

Implementación de la técnica de Hibridación in situ fluorescente (FISH) en Facultad de Medicina, UdeLaR

Implementation of the Fluorescent in Situ Hybridization technique in the Faculty of Medicine, UdeLaR

Andrea Cairus¹, Eugenia Choca¹, Florencia Savio¹, Vanina Silva¹, Catherin Vera¹,
Faride Uturbey^{2*}

Resumen

El Laboratorio de Citogenética de Facultad de Medicina procesa en promedio 300 muestras anuales de centros asistenciales públicos y privados por citogenética convencional, siendo imprescindible implementar nuevas técnicas con el fin de mejorar la calidad del servicio ofrecido. El objetivo de este trabajo fue implementar la técnica de Hibridación in situ Fluorescente (FISH). Se realizó un estudio observacional transversal analítico. Se incluyeron muestras de sangre periférica de pacientes con cromosopatías sexuales diagnosticados por citogenética convencional. Se aplicó la técnica de Hibridación in situ Fluorescente comparándose ambos resultados. Se estudió el resultado de citogenética convencional, resultado por Hibridación in situ Fluorescente, porcentaje de mosaicismo detectado por citogenética convencional e Hibridación in situ Fluorescente. Se analizaron 24 muestras; 19 presentaron alteraciones numéricas, 3 estructurales y 2 ambas. Las alteraciones numéricas fueron síndrome de Turner, síndrome de Klinefelter, síndrome XXX y síndrome XYY, hallándose concordancia en los diagnósticos por ambas técnicas. Para el síndrome de Turner, 8 de 12 muestras correspondieron a mosaicismo, no existiendo diferencias significativas entre los porcentajes del mismo por citogenética convencional y la técnica estudiada ($p < 0.05$). Los síndromes de Klinefelter y XYY se presentaron en forma libre en ambas. Para el síndrome XXX, se observó mediante Hibridación in situ Fluorescente en tres de las muestras una línea normal (46, XX), en un porcentaje cercano al *cut off*. A partir de esta

¹Estudiante de Medicina, Ciclo de Metodología Científica II 2016, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay. La contribución en la realización del trabajo fue equivalente a la de los demás estudiantes.

²Docente supervisor. Dra. Prof. Adjunta, Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

*Contacto: Faride Uturbey. E-mail: farideuturbey@gmail.com

investigación se podrá realizar Hibridación in situ Fluorescente en este servicio, extenderlo a otras patologías y posibilitar la capacitación de recursos humanos; consolidando este laboratorio como centro de referencia académica nacional.

Palabras clave

Hibridación in situ Fluorescente, citogenética, cromosopatías sexuales, diagnóstico, Facultad de Medicina, UdelaR.

Abstract

The Cytogenetic Laboratory of the Faculty of Medicine processes, on average, 300 annual samples of public and private healthcare centers by conventional cytogenetics. It is essential to implement new techniques to improve the quality of the service offered. The purpose of this work was to implement the Fluorescent in situ Hybridization technique (FISH). An observational, cross-sectional, analytical study was performed. Peripheral blood samples from patients with sex chromosomopathies diagnosed by conventional cytogenetics were analyzed. Fluorescent in situ hybridization technique was applied, comparing results with FISH and with conventional cytogenetics. The percentage of mosaicism detected by conventional cytogenetics and Fluorescent in situ Hybridization was studied: 24 samples were analyzed; 19 presented numerical alterations, 3 structural and 2 both. Numerical alterations were Turner syndrome, Klinefelter syndrome, XXX syndrome and XYY syndrome. Concordance in diagnoses was found for both techniques. For Turner syndrome, 8 of 12 samples corresponded to mosaicism, and there were no significant differences between conventional cytogenetics and the technique studied ($p < 0.05$). Klinefelter syndrome and XYY were both presented in a non-mosaic karyotype. For XXX syndrome, a normal line (46, XX) was observed in three of the samples, in a percentage close to the cut off. From this research, it will be possible to implement Fluorescent in situ Hybridization in this service, to extend it to other pathologies and to enable the training of human resources; consolidating this laboratory as a national academic reference center.

Keywords

Fluorescent in situ Hybridization, Cytogenetics, Sex Chromosomopathies, Diagnosis, Faculty of Medicine, UdelaR.

