

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS,  
NATURALES Y AGRIMENSURA



Laboratorio  
**CENTRAL**  
de redes y programas

# Técnicas en Citogenética Oncohematológica

**PRACTICA OPTATIVA DE  
BIOQUIMICA**

**ALUMNA: LAURA DANIELA GALARZA**  
**DIRECTORA: BIOQ. MARIA ESTHER SOSA**



## Índice

INTRODUCCIÓN	2
PROCEDIMIENTO	10
EQUIPAMIENTO Y MATERIALES	11
CULTIVO DE CÉLULAS PARA LA OBTENCIÓN DE METAFASES	12
COSECHA DEL CULTIVO CELULAR	14
EXTENDIDO CELULAR	17
BANDEO GTW	19
ANÁLISIS CROMOSÓMICO	20
APLICACIÓN EN ONCOHEMATOLOGÍA	25
CONCLUSIÓN	28
BIBLIOGRAFÍA	28
ANEXO	30



## OBJETIVOS

### Generales:

-Adquirir formación teórica y práctica en los fundamentos y técnicas de la Citogenética Convencional aplicada en el análisis de cromosomas de médula ósea y sangre periférica de pacientes con neoplasias hematológicas.

### Particulares:

-Iniciar al alumno en el manejo de técnicas de citogenética convencional utilizadas para la obtención de cariotipos en médula ósea.

-Efectuar el control de calidad de los cultivos observando el índice mitótico, la presencia de restos citoplasmáticos (membrana) y dispersión cromosómica.

-Aprender a clasificar los cromosomas en grupos por su tamaño y morfología, en una tinción estándar, y por el patrón de bandas en el bandeo GTG.

-Adquirir hábitos de trabajo correctos y habilidades para el futuro uso de estas técnicas.

-Detallar las anomalías más frecuentes observadas en el transcurso de la práctica electiva.

## INTRODUCCIÓN

### Historia de la Citogenética

El año 1956 marcó el punto de partida de la era citogenética con el descubrimiento del número de cromosomas presente en las células humanas. Fueron Tjio y Levan (1956) quienes concluyeron que el complemento cromosómico estaba compuesto por 46 elementos y no 48 como se creía hasta ese entonces.

### Figura N° 1

*Metafase observada por Tjio, comprobando la existencia de 46 cromosomas en las células humanas*



Tjio, H. J., Levan, A. (1956). *Colchicine metaphases of human lung fibroblasts grown in vitro* [Imagen].  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1601-5223.1956.tb03010.x>



La técnica de tinción empleada permitía no sólo determinar la cantidad de elementos sino también su morfología, pudiendo clasificar los cromosomas en tres grandes grupos según el tamaño y la posición del centrómero. Uno de los primeros que intentó identificarlos fue Lejeune (1959); pudo reconocer sin dudas a los pares 1, 2, 3, 9, 16 e Y del complemento, siendo además de los primeros, junto con Turpin y Gauthier (1959), en reconocer la presencia de un cromosoma extra en el cariotipo de los pacientes con Síndrome de Down, correlacionando por primera vez una anomalía cromosómica con una patología humana conocida, abriendo las puertas al comienzo del estudio genético en la práctica clínica.

**Figura N° 2**

*Tinción de Giemsa (estándar). Se distinguen los cromosomas por el tamaño y la ubicación del centrómero*



En un intento por reconocer cada elemento de forma particular, Caspersson y col (1970) utilizaron el compuesto fluorescente mostaza de quinacrina, que se intercalaba entre las bases nitrogenadas del ADN generando segmentos fluorescentes con distinta intensidad de brillo (Bandeo Q) (**ver Anexo Figura N° 19**), logrando con ello la *caracterización cromosómica*. En la misma década, Summer (1971) pudo efectuar el bandeo cromosómico de regiones centroméricas de heterocromatina con solución salina caliente (2xSSC a 60°C) y posterior coloración con Giemsa (Bandeo C) (**ver Anexo Figura N° 20**). Ese mismo año, Seabright (1971) publicó por primera vez la técnica de bandeo cromosómico que usaba tripsina, una proteasa que rompía las uniones covalentes entre las bases purinicas y pirimidinicas (moléculas de A y T), permitiendo la penetración del colorante (Giemsa o Wright, obteniendo mejores resultados con este último), dando como resultado un patrón de bandas distintivo (Bandeo GTG); las regiones ricas en A y T se veían como bandas oscuras al microscopio, mientras que aquellas donde predominaban las bases C y G se apreciaban como bandas de color claro. El bandeo G, tiene la particularidad de que solo puede ser visualizado en metafase, motivo por el cual es necesario contar con células en división. La adquisición de esta técnica marcó un salto enorme en la historia de la citogenética, al permitir la identificación de cada par cromosómico mediante la visualización de estas bandas características en un microscopio de campo claro.



**Figura N°3**

*Bandeo GTG de una metafase humana; cariotipo: 46,XY*

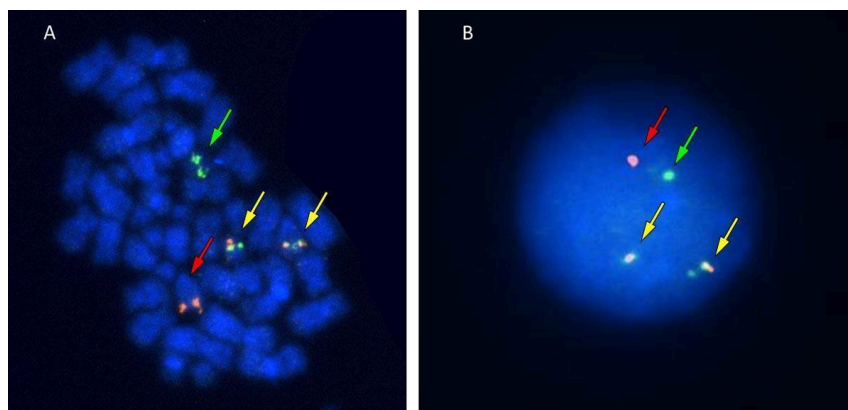


[Chromosome spread with chromosomes shown by bright field G-banding]. (2003).  
<http://www.pathology.washington.edu/galleries/Cytogallery/images/fgs.jpg>

Con el advenimiento de las técnicas moleculares, la citogenética como disciplina avanzó hacia el desarrollo de la citogenómica. En la década de los 80' comenzó a implementarse la tecnología molecular FISH (*hibridación in situ fluorescente*); haciendo uso de las propiedades de la molécula de ADN de desnaturalización y de re-hibridación, emplea “sondas” (fragmentos de ADN homólogo a una secuencia blanco marcados con una molécula de fluoróforo) que hibridan con las secuencias de interés, dando una señal luminosa de color característico observable en el microscopio de fluorescencia. Es aplicable a núcleos tanto en mitosis como en interfase con alta sensibilidad y especificidad. Con ella es posible confirmar o descartar alteraciones cromosómicas estructurales crípticas (200 a 400 bp) como duplicaciones, inserciones, deleciones, amplificaciones, inversiones, así como también intercambio de material genético balanceado.

**Figura N° 4**

*Sondas de doble fusión FISH de una célula en metafase (A). FISH de una célula en interfase (B) (se ven señales rojas, verdes y amarillas donde la última se da cuando ocurre la fusión de genes por una translocación recíproca)*







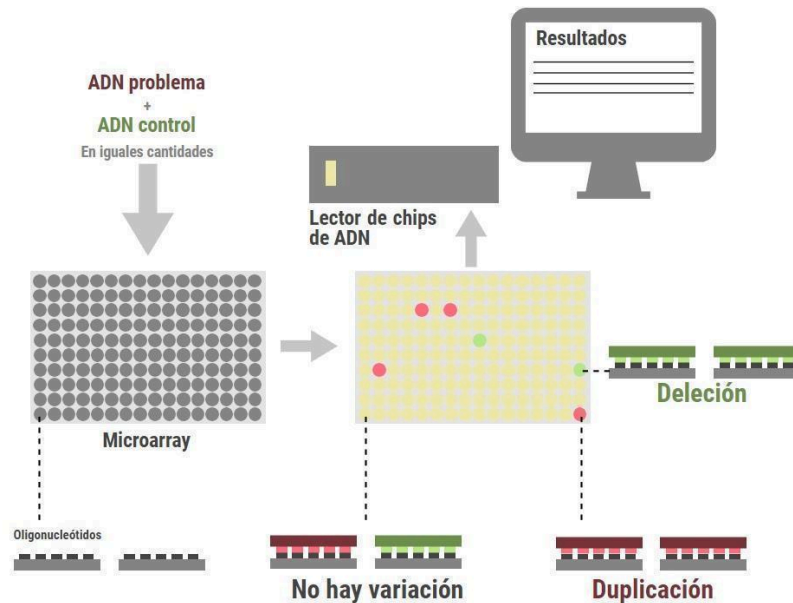
[Fluorescence in situ hybridisation (FISH) of t(15;17)(q22;q21)]. (2016).

<https://www.leukemia-cell.org/atlas/index.php?pg=images--acute-myeloid-leukaemia--recurrent-genetic-abnormalities--pml-rara#14>

Seguidamente, el continuo avance tecnológico llevó a la creación de CGH (*hibridación genómica comparativa*); como indica su nombre, ocupa microarrays que poseen sondas que hibridan todo el material genómico a ser examinado, efectuando luego una comparativa entre una muestra de referencia y la estudiada.

Figura N° 5

Esquema de la técnica CGH



Megía González, R. (2021). *Hibridación Genómica Comparativa: ¿Qué es y para qué sirve?* [Imagen]. Recuperado de <https://genotipia.com/cgh/>

### Estructura y Anomalías de los cromosomas humanos

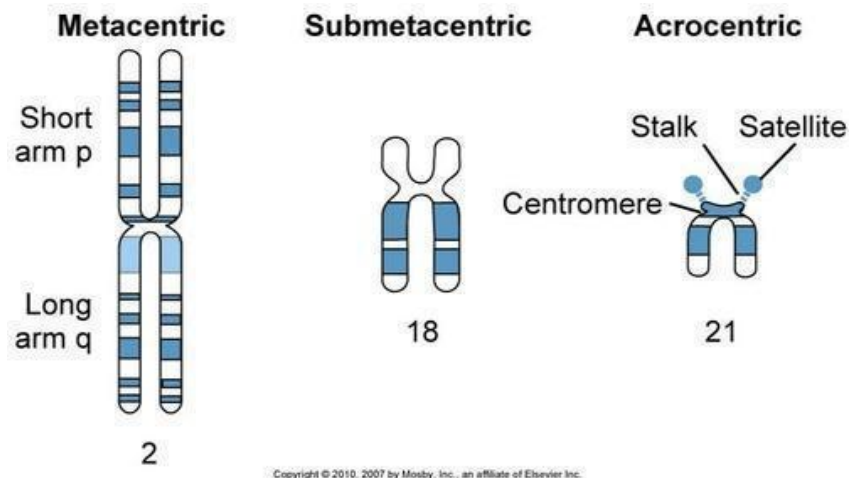
En metafase, la cromatina conforma una estructura altamente condensada compuesta por dos cromátides hermanas unidas en la constricción primaria o centrómero. La posición que ocupa define la presencia de un brazo corto p (petite) y un brazo largo q; cuando se ubica en el centro, el cromosoma será metacéntrico, mientras que aquellos donde el centrómero está desplazado hacia un extremo son submetacéntricos. Por último, los cromosomas con un centrómero ubicado próximo a un extremo distal se conocen como acrocéntricos.

El set cromosómico humano presenta 46 cromosomas que conforman 23 pares (22 pares autosómicos y un par sexual), los que se describen a través del cariotipo (ej: 46,XX). En un cariograma pueden agruparse en 7 grupos acorde a su tamaño y morfología, determinada por la posición del centrómero.



