir el nombre del alumno, fecha, complemento cromosómico y Dx.

ANÁLISIS CROMOSÓMICO MICROSCÓPICO

(PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL)

Para realizar el análisis cromosómico microscópico, se seguirá el siguiente método:

1. Proporcionar a cada alumno una preparación cromosómica, un microscopio óptico, papel seda y aceite de inmersión.
2. Traer colores, lápiz y un cuaderno para bitácora.
3. Revisar la laminilla con el objetivo de 10x y observar si hay un número suficiente de metafases.
4. Con el objetivo de inmersión 100x contar el número cromosómico de 25 metafases.
5. Para realizar el conteo, se sugiere que el alumno trace un círculo en su bitacora y lo divida a la mitad o en cuatro partes y a su vez el campo microscópico que esté observando, lo divida imaginariamente igual, para que vaya anotando en cada división, el número de cromosomas que vaya contando y al final sumarlos.
6. Al finalizar el conteo cromosómico, el alumno elegirá la mejor metafase, es decir, aquella que tenga el complemento cromosómico completo, que los cromosomas tengan un tamaño adecuado para poderlos clasificar y que no estén sobrepuestos.

6. Una vez elegida la metafase, trazar en la bitacora un círculo grande donde irá dibujando los cromosomas que vaya identificando tal y como los ve ubicados en el campo microscópico.
7. Identificar primero a los cromosomas del grupo A y dibujarlos de color verde, posteriormente a los del grupo B con el color rojo y después a los del grupo D con el color azul y proceder a calificar.
8. Posteriormente, a los cromosomas del grupo G y dibujarlos de color morado, los del grupo F de color naranja, los del grupo E de color amarillo y todos los que sobren se dibujarán con el color negro. Corroborar que correspondan al grupo C.
9. El profesor revisará y calificará el trabajo realizado.
10. Este método de análisis cromosómico, se realizará en varias sesiones, con preparaciones cromosómicas normales, con técnicas de bandeo y con patologías cromosómicas.

Figura 10

UNAM
CUAUTITLÁN

HOJA DE CARIOTIPO

1 2 3
A

4 5
B

6 7 8 9 10 11 12
C

13 14 15
D

16 17 18
E

19 20
F

21 22
G

Cromosomas Sexuales

SINDROME: _____ LAMINILLA: _____ FECHA: _____

CARIOTIPO: _____ ELABORADO POR: _____

Figura 11

PRÁCTICA 3
Técnica de tinción selectiva por bandeo C y G

OBJETIVO

El alumno aprenderá dos técnicas de tinción diferencial: Bandas C y Bandas G, para que, por medio de la realización de las mismas, comprenda la importancia y utilidad que tienen en la identificación correcta de cada par cromosómico y en el diagnóstico de alteraciones cromosómicas en humanos que pasan inadvertidas con la tinción de rutina.

INTRODUCCIÓN

En 1920 Pardue y Gall observaron en los cromosomas de ratón que las áreas de heterocromatina constitutiva donde se encuentra el ADN satélite se teñian de color oscuro con Giemsa después de la desnaturalización y reasociación del ADN cromosómico (Rost, 1995), por lo que este tratamiento reveló segmentos repetitivos en los cromosomas, y se denominó bandas C (**Sumitra, 2005**).

Las bandas reflejan el grado variable en que las cromátidas de los cromosomas difieren en: composición de bases, densidad génica, tiempo de replicación y conformación de la cromatina (la cromatina se puede dividir en dos tipos: eucromatina, donde se encuentran la mayoría de genes únicos y rica en G-C, y heterocromatina, rica en A-T, en elementos transponibles y secuencias repetitivas llamada también ADN satélite) (**Schenderman, 2010**).

La técnica de bandeo C marca selectivamente la heterocromatina constitutiva o cetromérica (**Miller, 2001**), mientras que la heterocromatina facultativa no se tiñe por estos métodos. En este caso, su detección se realiza a partir del patrón de replicación tardío, característico de las regiones heterocromáticas (**Puerto, 2001**). Las Bandas C varían considerablemente de tamaño en la población. La mayor variabilidad se demuestra en los satélites y brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos. Estas variaciones se denominan generalmente **heteromorfismos**, porque el término **polimorfismo** se restringe por los genetistas a una variante hereditaria que implica a los grandes bloques de heterocromatina de los cromosomas 1, 9, 16 y la parte distal del cromosoma Y, motivo por el cual las bandas más prominentes se encuentran en estos cromosomas. Los heteromorfismos y polimorfismos cromosómicos han sido utilizados como marcadores en el mapeo genético, pruebas de paternidad y la distinción de gemelos monocigóticos, dicigóticos. Incluso las variaciones extremas en el tamaño de variantes de las Bandas C son generalmente constantes de una generación a otra y demuestran la herencia mendeliana normal (**Miller, 2001**).

Las bandas C más reproducibles y mejor definidas, se obtienen realizando un pretratamiento con hidróxido de sodio o de bario y sales, a temperaturas elevadas, que extraen preferencialmente el ADN de las regiones cromosómicas con bandas negativas, la posterior coloración con Giemsa revela regiones intensamente coloreadas, que se localizan preferentemente en las regiones pericéntricas y teloméricas, ricas en ADN altamente repetitivo (**Descailleaux, 1980**), ver figura 12 .

Figura 12. Bandas C (Blennow, 2006b)

CUESTIONARIO PREVIO

1.- ¿Cuál es la función del Hidróxido de Bario y del Ácido Clorhídrico en el Bandeo C?
2.- ¿Qué utilidad tienen las técnicas de Bandeo cromosómico?
3.- ¿Cuáles cromosomas se pueden identificar perfectamente con el bandeo C y por qué?
4.- ¿Cuál es la función de la solución 2XSSC en el Bandeo C?
5.- ¿Qué tipo de cromatina pone de manifiesto el Bandeo C?
6.- ¿Cuál es el bandeo cromosómico que se utiliza de rutina en el diagnóstico citogenético y por qué?
7.- Escribe la nomenclatura que se utiliza para los bandeos cromosómicos.
8.- ¿Por qué ya no se utiliza el Bandeo Q?
9.- Explica el procedimiento para evidenciar las bandas G y menciona la función de cada uno de los reactivos que se utilizan.
10.- ¿Qué pone de manifiesto el Bandeo G?

EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES

Material por alumno

2 preparaciones cromosómicas
1 pinza Adson sin dientes
1 microscopio

Material por grupo

Vasos Coplin
Baño María
Una pizeta

Reactivos

HCL 0.2 N
$Ba(OH)_2$ 0.1 N
2 X SSC (solución salina doble de citratos)
Giemsa al 4 %
Buffer de fosfatos pH 6.8
Agua destilada

1. Utilizar preparaciones cromosómicas de dos días de maduración.

2. Colocar las laminillas en un vaso Coplin que contenga HCL 0.2 N durante 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Enjuagar con agua destilada.
4. Colocar las laminillas en un vaso Coplin con Ba(OH)2 0.1 N a 28 °C durante 8 min.
5. Enjuagar con agua destilada.
6. Colocar las laminillas en un vaso Coplin con solución 2XSSC durante 2 horas a 60–65 °C.
7. Enjuagar con agua destilada.
8. Teñir con Giemsa al 4 % con buffer de fosfatos pH 6.8.
9. Observar al microscopio y estudiar las metafases seleccionadas con el objetivo seco fuerte.

Nota: Para realizar el análisis cromosómico, una vez colocada la laminilla con la preparación en el microscopio, se inicia la observación con el objetivo 10X para la localización de las metafases, y después el objetivo 100X con aceite de inmersión para el estudio de las metafases. Es más fácil la localización de ellas si la laminilla se mueve suavemente de abajo hacia arriba y de izquierda a derecha (**Swansbury, 2003**):

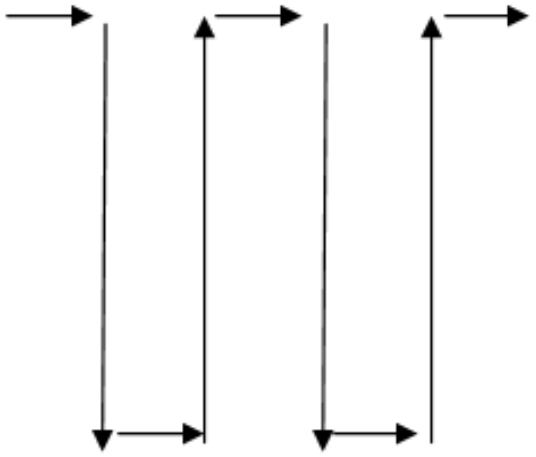


Figura 13. Reporte sus observaciones indicando si encontró polimorfismo

CONSEJOS Y SUGERENCIAS

- Con base en nuestra experiencia, el $Ba(OH)_2$ que tiene más tiempo de preparado, es el que produce mejor patrón de bandas.
- Durante el uso, el contenedor con $Ba(OH)_2$ debe estar cerrado para prevenir los depósitos de cristales de carbonato de bario que se forman en las laminillas. Éstos deben de ser retirados por lavados; pero, sí persisten, enjuagar brevemente con una solución diluída de HCl.

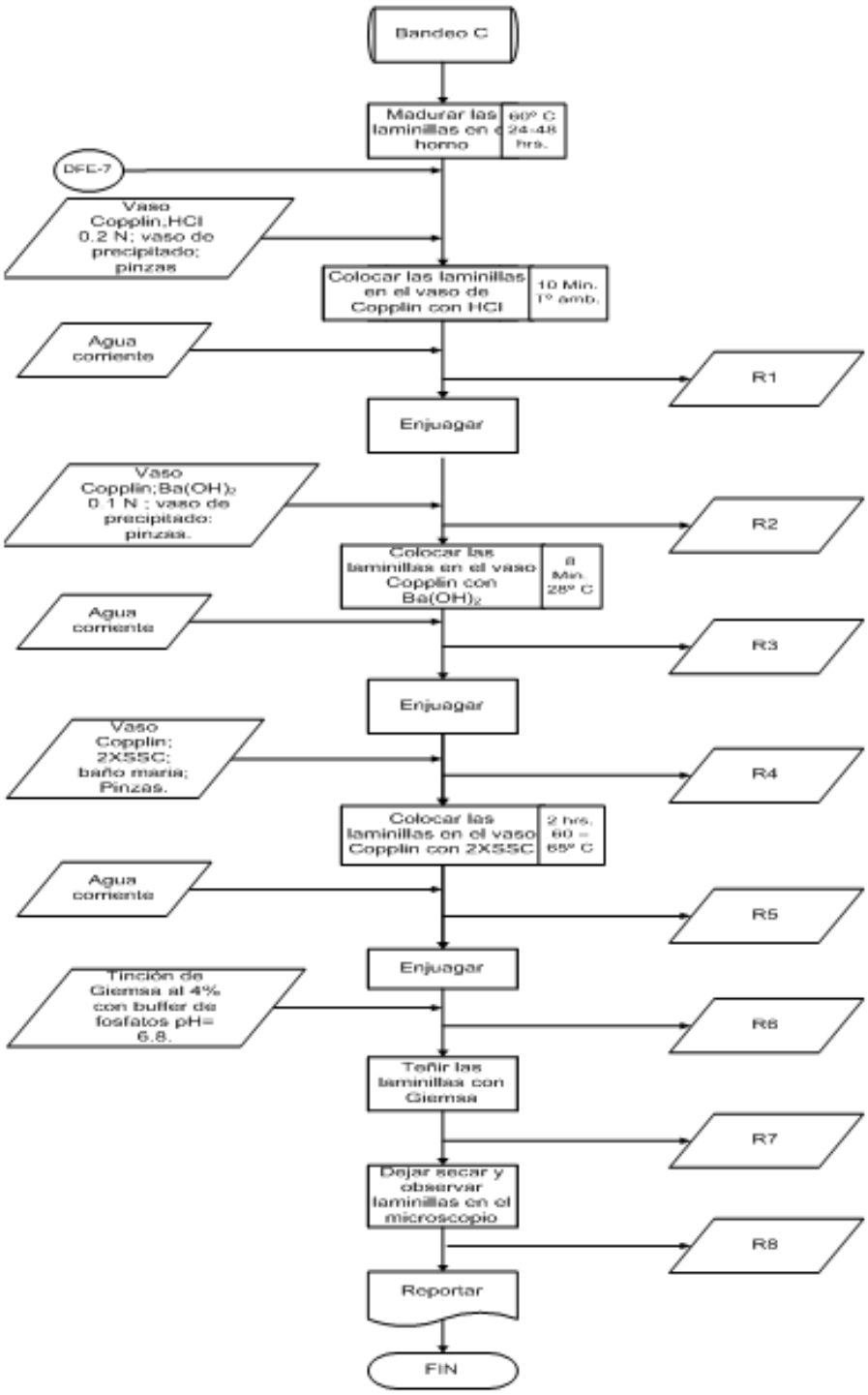

Bandeo C
Madurar las laminillas en el horno
60° C 24-48 hrs.
DFC-7
Vaso Copplin,HCl 0.2 N; vaso de precipitado; pinzas
Colocar las laminillas en el vaso de Copplin con HCl
10 Min. 1° amb.
Agua corriente
R1
Enjuagar
Vaso Copplin;Ba(OH)2 0.1 N ; vaso de precipitado; pinzas.
R2
Colocar las laminillas en el vaso Copplin con Ba(OH)2
8 Min. 28° C
Agua corriente
R3
Enjuagar
Vaso Copplin; 2X SSC; baño maría; Pinzas.
R4
Colocar las laminillas en el vaso Copplin con 2X SSC
2 hrs. 60 - 65° C
Agua corriente
R5
Enjuagar
Tinción de Giemsa al 4% con buffer de fosfatos pH= 6.8.
R6
Teñir las laminillas con Giemsa
R7
Dejar secar y observar laminillas en el microscopio
R8
Reportar
FIN

Figura 14

Tabla 3

Número de residuo	Residuo	Norma que regula su recolección o almacenamiento	Disposición
R1	Acido clorhídrico (HCl)	NOM-052-SEMARNAT-2005 NOM-002-ECOL-1996	Neutralizar con una base hasta obtener un pH cercano a la neutralidad y verter a la tarja ó desagüe
R2	Agua con trazas de ácido clorhídrico	NOM-052-SEMARNAT-2005 NOM-002-ECOL-1996	Tarja ó desagüe
R3	Hidróxido de Bario $Ba(OH)_2$	NOM-052-SEMARNAT-2005 NOM-002-ECOL-1996	Neutralizar con un ácido hasta obtener un pH cercano a la neutralidad y verter a la tarja ó desagüe
R4	Agua con trazas de hidróxido de bario	NOM-052-SEMARNAT-2005 NOM-002-ECOL-1996	Tarja ó desagüe
R5	Solución salina doble citratos. (2 X SSC)	NOM-052-SEMARNAT-2005 NOM-002-ECOL-1996	Verter a la tarja ó desagüe con abundante agua
R6	Agua con trazas de solución salina doble citratos	NOM-002-ECOL-1996	Tarja ó desagüe
R7	Solución de Giemsa	NOM-002-ECOL-1996	Verter a la tarja ó desagüe con abundante agua
R8	Laminillas	NOM-087-ECOL-SSA1-2002	Contenedor de desechos de vidrio. Basurero municipal

3.1 BANDEO G

INTRODUCCIÓN

El bandeo G fue descubierto por accidente durante los intentos de mejorar la técnica del bandeo C, ya que la técnica de Pardue y Gall producía en una célula bandas a lo largo de todo el cromosoma. Así mediante modificaciones a esta técnica, se obtuvo el patrón correspondiente a las bandas G (**Rost, 1995).**

El bandeo G es la técnica de rutina para el diagnóstico citogenético, ya que tiene la gran ventaja de ser permanente, barata, menos tóxica y, por tanto, es más adecuada que el patrón de bandas fluorescentes.

Este patrón se obtiene, cuando los cromosomas se tratan previamente con una solución salina a 60 ^{0}C o con una enzima pro-teolítica, como la tripsina, antes de la tinción con Giemsa u otro colorante. Generalmente, el patrón diferencial de las bandas se observa sobre determinadas regiones cromosómicas específicas, ya que las bandas oscuras corresponden a las regiones heterocromáticas y las pálidas a las regiones eucromáticas. Este patrón se desarrollo inicialmente para el análisis de un segmento en un cromosoma humano (**Miller, 2001**), ver figura 15.