Introducción

En el Laboratorio de Citogenética del Departamento de Genética de la Facultad de Medicina, UdelaR, se utiliza el diagnóstico citogenético convencional para el estudio de alteraciones cromosómicas constitucionales y adquiridas. La citoge-

nética convencional implica la realización del cariotipo humano, definido como el juego completo de cromosomas que posee un organismo, que suele representarse como un diagrama de los cromosomas metafásicos ordenados en grupos según su tamaño. Cuando en el organismo, en vez de haber un único tipo de conjunto cromosómico en

todas las células somáticas, algunas células muestran un cariotipo y otras un cariotipo distinto, se dice que existe un mosaicismo. Para la realización del cariotipo se realiza preferentemente cultivo de linfocitos de sangre periférica. Se utiliza la colchicina para detener el ciclo celular en metafase. Luego de procesado, el preparado es fijado en portaobjetos para su posterior bandeado y tinción mediante bandeado G. Un análisis citogenético de rutina incluye típicamente el examen de al menos 20 células, con el fin de descartar cualquier mosaicismo clínicamente significativo (Ley de Patau). En el análisis del cariotipo, el mosaicismo se diagnostica como la ganancia cromosómica en 2 o más metafases o la pérdida cromosómica en tres o más metafases⁽¹⁾. Mediante el estudio del cariotipo humano es posible diagnosticar alteraciones cromosómicas. Éstas se clasifican en dos grandes grupos: alteraciones del número de cromosomas (poliploidías y aneuploidías) y alteraciones de su estructura (deleciones, duplicaciones, inversiones, translocaciones, isocromosomas y sitios frágiles cromosómicos).

El presente proyecto se enfoca en las cromosopatías sexuales, es decir aquellas que involucran a los cromosomas X e Y, siendo éstas frecuentes. Las cromosopatías sexuales más frecuentes en recién nacidos vivos y fetos son: las trisomías, distinguiéndose el Síndrome de Klinefelter (47, XXY y variantes), Síndrome XYY (47, XYY), Trisomía X (47, XXX); y la monosomía del X (45, X y variantes, síndrome de Turner)⁽²⁾⁽³⁾.

En las últimas décadas, ha surgido la citogenética molecular para complementar las técnicas de bandeado tradicionales, convirtiéndose así en un componente esencial del diagnóstico citogenético en muchas áreas de la medicina, incluidas la genética médica, medicina materno-fetal, pedia-

tría, medicina reproductiva, anatomía patológica, hematología y oncología. La técnica Hibridación in situ fluorescente (FISH) implica la hibridación de una sonda marcada (segmento de ADN), a un objetivo cromosómico in situ. El principio de hibridación refiere a la propiedad que posee una hebra simple de ADN de unirse a su secuencia complementaria para formar una doble hebra de ADN (Figura 1). El procedimiento básico consiste en la desnaturalización de la sonda y la diana de ADN usando incubación a alta temperatura en una solución de formamida/buffer. Las sondas se encuentran marcadas directamente con fluorocromos. La sonda se aplica en exceso, asegurando que sea ésta que se hibride con el ADN diana específico. Los fluorocromos se activan emitiendo luz de espectro específico utilizando un microscopio de fluorescencia. Esto proporciona la capacidad de detectar visualmente las regiones homólogas dentro de la estructura celular. Existen diferentes tipos de sondas de FISH: locus específicos, centroméricas, de cromosomas enteros, teloméricas. A diferencia de la citogenética convencional, con el FISH se pueden detectar y caracterizar anormalidades cromosómicas en extendidos de metafase y células en interfase. Actualmente la técnica de FISH no se realiza en el Laboratorio de Citogenética siendo su incorporación fundamental para la complementación de los procedimientos diagnósticos y mejorar la calidad del servicio asistencial ofrecido.

En el marco del curso de Metodología Científica II, el objetivo de este trabajo fue la implementación de la técnica FISH en el Laboratorio de Citogenética. Durante el período comprendido entre julio y setiembre de 2016, se compararon los resultados de la técnica FISH con los obtenidos mediante la técnica gold estándar para el diagnóstico de cromosopatías sexuales. Asimismo, se

evaluó la detección de mosaicismos con la técnica FISH en comparación con la citogenética convencional.