Figura N°6

*Tipos de cromosomas humanos según su morfología*



[Metacentric, submetacentric, and acrocentric chromosomes. Note the stalks and satellites present on the short arms of the acrocentric chromosomes]. (2019).

<https://basicmedicalkey.com/clinical-cytogenetics-the-chromosomal-basis-of-human-disease/>

Las anomalías cromosómicas representan una alteración en la composición genómica de un individuo; existen dos categorías principales en las que pueden clasificarse: anomalías numéricas o estructurales.

Anomalías numéricas:

- Aneuploidías: trisomías ( $2n+1$ ), monosomías ( $2n-1$ )
- Poliploidías: triploidías ( $3n$ ), tetraploidías ( $4n$ )

Anomalías estructurales:

- Deleciones
  - Duplicaciones
  - Inversiones
  - Inserciones
  - Translocaciones
  - Anillos
  - Isocromosomas
- Anomalías no balanceadas
- Anomalia balanceada

El hallazgo de un cierto tipo/s de aberraciones cobra relevancia ya que puede determinar la presencia de un clon celular anormal; estos pueden coexistir junto con células normales, por lo que para establecer su existencia es necesario encontrar:

- Dos o más células que contengan la misma alteración estructural. Ejemplo: Delección del(7)(q-)
- Dos o más células que posean la misma ganancia cromosómica. Por ejemplo: trisomía del 8
- Tres o más células con la misma pérdida cromosómica. Ejemplo: monosomía del 11

Al momento de proceder al análisis, es preciso conocer si se trata de un debut o si el paciente se halla bajo seguimiento. En el primer caso se han de observar un mínimo de 20 metafases antes de informar un cariotipo normal o cualquier tipo de anomalía presente; al hacer un

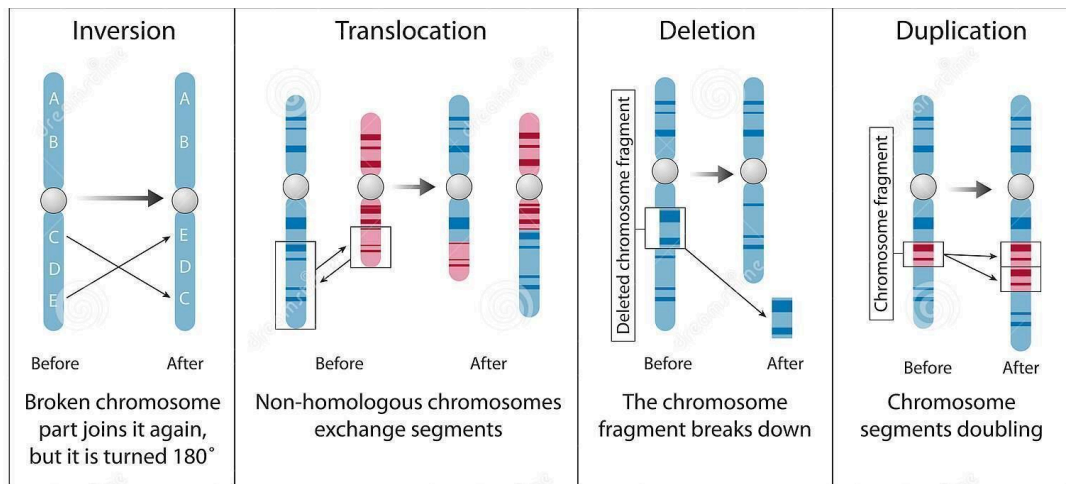


seguimiento del tratamiento, el estudio es más exhaustivo, analizando como mínimo 25 metafases antes de realizar el informe. En ambos casos, el reconocimiento de una anomalía implica su observación en al menos dos cultivos independientes.

Cuando las aberraciones se ven en una única célula no revisten mayor relevancia, excepto en aquellos casos donde esa alteración cromosómica esté asociada a una patología (se mencionan ejemplos en la sección “Aplicación en oncohematología”).

Figura N°7

Anomalías cromosómicas estructurales y su mecanismo de formación



Griskeviciene A. (2019). Anomalía cromosómica, trastorno, anomalía, aberración o mutación [Imagen].  
<https://www.alamy.es/anomalia-cromosomica-trastorno-anomalia-aberracion-o-mutacion-image432546236>

### Nomenclatura citogenética

El cariotipo se informa teniendo presente lo establecido por el Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenómica Humana (ISCN) vigente, que establece las normas a nivel internacional para la construcción del cariotipo de un individuo o de un clon celular. Se expresa con el número total de cromosomas presente en metafase y a continuación seguido de una coma, se indica el par sexual, XX o XY.

Ejemplo: 46,XX ó 46,XY

Para describir alguna alteración en un cromosoma en particular se debe nombrar el brazo (ya sea p o q), luego la región, luego la banda y finalmente la sub-banda.

Ejemplo: 7q21

Lo que se interpreta como la región 2 y banda 1 del brazo largo (q) del cromosoma 7.

- Anomalías numéricas

En el caso de las aneuploidías, se indica primero el número total de cromosomas, el complemento sexual y en los cromosomas autosómicos las pérdidas o ganancias se representan con un menos (-) y un más (+).

Ejemplo: 45,XY,-7 → monosomía del cromosoma 7





47,XX,+21  $\longrightarrow$  trisomía del cromosoma 21

En el caso de los cromosomas sexuales no se utilizan los signos más y menos, simplemente se añade o quita el cromosoma sexual implicado.

Ejemplo: 45,X  $\longrightarrow$  monosomía del cromosoma X

47,XXY  $\longrightarrow$  trisomía del cromosoma X

- Anomalías estructurales

Al igual que en las anomalías numéricas, luego del número total de cromosomas y el par sexual se detalla la alteración estructural que presente el cromosoma, aplicando una sigla indicativa de la misma (**Tabla N° 1**). Finalmente se coloca entre paréntesis el cromosoma implicado y seguido de otro paréntesis el brazo, región y banda afectados.

Ejemplo: 46,XX,del(8)(p22)  $\longrightarrow$  se tiene un cariotipo femenino con 46 cromosomas donde hay una delección en la región 2, banda 2 del brazo corto del cromosoma 8.

El punto y coma (;) se usa para separar a los cromosomas en caso de ser dos o más los que participen en la alteración junto a las bandas involucradas de dichos cromosomas

Ejemplo: 46,XY,t(8;14)(p21;q22)  $\longrightarrow$  se presenta un cariotipo masculino con 46 cromosomas donde hay una translocación de los brazos largos de los cromosomas 8 y 14.

**Tabla N° 1**

*Abreviatura de las anomalías estructurales usada para designar el cariotipo según ISCN*

del	Delección
dup	Duplicación
inv	Inversión
t	Translocación
ins	Inserción
r	Cromosoma en anillo
i	Isocromosoma
der	Cromosoma derivado
mar	Cromosoma marcador

Fuente: Elaboración propia

- Clones

Como se mencionó anteriormente, en las neoplasias en general es común la coexistencia de una línea celular normal junto con la línea tumoral. Para indicar la presencia de un clon se detalla primero la línea celular alterada y luego la normal (en caso de coexistir va siempre al final la línea celular normal). Se escribe entre paréntesis cuadrado ([ ]) la cantidad de metafases pertenecientes tanto al clon patológico, como a las células normales. En caso de coexistir más de una línea celular alterada, siempre se escribe primero la que contenga más células.

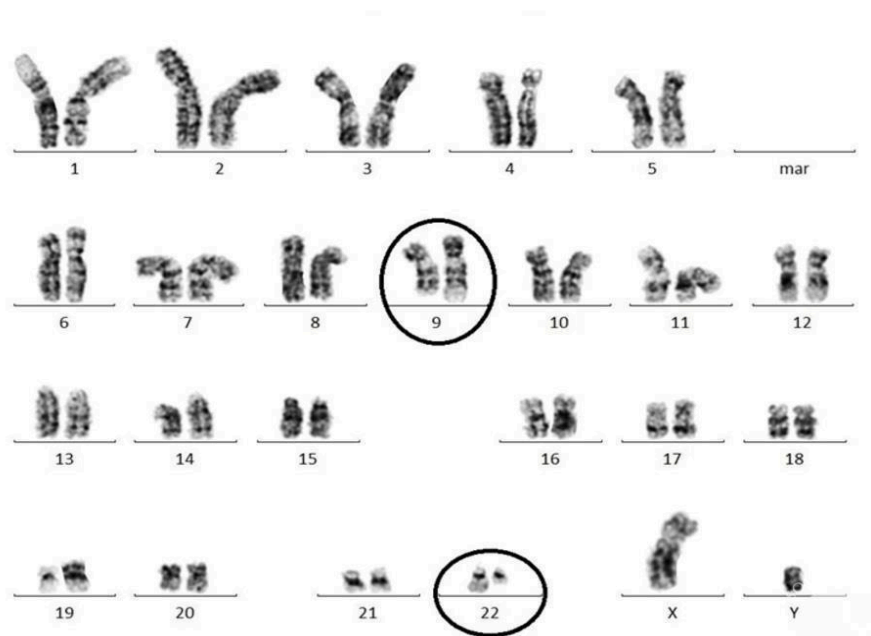
Ejemplo: 46,XX,t(15;17)[9]/46,XX[11]  $\longrightarrow$  se contaron 20 metafases de las cuales 9 presentan una translocación entre los cromosomas 15 y 17, y en las 11 restantes no se encontraron alteraciones.



La citogenética cobra especial relevancia en el análisis cromosómico de neoplasias de origen hematológico. Este grupo de enfermedades heterogéneas tiene como punto en común la expansión anormal y autónoma de un clon, que manifiesta diferentes grados de diferenciación y maduración (según de qué patología se trate). Diversos estudios han demostrado la presencia de ciertas anomalías cromosómicas características en pacientes afectados. David Hungerford y Peter Nowell (1960) observaron un pequeño cromosoma que se repetía en los pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC), recibiendo el nombre de “cromosoma Philadelphia” (Ph) por la ciudad en la que fue descubierto; fue Janet Rowley (1973) quien develó el mecanismo de formación del cromosoma Ph: la  $t(9;22)(q34;q11.2)$ , responsable del intercambio de material genético entre los cromosomas 9 y 22, siendo entonces la primera enfermedad oncohematológica en la que se estableció una relación evidente con una anomalía cromosómica determinada.

Figura N°8

Cariotipo:  $46,XY,t(9;22)(q34;q11)$



Kumar Yadav, A., Manorama, B. (2018). *Philadelphia chromosome by karyotype* [Imagen].  
<https://imagebank.hematology.org/collection/61436>

Hoy en día se conoce que el 95 % de las LMC son Ph positivas y su identificación en una muestra es diagnóstica. La  $t(9;22)(q34;q11.2)$  también se encontró en infantes con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), lo que demostró que estas anomalías no son específicas de una patología particular pero sirven para su caracterización.