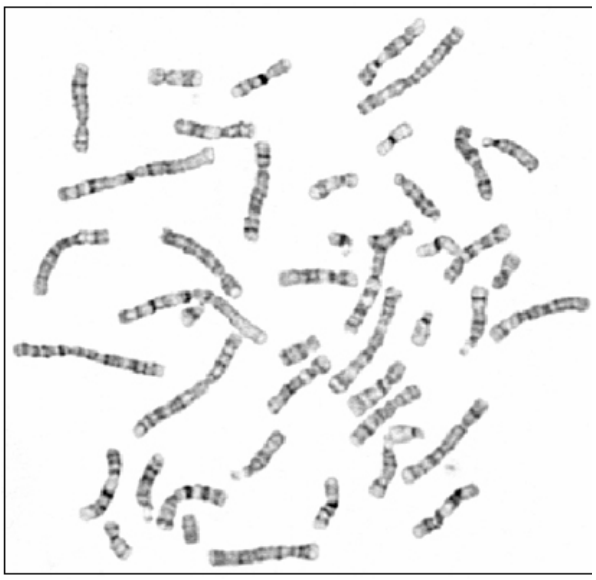


Figura 15. Bandas G

EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES

Material por alumno y equipo

- 2 preparaciones cromosómicas
- 1 pinza Adson sin dientes
- 1 microscopio
- Cubrebocas
- Marcador indeleble
- Guantes de látex o vinilo
- 1 pizeta

Material por grupo

- 1 Baño María
- 5 Vasos Coplin

Reactivos

Solución salina fisiológica
Tripsina 20 mg/50 ml
Bicarbonato de sodio 7 %
Solución de EDTA al 1 %
Buffer de fosfatos 0.06 M pH 6.8
Etanol al 70 %
Colorante de Giemsa

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. Sembrar y cosechar de la manera habitual (ver cap 1.4).
2. Utilizar laminillas previamente maduras en la estufa a 60ºC por 24 h.
3. Sumergir las laminillas en un vaso Copplin que contenga solución salina fisiológica durante un minuto.
4. Introducir las laminillas en una solución a 37ºC de tripsina (20 mg/50 ml) bufferada a pH de 8 con bicarbonato de sodio a 7 % de 10 a 15 segundos, aunque el tiempo puede incrementarse hasta 20 segundos dependiendo de la nitidez de las bandas, una vez que éstas se observan al microscopio. Cabe mencionar que con las condiciones a las cuales se trabaja en el laboratorio, el tiempo óptimo de digestión es de 17 segundos.
5. Una vez concluida la digestión, sumergir las laminillas en una solución de EDTA al 1 % durante 15 a 20 segundos.
6. Enjuagar las laminillas por inmersión en dos vasos Coplin que contengan buffer de fosfatos 0.06 M a pH de 6.8 o bien en etanol al 70 %.
7. Teñir con Giemsa 1:10 durante 7 minutos.
8. Observar al microscopio y reportar los resultados.

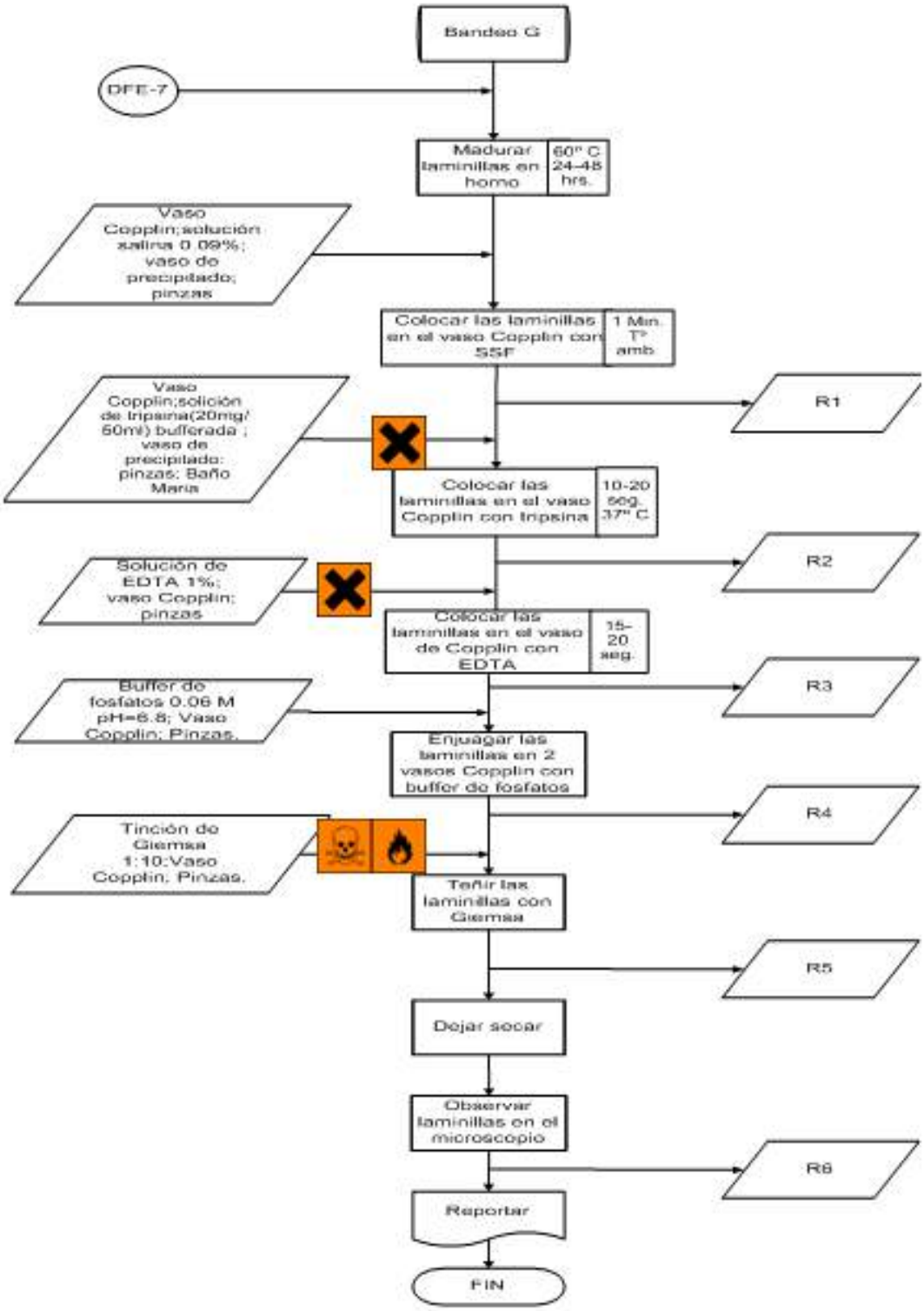

Bandeo G
DFE-7
Madurar laminillas en horno
60° C 24-48 hrs.
Vaso Copplin;solución salina 0.09%; vaso de precipitado; pinzas
Colocar las laminillas en el vaso Copplin con SSF
1 Min. T° amb
R1
Vaso Copplin;solición de tripsina(20mg/ 60ml) bufferada ; vaso de precipitado: pinzas; Baño María
Colocar las laminillas en el vaso Copplin con tripsina
10-20 seg. 37° C
R2
Solución de EDTA 1%; vaso Copplin; pinzas
Colocar las laminillas en el vaso de Copplin con EDTA
15-20 seg.
R3
Buffer de fosfatos 0.06 M pH=6.8; Vaso Copplin; Pinzas.
Enjuagar las laminillas en 2 vasos Copplin con buffer de fosfatos
R4
Tinción de Giemsa 1:10;Vaso Copplin, Pinzas.
Teñir las laminillas con Giemsa
R5
Dejar secar
Observar laminillas en el microscopio
R6
Reportar
FIN

Figura 16

Tabla 4

Número de residuo	Residuo	Norma que regula su recolección o almacenamiento	Disposición
R1	Solución salina fisiológica	NOM-052-SEMARNAT-2005 NOM-002-ECOL-1996	Tarja ó desagüe
R2	Tripsina	NOM-002-ECOL-1996	Verter a la tarja ó desagüe con abundante agua
R3	EDTA	NOM-002-ECOL-1996	Neutralizar con abundante agua y Tarja ó desagüe
R4	Buffer de fosfatos	NOM-002-ECOL-1996	Verter a la Tarja ó desagüe con abundante agua
R5	Solución de Giemsa	NOM-002-ECOL-1996	Verter a la tarja ó desagüe con abundante agua
R6	Laminillas	NOM-087-ECOL-SSA1-2002	Recipiente de residuos de vidrio. Basurero municipal

PRÁCTICA 4

Identificación de la cromatina "X" y de la cromatina "Y" en células de la mucosa oral

OBJETIVO

El alumno aprenderá las técnicas para la observación de la Cromatina "X" y de la Cromatina "Y" en células epiteliales de la mucosa oral, por medio de la realización de las mismas para que comprenda la utilidad que tienen estas pruebas en la determinación de los cromosomas sexuales presentes en el genoma de un individuo y su correlación con alguna patología.

INTRODUCCIÓN

En la década de los 40´s el embriólogo francés Alfred Jost observó que cuando se le extirpaban las gónadas indiferenciadas al feto de un conejo macho antes de que hubiera comenzado el desarrollo masculino, éste se desarrollaba como una hembra. Las gónadas, los conductos deferentes (mesonéfricos y paramesonéfricos) y los genitales externos se desarrollan a partir de un estadío indiferenciado aproximadamente al final de la sexta semana de embarazo en los seres humanos, después de que migraron las células germinales del primordio del embrión dentro de las gónadas al inicio indiferenciadas. En las gónadas pueden distinguirse una parte interna (médula) y otra externa (corteza) (**Passarge, 2004**). Estudios recientes han demostrado que la diferenciación de la gónada se produce en el momento mismo de la edad del feto (7 ª semana), para el testículo y para el ovario, alrededor de la novena semana de vida embrionaria, en el ser humano (**Sizonenko, 2011**).

En los mamíferos, con la presencia de los cromosomas XY, la gónada bipotencial se diferencia hacia testículo bajo la influencia del gen SRY (gen responsable de la diferenciación testicular), así como el factor determinante del testículo TDF (por sus siglas en inglés testis-determinning factor) localizados en el cromosoma Y. Los testículos producen testosterona, necesaria para la diferenciación del conducto de Wolff en el epidídimo, conductos deferentes, las vesículas seminales y MIS (sustancia inhibidora de los conductos de Müller, también conocida como hormona anti-Mulleriana o AMH) la cual causa la regresión de los conductos de Müller, útero, trompas de falopio y la parte superior de la vagina en especies de mamíferos (**Teixeira et al., 2001**). Por lo tanto, en ausencia de un cromosoma Y y SRY, la gónada indiferenciada se diferencia hacia ovario. Sin testosterona, el conducto de Wolff se degenera, y sin MIS, los conductos de Müller se diferencian en vagina superior, útero y las trompas de falopio (**Teixeira et al., 2001**).

Los cromosomas sexuales de los mamíferos son muy heteromorfos, ya que en las hembras los dos cromosomas X son completamente homólogos, mientras que en los machos no, por que el cromosoma X es grande y genéticamente rico: tiene muchos genes activos imprescindibles para la vida, en contraste con el pequeño, heterocromático y degenerado cromosoma Y. Así, los cromosomas sexuales constituyen un desafío a los mecanismos que garantizan la correcta segregación de los autosomas durante la meiosis, puesto que la sinapsis se debe de llevar a cabo entre ellos (**Åkerfelt et al., 2010**). La zona de recombinación entre los cromosoma X e Y se encuentra en el extremo telomérico del brazo corto de ambos cromosomas. A esta región se le llama seudoautosómica (RSA). Fue demostrada en la especie humana por Weissenbach, H. Cooke y P. Goodfellow en 1985, pero la homología disminuye a medida que se aleja de esta región, (**Hernández, 2006**), ver figura 17. Con el fin de hacer frente a una sinapsis incompleta, los cromosomas sexuales se aíslan en un compartimento subnuclear, llamado corpúsculo de cromatina sexual (**Åkerfelt et al., 2010**).

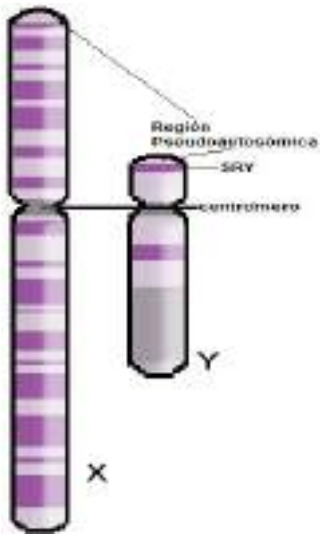


Figura 17. Zona de recombinanción entre los cromosomas X y Y (imagen modificada de kadipedia.com)

En 1970 Cassperson y colaboradores demostraron que el cromosoma Y tiene afinidad a ciertas sustancias fluorescentes como el hidrocloruro de quinicrina. Person y colaboradores, en 1970, encontraron que las células en interfase obtenidas por un suave raspado de la mucosa oral de varones normales, muestran un cuerpo fluorescente muy brillante. A dicha estructura se le denominó cromatina sexual "Y" o corpúsculo "F". El estudio de la cromatina sexual Y es un método útil que permite determinar el número de cromosomas Y presentes en un individuo. Por ejemplo, el hallazgo de 2 cro-matinas Y en varias células puede observarse en pacientes con alte- ración cromosómica tipo XY**Y (Orrego, 2006)**

El ADN de los cromosomas se une a los diversos tipos de colorantes, algunos de los cuales producen fluorescencia al ponerse en contacto con la luz UV, de éstos; el colorante mas efectivo es la quinacrina que tiñe de forma característica a los cromosomas. El cromosoma Y presenta una fluorescencia especialmente brillante tanto en núcleos metafásicos como en interfásicos, por lo que su identificación es muy sencilla. Esta técnica debe emplearse para valorar todo paciente en que se sospeche una alteración cromosómica **(Verma, 1995).**

CUESTIONARIO PREVIO

1.- ¿Qué es la cromatina X y qué utilidad tiene su identificación?
2.- ¿Qué factores pueden reducir la frecuencia de las células con cromatina X?
3.- ¿A qué edad se inactiva en la mujer un cromosoma X?
4.- ¿Qué colorantes se pueden utilizar para la identificación de la cromatina X?
5.- ¿Quiénes fueron los que observaron por primera vez la cromatina X, en qué animal y en qué tejido?
6.- ¿Qué genes escapan a la inactivación y en dondé se localiza el centro de inactivación del cromosoma X?
7.- Escribe la hipótesis de Mary Lyon.
8.- ¿Qúe es el corpúsculo F y qué pone de manifiesto?
9.- ¿Cuál es la densidad génica del cromosoma X y del cromosoma Y?
10.- Explica la función que tiene cada uno de los reactivos que se utilizan en la identificación del corpúsculo F.

EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES

Material por alumno

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Abatelenguas
- Guantes
- Cubrebocas
- Marcador indeleble
- Guantes de látex o vinilo
- Pinzas Adson sin dientes

Material por equipo

- Microscopio de fluorescencia
- Vasos Coplin
- Servitoallas

Reactivos

- Buffer de Mcllvaine pH 5.6
- Solución de quinacrina
- Metanol absoluto

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Corpúsculo F

1. Obtener células epiteliales de la mucosa oral mediante raspado con un abatelenguas estéril. Es importante emplear una presión suficientemente firme para obtener células epiteliales profundas, las cuales tienen núcleos vesiculosos grandes, pues los núcleos pignóticos de las células superficiales no son satisfactorios
2. Dispersar las células sobre un portaobjetos limpio.
3. Colocar las laminillas en metanol absoluto de 10 a 15 minutos.
4. Enseguida de la fijación, dejar la laminilla en una posición inclinada y dejar que se seque.
5. Colocar la laminilla en la solución de quinacrina de 5 a 10 minutos.
6. Enjuagar con agua corriente.
7. Montar el buffer de Mcllvaine pH 5.6.
8. Examinar la laminilla con el microscopio de fluorescencia con una longitud de onda de 450 nm a 500 nm.