Materiales y métodos

El presente estudio es de tipo observacional transversal analítico. Para su desarrollo se incluyeron cultivos celulares de sangre periférica fijados en suspensión (pellet citogenético), provenientes de pacientes con diagnóstico de cromosopatías sexuales X y/o Y, realizado por técnica de citogenética convencional en el Laboratorio de Citogenética, en el período comprendido entre enero de 2011 a junio de 2016. Se excluyeron las muestras insuficientes, entendiéndose por tal aquellas que presentaban una densidad de células muy reducida. Para la selección de las muestras se utilizó una base de datos del Laboratorio de Citogenética donde los mismos se encuentran anonimizados de manera irreversible por lo que la identificación del paciente no es posible desde este archivo. Se obtuvieron los datos correspondientes al número de muestra y al resultado de la citogenética convencional. Las variables estudiadas fueron: resultado de citogenética convencional, resultado del FISH, porcentaje de mosaicismo detectado por citogenética convencional, porcentaje de mosaicismo en FISH.

Protocolo de FISH

Preparación de muestras

Se realizó un extendido en láminas de las muestras siguiendo el protocolo estándar del laboratorio. Seguidamente, se traspasaron las muestras a un tubo falcon de 15 ml, agregándose fijador 3:1 (solución de metanol y ácido acético en proporción 3:1). Luego, se llevó hasta 3 ml,

se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos, se extrajo el sobrenadante, se agregó 1 ml de fijador 3:1 y se resuspendió. Después, se goteó el pellet a 20 cm de distancia en láminas de vidrio previamente lavadas y se dejaron secar al aire. Se fijaron al vidrio, colocando los extendidos por 30 minutos en plancha caliente a 90° C (envejecimiento). Bajo microscopio óptico de contraste de fase se seleccionó el área para la hibridización.

Hibridización

Las láminas previamente preparadas se sumergieron en formaldehído 37% durante 2 minutos. Se sumergieron en buffer de lavado SSC 2X durante 5 minutos. Se deshidrataron en alcohol 70%, 90% y 100% 2 minutos en cada uno. Luego de secar las láminas, se aplicaron las sondas fluorescentes específicas para el centrómero X y gen SRY (*Vysis CEP X Spectrum Green Probe/ Vysis SRY Probe LSI SRY Spectrum Orange; Abbott Molecular*) en la oscuridad (Figura 1). Se cubrió el área hibridizada con un cubreobjetos. Mediante el programa Hybrite se realizó la desnaturalización a 82° C durante 5 min y la hibridación a 45° C durante 14-20 horas. Luego del lavado poshibridización y deshidratación se realizó la contra tinción con DAPI (*Vysis*). Las láminas se guardaron en el freezer durante 24 hs.

Análisis Cromosómico por FISH

Se examinaron las láminas bajo microscopio de epifluorescencia (*Olympus modelo BX43*) en el Laboratorio de Citogenética. Los cromosomas X e Y se identificaron como señales fluorescentes verdes y anaranjadas, respectivamente. Se contabilizaron las diferentes combinaciones de señales provenientes de aproximadamente 300 núcleos

y/o metafases en cada lámina. El conteo fue realizado por tres observadores diferentes en cada caso.

Definición de mosaicismo usando citogenética convencional y FISH

En el análisis del cariotipo por citogenética convencional, el mosaicismo se diagnostica como la ganancia cromosómica en 2 o más metafases o la pérdida cromosómica en tres o más metafases⁽¹⁾. En el análisis mediante FISH se aplica el mismo concepto, por encima del *cut off*.

Definición de *cut off*

Es el valor porcentual de señales por debajo del cual, el resultado es negativo con una certeza del 95% y el error tipo Beta es menor o igual al 5%. El *cut off* fue determinado previamente, para la misma marca comercial de sonda en el laboratorio del Servicio de Hematología del Hospital Maciel y coincidió con las recomendaciones del fabricante (5%). Eso significa que aquellos hallazgos que constituyan menos del 5% del total de metafases y/o núcleos analizados no se consideran para el diagnóstico.

Normas éticas

El presente estudio implicó la utilización de muestras biológicas humanas anonimizadas conservadas en el Laboratorio de Citogenética, para lo cual contó con la aprobación en junio de 2016

del Comité de Ética de la Facultad de Medicina, UdelaR.