El análisis *citogenético convencional* de los tejidos afectados (médula ósea, sangre periférica, ganglios linfáticos, entre otros) confirma el diagnóstico de una determinada patología oncohematológica, evalúa el riesgo y define el camino terapéutico a seguir; por todo esto, es la base para la nueva clasificación de tumores hematopoyéticos propuesta por la OMS (2017). Dado que las aberraciones cromosómicas halladas en los clones malignos le dan una entidad específica, es mandatoria su realización ya que:

- Permite la observación global del genoma humano a través de sus cromosomas
- Evidencia la clonalidad y por ello la neoplasia



- Es posible realizar una presunción del linaje celular del que forma parte del clon neoplásico
- Indica los posibles mecanismos de leucemogénesis y los sitios de supuestos oncogenes
- Confirma el diagnóstico
- Aporta información relevante para la estadificación
- Es indicativa del pronóstico
- Brinda información relevante para la elección de la terapéutica
- Evidencia regresión terapéutica
- Evidencia evolución clonal y con ello el empeoramiento del pronóstico

Como desventajas o debilidad de la técnica se puede enumerar:

1. Requiere de tejidos vivos, en división espontánea
2. Existe la posibilidad de obtener bajo o nulo índice mitótico (células en metafase)
3. Posee una baja resolución cromosómica (entre 5- 10 Mb)
4. Presenta la imposibilidad de detectar anomalías crípticas
5. Requiere de un entrenamiento exhaustivo tanto en el proceso de cultivo celular como en el análisis microscópico.

A pesar de esto, el estudio citogenético convencional es una herramienta muy útil, pues proporciona una mirada global del genoma, en contraposición con FISH, que necesita tener una sospecha de que lo que se desea detectar para la elección de las sondas, e incluso la CGH, que sólo determina anomalías donde existe pérdida o ganancia de material genético al ser incapaz para detectar alteraciones balanceadas (translocaciones y/o inversiones) donde únicamente ocurre un rearrreglo espacial del genoma.

#### PROCEDIMIENTO

Para comenzar, es un requerimiento primordial contar con células en división, o que sean capaces de hacerlo al ser estimuladas con agentes mitogénicos. Dentro de las muestras que pueden ser utilizadas para el estudio, la principal es el aspirado de la primera porción de médula ósea (PAMO), recogida usando heparina sódica como anticoagulante; está indicado el uso de SP en aquellos casos donde el aspirado no sea posible (aspirado “seco” o en pacientes con trombocitopenia severa), o exista presencia de blastos en un porcentaje elevado. También en leucemias agudas hiperleucocitarias o en la crisis blástica de la LMC, la muestra puede ser SP. Cuando se sospecha que el paciente cursa con un linfoma se analizarán el/los ganglio/s linfáticos correspondientes, teniendo la precaución de enviarlo en solución fisiológica o medio de cultivo al laboratorio.

Otras muestras factibles de ser estudiadas son: LCR, líquido amniótico, líquido pleural, tejidos parafinados.

#### *Muestras no adecuadas*

Existen diferentes situaciones por las que una muestra recibida en el laboratorio no sea apropiada para el análisis:

- Muestra tomada con el anticoagulante inadecuado. Por ejemplo, cuando se usa EDTA como anticoagulante, pues inhibe la división celular al ser quelante del calcio. Se solicita nueva muestra.



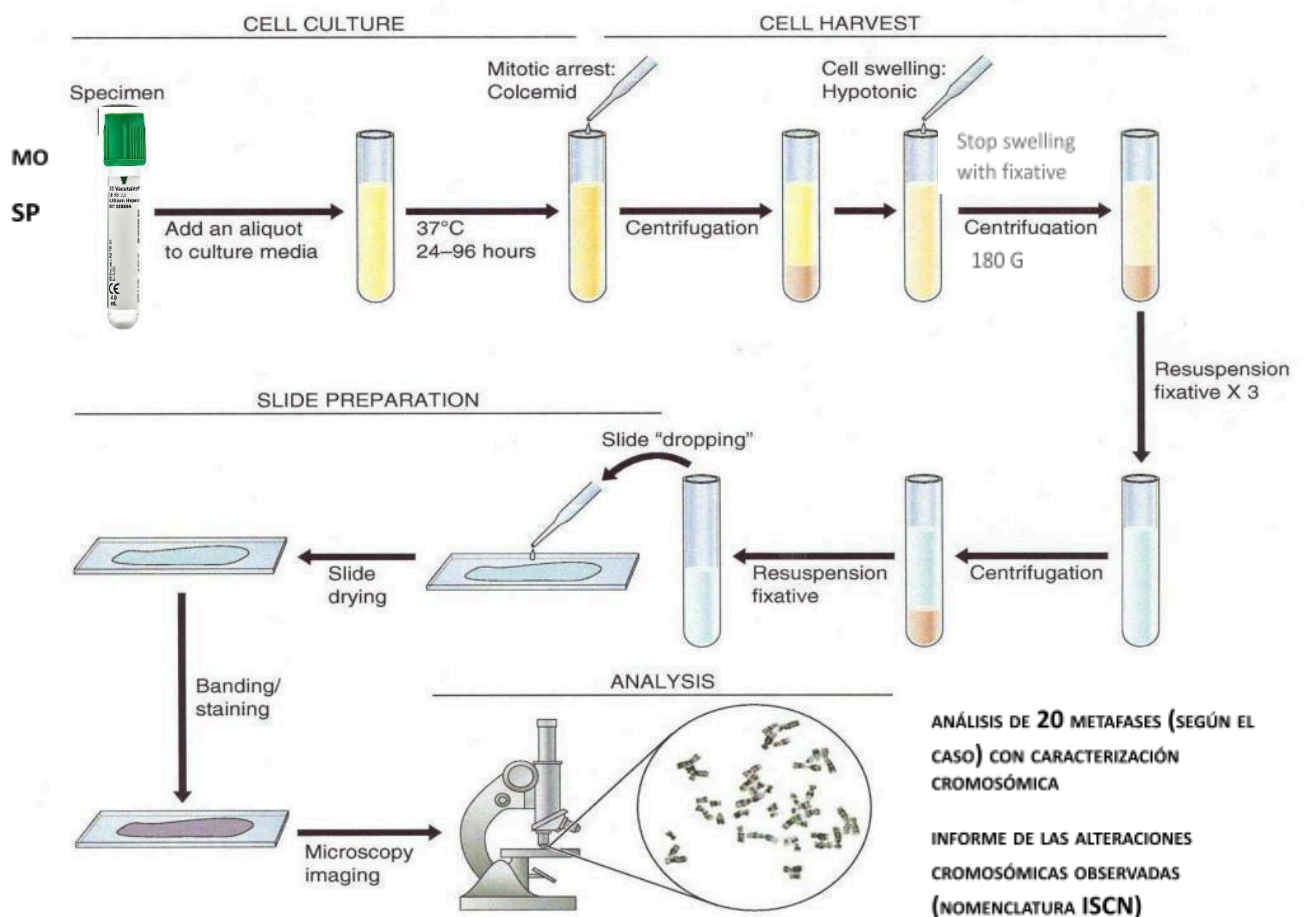
- Volumen insuficiente. En estos casos se debe priorizar el estudio cuyo resultado teórico presente un mayor rendimiento diagnóstico.
- Tipo de muestra inadecuada para la patología bajo sospecha.
- Problemas en la conservación de la muestra, ya sea durante el transporte o el tiempo de envío. La muestra puede resultar coagulada, hemolizada o con posible contaminación (muestras derramadas o con tapones mal cerrados). Se debe valorar si la muestra puede ser aceptada condicionalmente o si se solicita una nueva muestra.

*En todos los casos es fundamental la comunicación con el médico.*

-Una vez ingresa la muestra al laboratorio el proceso a seguir es en esencialmente el mismo para todas; se resume en la imagen a continuación:

Figura N°9

*Esquema representativo de la técnica convencional*



Zhang, Y. (2014). *Can cytogenetics and FISH survive in the modern genomic era?* [Imagen].  
<https://www.slideserve.com/zeal/can-cytogenetics-and-fish-survive-in-the-modern-genomic-era>

#### EQUIPAMIENTO Y MATERIALES

- Cámara de Bioseguridad Clase 2A
- Centrífuga
- Estufa de cultivo



- Baño María
- Medio de cultivo RPMI 1640
- Suero fetal bovino
- Antibióticos (Penicilina y Estreptomina)
- Tubos cónicos de 15 ml
- Tubos Falcón de 50 ml
- Bromuro de Etidio
- Colcemid (0,1 ug/ml)
- Solución de KCl 0,075 M
- Líquido de Türk
- Cámara de Neubauer
- Metanol
- Ácido acético glacial
- Buffer GURR
- Tripsina
- Buffer PBS
- Colorante Wright
- Giemsa
- Agua destilada

#### CULTIVO DE CÉLULAS PARA LA OBTENCIÓN DE METAFASES

Consiste en incubar las muestras por un periodo definido de tiempo a una temperatura de 37°C en un medio de cultivo que le brinde los nutrientes necesarios para que se produzca la proliferación celular. Las células sanguíneas se caracterizan porque su cultivo se realiza en suspensión, lo que implica que no requieren de un sustrato al que deban adherirse para lograr su desarrollo. Esto ofrece grandes ventajas como ser: mayor facilidad de manipulación y ausencia del uso de proteasas para conseguir la separación celular (tanto del sustrato como entre sí), ya que al encontrarse suspendidas en el medio de cultivo pueden ser separadas mediante centrifugación.

El medio de cultivo usado en este caso es el RPMI 1640 de GIBCO, el cual se fracciona en tubos Falcon de 50 ml, añadiendo también a cada uno:

- Suero fetal bovino (SFB), requerido para brindar los factores de crecimiento a las células en desarrollo entre 15-20%
- Antibióticos, penicilina y estreptomina, retardan el desarrollo bacteriano y micótico. Se utiliza un 0,5%, ya que una mayor concentración afectaría a las células.
- L-glutamina al 1%, aminoácido esencial para el crecimiento celular.
- Heparina sódica, como anticoagulante al 0,5%
- Agentes mitogénicos, entre los que se destacan Pokeweed (PW) y Fitohemaglutinina (PHA), los que se añaden en caso de cultivo de células maduras principalmente en síndromes linfoproliferativos. Pokeweed tiene la ventaja de estimular tanto a la población de linfocitos T como B. Se ocupa al 2%.





Al llegar la muestra al laboratorio se procede a tomar 2 ml de la misma y agregar el medio de cultivo fraccionado en un tubo cónico hasta alcanzar los 10 ml. Esto constituye la denominada *siembra "primaria"*.

En esta etapa se establece la concentración celular de la muestra para poder ajustar la cantidad en caso de ser requerido, dado que es necesario una concentración celular de entre  $2,5-3,0 \times 10^6$  células/ml de medio de cultivo. Esto es preciso para que los nutrientes presentes sean suficientes, porque una densidad celular mayor podría causar un fracaso en la obtención de una cantidad adecuada de metafases.

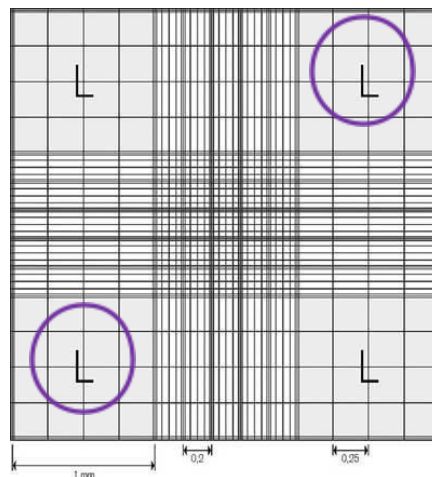
Se cuentan con dos métodos para lograr este propósito:

□ Recuento celular en cámara de Neubauer:

En un eppendorf de 1,5 ml se realiza una dilución 1/20 la "siembra primaria" en líquido de Türk (20  $\mu$ l en 380  $\mu$ l). Se homogeniza y se carga la cámara, efectuando el conteo de células en los cuadrantes correspondientes al recuento de leucocitos en 10x. Se contabiliza el número de elementos en dos cuadrantes opuestos.

**Figura N°10**

*Esquema de la cámara de Neubauer. Los cuadrantes de leucocitos se marcan con un círculo*



[Neubauer improved]. (2010).