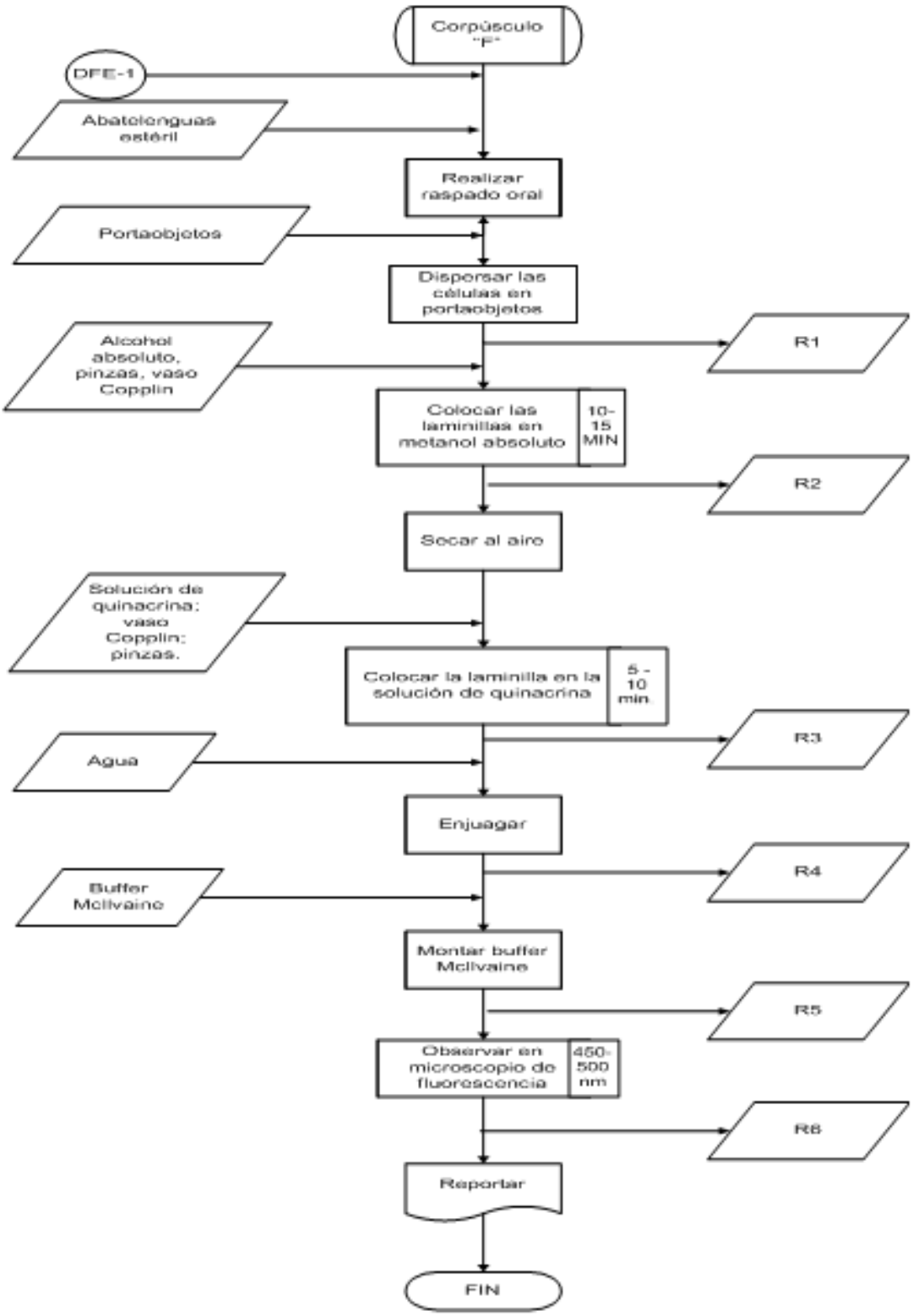

Corpúsculo "F"
DFE-1
Abatolenguas estéril
Realizar raspado oral
Portaobjetos
Dispersar las células en portaobjetos
Alcohol absoluto, pinzas, vaso Copplin
R1
Colocar las laminillas en metanol absoluto
10-15 MIN
R2
Secar al aire
Solución de quinacrina; vaso Copplin; pinzas.
Colocar la laminilla en la solución de quinacrina
5 - 10 min
R3
Agua
Enjuagar
R4
Buffer McIlvaine
Montar buffer McIlvaine
R5
Observar en microscopio de fluorescencia
450-500 nm
R6
Reportar
FIN

Figura 18

Tabla 5

Número de residuo	Residuo	Norma que regula su recolección o almacenamiento	Disposición
R1	Abatelenguas	NOM-087-ECOL-SSA1-2002.	Bolsa de basura negra, basurero municipal
R2	Alcohol Absoluto		Destilado y reutilizado
R3	Solución de quinacrina		Inactivación por fotólisis solar.
R4	Agua con trazas de solución de quinacrina	NOM-002-ECOL-1996	Tarja ó desagüe
R5	Buffer de McIlvaine	NOM-002-ECOL-1996	Tarja ó desagüe
R6	Laminillas	NOM-087-ECOL-SSA1-2002	Inactivación y basurero municipal en recipiente para residuos de vidrio

4.1 CROMATINA SEXUAL "X" O CORPÚSCULO DE BARR

INTRODUCCIÓN

Los experimentos de Murray L. Barr y Ewart G. Bertram con células nerviosas de gatas en 1949, así como estudios posteriores de Keith Moore y Barr en la especie humana, demostraron un mecanismo genético en mamíferos que compensa la expresión de los genes ligados al cromosoma "X" en los dos sexos, al observar un cuerpo que se teñía de oscuro en la interfase de células nerviosas de gatas, que no se encontraba en células similares del gato **(Klug, 2006).**

Uno de los grandes acontecimientos de la Citogenética contemporánea ha sido la comprobación de la Hipotésis de Mary Lyon. Pruebas experimentales demuestran que este cuerpo, llamado **Corpúsculo de cromatina sexual,** o simplemente **corpúsculo de Barr**, es un cromosoma X inactivado. Susumo Ohno fue el primero en sugerir que el Corpúsculo de Barr surge de uno de los 2 cromosomas X en la mujer. **(Klug, 2005).** Ver figura 19.

En 1961 Mary Lyon propuso una hipótesis, la cual es conocida como "Hipótesis de Lyon" (en su honor), la cual establece que uno de los cromosomas "X" en las hembras de mamíferos se inactiva en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario. Se entiende por Lyonización al proceso por el cual uno de los dos cromosomas "X" en la mujer se inactiva en cada una de las células somáticas. Esta inactivación se manifiesta por la presencia de la cromatina "X" y ocurre en el trofoblasto al décimo día después de la fecundación y, en el embrión propiamente dicho, al décimo sexto día. Para dar su hipótesis, Mary Lyon, se basó en sus observaciones hechas en ratones hembras heterocigotas para los genes que determinan el color del pelaje ligados al cromosoma X **(Klug, 2006).**

La inactivación del cromosoma X sólo ocurre en las células somáticas que tienen dos cromosomas "X", ya que en las células germinales ambos cromosomas X tienen necesariamente que permanecer activos.

El proceso de inactivación del cromosoma X es un mecanismo complejo, debido a que en el inicio de la inactivación y en el mantenimiento de la misma participan mecanismos moleculares precisos.

Existen dos tipos de inactivación del cromosoma X: a) Inactivación del cromosoma X con imprinting: el cromosoma X de origen paterno se inactiva de forma preferencial en los tejidos extraembrionarios; b) Inactivación del cromosoma X al azar: ocurre tempranamente en el embrión hembra, en el que los dos cromosomas X de origen paterno o materno tienen la misma posibilidad de ser inactivados. Este proceso complejo se realiza por separado en cada célula **(Shen et al., 2008)**. La inactivación del cromosoma X es resultado de la inactivación aleatoria de la transcripción de uno de los dos cromosomas X en las células normales de los mamíferos hembra.

Este proceso permite a los mamíferos alcanzar la dosis de equivalencia de la mayoría de los genes ligados al X entre las mujeres, que normalmente tienen dos cromosomas X, y los hombres, que normalmente tienen uno solo. (**Hendrich et al., 1997**).

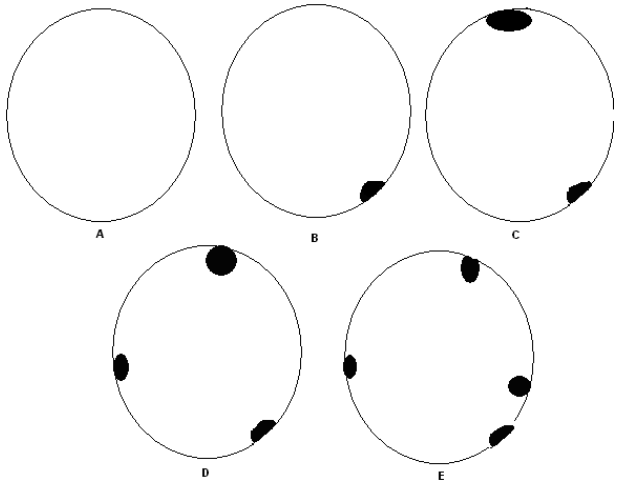
El locus genético principal, propuesto para controlar el proceso de inactivación del cromosoma X, es el Centro de Inactivación del Cromosoma X, denominada región del XIC y localizada en Xq13 (en los brazos largos del cromosoma X, en la región uno, banda tres). Esta región abarca unos 680 kb en el humano, es un elemento regulatorio que facilita la expansión bidireccional de la inactivación del cromosoma X y posee la información para la elección del cromosoma que va a inactivar.

En esta región se encuentra el gen Xist, que transcribe pero no traduce, es decir, el producto del gen Xist es un RNA regulador que no codifica para ninguna proteína y es generado a partir de los dos cromosomas X. Su función es cubrir por completo al cromosoma X que va a ser inactivado. A medida que se expande por el cromosoma X, se van silenciando los genes, provocando un cambio en la conformación de la cromatina, ya que se produce la metilación de la histona H3 en las lisinas K9 y K27 y una no metilación en la lisina K4, además de la desacetilación de la histona H4, adoptando una configuración de heterocromatina. En los seres humanos y ratones, XIC parece ser estabilizado por la metilación de los residuos de citosina en las islas (CpG) en los sitios de las regiones promotoras de los genes en las células con el cromosoma X inactivo (**Hore et al., 2008**).

Sin embargo, es importante recalcar, que no todos los genes ubicados en el cromosoma X se inactivan, aproximadamente el 15 % de ellos se escapan a la inactivación expresándose tanto en el X activo (Xa) como en el X inactivo (Xi) y son los de la región pseudoautosómica. Un 10 % muestran inactivación variable y éstos se ubican principalmente en Xp distal (**Hendrich et al., 1997**).

Se sabe que Xist juega un papel importante en la inactivación del cromosoma X (XCI) durante la embriogénesis de los mamíferos hembra y que cada célula somática tendrá el cromosoma X materno o paterno inactivo (**Dvash et al., 2010**). El mecanismo por el cual XIST induce el silenciamiento de genes, una vez asociado con el cromosoma X inactivo, se encuentra actualmente en fase de investigación activa. (**Lyon, 2007**).

El cromosoma X inactivo permanece condensado durante la mayor parte de la interfase, es de replicación tardía y visible en el interior del núcleo de las células interfásicas de la mucosa oral como una masa de cromatina que se tiñe intensamente con colorantes afines al ADN, observándose como un cuerpo plano convexo adherido a la superficie de la membrana nuclear. En las mujeres, cuando uno de los cromosomas X es estructuralmente anormal, es el que se inactiva de preferencia y, cuando las células tienen más de dos cromosomas X, se inactivarán todos los extras menos uno. Por lo tanto el número de cromatinas X o Corpúsculos de Barr será igual al número total de cromosomas X presentes, menos uno. C = N – 1. Donde C es el número de Corpúsculos X y N es el número total de cromosomas X presentes (**Klug, 2006**). Ver figura 19.



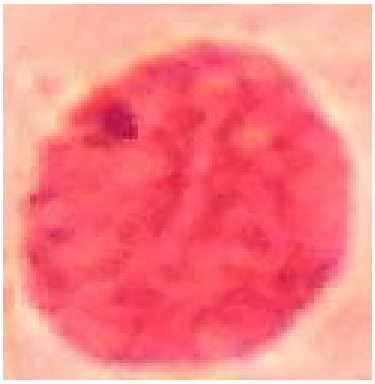


Figura 19. Corpúsculo de Barr. Arriba, Corpúsculos de Barr en diferentes muestras: (A) (46, XY). (B) (46, XX). (C) (47, XXX). (D) (48, XXXX). (E) (49, XXXXX). Abajo, Corpúsculo de Barr tomada en el Laboratorio de Citogenética de la FESC, Campo Uno

EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES (CROMATINA SEXUAL)

Material por alumno

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Abatelenguas
- Guantes de látex o vinilo
- Cubrebocas
- Pinzas Adson sin dientes

Material por equipo

- Microscopio
- Vasos Coplin
- Papel secante
- Aceite de inmersión

Reactivos

- Acetorceína
- Aceite de inmersión
- **Alcohol de 96°**
- Xilol

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. Obtener células epiteliales de la mucosa oral mediante raspado con un abatelenguas estéril. Es importante emplear una presión suficientemente firme para obtener células epiteliales profundas, las cuales tienen núcleos vesiculosos grandes, pues los núcleos pignóticos de las células superficiales no son satisfactorios.
2. Dispersar las células sobre un portaobjetos limpio.
3. Adicionar unas gotas de colorante de acetoceína y colocar encima un cubreobjetos.
4. Presionar con el papel secante para que las células se aplanen adecuadamente y se quite el exceso de colorante.
5. Observar al microscopio con el objetivo 10x ó 40x para posteriormente utilizar el objetivo de inmersión.
6. Observar 50 células y anotar el número de corpúsculos de Barr encontrados y reportar los resultados.

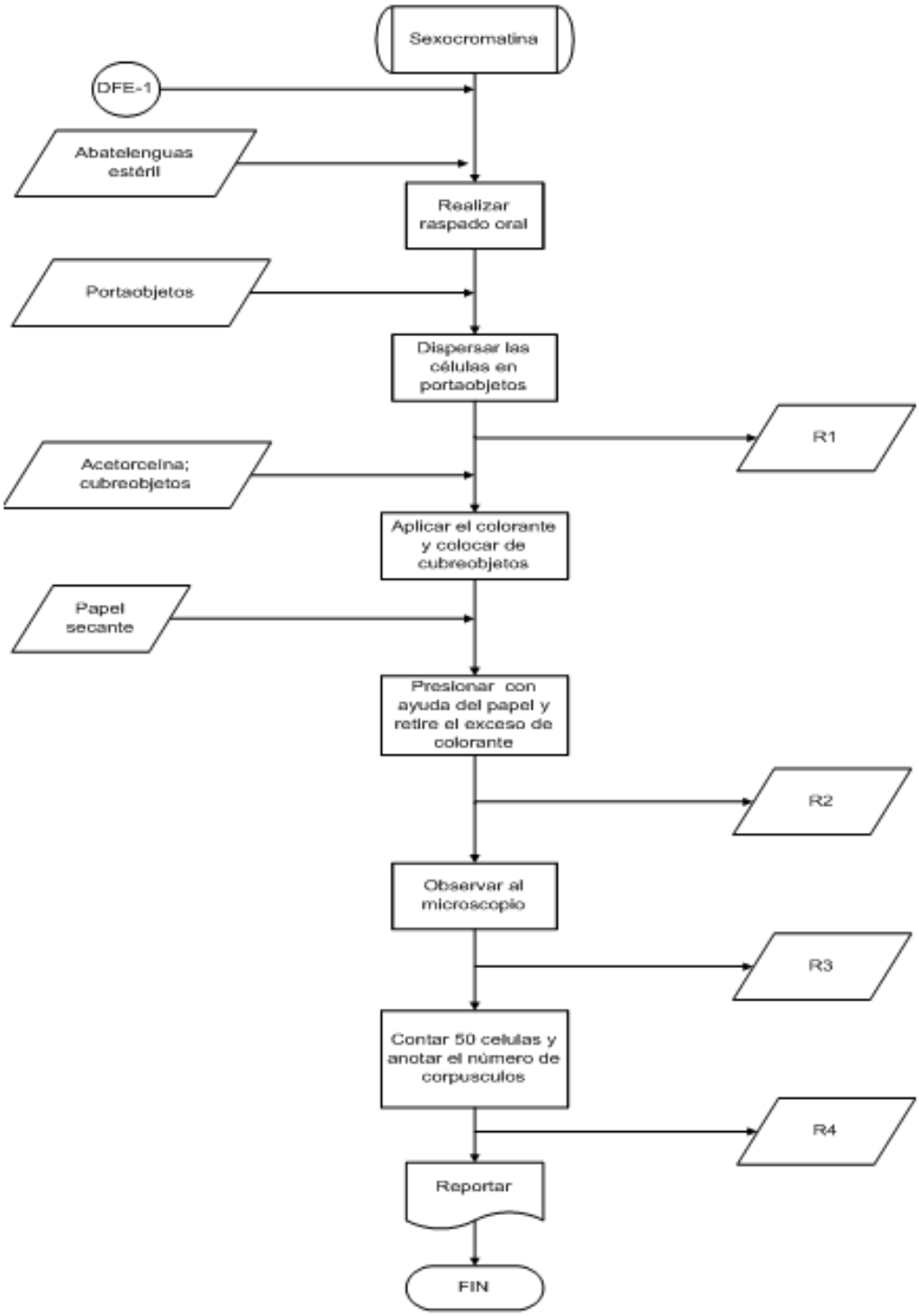

Sexocromatina
DFE-1
Abatelenguas estéril
Realizar raspado oral
Portaobjetos
Dispersar las células en portaobjetos
R1
Acetorcelna; cubreobjetos
Aplicar el colorante y colocar de cubreobjetos
Papel secante
Presionar con ayuda del papel y retire el exceso de colorante
R2
Observar al microscopio
R3
Contar 50 celulas y anotar el número de corpusculos
R4
Reportar
FIN

Figura 20

Tabla 6

Número de residuo	Residuo	Norma que regula su recolección o almacenamiento	Disposición
R1	Abatelenguas	NOM-087-ECOL-SSA1-2002.	Bolsa de basura negra, basurero municipal.
R2	Servitoallas sucias.	NOM-087-ECOL-SSA1-2002.	Bolsa de basura negra, basurero municipal.
R3	Papel Seda	NOM-087-ECOL-SSA1-2002.	Bolsa de basura negra, basurero municipal.
R4	Laminillas	NOM-087-ECOL-SSA1-2002	Recipiente para residuos de vidrio. Basurero municipal

PRÁCTICA 5
Aberraciones cromosómicas estructurales (ACE)

OBJETIVO

El alumno analizará preparaciones cromosómicas a través del microscopio óptico para adquirir destreza, habilidad y poder discriminar las diversas cromosomopatías.