Resultados

Se incluyeron en el estudio un total de 27 muestras de pacientes con diagnóstico citogenético de cromosopatías sexuales. Se aplicó la técnica FISH a 24 muestras ya que 3 presentaron cantidad insuficiente de pellet y fueron excluidas. Del total de muestras analizadas, 19 presentaron alteraciones numéricas, 3 alteraciones estructurales y 2 alteraciones estructurales y numéricas (Figura 2). Respecto a las alteraciones numéricas estudiadas: 10 presentaron síndrome de Turner, 4 síndrome de Klinefelter, 4 síndrome XXX y un caso presentó síndrome XYY. Con relación a las alteraciones estructurales se analizaron tres muestras: una presentaba isocromosoma del X, otra inversión del cromosoma X y una final, delección del cromosoma X. Dentro de las alteraciones numéricas y estructurales se hallaron dos síndromes

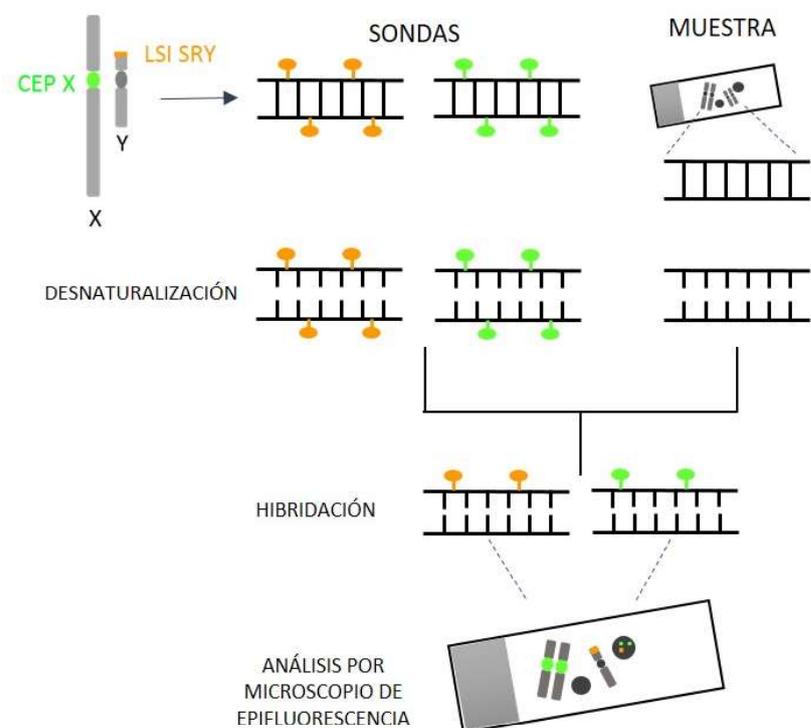


Figura 1. Diagrama esquemático de la técnica FISH.

Fuente: Elaboración propia.