[http://biociencias.jodra.net/wp-content/uploads/2019/04/GK900\\_05\\_Clinical\\_Lab\\_Zaehlammern\\_s.pdf](http://biociencias.jodra.net/wp-content/uploads/2019/04/GK900_05_Clinical_Lab_Zaehlammern_s.pdf)

*Ejemplo de cálculo para el ajuste de la concentración:*

*Se contaron un total de 86 células en cuadrantes opuestos, teniendo ese total en 10 ml ( $86 \times 10^6/10$  ml) siendo el objetivo conseguir entre 25 y 30 millones de células en 10 ml.*

$86 \times 10^6 \dots\dots\dots 10$  ml

$30 \times 10^6$  cel.....X= ( $30 \times 10$  ml= 3,48 ml)

$25 \times 10^6$  cel.....X= ( $25 \times 10$  ml= 2,90 ml)

Para alcanzar la densidad celular óptima se deben colocar 3,5 y 2,9 ml de siembra primaria respectivamente en tubos cónicos estériles y llevar a 10 ml con el medio de cultivo suplementado con SFB, L-Glutamina, P-E; y heparina; luego se deja incubar a 37°C el tiempo que corresponda según la patología sospechada.



### □ Frotis de la muestra

Se realiza un frotis de la muestra antes de efectuar la siembra primaria. Se colorea 3' con May Grünwald y luego 15' con Giemsa. Se cuentan las células en 5 campos utilizando un aumento de 10x. El hallazgo de menos de 50 elementos por campo equivale al agregado de 25 gotas de la muestra, mientras que si se visualizan más de 100 por campo se añaden 10 gotas. Al igual que el caso anterior, se lleva a 10ml con RPMI 1640 suplementado.

Este método tiene la ventaja de que permite conocer la cantidad real de células de la muestra cuando el recuento en cámara se dificulta, por ejemplo, en aquellos casos donde la MO presenta mucha fibrina, lo que provoca agregados celulares que dan la impresión que la misma no contiene elementos.

Al ajustar la densidad celular, finalmente se incuban los tubos en posición inclinada a 45° (para obtener una mayor superficie de intercambio entre las fases líquida y gaseosa) en estufa a 37°C.

### *Tiempos de cultivo*

El tiempo de incubación de las muestras dependerá del tipo de patología sospechada, dado que en ciertas neoplasias se produce la división espontánea de las células malignas como es el caso de las leucemias agudas (LA); mientras que existen aquellas como la leucemia linfática crónica (LLC), donde las células a ser analizadas son maduras, para lo cual se deberá emplear un agente mitógeno para inducir su división.

Es posible cosechar la muestra directamente previa incubación a 37°C con un inhibidor mitótico, pero siempre se acompaña con un cultivo de 24/48/72 hs con las condiciones mencionadas previamente. En células maduras, el uso de este agente provoca la división celular 48 hs después de agregarlo; luego cada 24 hs ocasiona nuevas divisiones. Por ello, se cultiva en un periodo total de 72 hs (**Tabla N° 2**).

**Tabla N° 2**

*Tiempos de cultivo y mitógenos en función del diagnóstico*

Diagnósticos	Directo	Tiempos de cultivo a 37°C			Mitógenos	
		24	48	72	PHA	PW
LA	X	X				
LLA	X					
LMA	X	X				
LPA	X	X				
LMC	X	X				
NMPC: PV, TE, MF		X				
PTI		X				
SMD		X				
Anemia/ Leucopenia/ Trombocitopenia		X				
Pancitopenia		X				
LLC T		X	X	X	X	
LLC B		X		X		X
Linfomas		X	X			



Mieloma Múltiple Gammopatías M-GUS	X			X		
--	---	--	--	---	--	--

Fuente: Elaboración propia

Nota. PHA: Fitohemaglutinina; PW: Pokeweed; LA: Leucemia Aguda; LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda; LMA: Leucemia Mieloide Aguda; LPA: Leucemia Promielocítica Aguda; LMC: Leucemia Mieloide Crónica; NMPC: Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas; PV: Policitemia Vera; TE: Trombocitemia Esencial; MF: Mielofibrosis; PTI; Púrpura Trombocitopénica Inmune; SMD: Síndrome Mielodisplásico; LLC: Leucemia Mieloide Crónica; M-GUS: Gammopatía Monoclonal de significado incierto.

#### COSECHA DEL CULTIVO CELULAR

El objetivo es obtener células en metafase en una cantidad suficiente para el estudio de las aberraciones cromosómicas factibles de ser visualizadas al microscopio óptico. El proceso de cosecha celular es igual para todos los tipos de muestras antes mencionados.

Consta de 4 etapas:

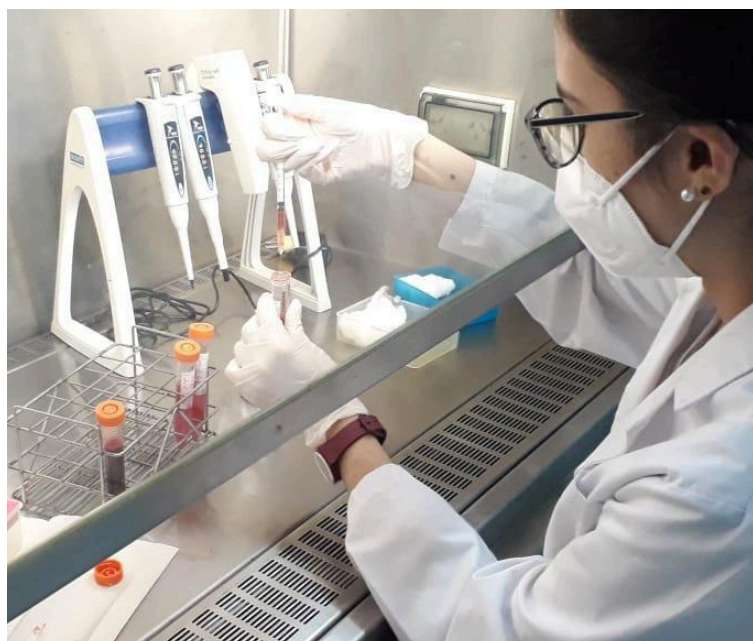
- *Agregado de bromuro de etidio:*

Con el bromuro de etidio se logra la elongación sutil de los cromosomas al intercalarse entre las bases nitrogenadas. Esta elongación de tipo química es usada como práctica de rutina en los cultivos de médula ósea para adquirir mayor resolución a la hora del bandedo, pero se deben aplicar cuidados extremos al manipularlo, al ser un químico altamente mutagénico. El agregado de este agente es opcional y se debe realizar antes de que se cumpla el tiempo establecido para completar el cultivo celular.

Se añaden a la muestra 100 µl mediante una aguja de tuberculina y se continúa la incubación a 37°C.

**Figura N° 11**

*Agregado de BrEt en cámara de bioseguridad*



- *Parada del ciclo celular en la etapa de metafase*



Es sabido que la mitosis celular consta de cuatro fases; en metafase se produce la mayor condensación de la cromatina. Por ello, es necesario detener el ciclo celular en esta etapa añadiendo Colchicina o Colcemid (deacetilmetilcolchicina, un derivado sintético de la colchicina), agentes que despolimerizan las fibras del huso mitótico impidiendo la separación de las cromátides hermanas en anafase. Se debe tener presente que un mayor tiempo de exposición al agente genera una mayor cantidad de metafases, pero cromosomas más cortos, por lo que se opera en tiempos de una hora para la cosecha directa y de 30 minutos para los cultivos de 24, 48 y 72 hs, de modo de conseguir cromosomas elongados.

- *Uso de la solución hipotónica*

El agregado de la solución hipotónica marca el comienzo per se de la cosecha de células. Para poder realizar el análisis citogenético es preciso observar cada cromosoma de forma individual, por este motivo se usa una solución hipotónica de KCl 0,075 M que ocasiona el hinchamiento de las células de modo tal que los cromosomas se dispersan para su posterior visualización.

El tiempo destinado para ello oscila entre los 20 a 30 minutos, donde se recomienda que la solución hipotónica se halle previamente a una temperatura de 37°C (precalentamiento). Es importante destacar que el tiempo cobra particular relevancia en este proceso, ya que si se someten a tiempos muy prolongados las células podrían explotar, perdiendo cromosomas y no se encuentre el número diploide completo; mientras que si el tiempo es muy corto se obtendrá una baja dispersión, pudiendo observarse “ovillos” de cromosomas que imposibilitan el análisis.

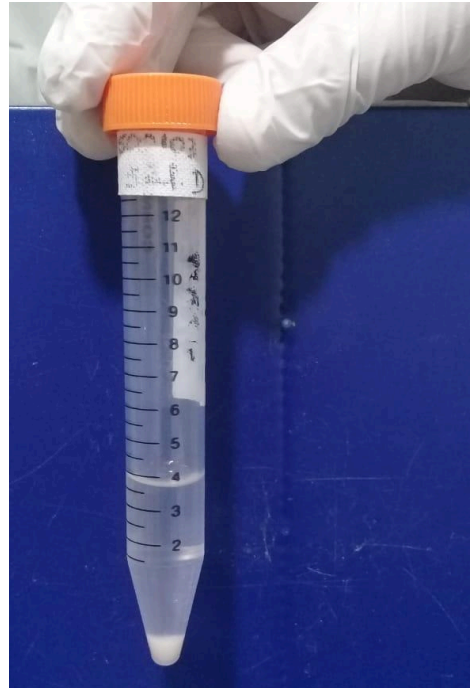
- *Fijación celular*

Utilizando la solución de Carnoy, una mezcla 3:1 de metanol y ácido acético glacial, se corta la acción de la solución hipotónica. Esto favorece la dispersión de cromosomas y su estabilización. El metanol desnaturaliza las histonas, lo que posibilita el ingreso de tripsina al momento de realizar el bandeo G; el ácido acético glacial se usa para deshidratar la muestra. La solución fijadora también elimina los restos de membrana y citoplasma presentes.

Al finalizar el tiempo de tratamiento hipotónico (20 minutos) se añade 0,5 ml de solución fijadora recién preparada y fría. En este momento ocurre la lisis de los glóbulos rojos presentes, transformando la hemoglobina de color rojo en hematina de color marrón oscuro. Se mezcla por inversión para que el fijador alcance a toda la muestra y se centrifuga. El pellet celular alcanzado se diluye a 10 ml con el fijador, dejándolo hasta el día siguiente (tiempo mínimo una hora). Al otro día se procede a los lavados con más fijador hasta obtener un pellet limpio, lo que puede llevar entre uno y dos lavados. Concluida esta etapa se conserva el pellet (ajustado a una densidad comparable a un vidrio esmerilado) a -20°C.

**Figura N°12**

*Aspecto del pellet celular luego de los lavados con fijador (pellet límpido)*



Un factor a tener en cuenta es que la solución fijadora se debe preparar al momento de ser usada y previo a la fijación debe almacenarse en frío.

#### EXTENDIDO CELULAR

Una vez se cuenta con el pellet celular, es momento de efectuar el extendido en portaobjetos limpios. Los mismos deberán estar previamente fríos, de modo que las metafases se expandan en el vidrio al entrar en contacto con éste. Se dejan caer 2 o 3 gotas del pellet en el portaobjeto. Para finalizar, se sopla el vidrio con intensidad y se deja secar (técnica de Splash). El propósito de esto es evaporar el fijador, permitiendo la dispersión de los cromosomas en la metafase, evitando los extremos (pérdida de cromosomas o metafases cerradas).