INTRODUCCIÓN

Para que un cromosoma sea completamente funcional, y por tanto pueda estar implicado en el proceso de la herencia, debe de tener ciertos locus específicos, como son: los telómeros, centrómeros, y orígenes de replicación. Los orígenes de replicación garantizan la copia exacta de todo el genoma, los telómeros protegen la terminación del cromosoma de la degradación y eliminación proporcionando cierta estabilidad, y los centrómeros aseguran la repartición del genoma a las células hijas. Los defectos en cualquiera de estas funciones conducen a la inestabilidad del genoma, su reorganización, y, de esta manera, puede ocurrir una aneuploidía. Las anomalías cromosómicas constituyen también la base de enfermedades humanas congénitas (**Stimpson et al., 2010**).

Las ACE´s se forman por la ruptura del material genético cromosómico o sobrecruzamiento desigual del cromosoma dando lugar a eliminaciones (deleciones), anillos cromosómicos, duplicaciones, translocaciones, inserciones, e inversiones. Una simple ruptura en un cromosoma puede producir una deleción terminal, mientras que dos rupturas en un solo cromosoma pueden dar lugar a una deleción intersticial, un cromosoma en anillo o una inversión. Dos rupturas en dos cromosomas diferentes pueden producir cambios estructurales como translocaciones simples, recíprocas y robertsonianas. Un sobrecruzamiento desigual puede dar lugar a duplicaciones o deleciones (**Moore; Best, 2001b).**

Las cromosomopatías estructurales pueden ser balanceadas o no balanceadas. Las balanceadas a menudo no tienen consecuencias importantes para quien las porta, pero para su descendencia sí; en tanto, las anomalías que no están balanceadas pueden producir síndromes graves a los individuos y a su descendencia. Dichas cromosomopatías se dan por una inapropiada alineación durante la meiosis o por ruptura en la meiosis o mitosis (la probabilidad de una ruptura cromosómica aumenta con la presencia de agentes nocivos, denominados clastógenos), y aunque existen mecanismos de reparación algunas estas rupturas se mantienen o se reparan de manera ineficiente de tal forma que se altera la estructura del cromosoma (**Jorde, 2005**).

El análisis cromosómico de las células que se dividen a veces revela la presencia de cromosomas rotos o de reordenamientos complejos, tales como anillos y cromosomas con centrómeros múltiples. Algunos de estos pueden dar lugar a células hijas con deleciones o translocaciones, mientras que otros serán incompatibles a la división celular y la supervivencia de la célula (**Warburton, 2006**).

Tabla 7. Abreviaciones cromosómicas según el Sistema Internacional de Nomenclatura de la Citogenética Humana (Passarge, 2010)

Cariotipo femenino normal con 46 cromosomas (dos cromosomas XX)	46,XX
Cariotipo masculino normal con 46 cromosomas (un cromosoma X y un Y)	46,XY
Cariotipo con 47 cromosomas (dos cromosomas XX e unoY)	47, XXY
Cariotipo con 47 cromosomas (cromosomas X e Y) y un cromosoma 21 adicional (trisomía 21)	47,XX,+21
Brazo corto del cromosoma 13	13p
Brazo largo del cromosoma 13	13q
Región 1, banda 4 del brazo largo del cromosoma 13	13q14
Deleción del cromosoma 5	del(5)
Deleción del cromosoma 5, desde la region 2 banda 1 del brazo largo (2q21) hasta el final (telómero del brazo largo (q-ter)	del(5)(q21-qter)
Inversión del cromosoma 4 , 4p11 a 4q21 (inversión pericéntrica)	Inv(4)(p11q21)
Forma de anillo del cromosoma 13 (implica una deleción)	r13
Isocormosoma para el brazo largo del cromosoma X	i(Xq)
Translocación recíproca entre un cromosoma 2 y uno 5; el brazo largo del cromosoma 2 se acortó y el del 5 se alargó	t(2q-;5q+)
El segmento q22 al q32 de un cromosoma 2 se insertó en la región p14 de un cromosoma 5	Ins(5;2)(p14;q22;q32
Cromosoma X con un sitio frágil en la posición q 27.3	Fra(X)(q27.3)
Pérdida	-
Ganancia	+
Mosaicos; translocación Robertsoniana	/

CUESTIONARIO PREVIO

1.- ¿En que consiste una aberración cromosómica estructural?
2.- ¿Cómo se clasifican las aberraciones cromosómicas estructurales?
3.- ¿En qué etapa del ciclo celular es más factible que sucedan este tipo de aberraciones y por qué?
4.- ¿Qué técnica de Bandeo cromosómico se utiliza para su diagnóstico?
5.- ¿Cuáles son los mecanismos que originan este tipo de aberraciones? Dibújalos
6.- Escribe 3 síndromes (con sus signos y síntomas) que se originen por este tipo de aberraciones.

EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES

Material por alumno

1 laminilla con preparación cromosómica
1 microscopio

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. Colocar la laminilla con la preparación cromosómica en el microscopio.
2. Observar al microscopio óptico con los objetivos 10x y 40x.
3. Estudiar las metafases seleccionadas con el objetivo seco fuerte (100x).
4. Anotar sus observaciones e indicar de que ACE se trata.

EJERCICIO 2

1. De la siguiente microfotografía localizar y contar el número de cromosomas.
2. Realizar los pasos como se indican en el capítulo 1.5, análisis cromosómico.
3. Analizar y utilizar la tabla para indicar de que ACE se trata.

Figura 21

UNAM
CUAUTITLÁN

HOJA DE CARIOTIPO

1 2 3
A

4 5
B

6 7 8 9 10 11 12
C

13 14 15
D

16 17 18
E

19 20
F

21 22
G

Cromosomas Sexuales

SINDROME: _____ LAMINILLA: _____ FECHA: _____

CARIOTIPO: _____ ELABORADO POR: _____

Figura 22

PRÁCTICA 6

Aberraciones cromosómicas numéricas (ACN)

OBJETIVO

El alumno analizará preparaciones cromosómicas a través del microscopio óptico para adquirir destreza, habilidad y poder discriminar las diversas cromosomopatías numéricas en el humano, con el fin de realizar un diagnóstico citogenético correcto.

INTRODUCCIÓN

El cariotipo normal de los cromosomas consiste en un patrón de 22 pares de cromosomas autosómicos y un par de cromosomas sexuales: XY en el varón y XX en la mujer (Pagana, 2008). Las alteraciones numéricas pueden ser por exceso, disminución o por defecto, y afectar a toda la serie haploide (euploidías) o a pares cromosómicos aislados (aneuploidías) (**Oliva, 2004**).

6.1 EUPLOIDÍAS

Las alteraciones euploides son múltiplos exactos del número haploide n (triploidías 3n=69 cromosomas, tetraploidías 4n=92 cromosomas, etc.). Si el número de veces que se repite la serie haploide es muy elevado se denominan poliploidías; su origen suele residir en una dispermia (fecundación del óvulo por dos o más espermatozoides) o por error meiótico (no expulsión del cuerpo polar) o por errores en la citocinesis (**Oliva, 2004**).

Estas euploidias se pueden producir en los tumores o en líneas celulares cultivadas, produciéndose normalmente en pocos tejidos del cuerpo. La triploidía o tetraploidía puede ocurrir en la concepción, pero por lo general conduce a la muerte embrionaria o fetal. La haploidía es cuando hay sólo un cromosoma de cada par, se produce rara vez en los tumores, pero no es compatible con el desarrollo más allá de las primeras divisiones celulares (**Warburton, 2006**).

6.2 TRIPLOIDÍA

Las triploidías son unas de las anomalías cromosómicas más comunes en los seres humanos, que ocurren en aproximadamente el 1 % de todos los productos de la concepción. La mayoría de las concepciones triploides mueren en el desarrollo temprano y representa aproximadamente el 10 % de los abortos espontáneos (**Zaragoza et al., 2000**).

La triploidía es un trastorno genético que no es compatible con la vida, ya que se tiene un

complemento cromosómico haploide adicional que resulta en un total de 69 cromosomas, ver figura 23. Existen dos tipos de triploidía según el origen parental. El tipo I, cuando el complemento cromosómico que está de más es de origen paterno (diandra), "con crecimiento normal del feto", presentando un aumento de la translucencia nucal, una placenta muy grande y multiquística, con niveles elevados en suero materno de beta gonadotropina coriónica humana (β- hCG), lo que se conoce como mola hidatiforme. Los embarazos molar parciales se asocian generalmente con triploidía de origen diandrico (**Houwen et al., 2009**).

El tipo II es cuando el complemento cromosómico adicional que está de más es de origen materno (diginia). Se caracteriza por una placenta pequeña, pero normal, con disminución de los niveles de restricción del cre-cimiento β-hCG y del feto asimétrico. Los defectos estructurales comunes en ambos tipos son las manos, el corazón, la cabeza y la cara con malformación (**Houwen et al., 2009**).

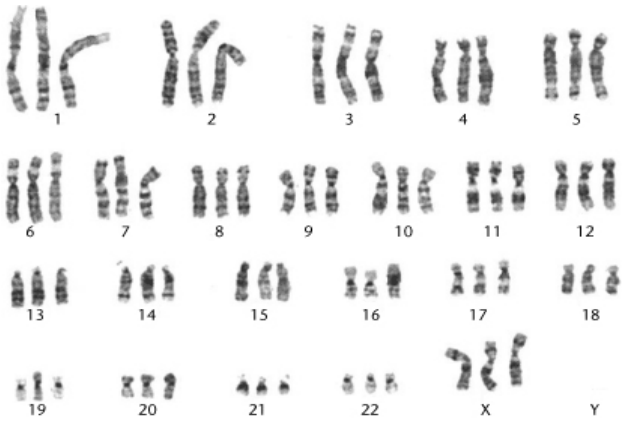


Figura 23. Cariotipo de una célula triploide de un feto abortado (**Warburton, 2006**)

6.3 TETRAPLOIDÍAS

La mayoría de las plantas poliploides son tetraploides. Los alotetraploides son aquellas plantas que tienen dos genomas diferentes, los cuales surgen a partir de cruzamientos entre especies diferentes seguida por la duplicación de los cromosomas. Esta situación da lugar a la formación de bivalentes en la profase de la meiosis I y por lo tanto es llamada la herencia disómica. Mientras que los autotetraploides son aquellas plantas que tienen 2 genomas iguales (**Birchler, 2009**).

6.4 POLIPLOIDÍAS

La poliploidía es la duplicación de todo el genoma, con la participación de alopoliploides y autopoliploides. Es un modo importante de especiación en las plantas, pero es relativamente rara en los animales. El 47 % de todas las plantas con flores y el 95 % de todos los helechos surgió a través de la duplicación de los cromosomas en híbridos interespecíficos (**Nevo, 2006**).

6.5 ANEUPLOIDÍAS AUTOSÓMICAS

La aneuploidía se define como un número anormal de cromosomas; es reconocida como un mecanismo común de las patologías cromosómicas humanas y a menudo conduce a patrones anormales de la expresión génica con exceso o disminución en la expresión de genes específicos. Clásicamente, el término se limitó a la presencia de cromosomas enteros de más (trisomía) o la ausencia de cromosomas (monosomía). Sin embargo, con el desarrollo de técnicas moleculares

de alta resolución para escanear el genoma, las aneuploidias están siendo cada vez mejor definidas e identificadas **(Dierssen et al., 2009).**

La aneuploidía (trisomía o monosomía) es la anomalía cromosómica más frecuentemente identificada en los humanos: se produce en al menos 5 % de todos los embarazos clínicamente reconocidos. Sin embargo, algunos fetos aneuploides sobreviven a largo plazo. Además, la aneuploidía es la causa más común de retraso mental. El desequilibrio de la dotación cromosómica generalmente da lugar a la inviabilidad. Por lo tanto, la no disyunción meiótica y el rezago anafásico es un de los mecanismos que la producen (Hassold;Hunt, 2001)

CUESTIONARIO PREVIO

1.- ¿En qué consiste una aberración cromosómica numérica?
2.- ¿Cuáles son los mecanismos que originan este tipo de aberraciones?
3.- ¿Cómo se clasifican las aberraciones cromosómicas numéricas?
4.- Dibuja una no disyunción y un rezago anafásico. ¿Qué originan?
5.- Escribe 5 síndromes (con sus signos y síntomas) que se originen por este tipo de aberraciones.

EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES

Material por alumno

1 laminilla con preparación cromosómica
1 microscopio

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. Colocar la laminilla con la preparación cromosómica en el microscopio.
2. Observar al microscopio óptico con los objetivos 10x y 40x.
3. Estudiar las metafases seleccionadas con el objetivo seco fuerte (100x).
4. Anotar sus observaciones e indicar de qué ACE se trata.

EJERCICIO 3

1. De la siguiente microfotografía localizar y contar el número de cromosomas.
2. Realizar los pasos como en el capítulo 1.5 análisis cromosómico.
3. Analiza y utiliza la tabla para indicar de que ACN se trata.

Figura 24

UNAM
CUAUTITLÁN

HOJA DE CARIOTIPO

1 2 3
A

4 5
B

6 7 8 9 10 11 12
C

13 14 15
D

16 17 18
E

19 20
F

21 22
G

Cromosomas Sexuales

SINDROME: _____ LAMINILLA: _____ FECHA: _____

CARIOTIPO: _____ ELABORADO POR: _____

Figura 25

APÉNDICE

(Preparación de Reactivos)

1) Solución hipotónica de KCl 0.075 M
Pesar 1.3979 g de cloruro de potasio y disolverlo en 250 ml de agua destilada.

2) Colchicina 0.04 %
Pesar 0.04 g de colchicina y disolverlos en 100 ml de agua destilada.
NOTA: Utilizar guantes y cubreboca al preparar esta solución ya que la colchicina
puede ser genotóxica.

3) Fitohemaglutinina
Lavar 20 g de frijol con agua corriente. Dejarlos remojando toda la noche a 4 °C. Transcurrido el tiempo, decantar el agua, poner los frijoles en una licuadora y hacer una pulpa fina con 30 ml de solución salina isotónica (NaCl 0.85 %). Pasar la pulpa a un frasco con tapa y agregar otros 70 ml de solución salina isotónica. Continuar la extracción por 24 horas a 4 °C, agitando ocasionalmente. Posteriormente, puede centrifugarse en una centrifuga clínica para quitar los residuos gruesos de la pulpa del frijol, para posteriormente centrifugar a 4 °C por 15 minutos a 14 000 rpm. Retirar los sobrenadantes y de ser necesario centrifugar una vez más hasta que no se observen sólidos. Recoger el sobrenadante y medir su volumen. Diluir 1:25 con solución salina isotónica.
Esterilizar por filtración inmediatamente. Congelar la fitohemaglutinina en alícuotas pequeñas para su uso.