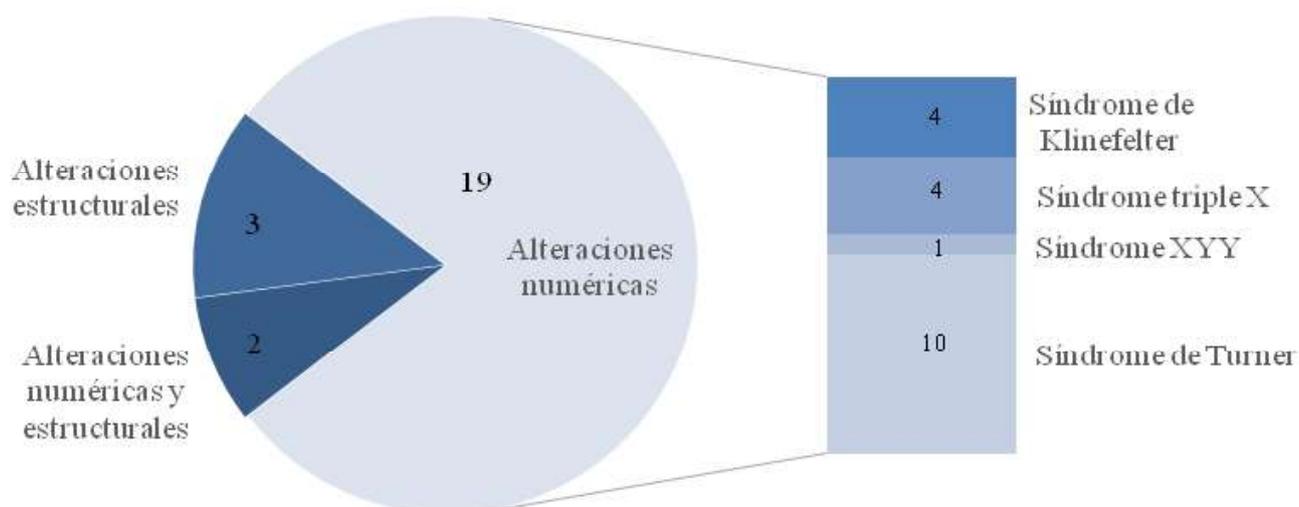


Figura 2. Distribución de cromosopatías sexuales en la muestra estudiada. n = 24

Fuente: Elaboración propia

de Turner con isocromosoma o delección del cromosoma X.

En la *Tabla 1* se muestra el resumen de los 24 casos estudiados, donde se presenta comparativamente el resultado de la citogenética convencional y el resultado del FISH, especificándose entre paréntesis el número de metafases y/o núcleos hallados con las correspondientes fórmulas cromosómicas. También se presenta el porcentaje de metafases y/o núcleos que presentan la alteración y si presentan o no mosaicismo.

Síndrome de Turner

Según los resultados de citogenética convencional (*Tabla 1*), dentro de los 12 casos estudiados con síndrome de Turner, 4 presentaron monosomía total y libre (45, X) y 8 mosaicismo en distinta proporción (45, X / 46, XX), siendo así más prevalente la presencia de síndrome de Turner mosaico.

Respecto a los resultados obtenidos mediante la técnica de FISH se observa en primer lugar que

los 12 casos analizados que tenían diagnóstico de síndrome de Turner por citogenética convencional fueron positivos para este diagnóstico a través del FISH, en concordancia con lo esperado.

Dentro de los 4 casos que tenían síndrome de Turner libre por citogenética convencional, dos de ellos (muestras 2 y 4) presentaron por FISH la alteración en todos los núcleos y/o metafases analizadas (100%), mientras que en los otros dos casos (muestras 1 y 3) se halló otra línea celular normal que no se considera significativa ya que se encuentra por debajo del *cut off* establecido.

M: Mosaicismo; NM: no mosaicismo. Se detalla la fórmula cromosómica hallada en cada muestra por ambas técnicas, señalándose entre paréntesis el número de metafases y/o núcleos. Los porcentajes corresponden a las líneas patológicas.

Tabla 1. Detalle del cariotipo en cada caso por citogenética convencional y FISH

Muestra	Citogenética Convencional	Proporción por citogenética convencional	M/NM	FISH	Proporción por FISH	M/NM
1	45,X[20]	100%	NM	45, X[299]/46, XX[1]	99,7%	NM
2	45, X[20]	100%	NM	45, X[300]	100%	NM
3	45 ,X[20]	100%	NM	45, X [303]/46, XX[3]	99,01%	NM
4	45, X[20]	100%	NM	45, X [240]	100%	NM
5	45, X [4]/ 46, XX[19]	17,4%	M	45, X[15]/ 47, XXX[2]/46, XX[283]	5%;0,6%	M
6	45, X [2]/ 46, XX[40]	5%	M	45, X [33]/ 46, XX[269]	10%	M
7	45 ,X [3]/ 46, XX[17]	15%	M	45, X [24]/ 46, XX[276]	8%	M
8	45, X [2]/ 46, XX[40]	5%	M	45, X [24]/ 46 ,XX[276]	8%	M
9	45, X [2]/ 46, XX[40]	5%	M	45, X [16]/ 46, XX[296]	5,13%	M
10	45, X [16]/ 46, XX[15]	51,6%	M	45, X[201]/47, XXX[69]/46, XX[31]	66,7%;23%	M
11	45, X [17] /46, X del(X) p 1,1 ter[3]	85%	M	45, X [40]/ 46, XX[36]	52,6%	M
12	45, X [24]/46 ,Xi (x) (q 10)[6]	80%	M	45, X [256]/ 46, XX[49]	83,9%	M
13	47, XXX [20]	100%	NM	47, XXX[282]/46, XX[17]	94,3%	M
14	47, XXX [20]	100%	NM	47, XXX[279]/46, XX[24]	92,1%	M
15	47, XXX [20]	100%	NM	47, XXX[263]/46, XX[37]	87,6%	M
16	47, XXX[2]/46, XX[22]	8,3%	M	47, XXX[8]/46, XX[142]	5,3%	M
17	47, XXY[20]	100%	NM	47, XXY[300]	100%	NM
18	47, XXY[20]	100%	NM	47, XXY[301]	100%	NM
19	47, XXY[20]	100%	NM	47, XXY[300]	100%	NM
20	47, XXY[20]	100%	NM	47, XXY[303]	100%	NM
21	47, XYY[20]	100%	NM	47, XYY[300]	100%	NM
22	46, XX inv(X) (p 22, q 21)[20]	100%	NM	46, XX [300]	100%	NM
23	46, XX del X (p 2, 1,1)[20]	100%	NM	46, XX[300]	100%	NM
24	46, XX, i(x) (q 10) [20]	100%	NM	46, XX[300]	100%	NM