Antes de llevar a cabo el extendido definitivo de los vidrios que serán bandeados es imperativo realizar un control de calidad para ver si existen inconvenientes que puedan ser modificados, con tal de ejecutar un análisis eficiente de las metafases (**Tabla N° 4**). Para ello se colorean con Giemsa y se visualizan al microscopio en aumento 10 x con el fin de evaluar el índice mitótico (siendo lo ideal un índice de 3 cruces)(**ver Tabla N° 3**) , la presencia de restos de membranas celulares y la forma de las metafases encontradas, es decir, si se hallan “estalladas” o por el contrario, se encuentran cerradas.

**Tabla N° 3**

*Estimación del índice mitótico por vidrio*

Índice mitótico	Estimación en cruces
Más de 20 metafases	3 cruces (+++)
Entre 20 y 10 metafases	2 cruces (++)
Menos de 10 metafases	una cruz (+)

Fuente: Elaboración propia

**Tabla N° 4**

*Problemas que pueden presentarse en el extendido celular*





Problema	Solución
Escaso número de metafases	<ul style="list-style-type: none"><li>• Concentrar la muestra centrifugando y añadiendo menos fijador</li><li>• Aumentar la cantidad de gotas depositadas sobre el portaobjetos</li></ul>
Metafases en ovillo	<ul style="list-style-type: none"><li>• Elevar la altura desde la cual se realiza el goteo</li><li>• Soplar con fuerza el extendido</li><li>• Si persiste esta situación añadir al pellet unas gotas de ácido acético al 45% antes de gotear el material</li></ul>
Metafases explotadas	<ul style="list-style-type: none"><li>• Disminuir la altura desde la cual se gotea el pellet</li><li>• Soplar el extendido con menos fuerza</li></ul>

Fuente: Elaboración propia

Es en esta etapa del proceso que se obtienen los denominados *estándar* (**Figura N° 13**). En la observación del estándar es posible:

- Contar los cromosomas presentes y establecer el número total de elementos
- Observar la morfología y el tamaño, para clasificarlos en los 7 grupos cromosómicos de forma aproximada
- Hacer un reconocimiento preliminar de algunos pares cromosómicos: 1, 2, 3, 9, 16 y el cromosoma Y
- Visualizar satélites
- Obtener información sobre anomalías cromosómicas numéricas y alteraciones estructurales groseras (cromosomas dicéntricos, anillos, cromosomas marcadores)
- Detectar dobles minutos, sitios frágiles, rupturas y gaps
- Evaluar los extendidos (cantidad de metafases, dispersión de los cromosomas, presencia de membranas, contaminación)

**Figura N°13**

*Estándar de un extendido en 100x*



Finalizado el control de calidad (al determinar que las metafases se hallan en condiciones o inmediatamente después de la corrección de los factores que pueden dificultar el estudio), se extienden seis vidrios, los que inmediatamente se llevan a la estufa a una temperatura de 50°C durante una hora. Este paso se efectúa para envejecer los vidrios por calor, pudiendo aplicar distintos métodos según las condiciones de trabajo de cada laboratorio. **(Tabla N° 5)**

Tabla N° 5. Métodos de envejecimiento de los extendidos

Método	Temperatura	Tiempo
Envejecimiento natural (con desecadores si hay alta humedad)	20°C	3-5 días
Con planchas calefactoras	<ul style="list-style-type: none"><li>• 65°C</li><li>• 75°</li><li>• 90-95°C</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 24-48 hs</li><li>• 1-2 hs</li><li>• 20-60 min</li></ul>
Pretinción con Giemsa	20°C	2 días; desteñir y bandear
Tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 15% v/v	20°C	7 min; lavar con agua destilada y bandear

Fuente: Elaboración propia

Luego, los vidrios deben permanecer a temperatura ambiente por lo menos 7 días; este proceso de envejecimiento, como la fijación, es una condición necesaria que asegura el ingreso de la tripsina a la cromatina, logrando una mayor definición de las bandas claras y oscuras en el bandeo G.

#### BANDEO GTW

##### *Caracterización cromosómica*

Esta etapa busca obtener cromosomas con bandas claras y oscuras que tengan una resolución de al menos 400 bandas para el análisis de neoplasias hematológicas.

Las concentraciones de tripsina usadas son de 0,025 o 0,05%, a una temperatura de 37°C y a pH 7. Con respecto al tiempo de exposición a la enzima, se debe calcular medio segundo por



día de envejecimiento del extendido celular. *Ejemplo: si el vidrio estuvo 20 días envejeciendo, se sumergirá en tripsina por 10 segundos.*

Se disponen 4 frascos de tipo Coplin de 50 ml:

- 1) Contiene tripsina al 0,05% a 37°C
- 2) Contiene buffer fosfato salino (PBS) frío
- 3) Contiene la solución del colorante Wright que se prepara diluyendo en el buffer GURR (1:10) pH= 6,8
- 4) Contiene agua corriente

Primeramente, se coloca el extendido en el frasco de tripsina. Al alcanzar los segundos necesarios, se corta la acción de la proteasa enjugando en PBS frío, coloreando luego con la solución de Wright por 10 minutos. Por último, se elimina el exceso de colorante pasando el portaobjeto por agua corriente, escurriendo y dejándolo secar.

Se observa al microscopio primero en 10x y luego en 100x para el análisis e identificación cromosómica.

**Figura N°14**

*Bandeo GTW de una metafase. Cariotipo 46,XX. Aumento 100x*



Existe la posibilidad de encontrar diferentes defectos en el material a ser analizado, que hacen que no sean apropiados para el estudio cromosómico, siendo necesaria su corrección por medio de la preparación de nuevos extendidos. **(Tabla N° 6).**

**Tabla N° 6**

*Problemas que pueden encontrarse al efectuar el bandeo*

Problema	Causa	Solución
Ausencia de bandas claras y oscuras	<ul style="list-style-type: none"><li>● Tratamiento con Tripsina insuficiente</li><li>● Tinción excesiva de Wright</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>● Aumentar el tiempo de incubación de tripsina en 2-3 segundos</li><li>● Disminuir el tiempo en Wight. Esto ayudará a</li></ul>



		determinar si el tiempo de tripsina es suficiente.
Cromosomas “fantasmas”	<ul style="list-style-type: none"><li>● Tratamiento excesivo con tripsina</li><li>● Tinción de Wright insuficiente</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>● Disminuir el tiempo de incubación con tripsina.</li><li>● Esperar dos días más de envejecimiento o forzar con calor (dejar en estufa a 37 °C 24hs)</li><li>● Aumentar el tiempo de tinción con Wright.</li><li>● Si el colorante se ha usado para muchas muestras, es posible que se haya diluido. En este caso, se debe preparar una solución de colorante nueva.</li></ul>

Fuente: Elaboración propia

#### ANÁLISIS CROMOSÓMICO

El estudio de cromosomas en metafase se hace teniendo un objetivo muy claro: realizar el cariotipo del individuo, describiendo además, cualquier tipo de aberración que se halle. Para ello, primeramente se debe reconocer cada cromosoma en particular, usando como herramienta el bandeo GTW.

Como primera medida, se procede a realizar la clasificación, según su tamaño y morfología.

#### Clasificación

- Grupo A: Cromosomas grandes metacéntricos y submetacéntricos
- Grupo B: Cromosomas grandes y submetacéntricos
- Grupo C: Cromosomas medianos metacéntricos y submetacéntricos
- Grupo D: Cromosomas medianos acrocéntricos
- Grupo E: Cromosomas pequeños submetacéntricos
- Grupo F: Cromosomas pequeños metacéntricos
- Grupo G: Cromosomas pequeños acrocéntricos

*Descripción coloquial de cromosomas de 400 bandas de resolución:*

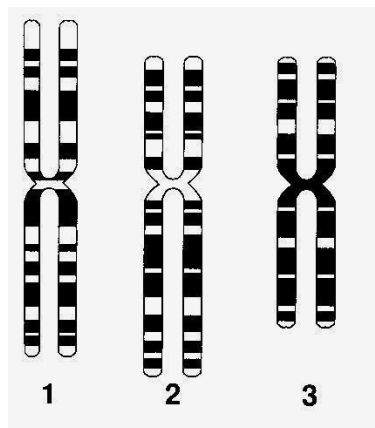
**GRUPO A:** Compuesto por los cromosomas 1, 2 y 3.



El cromosoma 1, metacéntrico, es el más largo de todos los que conforman el set cromosómico humano. En el brazo corto (p), cerca del centrómero, (p21 y p31) presenta dos bandas oscuras y desde la mitad hasta el p terminal se observa claro por ausencia de bandas oscuras prominentes. En el q existen 3 bandas (q31, q41 y q43) características que asemejan a la “cola de un mapache”.

El cromosoma 2, sub-metacéntrico, en él se distinguen distribuidas a lo largo del p cuatro bandas oscuras (p24, p22, p16 y p12); en el q se visualizan 5 bandas oscuras (q22, q24, q32, q34 y q36) que le dan una apariencia de cromosoma muy bandeado respecto a los otros del grupo.

El cromosoma 3, metacéntrico, es el más pequeño de este grupo; tanto en el p (p22p24) como el q (q24q26) aparecen dos bandas oscuras bien marcadas, que junto con las bandas oscuras centroméricas (p12 y q13) le dan “aspecto de antifaz”.

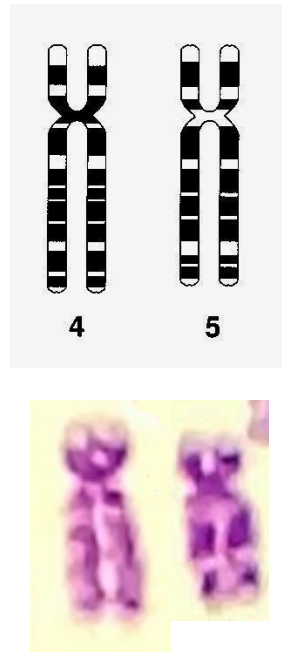


**GRUPO B:** Se hallan los cromosomas 4 y 5, sub-metacéntricos grandes, fáciles de distinguir.

El cromosoma 4 se diferencia del 5 por presentar un p más pequeño que cuenta con una banda central oscura (p16) y terminar con una banda clara prominente. En el q se destaca una banda oscura muy marcada próxima al centrómero (q13), que impresiona como las “hombrecitas de un saco”, además de tener una banda central oscura más tenue que el cromosoma 5 (q26q28).

El cromosoma 5 tiene una banda central en el p (p14) y en la mitad del q (q14q23) muestra un bloque oscuro debido a la proximidad de varias bandas oscuras, junto con una banda oscura en q terminal (q34).





**GRUPO C:** Conformado por los cromosomas 6-12, sub-metacentricos medianos, donde también se incluye el cromosoma X (uno o dos según el sexo del individuo). Este grupo manifiesta características similares en lo que respecta a su patrón de bandas, por lo que se requiere entrenamiento en la observación de los cromosomas bandeados para lograr su diferenciación.

El cromosoma 6 es uno de los más grandes del grupo. Tiene un p donde sus bandas oscuras, distal (p22) y centromérica (p12) dan la impresión al “marco de una ventana”. En el q podemos observar bandas oscuras marcadas muy próximas que le dan un aspecto oscuro en toda su longitud (q16 y q22q24).

El cromosoma 7, posee una banda distal en el p (p21) y en el q en la región central presenta dos bandas oscuras bien definidas (q21 y q31).

El cromosoma 8 es de los más difíciles de distinguir. El brazo p impresiona cuadrado y claro comparando con el resto del grupo, presenta dos bandas oscuras en el p, una proximal (p12) y otra distal (p22), semejando al “marco de una ventana”; en el q se visualizan dos bandas oscuras (q21 y q23), siendo la q distal la más intensa. Lo aconsejable es dejarlo para el final, cuando se han identificado el resto de cromosomas del grupo.