4) Ácido clorhídrico 0.2 N
Medir 0.616 ml de HCl de densidad 1.118 y aforar a 1000 ml con agua destilada.

5) Hidróxido de bario 0.1 N
Pesar 2.14225 g de $Ba(OH)_2$ y disolverlos en 250 ml de agua destilada.

6) Solución salina doble de citratos 2xSSC
Pesar 17.53 g de NaCl y 8.82 g de Citrato de sodio dihidratado ($Na_3C_6H_5O_7$. $2H_2O$) Disolver primero una sal y luego la otra en 1000 ml de agua destilada.

7) Buffer de fosfatos 0.3 M pH 6.8 (proporción 3A : 2B) para tinción Bandeo C
Solución A: Pesar 40.827 g de KH_2PO_4 y disolver en un litro de agua destilada.
Solución B: Pesar 42.588 g de Na_2HPO_4 y disolver en un litro de agua destilada.

8) Acetorceína
Pesar 0.5 g de orceína y colocarla en una matraz Erlenmayer con 12.5 ml de ácido acético glacial. Hervir la solución durante 30 minutos, evitando que bulla demasiado pues puede derramarse, agitando el matraz continuamente. Enfriar la

solución y aforar a 25 ml con agua destilada. Almacenar en botella ámbar y proteger de la luz (duración de 6 meses). Filtrar en frasco gotero para su uso.

9) Buffer de fosfatos 0.06 M pH 6.8 para Bandas G
Pesar 2.0413 g de KH_2PO_4 y disolverlos en 250 ml de agua destilada.
Pesar 2.1294 g de Na_2HPO_4 y disolverlos en 250 ml de agua destilada.
Para obtener la solución de trabajo, mezclar 25 ml de cada una de las soluciones anteriores obteniéndose así el pH de 6.8.

10) Solución de tripsina
Pesar 20 g de tripsina grado reactivo y disolverlos en 50 ml de agua destilada.

11) Solución de bicarbonato al 7 %
Pesar 7 g de bicarbonato de sodio y disolverlos en 100 ml de agua destilada.

12) Solución de EDTA al 1 %
Pesar 0.5 g de EDTA y disolverlos en 50 ml de agua destilada.

13) Buffer de Mcllvaine (pH5.4)
Disolver 2.1 g de ácido cítrico ($H_3C_6H_5O_7$), 3.9 g de fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4) en 500 ml de agua destilada

14) Solución de Quinacrina
Hidrocloruro de Quinacrina 100 mg en 200 ml buffer de Mcllvaine (pH 5.4). No olvides que la quinacrina, asi como otros fluorocromos pueden ser carcinogénicos, por lo que debes manejarlos con precaución y responsabilidad.

SEGURIDAD Y CALIDAD DENTRO DEL LABORATORIO

El trabajo en los laboratorios está regulado por diversas normas y protocolos tanto de calidad como de seguridad, cuyo objetivo principal es llevar a acabo un buen desempeño de las prácticas, así como también de sensibilizar a los participantes sobre la importancia tanto de su autocuidado como la de sus compañeros y su entorno; generar conciencia en seguridad, de los accidentes que pueden prevenirse y del control de los peligros asociados que ocurren con la manipulación y el uso de agentes infecciosos y químicos. Estas normas a su vez se encuentran reguladas por diversas normas (**NORMA Oficial Mexicana NOM-018-STPS-2000: NOM-087-ECOL-SSA1-2002; NOM-026-STPS-2008**; como también el manual de bioseguridad 2005 de la OMS). Siempre se deben tener presentes los posibles riesgos que existen al trabajar con materiales y agentes peligrosos, por lo que no hay excusa para que se presenten accidentes dentro del laboratorio si todos sus integrantes se encuentran bien informados. Por lo cual, a continuación se enlistarán una serie de normas que deben conocerse y seguirse para que tanto el alumno como los profesores y trabajadores puedan llevar a cabo.

El personal que ingresa al laboratorio de citogenética está OBLIGADO a seguir las indicaciones del personal a cargo del mismo (en este caso el profesor que en ese momento se encuentre impartiendo la materia). Al iniciar el ciclo escolar, el personal brindará la información sobre las medidas de seguridad (las cuales deberán seguirse a lo largo de todo el semestre), y sobre uso y localización de dispositivos de seguridad tales extintores, tragafuegos, salidas de emergencia, teléfonos de emergencia, lavaojos, regadera de emergencia y pictogramas, ubicados al interior del laboratorio los cuales NO DEBEN de ser ignorados por el personal (NOM-018-STPS-2000).

2.- SEÑALAMIENTOS Y COLORES DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Es importante también entender y comprender la importancia de los señalamientos y colores de seguridad e higiene colocados en el laboratorio, los cuales se ven desde la tubería hasta los reactivos a utilizar, cuya finalidad es indicar al alumno la presencia de peligro y así prevenir cualquier accidente que pueda ocurrir. En la Tabla 1 se muestran los colores de seguridad y su significado de cada uno de ellos.

Dentro del laboratorio como ya se ha comentado, existe una serie de pictogramas los cuales indican una acción ya sea preventiva o de prohibición; éstas están dispuestas para evitar accidentes en el área de trabajo. Cada pictograma se encuentra encardado por una serie de formas geométricas, que tienen asociadas una acción, estas están asignadas por la **NOM-026-STPS-2008.** A continuación en las tablas 2-6 se muestran los pictogramas que se encuentran en el laboratorio de citogenética.

Tabla 1. Colores de seguridad, su significado e indicaciones y precisiones (NOM-026-STPS-2008).

COLOR DE SEGURIDAD	SIGNIFICADO	INDICACIONES Y PRECISIONES
ROJO	Paro.	Alto y dispositivos de desconexión para emergencias.
	Prohibición.	Señalamientos para prohibir acciones específicas.
	Material, equipo y sistemas para combate de incendios.	Ubicación y localización de los mismos e identificación de tuberías que conducen fluidos para el combate de incendios.
AMARILLO	Advertencia de peligro.	Atención, precaución, verificación e identificación de tuberías que conducen fluidos peligrosos.
	Delimitación de áreas.	Límites de áreas restringidas o de usos específicos.
	Advertencia de peligro por radiaciones ionizantes.	Señalamiento para indicar la presencia de material radiactivo.
VERDE	Condición segura.	Identificación de tuberías que conducen fluidos de bajo riesgo. Señalamientos para indicar salidas de emergencia, rutas de evacuación, zonas de seguridad y primeros auxilios, lugares de reunión, regaderas de emergencia, lavaojos, entre otros.
AZUL	Obligación.	Señalamientos para realizar acciones específicas.

Tabla 2. Pictograma de prohibición (NOM-026-STPS-2008).

	INDICACION	CONTENIDO DE IMAGEN DEL SIMBOLO	EJEMPLO
A.1	PROHIBIDO FUMAR	CIGARRILLO ENCENDIDO	

Tabla 3. Pictogramas de precaución (NOM-026-STPS-2008).

C.2	PRECAUCION, SUSTANCIA TOXICA	CRANEO HUMANO DE FRENTE CON DOS HUESOS LARGOS CRUZADOS POR DETRAS	
C.3	PRECAUCION, SUSTANCIAS CORROSIVAS	UNA MANO INCOMPLETA SOBRE LA QUE UNA PROBETA DERRAMA UN LIQUIDO. EN ESTE SIMBOLO PUEDE AGREGARSE UNA BARRA INCOMPLETA SOBRE LA QUE OTRA PROBETA DERRAMA UN LIQUIDO	
C.4	PRECAUCION, MATERIALES INFLAMABLES Y COMBUSTIBLES	IMAGEN DE FLAMA	
C.9	ADVERTENCIA DE RIESGO BIOLOGICO	CIRCUNFERENCIA Y TRES MEDIAS LUNAS	

Tabla 4. Pictogramas de información (NOM-026-STPS-2008).

	INDICACION	CONTENIDO DE IMAGEN DEL SIMBOLO	EJEMPLO
D.1.1	UBICACION DE UN EXTINTOR	SILUETA DE UN EXTINTOR CON FLECHA DIRECCIONAL OPCIONAL, EN EL SENTIDO REQUERIDO	
D.1.2	UBICACION DE UN HIDRANTE	SILUETA DE UN HIDRANTE CON FLECHA DIRECCIONAL	

Tabla 5. Pictogramas de ubicación (NOM-026-STPS-2008).

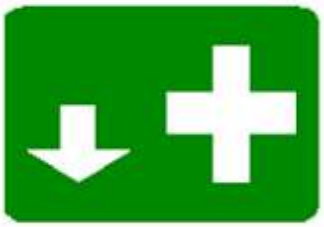
D.2.3	UBICACION DE UNA REGADERA DE EMERGENCIA	SILUETA HUMANA BAJO UNA REGADERA Y FLECHA DIRECCIONAL	
D.2.4	UBICACION DE ESTACIONES Y BOTIQUIN DE PRIMEROS AUXILIOS	CRUZ GRIEGA Y FLECHA DIRECCIONAL	
D.2.5	UBICACION DE UN LAVAOJOS	CONTORNO DE CABEZA HUMANA INCLINADA SOBRE UN CHORRO DE AGUA DE UN LAVAOJOS, Y FLECHA DIRECCIONAL	

Tabla 6. Formas geométricas para señales de seguridad e higiene y su significado (NOM-026-STPS-2008).

SIGNIFICADO	FORMA GEOMETRICA	DESCRIPCION DE FORMA GEOMETRICA	UTILIZACION
PROHIBICION		Círculo con banda circular y banda diametral oblicua a 45°, con la horizontal, dispuesta de la parte superior izquierda a la inferior derecha.	Prohibición de una susceptible de provoc riesgo.
OBLIGACION		Círculo.	Descripción de una obligatoria.
PRECAUCION		Triángulo equilátero. La base deberá ser paralela a la horizontal.	Advierte de un peligro.
INFORMACION		Cuadrado o rectángulo. La relación de lados será como máximo 1:2.	Proporcicna informaciór casos de emergencia.

Tabla 7. Colores de seguridad para tuberías y su significado (NOM-026-STPS-2008).

COLOR DE SEGURIDAD	SIGNIFICADO
Rojo	Identificación de fluidos para el combate de incendio conducidos por tubería.
Amarillo	Identificación de fluidos peligros conducidos por tubería.
Verde	Identificación de fluidos de bajo riesgo conducidos por tubería.

3.- BIOSEGURIDAD

Los residuos peligrosos biológicos infecciosos (RPBI), son aquéllos que se generan durante las actividades asistenciales a la salud de humanos o animales en los centros de salud, laboratorios clínicos o de investigación, bioterios, centros de enseñanza e investigación, principalmente, que por el contenido de sus componentes puedan representar un riesgo para la salud y el ambiente. La Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, establece los requisitos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos que se generan en establecimientos que presten servicios de atención médica (NOM-087-ECOL-SSA1-2002).

Es por esto importante que se conozca el manejo adecuado de los residuos biológicos generados en el laboratorio, ya que las medidas de seguridad no terminan al finalizar el experimento. La eliminación inadecuada o la ausencia de identificación son causa frecuente de contaminación ambiental y de accidentes. El depósito indiscriminado de residuos peligrosos, cristal roto, etc. en el bote de basura provoca frecuentes accidentes entre el personal de limpieza. Los residuos biológicos (sangre, tejidos animales o humanos y todo el material que haya estado en contacto con ellos) deberán ser recolectados en los recipientes y bolsas adecuadas, como se indica en la Norma Oficial Mexicana. La siguiente tabla muestra la adecuada separación de acuerdo a las características de cada residuo.

Tabla 8. Separación de residuos biológicos de acuerdo a las características de cada residuo (NOM-087-ECOL-SSA1-2002).

TIPO DE RESIDUOS	ESTADO FÍSICO	ENVASADO	COLOR
4.1 Sangre	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
4.2 Cultivos y cepas de agentes infecciosos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
4.3 Patológicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Amarillo
	Líquidos	Recipientes herméticos	Amarillo
4.4 Residuos no anatómicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
4.5 Objetos punzocortantes	Sólidos	Recipientes rígidos polipropileno	Rojo

Las bolsas se llenarán al 80 % de su capacidad, cerrándose antes de ser transportadas al sitio de almacenamiento temporal, y no podrán ser abiertas o vaciadas; mientras que los recipientes para los residuos peligrosos punzocortantes deberán ser rígidos, de polipropileno color rojo, con un contenido de metales pesados de no más de una parte por millón y libres de cloro, que permitan verificar el volumen ocupado en el mismo, resistentes a fracturas y pérdidas de contenido al caerse, destructibles por métodos físicos, tener separador de agujas y abertura para depósito, con tapa(s) de ensamble seguro y cierre permanente. Deberán contar con la leyenda que indique "RESIDUOS PELIGROSOS PUNZOCORTANTES BIOLÓGICO-INFECCIOSOS" y marcados con el símbolo universal de riesgo biológico tal y como lo determina esta Norma (NOM-087-ECOL-SSA1-2002).

4.- ACONDICIONAMIENTO DEL ENCARGADO DE TOMA DE MUESTRA

La persona designada para la toma de muestra debe estar conciente de aplicar las normas de higiene necesarias para llevar a cabo dicho procedimiento. Es por ello que a continuación se presenta el procedimiento que el usuario tiene que llevar a cabo antes de realizar la toma de muestra.

1. Antes de realizar cualquier procedimiento para la toma de muestra es importante realizar un adecuado lavado de manos con agua y jabón.
2. Posteriormente, se deben de secar perfectamente las manos con una toalla o servitoalla.
3. Debe usarse guantes y cubrebocas estériles para evitar entrar en contacto con el paciente y, de manera accidental, con la muestra obtenida.

PÁGINAS ELECTRÓNICAS

http://cancer.unq.edu.ar/Tpnro2bis.pdf)

http://morfoudec.blogspot.com/2008/07/microscopa-de-fluorescencia.html 01/10/10

http://science.jrank.org/pages/2775/Fluorescence-in-Situ-Hybridization-FISH.html

http://www.genedetect.com/insitu.htm 16/09/10

www.abottmolecular.com 20/09/10
www.genomasur.com/lecturas/Guia01.htm 28/09/10
www.kreatech.com 20/09/10

http://www.genycell.com 1/11/10
http://www.microbiologia.com.ar 25/10/2010

BIBLIOGRAFÍA

Åkerfelt M y col. Heat shock transcription factor 1 localizes to the sex chromatinduring meiotic repression. *JBC Papers in Press*. 2010 as Manuscript M110.157552.

Aksglaede L; Wikström AM; Rajpert-De Meyts E; Dunkel L; Skakkebaek NE; Juul A. (2006). Natural history of seminiferous tubule degeneration in Klinefelter syndrome. *Hum Reprod Update*. 12(1):39-48.

Aguilar HD. (2009). *Comparación del efecto teratogénico de la Griseofulvina y el etanol en el desarrollo larvario de* Drosophila melanogaster. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.

Bandyopadhyay R; Heller A; Knox-DuBois C; McCaskill C; Berend SA; Page SL and Shaffer LG. (2002). Parental origin and timing of de novo robertsonian translocation formation. *Am J Hum Genet*. 71(6): 1456–1462.

Baptista J; Prigmore E; Gribble SM; Jacobs PA; Carter NP; Crolla JA. (2005). Molecular cytogenetic analyses of breakpoints in apparently balanced reciprocal translocations carried by phenotypically normal individuals. *Eur J Hum Genet*. 13(11):1205-12.

Barlow SM, Greig JB, Bridges JW, Carere A, Carpy AJ, Galli CL, Kleiner J, Knudsen I, Koëter HB, Levy LS, Madsen C, Mayer S, Narbonne JF, Pfannkuch F, Prodanchuk MG, Smith MR, Steinberg P. (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. *Food Chem Toxicol.* 40(2-3):145-91.

Blennow E. (2006a). Chromosome Preparation. *Encyclopedia of life science.* John Wiley & Sons. http//www.els.net DOI: 10.1038/npg.els.0005776 (Citado 19/09/10)

Blennow E. (2006b). Banding Techniques. *Encyclopedia of life science*. John Wiley & Sons. http//www.els.net DOI: 10.1038/npg.els.0005777 (Citado 20/09/10)

Bouska A; Eischen C. (2009). Mdm2 Affects Genome Stability Independent of p53. *Cancer Res.* 1;69(5):1697-701.

Burt DW (2001). Chromosome Rearrangement in Evolution. Encyclopedia of life science. *John Wiley & Sons.* http//www.els.net DOI: 10.1038/npg.els.0001500 (Citado 29/11/10)

Campbell NA; Reece JB. (2007). *Biología.* 7a Edición. Editorial Médica Panamericana. España. pp 232.