Respecto a los 8 casos de síndrome de Turner en mosaico se obtuvo tanto por citogenética como por FISH (muestras 5 a 12) el mismo resultado. En relación a la muestra 5, por técnica de FISH, se halló una tercer línea celular 47, XXX en el 0,6% de metafases y/o núcleos analizados, estando debajo del *cut off* por lo que no se considera

significativo. Por lo tanto, es un mosaico de tipo 45 X/46 XX, al igual que el diagnosticado por citogenética. Asimismo, se destaca la muestra 10; el cuál presentó por citogenética convencional un mosaicismo para el síndrome de Turner de tipo 45 X [16]/ 46 XX [15] y un mosaicismo de tres líneas por FISH dado por 45, X [201]/47, XXX

[69]/ 46, XX[31]. Como fue explicado anteriormente, es frecuente que el Síndrome de Turner se presente como mosaicismo, de los cuáles los más frecuentes son los del tipo 45X/46XX, le sigue el isocromosoma X monocéntrico, luego el isocromosoma X dicéntrico, y en menor proporción 45X/46XY⁽⁴⁾⁽⁵⁾. Existen casos de mosaicismo 45X/47XXX/46XX para Síndrome de Turner reportados en la literatura como muy poco frecuentes⁽⁶⁾⁽⁷⁾. Esta diferencia puede explicarse porque el cultivo selecciona las células de mayor viabilidad y el registro y análisis de metafases está sesgado dado que se eligen al azar metafases de buena morfología. La presencia de una tercera línea celular no cambia el diagnóstico, pronóstico ni tratamiento de este paciente. Dado que corresponde a un solo caso y que los test estadísticos mostraron ausencia de significación, esto no sitúa al FISH con ventaja en el diagnóstico sobre la citogenética convencional.

Con respecto a las muestras 11 y 12 mediante citogenética se diagnosticaron como cromosopatías numéricas y estructurales de tipo 45 X /46 X del (X)p 1,1 ter y 45 X/46 Xi (x) (q 10) respectivamente. En las mismas por FISH solo se evidenciaron anomalías de tipo numérico; resultado que esperábamos debido al diseño de nuestras sondas.

Se compararon estadísticamente los porcentajes de mosaicismo presentes en los casos con síndrome de Turner obtenidos con ambas técnicas; para ello se realizó un Test de Wilcoxon de Rangos con Signo para muestras pareadas el cual no encontró diferencias significativas ($p > 0.05$). Por lo tanto, no existirían diferencias en cuanto a la detección de mosaicismo en síndrome de Turner entre ambas técnicas. Sin embargo, para este síndrome se cuenta con 8 observaciones de mosaicismo, siendo un tamaño muestral pequeño para

poder detectar diferencias. Tal como se mencionó anteriormente, estas observaciones son la totalidad de los Síndromes de Turner mosaicos que fueron referidos entre 2011-2016 al Laboratorio de Citogenética de Facultad de Medicina.

En la Figura 3A se muestra un caso representativo de síndrome de Turner analizado por FISH.