El cromosoma 9 cuenta con una región de heterocromatina en el brazo q próxima al centrómero que le da un aspecto más o menos elongado, incluso entre cromosomas homólogos. Generalmente sólo se lo distingue por una banda oscura en la mitad del p (p21) y dos bandas muy nítidas en el q (q21 y q31), con un extremo q terminal con una banda muy clara.

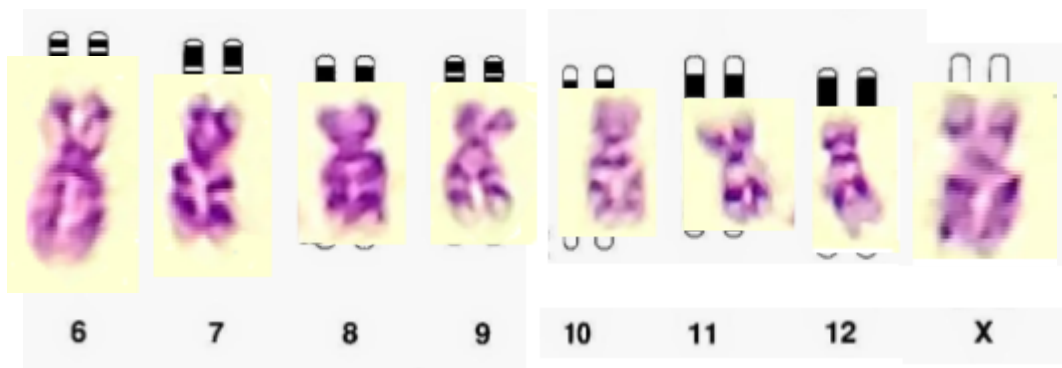
El cromosoma 10 es similar en tamaño al cromosoma 8. La presencia de una banda en el p (p12) es muy difícil de identificar la mayoría de las veces. Es el único del grupo que posee 3 bandas oscuras notorias en el q, siendo la más intensa (q21) la que está próxima al centrómero.

Los pares 11 y 12 al inicio del entrenamiento son difíciles de diferenciar entre sí, puesto que tienen un tamaño casi idéntico y una morfología similar. El cromosoma 11 tiene un p más grande respecto al 12, con una banda oscura central importante (p12p14). En el q se hallan dos



bandas oscuras que por su cercanía se ven como una sola banda central (q14q22) y en el extremo distal se encuentra una banda oscura muy sutil.

El cromosoma 12 es más sub-metacéntrico respecto del 11, por lo que el p es más pequeño en comparación. Su patrón de bandas es similar: una banda intensa en el centro del p (p12) y un



bloque muy oscuro en la zona central del q (q14q23). La diferencia radica en el tamaño de ese bloque oscuro, siendo mayor en este caso.

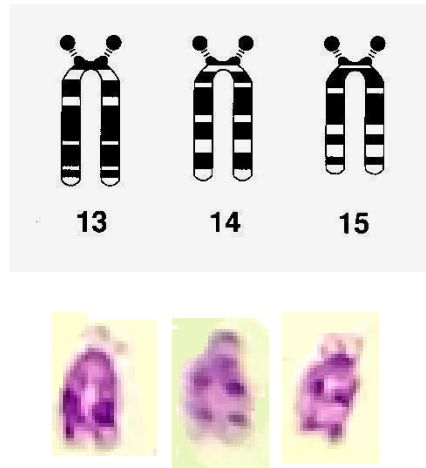
El cromosoma X es fácil de distinguir al exhibir dos bandas oscuras, una en el p (p21) y otra en el q (q21), ambas equidistantes entre sí; el resto del q suele aparecer menos teñido, aunque dependiendo del contraste de la tinción puede aparecer alguna banda tenue al final. Tiene un tamaño similar al 6.

**GRUPO D:** Se presentan los cromosomas 13-15. Los mismos tienen tallo y satélite en el brazo p. Sólo se los puede distinguir al comparar los brazos q de cada uno.

El cromosoma 13, es el más grande del grupo; tiene tres bandas distales que muchas veces se visualizan como una única banda oscura (q21, q31 y q33).

El cromosoma 14 contiene dos bandas oscuras, una cerca del centrómero (q21) y una q terminal (q31) junto con una banda clara telomérica.

El cromosoma 15 se distingue porque posee una banda oscura cercana al centrómero (q21). Además, la mitad proximal aparece más oscura que la mitad distal, contrario al cromosoma 13.

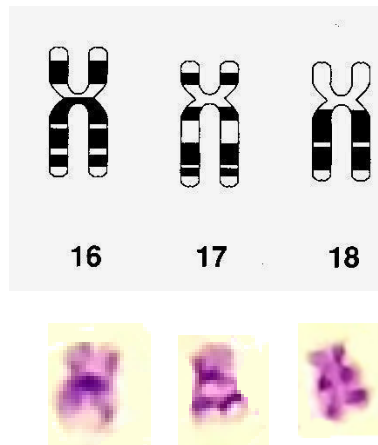


**GRUPO E:** En este grupo se hallan los cromosomas 16-18.

El cromosoma 16 es el sub-metacéntrico más grande entre los pequeños; suele aparecer bastante claro o presentando una banda oscura tenue en el q (q23), que lo diferencia del cromosoma 19, con el que suele existir confusión.

El cromosoma 17 es más sub-metacéntrico que el anterior y muestra una banda central en el brazo p (p12) y una oscura y distal en el brazo q (q22q24) seguida de una banda clara terminal.

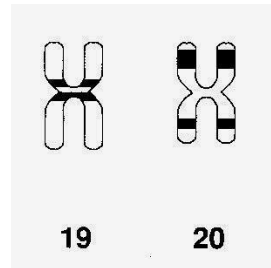
El cromosoma 18 es el que tiene el brazo corto más pequeño del grupo y exhibe dos bandas oscuras en el q (q12 y q22). Posee un aspecto más oscuro respecto de los anteriores del grupo.



**GRUPO F:** Compuesto por los cromosomas 19 y 20.

El cromosoma 19 no se distinguen bandas oscuras en ninguno de los brazos a esta resolución; se destaca su centrómero bien oscuro (bandas en p12 y q12).

El cromosoma 20 tiene una banda oscura tenue en el p que permite su identificación (p12).

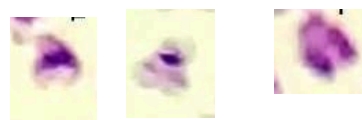
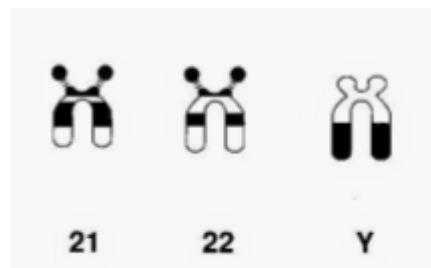


**GRUPO G:** Contiene los cromosomas 21 y 22 junto con el cromosoma Y. Al igual que los del grupo D, el 21 y 22 tienen tallo y satélites en el brazo corto.

El cromosoma 21 muestra en el q una banda oscura muy cercana al centrómero (q21). Es el cromosoma más pequeño de todos.

El cromosoma 22 tiene una banda oscura tenue hacia la mitad del q (q12), que asemeja a una “falda”.

El cromosoma Y suele verse bastante teñido. Posee una región de heterocromatina cerca al extremo distal del brazo q (q12), lo que hace que su tamaño varíe.



La identificación de los cromosomas normales es fundamental antes de proceder a establecer las posibles anomalías cromosómicas presentes en un clon patológico. Todas las aberraciones presentes en las metafases examinadas deben informarse en el cariotipo, respetando la guía vigente de la ISCN para su correcta nomenclatura.

#### APLICACIÓN EN ONCOHEMATOLOGÍA

Las técnicas citogenéticas convencionales constituyen el gold standard a la hora de determinar las anomalías genéticas responsables del desarrollo de una neoplasia particular; existen casos puntuales donde la detección de un único elemento mutado es suficiente para establecer el tipo de patología. Uno de ellos lo constituye el hallazgo de un Ph; la identificación inequívoca en metafase es suficiente para informar que se está en presencia de una LMC. Como se mencionó previamente, involucra la translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22

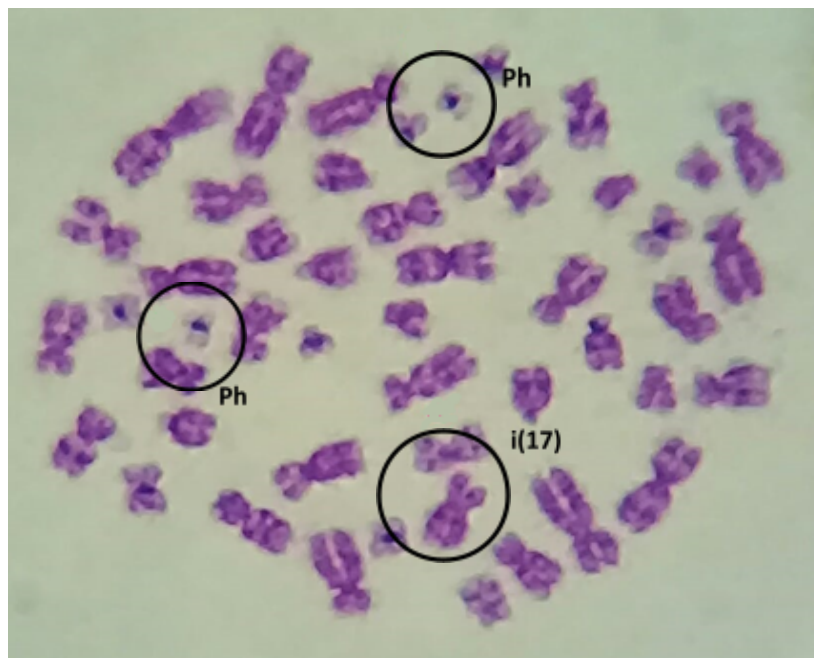


(t(9;22)(q34;q11)) y se encuentra en aproximadamente el 90% de los clones leucémicos de pacientes en fase crónica de LMC.

Cuando la LMC evoluciona hacia la fase de crisis blástica (CB), representada por la proliferación descontrolada de blastos, es posible encontrar una alta recurrencia de nuevas anomalías en los clones malignos. En este estadio es frecuente hallar la presencia de dos Ph, trisomía del cromosoma 8, formación de un isocromosoma 17, trisomía del cromosoma 19, entre otras menos frecuentes. En la figura 15, se puede observar una metafase correspondiente a un paciente masculino en CB, donde fue posible identificar dos cromosomas Ph y un isocromosoma 17.

**Figura N°15**

*Cariotipo 46,XY, t(9;22)(q34;q11.2),i(17)(q10)*



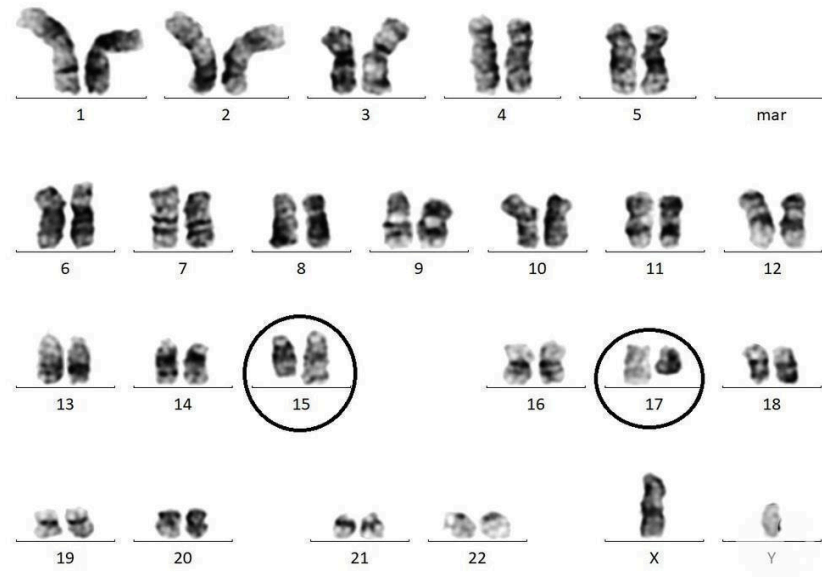
Otra mutación diagnóstica es la translocación recíproca entre los cromosomas 15 y 17, t(15;17)(q23;q21), dando como resultado una Leucemia Promielocítica Aguda (LPA), también conocida como Leucemia Mieloide Aguda M3, según la clasificación de la FAB.