Campbell PN. (2006). *Bioquímica ilustrada: bioquímica y biología molecular en la era posgenómica*. 5a Edición. Editorial Elsevier-Masson. España. pp. 220.

Cruz-Coke MR. (2003) Valoración de trabajos clásicos en la historia de la genética. *Rev. méd. Chile* v.131 n.2.

Czepulkowski B. (2001). *Analyzing chromosomes*. 1a Edición. Editorial BIOS Scientific Publisher. USA. pp 49,178-181.

Dawson AB. (1926). *A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red s.* Vol. 1, No. 4 , Pages 123-124.

De Vree PJP; Simon M; van Dooren MF; Stoevelaar GHT; Hilkmann JTW; Rongen MA; Huijbregts GCM; Verkerk AJMH and Poddighe PJ. (2009). Application of molecular cytogenetic techniques to clarify apparently balanced complex chromosomal rearrangements in two patients with an abnormal phenotype: case report. *Mol Cytogenet*. 2:15.

Descailleaux J. (1980). Avances en los estudios citogenéticos. *Revista de Ciencias U.N.M.S.M.* Vol 72, No. 1. pp 71-85.

Díaz S. y Ruíz C. (2006). Estudio teratogénico del gabapentin en ratones. *CREANDO revista científica juvenil.* Mérida-Venezuela. ISSN 1316-9505. Vol. V 75-80.

Dierssen M; Herault Y and Estivill X. (2009). Aneuploidy: from a physiological mechanism of variance to down syndrome. *Physiol. Rev.* 89: 887-920, doi:10.1152/physrev.00032.2007.

Drets ME. (2002). Una saga citogenética: El descubrimiento de los métodos de bandeo cromosómico. Significado y proyección bio-médica. *Rev Med Uruguay.* 18 107-121.

Dudarewicz L; Holzgreve W; Jeziorowska A; Jakubowski L; Zimmermann B. (2005). Molecular methods for rapid detection of aneuploidy. *J Appl Genet* 46(2), pp. 207-215.

Dvash T; Lavon N and Fan G. (2010). Variations of X Chromosome inactivation occur in early passages of female human embryonic stem cells. *PLoS ONE* 5(6): e11330. doi:10.1371/journal.pone.0011330.

Ennis DG. (2001). Mutagenesis. *Encyclopedia of life science*. John Wiley & Sons. http// www.els.net DOI: 10.1038/npg.els.0000559. (Citado 07/12/10)

Erolu EH; Hamzaolu E; Aksoy A; Budak U; Ozkul Y. (2010). *In vitro* genotoxic Effects of four helichrysum species in human lymphocytes cultures. *Biol Res.* 00;43(2):177-182.

Espinet B. *Técnicas de citogenética molecular y sus aplicaciones*. Hospital de Mar de Barcelona. http://www.cekm.unlugar.com/tec_cit_mol.pdf. (Citado 30/09/10)

Eynard, A. (2008). H*istología y embriología del ser humano: bases celulares y moleculares.* 4ta Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. pp. 52.

Freeman SB; Allen EG; Oxford-Wright CL; Tinker SW; Druschel C; Hobbs CA; O'Leary LA; Romitti PA; Royle MH; Torfs CP and Sherman SL. (2007). The national down syndrome project: Design and implementation. *Public Health Rep*. 122(1): 62–72.

Fulcher EM. (2007). *Introducción a la terapia intravenosa para profesionales de la salud*. Editorial Elsevier. España. pp 37.

Galán GE. (2002). Aplicaciones del laboratorio de citogenética a la clínica. *Pediátrica Integral*; 6(9):820-830

García CJ. (2000). *Oncología clínica básica*. 1a Edición. Aran Ediciones. España. pp 52,53

García RMC; Altamirano LMA. (2007). La clorofilina como modulador y protector de daño al ADN: experiencia en el ratón in vivo. *Bioquimia*. Volumen 32 No. 1. pp. 15-24.

Gall JG; Pardue ML. (1969). Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*.; 63(2):378-83.

Gianaroli L; Magli;Cavallini G; Crippa A; Capoti A; Resta S; Robles F and Ferraretti AP. (2010). Predicting aneuploidy in human oocytes: key factors which affect the meiotic process. *Hum Reprod.* 25(9): 2374–2386.

Giri S; Giri A; Sharma GD; Prasad SB. (2003). Induction of sister chromatid exchanges by cypermethrin and carbosulfan in bone marrow cells of mice in vivo. *Mutagenesis.* 18(1):53-8.

Goldys EM. (2009). *Fluorescence aplications in biotechnology and life sciences*. 1a Edición. Editorial Wiley-Blackwell. USA. pp. 300, 298.

Gole L. (2001). Fluorescence in situ Hybridization. *Encyclopedia of life science*. John Wiley & Sons. http//www.els.net DOI: 10.1038/npg.els.0001468 (Citado 09/09/10)

González BJM. (2005). *Técnicas y métodos de laboratorio clínico*. 2a Edición. Editorial Masson. España. pp.452, 453

Gonzalez-Gil G; Navarrete MH. (1982). On the mechanism of differential Giemsa staining of brd U-substituted chromatids. *Chromosoma* (Berl.) 86, 375-382.

Graves AE; Freeman SB; Druschel C; Hobbs CA; O'Leary LA; Romitti PA; Royle MH; Torfs C and Sherman SL. (2009). Maternal age and risk for trisomy 21 assessed by the origin of chromosome nondisjunction: a report from the Atlanta and National Down Syndrome Projects. *Hum Genet*. 125(1): 41–52.

Hassold T and Hunt P. (2001). To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews Genetics* 2, 280-291. doi:10.1038/35066065.

Hendrich BD; Plenge RM; and Willard HF. (1997). Identification and characterization of the human XIST gene promoter: implications for models of X chromosome inactivation. Oxford University *PressNucleic Acids Research,*.Vol. 25, No. 13 2661–2671.

Hernández AE. (2006). Mobile genetic elements in molecular studies of insects (Drosophila) and primates. *Salud Uninorte*. Barranquilla (Col.) 22 (2): 154-167.

Hernando DC. (2005). *Caracterización de anomalías cromosómicas en diagnóstico prenatal y postnatal mediante técnicas de citogenética molecular*. Tesis Doctoral. Universidad Autonoma de Barcelona. España.

Houwen CVD; Schukken T and Pampus MV. (2009). Transient early preeclampsia in twin pregnancy with a triploid fetus: a case report. *J Med Case Reports*. 3: 7311.

Hovhannisyan GG. (2010). Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. *Mol Cytogenet.* 3: 17.

Hultén MA; Patel SD; Westgren M; Papadogiannakis N; Jonsson AM; Jonasson J and Iwarsson E. (2010). On the paternal origin of trisomy 21 Down syndrome. *Mol Cytogenet.* 3: 4.

Jacobson K. (2010). Fluorescence Microscopy. *Encyclopedia of life science*. John Wiley & Sons. http//www.els.net DOI: 10.1002/9780470015902.a0002637.pub2. (Citado 17/09/10)

Jorde LB. (2005). *Genética médica*, 3a Edición. Editorial Elsevier. España. pp 122, 129.

Kaminker P; Armando R. (2008). Síndrome de Down. Primera parte: enfoque clínico-genético. *Arch Argent Pediatr*. 106(3):249-59.

Klug WS. (2006). *Conceptos de genética*, 8a Edición. Editorial Pearson. España. pp. 199, 200.

Klug WS. (2005). *Essential of Genetics.* 5a Edición. Editorial Pearson. USA. pp. 103.

Krishna G; Hayashi M. (2000). *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res*. 455(1-2):155-66.

Lacadena JR. (1996). *Citogenética.* 1a Edición. Editorial Complutense. España. pp 82, 150-151.

Lamb ME; Yu K; Shaffer J; Feingold E and Sherman SL. (2005). Association between maternal age and meiotic recombination for trisomy 21. *Am J Hum Genet*. January; 76(1): 91–99.

Latt SA; Schreck RR. (1980). Sister chromatid exchange. Analysis. A*m J Hum Genet* 32:297-3 13.

Liman R; Akyil D; Eren Y; Konuk M. (2010). Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/Salmonella and Allium test. *Chemosphere*. 80 (9):1056-61.

Liu W and Sun X. (2009). Skewed X chromosome inactivation in diploid and triploid female human embryonic stem cells. *Human reproduction*, vol 24, No 8 pp. 1834-1843.

Luque CJ. (2001). *Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. 1a Edición. Editorial Elsevier. España. pp. 176, 258.

Luthardt FW; Keitges E. (2001). Chromosomal syndromes and genetic disease. *Encyclopedia of life science*. John Wiley & Sons. http//www.els.net DOI: 10.1038/npg.els.0001446 (Citado 30/10/10)

Lyon MF. (2007). X-chromosome inactivation and disease. *Encyclopedia of life science.* JohnWiley & Sons. http//www.els.net. DOI: 10.1002/9780470015902.a0005480. pub2 (Citado 17/11/10)

Martin BM. (2001). Safety considerations in the tissue culture laboratory. *Encyclopedia of life science*. John Wiley & Sons. http//www.els.net DOI: 10.1038/npg.els.0002563. (Citado 19/09/10)

Mascarenhas OA; FletcherJA. (2006). Translocation breakpoints in cancer. *Encyclopedia of life science.* John Wiley & Sons. http//www.els.net DOI: 10.1038/npg.els.0006066.) (Citado 03/12/10)

Masters BR. (2008). History of the optical microscope in cell biology and medicine. *Encyclopedia of life science.* John Wiley & Sons. http//www.els.net DOI: 10.1002/9780470015902.a0003082. (Citado 04/10/10)

Masters BR. (2010). The development of fluorescence microscopy. *Encyclopedia of life science.* John Wiley & Sons. http//www.els.net DOI: 10.1002/9780470015902.a0022093. (Citado 01/10/10)

Mavournin KH; Blakey DH; Cimino MC; Salamone MF; Heddle JA. (1990). The in vivo micronucleus assay in mammahan bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*, 239; 29-80.

Mericko P; Helmirch A; Chen L; Kusamoto K; Toumadje; Chapline C; Sato D; Barnes DW. (2002). Cell culture: basic procedures. *Encyclopedia of life science*. John Wiley & Sons. http//www.els.net DOI: 10.1038/npg.els.0002556. (Citado 08/10/10)

Miller OJ. (2001). *Human Chromosomes.* 4a Edición. Editorial Springer. USA. pp. 81-83.

Mondal MS; Gabriels J; McGinnis C; Magnifico M; Marsilje TH; Urban L; Collis A; Bojanic D; Biller SA; Frieauff W; Martus HJ; Suter W; Bentley P. (2010). High-content micronucleus assay in genotoxicity profiling: initial-stage development and some applications in the investigative/lead-finding studies in drug. *Discovery Toxicol*. Sci. 118 (1): 71-85.

Montengua BL. (2009). *Técnicas de histología y biología celular*. 1a Edición. Editorial Elsevier. España. pp. 23, 24, 32.

Moore CM; Best RG. (2001a). Chromosome preparation and banding. *Encyclopedia of life science*. John Wiley & Sons. http//www.els.net DOI: 10.1038/npg.els.0001444 (Citado 20/09/10)

Moore CM; Best RG. Chromosomal genetic disease: structural aberrations. *Encyclopedia of life science*. John Wiley & Sons. (2001b). http//www.els.net DOI: 10.1038/npg.els.0001452. (Citado 29/09/10)

Moore CM; Best RG. (2007). Chromosome mechanics. *Encyclopedia of life science*. John Wiley & Sons. http//www.els.net DOI: 10.1002/9780470015902.a0001441.pub2. (Citado 20/09/10)

Moore KL; Persaud TVN. (2004). *Embriología clínica*. 7a Edición. Editorial Elsevier. España. pp. 172, 175-180.

Morel G. (2000). *Hibridación* in situ *en microscopía óptica*. Universidad Santiago de Compostela. España. pp 152.

Murray PR. (2005). *Microbiología médica*. 5a Edición. Editorial Elsevier Mosby. España. pp. 82.

Nanjiani A; Hossain A; Mahgoub N. (2007). Patau syndrome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci. Spring;*19(2):201-2.

Nevo E. (2006). Speciation: Chromosomal mechanisms. *Encyclopedia of life science*. John Wiley & Sons. http//www.els.net DOI: 10.1038/npg.els.0004168 (Citado 21/09/10)

O'Connor C. (2008). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Nature Education* 1(1) http://www.nature.com/scitable/topicpage/fluorescence-in-situ-hybridization-fish-327 (Citado 14/10/10)

Ogur G; Van Assche E; Vegetti W; Verheyen G; Tournaye H; Bonduelle M; Van Steirteghem A; Liebaers I. (2006). Chromosomal segregation in spermatozoa of 14 robertsonian translocation carriers. *Mol Hum Reprod.* 12(3):209-15.

Oliva R. (2004). *Genética médica*. 3a Edición. Editorial Publicaciones i edicions. España. pp. 129.

Oliveira RM; Verreschi IT; Lipay MV; Eça LP; Guedes AD; Bianco B. (2009). Y chromosome in Turner syndrome: review of the literature. *Sao Paulo Med J.* 127(6):373-8.

Oliver TR; Feingold E; Yu K; Cheung V; Tinker S; Yadav-Shah M; Masse N and Sherman SL. (2008). New insights into human nondisjunction of chromosome 21 in Oocytes. *PLoS Genet.* 4(3): e1000033.

Olesen C, Steffensen FH, Nielsen GL, de Jong-van den Berg L, Olsen J, Sørensen HT. (1999). Drug use in first pregnancy and lactation: a population-based survey among Danish women. *Eur J Clin Pharmacol.* 55: 139 -144.

Pack SD; Stratakis CA. (2002). Chromosomes: methods for preparation. *Encyclopedia of life science*. John Wiley & Sons. http//www.els.net DOI: 10.1038/npg.els.0002709 (Citado 21/09/10) Pagana KD. (2008). "Guía de pruebas diagnósticas y de laboratorio". 8a Edición. Editorial Elsevier Mosby. pp. 242.

Pardue ML; Gall JG. (1969). Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 64(2):600-4.

Parry JM; Parry EM. (2006). Environmental mutagenesis. *Encyclopedia of life science.* John Wiley & Sons. http//www.els.net DOI: 10.1038/npg.els.0005559 (Citado 09/12/10)

Park J; Hoon WJ. (2010). Application of a target array comparative genomic hybridization to prenatal diagnosis. *BMC Med Genet.* 11: 102.

Passarge E. (2004). *Genética. Texto y atlas*. 2a Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. pp. 386, 388.

Pastor BS. (2002). *Biomonitorización citogenética de cuatro poblaciones agrícolas europeas expuestas a plaguicidas, mediante el ensayo de micronúcleos.* Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. España.

Pimentel PE; Ortiz MAR y Breña VM. (2006). *Tópicos de genética.* Universidad Autónoma del Estado de México. México. Pp 209-210.

Prasad S; Srivastava S; Singh M; Shukla Y. (2009). Clastogenic effects of glyphosate in bone marrow cells of swiss albino mice. *J Toxicol.* 2009: 308985.

Puerto NS. 2001. *Relación entre heterogeneidad intragenómica y formación de aberraciones cromosómicas.* Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. España.

Quintanar TM. 2005. *Inducción de intercambios de cromátides hermanas y modificación de la cinética de proliferación celular provocada por el extracto hexánico de cuachalalate en cultivo de linfocitos humanos*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.

Rasmussen SA; Wong LYC; Yang Q; May KM; Friedman JM. (2003). Population-based analyses of mortality in trisomy 13 and trisomy 18. *Pediatrics* Vol. 111 No. 4. pp. 777-784.

Robinson WP; McFadden DE. (2001). Chromosomal genetic disease: numerical aberrations. *Encyclopedia of life science*. John Wiley & Sons. http//www.els.net DOI: 10.1038/npg.els.0001451. (Citado 28/10/10)

Rodríguez AR. (2005). *Manual de prácticas de genética y cuaderno de trabajo*.1a Edición. UNAM. México. pp. 80, 155.

Rodríguez CA; Torres LD; Rodríguez PA; Serrera FMA; Hernández GJM; Machuca PG. (2010). Cri du chat syndrome: a critical review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 15(3):e473-8.

Rodríguez. CE. (2005a). *Bacteriología general: principios y prácticas de laboratorio.* Editorial Universidad de Costa Rica. Costa Rica. pp. 364-365.

Rojas JJ; Jubiz W; Isaza C. (2005). Gen SRY y ausencia de tejido testicular en una mujer 47XYY con disgenesia gonadal. *Colomb Med* vol.36 no.1.