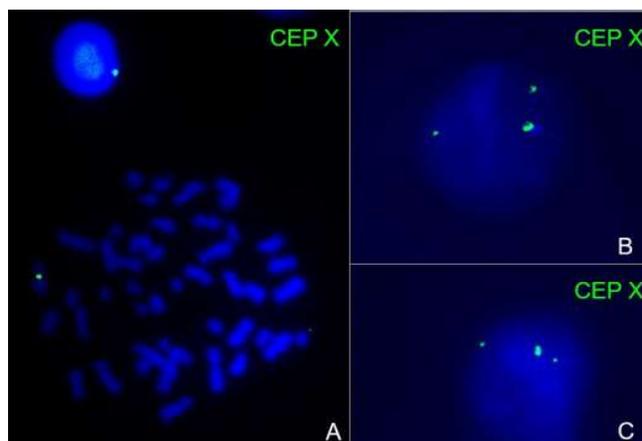


Figura 3. Análisis por FISH de un caso de síndrome de Turner y un caso de síndrome de Triple X

La sonda de color verde (CEP X) es específica para el centrómero del X. En A se visualiza un núcleo interfásico y una metafase, marcados con DAPI, con una señal verde cada uno, indicando la presencia de un cromosoma X; representativas de un síndrome de Turner. En B y C se observan dos núcleos interfásicos con tres señales verdes cada uno, lo que indica la presencia de tres cromosomas X; representativas de un síndrome XXX.

Síndrome de Klinefelter

En lo que respecta al síndrome de Klinefelter, los cuatro casos analizados (muestras 17 a 20) se presentan de forma libre (47, XXY) mediante citogenética convencional. Analizado con FISH, los cuatro casos presentan la alteración en todas las metafases y/o núcleos; acorde con lo obtenido mediante citogenética convencional. En la Figura 4A se muestra un caso representativo de este síndrome analizado por FISH.

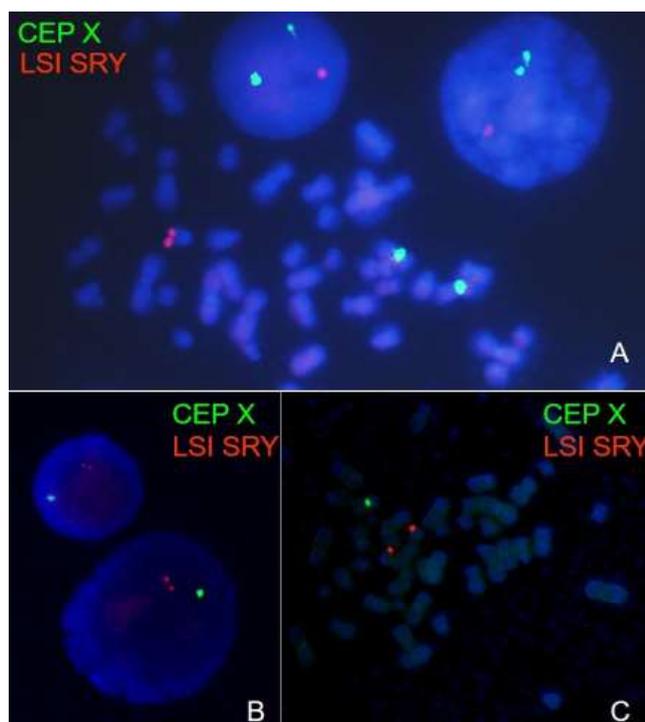


Figura 4. Análisis por FISH de un caso de síndrome de Klinefelter y un caso de síndrome XYY

La sonda de color naranja (LSI SRY) es específica de locus para el gen SRY del cromosoma Y y la sonda de color verde (CEP X) para el centrómero del X. En A se visualizan dos núcleos interfásicos y una metafase marcados con DAPI con dos señales verdes y una señal naranja cada uno, representativos de un síndrome de Klinefelter. En B se observan dos núcleos interfásicos con dos señales rojas y una señal verde, lo que indica la presencia de dos cromosomas Y y un cromosoma X; representativos de un síndrome XYY. En C se visualizan metafases con la misma alteración.

Síndrome XXX

Dentro de los casos con síndrome Triple X (muestras 13 a 16) mediante citogenética convencional se había detectado un paciente con mosaicismo (47, XXX/46, XX), los tres restantes presentaron el síndrome Triple X libre (47, XXX). En el análisis por FISH se obtuvo el diagnóstico

Triple X en los 4 casos, presentándose todos como mosaico. Se destaca que en las muestras 13 a 15 los mosaicos hallados (47, XXX / 46, XX) que no estaban presentes mediante citogenética convencional presentan la línea celular normal 46, XX en muy bajos porcentajes.