**Figura N°16**

*Cariotipo: 46,XY,t(15;17)(q23;q21)*

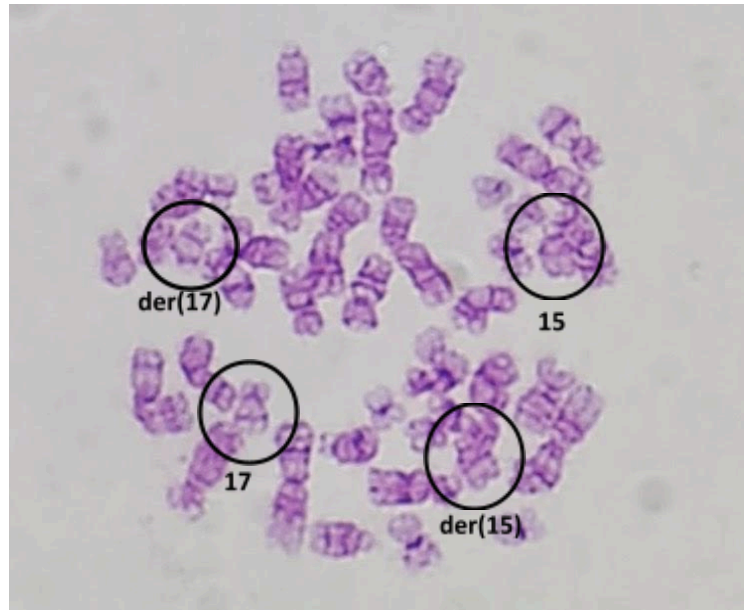


Kumar Yadav, A., Manorama, B. (2018). *Karyotype showing classic translocation t(15;17)(q24;q21)* [Imagen].  
Recuperado de <https://imagebank.hematology.org/collection/61553>

La t(15;17)(q23;q21) se encuentra hasta en un 95% de los pacientes con LPA, donde el 5% restante expresa una translocación diferente involucrando al cromosoma 17. Un factor a tener en cuenta cuando se sospecha esta patología es que la t(15;17)(q23;q21) no siempre puede verse al efectuar el análisis citogenético, si las metafases obtenidas no son de buena calidad, siendo necesario recurrir a técnicas moleculares para confirmar o descartar su presencia en los clones malignos. En la figura 17 se aprecia una metafase nuevamente de un paciente masculino portador de la mutación balanceada.

**Figura N°17**

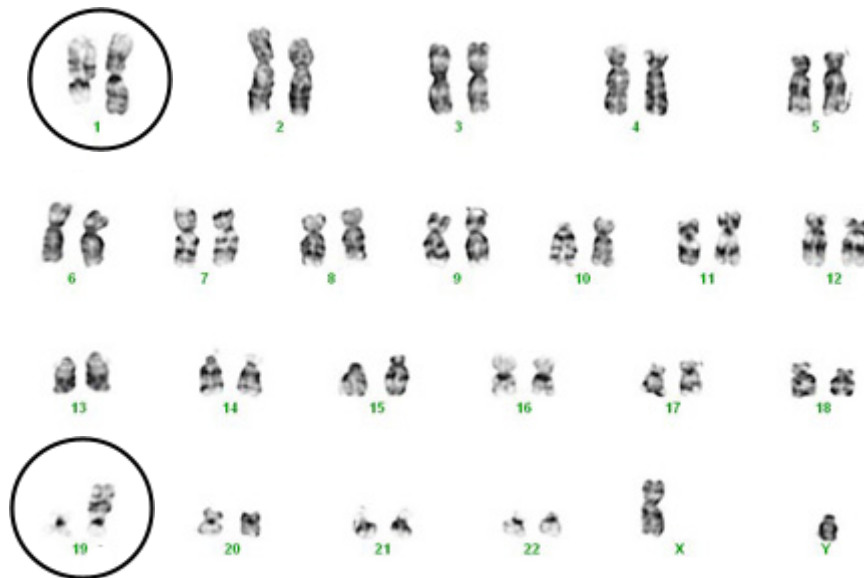
*Metafase de un paciente con LPA, indicando los derivados 15 y 17 producto de la translocación recíproca. Cariotipo: 46,XY,t(15;17)(q23;q21)*



Entre las anomalías halladas en laboratorio durante la realización de la práctica, podemos destacar la  $t(1;19)(q23;q13)$ , que como señala la nomenclatura, involucra la translocación balanceada entre los cromosomas 1 y 19, característica de una LLA Pre-B. Es de las más frecuentes dentro de las asociadas a esta neoplasia. La figura 18 muestra el cariotograma de una paciente masculino en edad pediátrica, en el cual se detectó la translocación  $t(1;19)(q23;q13)$ . Teniendo en cuenta la alta prevalencia de la LLA en esta población, es fundamental buscar esta aberración en aquellos con alta sospecha de presentarla.

Figura N°18

Cariotipo:  $46,XY,t(1;19)(q23;q13)$



Litchman, M.A., Shafer, M.S. (2019).  $t(1;19)(q23;q13)$ . *G banding*. [Imagen]. Recuperado de <https://oncohemakey.com/acute-lymphocytic-leukemia/>



#### CONCLUSIÓN

La citogenética convencional en el marco de las neoplasias oncohematológicas continúa siendo uno de los ejes fundamentales en el estudio de estas patologías, dada la cantidad de información valiosa que le aportan al médico especialista. Por este motivo es vital contar con personal especializado tanto en el manejo de las técnicas de uso diario y los fundamentos teóricos detrás de cada etapa del proceso, como también en el reconocimiento y análisis del complemento cromosómico humano y las anomalías factibles de ser encontradas en los clones mutados.

Si bien los métodos moleculares no se llevaron a cabo en el transcurso de esta práctica, no se debe dejar de mencionar lo importante que resulta el estudio en conjunto con la técnica convencional, al obtener una mayor comprensión tanto del cuadro clínico, como de su evolución a futuro.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Bayani, J., Squire, J. A. (2004). Traditional Banding of Chromosomes for Cytogenetic Analysis. *Current Protocols in Cell Biology*, 23(1).
- Bendari, M., Khoubila, N., Cherkaoui, S., Hda, N., Qachouh, M., Lamchahab, M., Quessar, A. (2020). Current Cytogenetic Abnormalities in Acute Myeloid Leukemia. In T. A. Çelik, & S. Dey (Eds.), *Chromosomal Abnormalities*. IntechOpen.
- Benasayag, S.J., Gallino M.I. (2010) Bases citogenéticas para la práctica hematológica. De lo supuesto a lo expuesto en nomenclatura citogenética. *HEMATOLOGIA*, 14(2), 58-68.
- Calabretta, B., Perrotti, D. (2004). The biology of CML blast crisis. *Blood*. 103, 4010-22.
- Caspersson, T., Zech, L., Modest, E.J. (1970). Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Cromosoma*, 30, 215-227.
- Cocco, M. C., Alonso, C. N., Rossi, J. G., Bernasconi, A. R., Rampazzi, M. A., Felice, M. S., Rubio, P. L., Eandi Eberle, S., Medina, A., Gallego, M. S. (2015). Cytogenetic and Molecular Findings in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia: Experience of a Single Institution in Argentina. *Molecular Syndromology*, 6(4), 193–203.
- Drets, M. E., Shaw, M. W. (1971). Specific band patterns of human chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci*, 68, 2073-2077.
- Espinet, B., Blanco, M.L., Costa, D., Cuatrecasas, E., Ruis-Xivillé, N. (2021) Análisis citogenómicos aplicados a neoplasias hematológicas. Recomendaciones preanalíticas analíticas y postanalíticas. *Documento avalado por la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH) y la Asociación Española de Genética Humana (AEGH)*.
- Harrison, C.J. (2000) The management of patients with leukaemia: the role of cytogenetics in this molecular era. *British Journal of Haematology*, 108, 19-30.
- Keagle, M.B., Gersen, S.L. (eds.) (2012). *The Principles of Clinical Cytogenetics*. Humana Press, Totowa, NJ.
- Kumar, S., Kiso, A., Kithan N. A., (2021) Chromosome banding and mechanism of chromosome aberrations. In Larramendy M. L., Solonesky S. (eds.) *Cytogenetics-Classical and Molecular Strategies for Analysing Heredity Material*. IntechOpen.
- Larson, D. P., Akkari, Y. M., van Dyke, D. L., Raca, G., Gardner, J. A., Rehder, C. W., Kaiser-Rogers, K. A., Eagle, P., Yuhas, J. A., Gu, J., Toydemir, R. M., Kearney, H., Conlin, L. K., Tang, G., Dolan, M. M., Ketterling, R. P., Peterson, J. F. (2020). Conventional Cytogenetic Analysis of Hematologic Neoplasms: A 20-Year Review of Proficiency Test



- Results From the College of American Pathologists/American College of Medical Genetics and Genomics Cytogenetics Committee. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 145(2), 176–190.
- Lejeune J., Gauthier M., Turpin R. (1959). Les chromosomes humains en culture de tissus [Human chromosomes in tissue cultures]. *CR Académie des Sciences*, 248(4), 602-603.
  - Lejeune J., Turpin R., Gauthier M. (1959). Le mongolisme, premier exemple d'aberration autosomique humaine. *Annales de génétique*, 1(2), 41-49.
  - Nowell, P. C., Hungerford, D. A. (1960). Chromosome Studies on Normal and Leukemic Human Leukocytes. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 25(1), 85–109.
  - Rooney, D.E., Czepulkowski, B.H. (eds.) (1992). Human Cytogenetics: A Practical Approach, Volume I: Constitutional Analysis. IRL/Oxford University Press, New York.
  - Rooney, D.E., Czepulkowski, B.H. (eds.) (1992). Human Cytogenetics: A Practical Approach, Volume II: Malignancy and acquired abnormalities. IRL/Oxford University Press, New York.
  - Rowley, J. D. (1973). A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature*, 243, 290–293.
  - Seabright M. (1971). A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*, 2, 971-972.
  - Sole Ristol F. (2020). Citogenética en el diagnóstico hematológico. Experto en Bases del Diagnóstico en Hematología (Módulo 1). Editorial Panamericana.
  - Sumner, A. T., Evans, H., Buckland, R. (1971) New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature New Biology*, 232, 31-32.
  - Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. (eds.) (2017) World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th edition. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon, France: IARC.
  - Taştemir, D., Demirhan, O., Gürkan, E., Tunç, E., Inandıklioğlu, N. (2011). Applications of Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) for Detecting Genetic Changes in Hematological Malignancies. *Journal of Cancer Therapy*, 2 (2), 125-134.
  - Taylor, J., Xiao, W., Abdel-Wahab, O. (2017). Diagnosis and classification of hematologic malignancies on the basis of genetics. *Blood*, 130(4), 410–423.
  - Tjio, H. J., Levan, A. (1956). The chromosome numbers of man. *Hereditas*, 42, 1–6.
  - Wan, T.S. (2014) Cancer cytogenetics: methodology revisited. *Annals of Laboratory Medicine*. 34(6), 413-425.
  - Wan, T.S.K., Hui, E.K.C., Ng, M.H.L. (2016). Chromosome Recognition. *Methods in Molecular Biology*, 67–74.
  - Wang, H.C., Fedoroff, S. (1972). Banding in human chromosomes treated with trypsin. *Nature New Biology*. 235(54), 52-54.