Romero CR. (2007). *Microbiología y parasitología humana*. 3a Edición. Editorial Médica Panamericana. México. pp 41.

Ross JL; Zeger M; Kushner H; Zinn AR; and Roeltgen DP. (2009).An extra X or Y chromosome: contrasting the cognitive and motor phenotypes in childhood in boys with 47,XYY syndrome or 47,XXY Klinefelter syndrome. *Dev Disabil Res Rev.* 15(4):309-17.

Rost FWD. (1995). *Fluorescence Microscopy.* Vol.II. Editorial Cambridge University Press. USA. pp. 91,202,288,353,366.

Sack GH. (2002). *Genética médica.* 3a Edición. Editorial Mc Graw Hill. México. pp 72-73.

Santos GA; Abad HMM; Fonseca SE; Cruz HJJ; Bullón SA. (2005). Expresión proteica de p53 y proliferación celular en leucoplasias. *Med orales Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 10:1-8.

Sawalha AH; Harley JB and Scofield RH. (2009). Autoimmunity and Klinefelter's syndrome: when men have two X chromosomes. *J Autoimmun.* 33(1): 31–34.

Schenderman JI; Goldstein S. (2010). Perturbation analysis of heterochromatin-mediated gene silencing and somatic inheritance. *Plos Genet*. 6(9) e1001095.

Shaffer LG. (2006). Karyotype interpretation. *Encyclopedia of life science*. John Wiley & Sons. http// www.els.net DOI: 10.1038/npg.els.0005778. (Citado 21/09/10)

Shaffer LG and Lupski JR. (2000). Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annual Review of Genetics*. Vol. 34: 297-329.

Shaffer LG. (2005). *ISCN 2005: An international system for human cytogenetic nomenclature (2005): recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature*. Editorial Karger Publesher. pp. 6, 7, 13.

Shen Y; Matsuno Y; Fouse SD; Rao N; Root S; Xu R; Pellegrini M;. Riggs AD, and Fan G. (2008). X-inactivation in female human embryonic stem cells is in a nonrandom pattern and prone to epigenetic alterations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(12): 4709–4714.

Sizonenko PC. (2011). *Humanos: diferenciación sexual*. Revisado de http://www.gfmer.ch/Books/Reproductive_health/Human_sexual_differentiation.html

Sobotta J; WelschU. (2009). *Histología*. 2a Edición. Editorial Médica Panamericana. España. pp. 2, 228-229.

Solari AJ. (2004). *Genética humana: fundamentos y aplicaciones en medicina*. 3a Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. pp. 376.

Stimpson KM; Young SI; Jauch A; Holtgreve-Grez H; Hayden KE; Bridger JM and Sullivan BA. (2010). Telomere disruption results in non-random formation of de novo dicentric chromosomes involving acrocentric human chromosomes. *PLoS Genet*. 6(8): e1001061.

Sullivan BA, Karpen GH. (2004).Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin. *Nat Struct Mol Biol.* 11(11):1076-83.

Sumitra Sen. (2005). *Cytology and genetics*. 1a Edición. Editorial alphascience international. U. K. pp. 235.

Tartaglia NR; Howell S; Sutherland A; Wilson R and Wilson L. (2010). A review of trisomy X (47,XXX).*Orphanet J Rare Dis*. 5: 8.

Teixeira J; Maheswaran S and Donahoe PK. (2001). Müllerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocrine Reviews*. 22 (5): 657-674.

Thomas NS; Durkie M; Van Zyl B; Sanford R; Potts G; Youings S; Dennis Nv Jacobs P. (2006). Parental and chromosomal origin of unbalanced de novo structural chromosome abnormalities in man. *Hum Genet.* 119(4):444-50.

Tompa A. (2007). Theory and practice of primary cancer prevention. *Magy Onkol.* 51(1):7-21.

Torres HMC; Marugán MJM; Rodríguez FLM. (2005). Supervivencia de 14 años en un paciente con síndrome de Edwards. *Anales de Pediatría* 63(5):458-9.

Tortora GJ. (2007). *Introducción a la microbiología*. 9a Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. pp 58, 188, 191.

Trossero C; Caffarena G; Hure E; Rizzotto M. (2006). Detección de mutagenicidad en compuestos N-Nitroso con el test de ames. *Acta Farm. Bonaerense* 25 (1): 139-44

Turnpenny P. (2009). *Emery, elementos de genética médica*.13a Edición. Editorial Elsevier. España. pp 32,34.

Uchida K. (2006). Gene amplification and cancer. *Encyclopedia of life science*. John Wiley & Sons. http//www.els.net DOI: 10.1038/npg.els.0006047. (Citado 03/12/10)

Valencia AG. (2004). *De la técnica a la modernidad: construcciones técnicas, ciencia, tecnología y modernidad*. 1a Edición. Editorial Universidad de Antioquia. Colombia. pp. 78-81.

Van Staveren WCG; Weiss SD; Delys L; Duprez L; Andry G; Franc B; Thomas G; Libert F; Dumont JE; Detours V; MaenhautC. (2007). Human thyroid tumor cell lines derived from different tumor types present a common dedifferentiated phenotype. *Cancer Res.* 67: (17).

Verma RS. (1995). *Human chromosomes. Principles and techniques*. 2a Edición. Editorial Mc Graw Hill. pp72, 165.

Visootsak J; Graham JM Jr. (2006). Klinefelter syndrome and other sex chromosomal aneuploidies. *Orphanet J Rare Dis*. 24;1:42.

Vives JL. (2006). *Manual de técnicas de laboratorio de hematología*. 3a Edición. Editorial Elsevier. España. pp 69-71,74.

Vorsanova SG; Yurov YB and Iourov IY. (2010). Human interphase chromosomes: a review of available molecular cytogenetic technologies. *Mol Cytogenet.* 3: 1.

Wang YP; Castleman KR. (2005). Normalization of multicolor fluorescence in situ hybridization (M-FISH) images for improving color karyotyping. *Cytometry Part A* 64A:101–109.

Warburton D. (2006). Chromosome analysis and identification. *Encyclopedia of life science.* John Wiley & Sons. http//www.els.net DOI: 10.1038/npg.els.0005775. (Citado 21/09/10)

Wiseman FK; Alford KA; Tybulewicz VLJ and Elizabeth M.C. Fisher. (2009). Down syndrome—recent progress and future prospects. *Hum Mol Genet.* 18(R1): R75–R83.

Wyandt HE; Tonk VS. (2004). *Atlas of human chromosome heteromorphisms*. 1a Edición. Editorial Kluver Academic Publishers. Holanda. pp13.

Zalacain M; Sierrasesúmaga L; Patiño A. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *An. Sist. Sanit. Navar.* 28 (2): 227-236.

Zaragoza MV; Surti U; Redline RW; Millie E; Chakravarti A; and Hassold TJ. (2000). Parental origin and phenotype of triploidy in spontaneous abortions: predominance of diandry and association with the partial hydatidiform. *Mole Am. J. Hum. Genet.* 66:1807–1820.

Zaragoza MV; Surti U; Redline RW; Millie E; Vekemans M. (2006). Trisomy. *Encyclopedia of life science*. John Wiley & Sons. http//www.els.net DOI: 10.1038/npg.els.0005544 (Citado 15/10/10)

ANEXO 1

TÉCNICAS MOLECULARES

Objetivo

Que el alumno conozca los fundamentos teóricos de una técnica molecular aplicada en citogenética como lo es la hibridación *in situ* por fluorescencia y sus variantes CGH y M-FISH, como alternativa en el diagnóstico citogenético.

Introducción

En el año de 1969, los investigadores Joseph Gall y Mary Lou Pardue se dieron cuenta de que la hibridación molecular podría ser usada para identificar la posición de las secuencias de ADN in situ (**Gall, 1969**). Meses después, los dos científicos publicaron un documento histórico que demuestra que las copias radiactivas de una secuencia de ADN ribosomal se podrían utilizar para detectar secuencias de ADN complementarias en el núcleo de un óvulo de rana Xenopus (**Pardue, 1969**).

El cariotipo humano, por lo general, se estudia a través de las técnicas de la citogenética clásica (bandeo cromosómico) y para llevarlas a cabo se tienen que obtener células mitóticas en metafase para poder observar los cromosomas. Esto conduce a realizar un cultivo celular, lo que implica mayor tiempo, así como la imposibilidad de analizar todas las células en metafase haciéndose una extrapolación de los datos del análisis cromosómico realizado a un par de decenas de células metafásicas para todo el organismo, lo que sugiere que todas las células restantes poseen estos genomas. Por lo anterior, las técnicas de citogenética molecular han demostrado ser mucho más eficaces y actualmente son reconocidas como un valioso complemento de las técnicas de la citogenética clásica, para dar un diagnóstico más preciso, certero y en menor tiempo, ya que por medio de ellas se pueden utilizar células tanto en interfase como en metafase, lográndose analizar un gran número de células de manera más fácil y rápida (**Vorsanova, 2010**).

La hibridación in situ por fluorescencia (FISH) utiliza moléculas fluorescentes para localizar genes o fragmentos de ADN. Esta técnica es especialmente útil para mapear genes o localizar anormalidades cromosómicas. La técnica consiste en preparar cortas secuencias de ADN de una sola hebra, llamadas sondas, que son complementarias de las secuencias de ADN que se quieren marcar y examinar. Estas sondas se "marcan" con moléculas fluorescentes (por ejemplo con biotina o fluoresceína) y se hibridan o unen al ADN complementario. Se entiende por hibridización a la unión por complementaridad

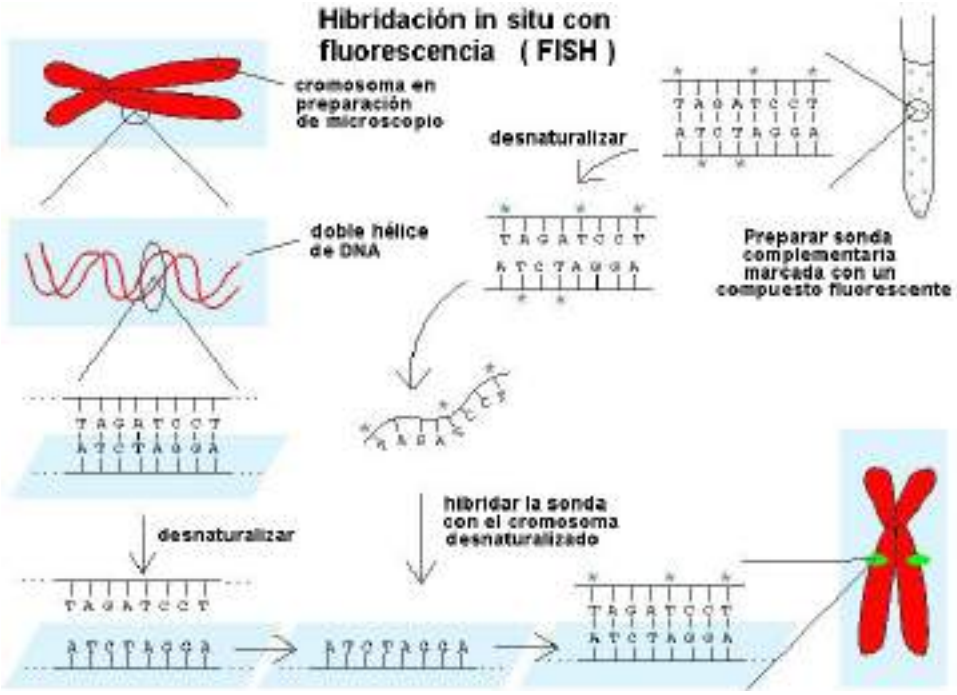


Figura 1. Figura que muestra los pasos de la técnica FISH en relación al marcaje de un locus específico (www2.uah.es)

de bases de dos cadenas sencillas de ácidos nucleicos que bien pueden ser ADN-ADN ó ADN-ARN. Como están marcadas con moléculas fluorescentes, permiten localizar las secuencias en las que se encuentran. A diferencia de otras pruebas utilizadas para estudiar los cromosomas que requieren que las células se encuentren en división activa, la hibridación fluorescente in situ puede ser llevada a cabo en células no activas y activas. Ver figura 1.

Elección de la sonda

La elección de la sonda es la decisión crucial y depende en gran medida de lo que se va a identificar. En citogenética clínica, las sondas de ADN a partir de ADN genómico de una región específica son las que, por lo general se utilizan, ya que son de mayor tamaño y se visualizan fácilmente en comparación con las sondas de ARN, cuya principal aplicación es la detección de ARN mensajeros (ARNm) expresados en células y tejidos.

Oligen de sondas

Básicamente existen cuatro tipos de preparación de las sondas que se puede utilizar en la realización de la hibridación in situ.

Sondas de oligonucleótidos

Estas sondas se preparan por una síntesis química automatizada. El método utiliza los desoxinucleótidos disponibles, los cuales son económicos, pero por supuesto se requiere que se conozca la secuencia de nucleótidos específicos que se desea preparar. Estas sondas tienen la ventaja de ser pequeñas, generalmente alrededor de 40-50 pb y resistentes a RNAsas. Esto es ideal para la hibridación *in situ* debido a su tamaño pequeño

que permite la fácil penetración en las células o tejidos de interés; asimismo, otra de las ventajas es que son de cadena sencilla lo cual excluye la posibilidad de una renaturalización (genedetect.com).

Sondas de Aec de cadena sencilla

Estas sondas son de menor tamaño entre 100 pb hasta 20 kb. El método de preparación (PCR) también consta de un menor número de fases, por lo que las sondas se obtienen de forma más rápida y sencilla. En general, partiendo del ADN de doble hebra se preparan sondas de la misma naturaleza, salvo en la PCR asimétrica, que conduce al ADN de hebra sencilla, y en la RT-PCR, que permite obtener sondas de ADN de doble hebra partiendo de un ARN **(Luque, 2001).**

Sondas de Aec doble cadena

Éstas pueden ser preparadas por la inclusión de la secuencia de interés en una bacteria que se multiplica, se lisa y el ADN se extrae, se purifica y la secuencia de interés se extirpa con enzimas de restricción. Además, si la secuencia es conocida, entonces se puede producir, con gran rapidez, la secuencia pertinente por el diseño de cebadores adecuados por PCR, con lo que se puede obtener una muestra muy limpia. La ventaja del preparado de la bacteria es que es posible obtener grandes cantidades de la secuencia de la sonda en cuestión. **(genedetect.com).**

Sondas de ARc (sondas o ribosondas cRNA)

Puesto que los híbridos ARN-ARN son más estables que los híbridos ARN-ADN, las ribosondas ofrecen la posibilidad de realizar la hibridación en condiciones más estrictas, condiciones que ayudarán a aumentar la especificidad y reducir el fondo. Por lo tanto, una sonda no unida específicamente se puede eliminar por digestión con RNasa A, que es muy específica para ssARN **(Hadidi, 2003).**

La FISH utiliza tres tipos de sonda con relación al "blanco" al que se unen:

Sondas centroméricas o Sondas alfoides: son sondas que identifican solamente las secuencias repetidas de ADN a satélite humano. Son las sondas de FISH específicas para cada cromosoma, ya que se utilizan para identificar este ADN, que generalmente se encuentra cerca de los centrómeros. Permite la identificación y recuento de cromosomas humanos en interfase y contienen secuencias complementarias de las secuencias repetidas que se encuentran en los centrómeros de los cromosomas. Como pueden utilizarse sondas de diferentes colores, cada cromosoma puede ser marcado de manera distinta, con lo que se puede averiguar si un individuo tiene el número correcto de cromosomas o si tiene un cromosoma extra **(www.abbotmolecular.com).**

Sondas para la identificación de un locus específico: estas sondas se hibridan a una región particular de un gen siendo útiles cuando se quiere averiguar en que cromosoma se encuentra. Identifican reordenamientos que afectan a regiones cromosómicas más pequeñas que una banda G. Las sondas de banda específicas son capaces de detectar pequeños segmentos cromosómicos, tales como los implicados en translo-

caciones sutiles con puntos de interrupción localizados en distintas bandas (www.kreatech.com).

Sondas subteloméricas: identifican solamente regiones cromosómicas próximas a los telómeros que contienen secuencias únicas, específicas de cada cromosoma. Han demostrado ser una herramienta muy útilpara la detección de anomalías teloméricas implicadas en abortos recurrentes, así como en la detección de casos de retraso mental. Dicha identificación es importante dado que las regiones subteloméricas contienen una gran cantidad de genes (**Hernando, 2005**).