No fue posible realizar el análisis estadístico para comparación de mosaicismo en este síndrome debido a un tamaño muestral insuficiente (4 casos). Vale destacar que mediante la técnica de citogenética convencional todas las observaciones tienen un porcentaje de mosaicismo levemente superior en comparación con las obtenidas con FISH.

En la Figura 3B y 3C se muestra un caso representativo de síndrome XXX analizado por FISH.

Síndrome XYY

Este síndrome solo se presentó en la muestra 21 (47 XYY) presentándose por ambas técnicas como una cromosopatía libre. En la Figura 4B y 4C se muestra este caso analizado por FISH.

Alteraciones cromosómicas estructurales

Se presentaron mediante citogenética convencional como inversión del X (muestra 22), delección del X (muestra 23) e isocromosoma del X (muestra 24) en forma libre. La técnica de FISH no permite la detección de dichas alteraciones ya que estas no involucran el centrómero del cromosoma X marcado por la sonda utilizada, pero fueron útiles como control positivo de la técnica.

Se calculó el índice Kappa para el síndrome de Turner, síndrome de Klinefelter y síndrome triple X (cromosopatías sexuales de mayor prevalencia), obteniéndose un valor de 1,0. Un índice

kappa de 1 indica muy buena fuerza de concordancia entre ambas técnicas. Una limitante en el cálculo de este índice fue la ausencia de casos control en la investigación.

Conclusiones y perspectivas

El presente trabajo ha logrado cumplir con el objetivo general planteado; se ha implementado la técnica de FISH en el Laboratorio de Citogenética, estableciendo los protocolos para el procesamiento de muestras y registro de los resultados obtenidos.

Se estableció la concordancia entre los diagnósticos de cromosopatías sexuales por citogenética convencional y por FISH. A pesar de la capacidad de la técnica de FISH para analizar un mayor número de núcleos en menor tiempo, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas para la detección de mosaicismos en las patologías estudiadas. Se concluye que la citogenética convencional mantiene su rol como *golden standar* no sólo para el diagnóstico de cromosopatías sexuales, sino también para la determinación de mosaicismos. La técnica de FISH quedaría reservada para casos específicos, no realizándose de rutina y cobraría especial indicación en muestras con escasas de metafases o con mala calidad cromosómica.

Esta técnica se puso a punto con un nivel de seguridad que permitiría su aplicación a otras patologías que lo requieran de manera primaria. Tal es el caso de las neoplasias hematológicas dada la frecuencia de alteraciones crípticas, la escasez de metafases o la mala calidad cromosómica y en patologías con baja tasa proliferativa o bajo tratamiento citostático. Por lo anteriormente dicho el Laboratorio de Citogenética podrá a partir de ahora realizar la técnica, extenderla a otras pato-

logías y posibilitar la exhaustiva capacitación de recursos humanos; cumpliendo con el objetivo de consolidar este laboratorio como centro de referencia académica nacional.

Agradecimientos

Agradecemos al Laboratorio de Citogenética por brindarnos los recursos materiales y a todo su equipo de trabajo, Burix Mechoso, Viviana Díaz, Sebastián Machado, Jorge Souto, Gabriela Cassina y Faride Uturbey por el apoyo brindado durante los meses de trabajo.

Referencias

1. Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: S. Karger; 2013.
2. Solari AJ. Genética humana. Fundamentos y aplicaciones en medicina. 4ª ed. Médica Panamericana; 2011.
3. Thompson & Thompson. Genetics in medicine. 6ta ed. Elsevier Science. 2001.
4. Van Dyke DL, Wiktor AE. Testing for sex chromosome mosaicism in Turner syndrome. Int Congr Ser. 2006;1298:9–12.
5. Wiktor AE, Van Dyke DL. Detection of low level sex chromosome mosaicism in Ullrich-Turner syndrome patients. Am J Med Genet. 2005;138A(3):259–61.
6. Hitosugi M, Matsuoka Y. Sertoli – Leydig cell tumour complicated by X chromosomal mosaicism. Clin Endocrinol (Oxf.). 1997;47(5):619–22.
7. Schwartz S, Raffel LJ. Prenatal detection of 45,X/46,XX/47,XXX mosaicism through amniocentesis: mosaicism confirmed in cord blood, amnion, and chorion. Prenat Diagn. 1992;12(12):1043–6.