#### ANEXO

##### Figura N°19

Bandeo Q, donde se pueden apreciar las bandas fluorescentes en un cariotipo 46,XX



[Chromosome spread with chromosomes shown by fluorescent Q-banding]. (2003). Recuperado de <http://www.pathology.washington.edu/galleries/Cytogallery/images/fqs.jpg>

**Figura N°20**

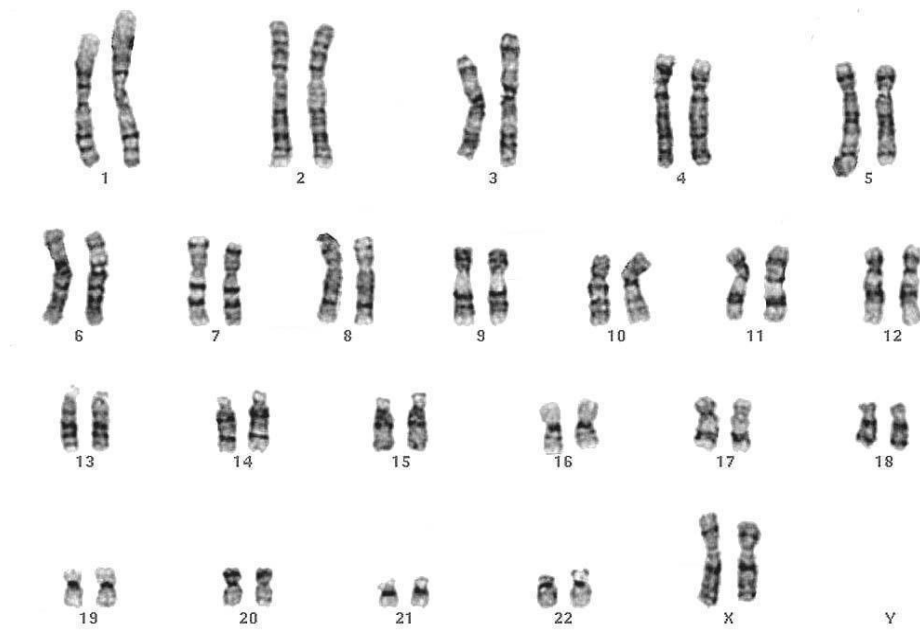
*Bandeo C. Se pueden ver las bandas oscuras correspondientes a la región centromérica. Cariotipo 46,XX*



[Chromosome spread with C-banding that shows the centromeric region of each chromosome]. (2003). Recuperado de <http://www.pathology.washington.edu/galleries/Cytogallery/images/fcs.jpg>

**Figura N°21**

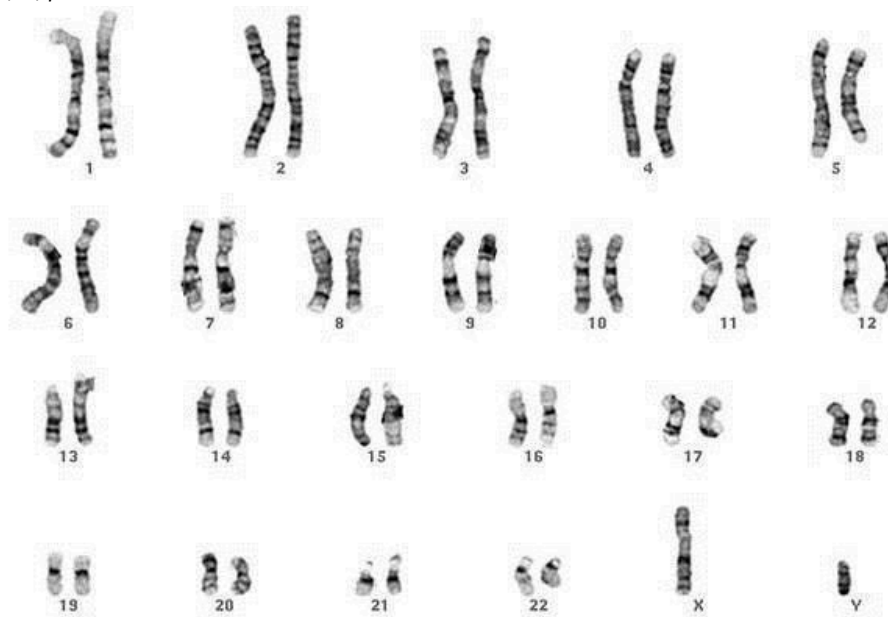
*Cariotipo 46,XX, perteneciente a un individuo femenino*



[Karyotype shown by bright field G-banding of chromosomes. Female].(2003). Recuperado de <http://www.pathology.washington.edu/galleries/Cytogallery/images/fgs.jpg>

**Figura N°22**

*Cariotipo 46,XY, perteneciente a un individuo masculino*



[Karyotype shown by bright field G-banding of chromosomes. Male]. (2003). Recuperado de <http://www.pathology.washington.edu/galleries/Cytogallery/images/mgk.jpg>



**Figura N°23**

*Clasificación de neoplasias hematológicas de la OMS*





#### WHO myeloid neoplasm and acute leukemia classification

##### Myeloproliferative neoplasms (MPN)

Chronic myeloid leukemia (CML), *BCR-ABL1*<sup>+</sup>

Chronic neutrophilic leukemia (CNL)

Polycythemia vera (PV)

Primary myelofibrosis (PMF)

PMF, prefibrotic/early stage

PMF, overt fibrotic stage

Essential thrombocythemia (ET)

Chronic eosinophilic leukemia, not otherwise specified (NOS)

MPN, unclassifiable

Mastocytosis

##### Myeloid/lymphoid neoplasms with eosinophilia and rearrangement of *PDGFRA*, *PDGFRB*, or *FGFR1*, or with *PCM1-JAK2*

Myeloid/lymphoid neoplasms with *PDGFRA* rearrangement

Myeloid/lymphoid neoplasms with *PDGFRB* rearrangement

Myeloid/lymphoid neoplasms with *FGFR1* rearrangement

*Provisional entity: Myeloid/lymphoid neoplasms with PCM1-JAK2*

##### Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MDS/MPN)

Chronic myelomonocytic leukemia (CMML)

Atypical chronic myeloid leukemia (aCML), *BCR-ABL1*<sup>-</sup>

Juvenile myelomonocytic leukemia (JMML)

MDS/MPN with ring sideroblasts and thrombocytosis (MDS/MPN-RS-T)

MDS/MPN, unclassifiable

##### Myelodysplastic syndromes (MDS)

MDS with single lineage dysplasia

MDS with ring sideroblasts (MDS-RS)

MDS-RS and single lineage dysplasia

MDS-RS and multilineage dysplasia

MDS with multilineage dysplasia

MDS with excess blasts

MDS with isolated del(5q)

MDS, unclassifiable

*Provisional entity: Refractory cytopenia of childhood*

Myeloid neoplasms with germ line predisposition

##### Acute myeloid leukemia (AML) and related neoplasms

AML with recurrent genetic abnormalities

AML with t(8;21)(q22;q22.1);*RUNX1-RUNX1T1*

AML with inv(16)(p13.1;q22) or t(16;16)(p13.1;q22);*CBFB-MYH11*

APL with *PML-RARA*

AML with t(9;11)(p21.3;q23.3);*MLLT3-KMT2A*

AML with t(6;9)(p23;q34.1);*DEK-NUP214*

AML with inv(3)(q21.3;q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2, MECOM*

AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.3);*RBM15-MKL1*

*Provisional entity: AML with BCR-ABL1*

AML with mutated *NPM1*

AML with biallelic mutations of *CEBPA*

*Provisional entity: AML with mutated RUNX1*

AML with myelodysplasia-related changes

Therapy-related myeloid neoplasms

AML, NOS

AML with minimal differentiation

AML without maturation

AML with maturation

Acute myelomonocytic leukemia

Acute monoblastic/monocytic leukemia

Pure erythroid leukemia

Acute megakaryoblastic leukemia

Acute basophilic leukemia



<b>WHO myeloid neoplasm and acute leukemia classification</b>
<b>Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm</b>
<b>Acute leukemias of ambiguous lineage</b>
Acute undifferentiated leukemia
Mixed phenotype acute leukemia (MPAL) with t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
MPAL with t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged
MPAL, B/myeloid, NOS
MPAL, T/myeloid, NOS
<b>B-lymphoblastic leukemia/lymphoma</b>
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma, NOS
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(12;21)(p13.2;q22.1); <i>ETV6-RUNX1</i>
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with hyperdiploidy
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with hypodiploidy
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(5;14)(q31.1;q32.3) <i>IL3-IGH</i>
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(1;19)(q23;p13.3); <i>TCF3-PBX1</i>
<i>Provisional entity: B-lymphoblastic leukemia/lymphoma, BCR-ABL1-like</i>
<i>Provisional entity: B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with iAMP21</i>
<b>T-lymphoblastic leukemia/lymphoma</b>
<i>Provisional entity: Early T-cell precursor lymphoblastic leukemia</i>
<i>Provisional entity: Natural killer (NK) cell lymphoblastic leukemia/lymphoma</i>

Adaptado de World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th edition. (p.10-11), por Swerdlow, S. H., (2017). Lyon, France: IARC.

Tabla N° 7

Alteraciones cromosómicas más frecuentes, genes involucrados y patologías asociadas

Patología	Alteraciones cromosómicas	Genes (sondas para FISH)
LMC	t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL (P210, P190, P230)
	del(20)(q12)	D20S108
	trisomía del 8 (+8)	CEP 8
NMP	t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL1 (P210, P190, P230)
	del(4)(q12)	PDGFRalfa
	del(5)(q32)	PDGFRbeta
	del(8)(p11)	FGFR1
SMD	del(5)(q23)/ monosomía del 5 (-5)	PDGFRbeta
	del(7)(q12)/monosomía del 7 (-7)	D7S486
	trisomía del 8 (+8)	CEP8
	del(20)(q12)	D20S108
LMA	t(8;21)(q22;q22) M2	AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1)
	inv(16)(p13.1;q22.1)/ t(16;16) M4 v eo	CBFB-MYH11
	t(v;11)(q23.3)	KMT2A (MLL1)
	t(1;22)(p13.3;q13.3) M7	RBM15-MKL1
	inv(3)(q21.3;q26)/t(3;3)(q21.3;q26)	EVI1 (GATA2,MECOM)
	t(6;9)(p23;q34.1) M2 o M4	DEK-NUP214
LPA (M3)	t(15;17)(q24;q21.1)	PML-RARA
	t(11;17)(p13.4;q21.1)	NUMA1-RARA



	t(5;17)(p35;q21.1)	NPM1-RARA
LLA-B	t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL (P210, P190, P230)
	t(12;21)(p13.1;q22.1)	ETV6-RUNX1 (TEL-AML1)
	t(1;19)(q23;q13.3)	TCF3-PBX1 (E2A-PBX1)
	t(4;11)	MLL-AF4
	t(v;11)	Otros rearrreglos del KMT2A
LLA-T	t(1)(q11)	TCRAlFA
	t(7)(q34)	TCRBETA
	del(19)(p13.1)	TCF3
LLC	t(3;22)(q27;q11)	IGL-BCL6
	t(3;14)(q27;q32)	IGH-BCL6
	del(14)(q23)	IGH reordenamientos
	del(13)(q14)	RB1 delección

Fuente: Elaboración propia