Sondas para pintado cromosómico: identifican cromosomas completos marcando cromosomas específicos. Son colecciones de sondas de un tamaño reducido, cada una de las cuales se hibrida a una secuencia diferente a lo largo de todo un cromosoma. Utilizando estas librerías de sondas, se puede marcar todo un cromosoma generando un cariotipo espectral. De esta manera, se consiguen imágenes en color que permiten examinar los cariotipos de una forma más exacta que los tradicionales cariotipos basados en bandas más o menos oscuras. Esta técnica es particularmente útil para examinar anormalidades cromosómicas (**Goldys, 2009**).

FISH de interfase

El FISH en interfase se utiliza para el análisis y la detección de anomalías numéricas (trisomías de los cromosomas 13, 18 y 21 principalmente) que representan la mayoría de las anomalías cromosómicas de interés especialmente en el diagnóstico prenatal, en las células del líquido amniótico y de las vellosidades coriónicas (**Gole, 2001**).

FISH de metafase

Las técnicas de citogenética de rutina son de gran valor para la información general de los cromosomas implicados, y FISH puede ser utilizada para obtener información precisa y la confirmación de los puntos de ruptura que no pueden ser visualizados por el microscopio óptico con las técnicas de la citogenética de rutina, tales como: las translocaciones de segmentos muy pequeños, inversiones de segmentos cromosómicos, muchas de las microdeleciones y síndromes de supresión de genes contiguos y otros marcadores cromosómicos (**Gole, 2001**).

Técnicas complementarias moleculares de hibridación in situ

En los últimos años la citogenética, en combinación con métodos moleculares, ha traído como consecuencia rápidos progresos, lo cuales han resultado en el desarrollo de técnicas más sofisticadas como son FISH, CGH y todas sus variedades (**Dudarewicz, 2005**).

La hibridación genómica comparada, también llamada CGH (Comparative Genomic Hybridization), es una técnica citogenética-molecular que permite detectar cambios numéricos de secuencias de ADN (deleciones, ganancias y amplificaciones) en un tejido tumoral. Dicha técnica se basa en la hibridación *in situ* del ADN tumoral y de un ADN control marcados con fluorocromos de distinto color y cohibridados en presencia de DNA Cot-1. Después de la hibridación, las variaciones numéricas del ADN tumoral se cuantifican mediante el coeficiente de intensidad de fluorescencia entre

el ADN tumoral y el ADN normal. A partir del análisis de un mínimo de 10 a 12 metafases se obtiene el valor promedio y se generan los perfiles de pérdida y ganancia (por encima del umbral 1.25 se considera ganancia y por debajo del 0.75 se considera pérdida) (**Hernando, 2005**).

Ya que la CGH compara las diferencias cuantitativas entre los genomas individuales, sus aplicaciones se limitan al análisis de pérdidas y ganancias de los cromosomas sin la evaluación directa de los cromosomas (**Vorsanova, 2010**).

Recientemente, la hibridación genómica comparativa de matriz (aCGH array comparative genomic hybridization) se ha utilizado en citogenética clínica prenatal y postnatal para detectar desequilibrios cromosómicos microscópicos. Esta técnica da resultados rápidos y la detección múltiple de ambas anomalías numéricas y desequilibrios estructurales con una resolución mucho más alta y cobertura más amplia que el cariotipo convencional y otras técnicas de citogenética molecular (**Park, 2010**).

Las técnicas M-FISH y SKY Multicolor (M-FISH) pueden visualizar la complejidad de los reordenamientos estructurales en una visión única, a veces sin ser detectados por la citogenética convencional mediante la aplicación de 24 colores distintos que separa a los cromosomas unos de otros (**de Vree , 2009**), permitiendo una rápida identificación de los 22 pares de homólogos y el par sexual. Estas técnicas son muy útiles para determinar de forma inequívoca cariotipos complejos y cromosomas no identificables con las técnicas de bandeo convencionales (marcadores cromosómicos) (**Hernando, 2005**). El M-FISH es una técnica citogenética recientemente desarrollada para el diagnóstico del cáncer y la investigación sobre los trastornos genéticos (**Wang, 2005**). Ver figura 2.

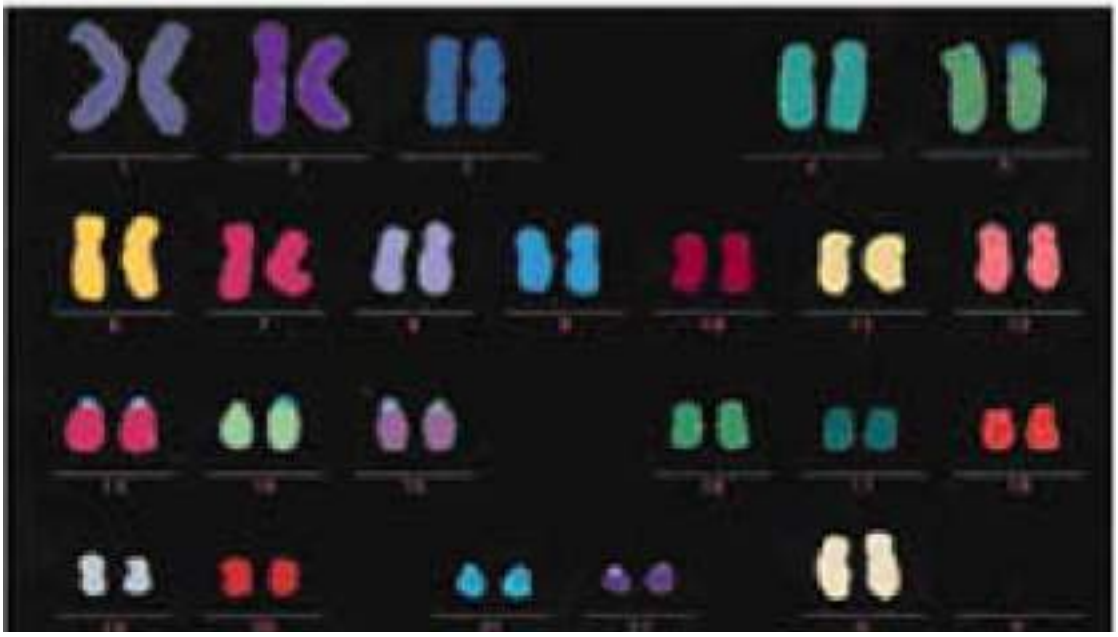


Figura 2. Análisis cromosómico por M-FISH (**Wang, 2005**).

Recientemente se ha descrito la técnica de multibanding-FISH (RxFISH), técnica similar a las de M-FISH o SKY, que permite la generación de un patrón de bandas de distintos colores para cada cromosoma. Dicha metodología se basa en las homologías genómicas que existen entre la especie humana y diferentes especies de mono. Las ventajas que ofrece respecto a las de M-FISH o SKY radican en que la de Rx-FISH permite la identificación de alteraciones estructurales dentro de un mismo cromosoma (inversiones y translocaciones) y en que los puntos de rotura de los posibles reordenamientos pueden ser localizados con mayor exactitud. Asimismo, permite determinar cariotipos complejos y cromosomas no identificables con las técnicas de bandeo (marcadores cromosómicos) pero tiene la limitación, como M-FISH y SKY, de necesitar células en división (**Hernando, 2005**). Ver figura 3.

M-FISH centromérica (cenMFISH) es otra nueva técnica de FISH multicolor que utiliza un coctel específico de sondas que permite la caracterización simultánea de todos los centrómeros humanos mediante el uso del marcado del ADN satélite centromérico como sondas. Cada par de cromosomas homólogos se distinguen uno de otros con un color distinto. Así los cromosomas pueden ser identificados a partir de un color del centrómero, obtenidos por la combinación de 1 a 5 fluorocromos (**Hernando 2005**). Ver figura 4.

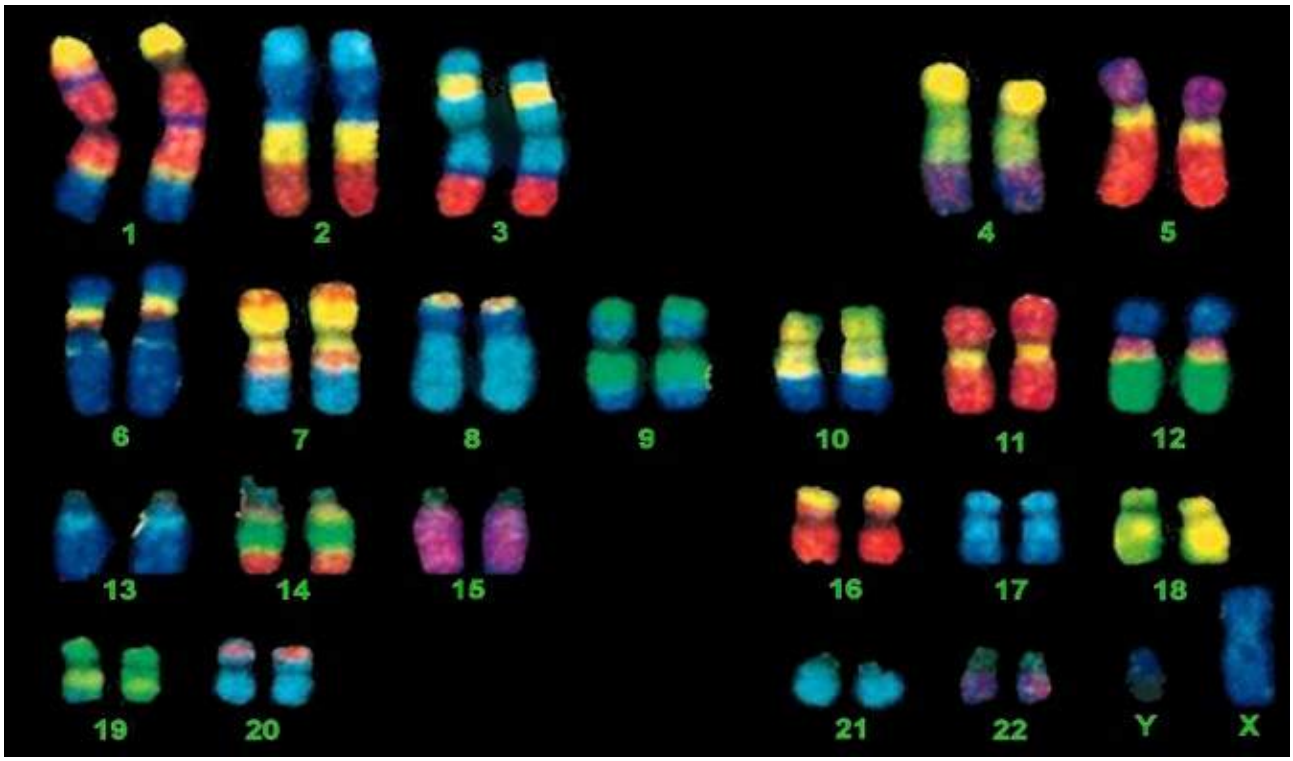


Fig 3. Cromosomas marcados con la técnica de FISH-multibanding (**Hernando, 2005**).

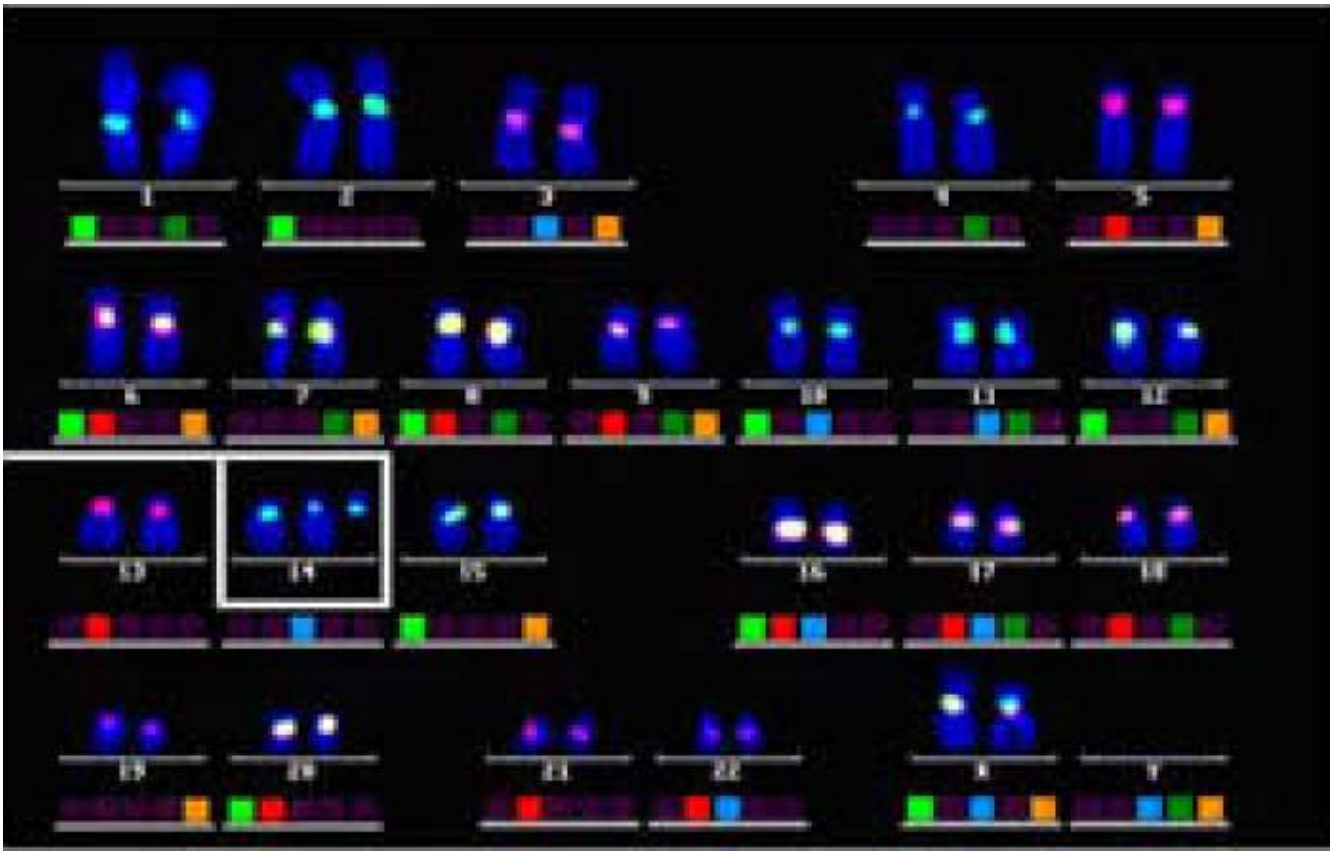


Figura 4. Cromosomas marcados con la técnica de FISH Multicolor de centrómero específico (Hernando, 2005).

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA		
Laboratorio: Citogenética humana **Práctica 1. Manejo de material y medios para cultivo celular**		
Nombre del alumno:	**Grupo:**	**Carrera:**
	Semestre:	**Fecha:**
Profesor de laboratorio:	**Firma:**	**Evaluación:**

	UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA		
	Laboratorio: Citogenética humana **Práctica 2. Elaboración de preparaciones cromosómicas a partir de cultivo de linfocitos**		
Nombre del alumno:		**Grupo:**	**Carrera:**
		Semestre:	**Fecha:**
Profesor de laboratorio:		**Firma:**	**Evaluación:**

	UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN** **DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS** **SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA**	
	Laboratorio: Citogenética humana **Práctica 3. Técnica de tinción selectiva por bandeo C y G**	
Nombre del alumno:	**Grupo:**	**Carrera:**
	Semestre:	**Fecha:**
Profesor de laboratorio:	**Firma:**	**Evaluación:**

	UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS SECCIÓN BIOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA HUMANA	
	Laboratorio: Citogenética humana Práctica 4. Cromatina "X" y Corpúsculo "Y"	
Nombre del alumno:	Grupo:	Carrera:
	Semestre:	Fecha:
Profesor de laboratório:	Firma:	Evaluación:

Citogenética humana
(Manual de laboratorio para BQD)

Los estudios citogenéticos han adquirido gran importancia en el diagnóstico clínico, por ello, es importante que el alumno conozca desde la elaboración de un cultivo hasta las técnicas de citogenética molecular. Este manual se centra en la elaboración y estudio de los cromosomas humanos a partir de un cultivo de linfocitos, sin embargo, la metodología utilizada puede aplicarse a la obtención de preparaciones cromosómicas de muchas otras especies, tanto vegetales como animales. Menciona, aunque de manera sucinta, algunas de las nuevas técnicas moleculares que sirven para el diagnóstico, el pronóstico y seguimiento de numerosas cromosomopatías.

colección: manuales de ciencias biológicas, químicas y de la salud