



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

Departamento de Genética  
Facultad de Medicina Universidad de la República



---

# Implementación de la técnica Hibridación in situ fluorescente (FISH) en Facultad de Medicina, UdelaR.

---

Estudiantes: Andrea Cairus

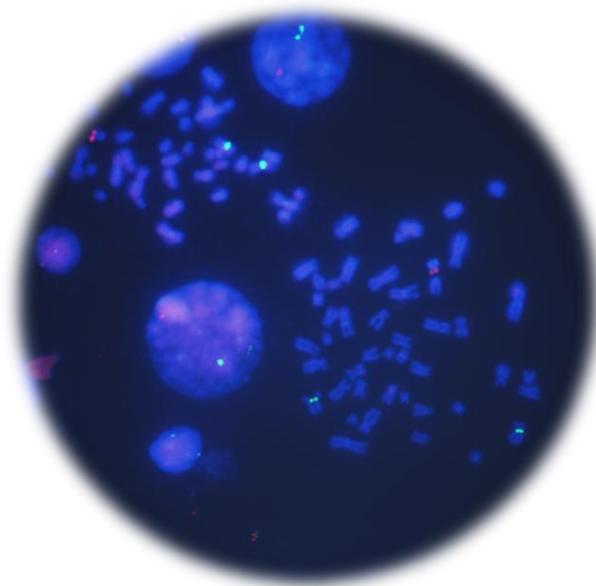
, Florencia Savio

Catherin Vera

María Eugenia Choca

Vanina Silva

Docente Orientador: Prof. Adjunta Dra. Faride Uturbey



DEPARTAMENTO DE GENÉTICA. FACULTAD DE MEDICINA.  
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. MONTEVIDEO, URUGUAY.

-Octubre 2016-



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

Resumen.....	Pág. 2
Introducción.....	Pág. 3
Objetivos.....	Pág. 11
Metodología.....	Pág. 12
Resultados.....	Pág. 14
Conclusiones y perspectivas.....	Pág. 22
Referencias bibliográficas.....	Pág. 23
Agradecimientos.....	Pág. 25



## RESUMEN

El Laboratorio de Citogenética, Departamento de Genética, Facultad de Medicina, procesa muestras de centros asistenciales públicos y privados desde el año 2005, con un promedio de 300 muestras anuales diagnosticadas por citogenética convencional. En este contexto, es imprescindible implementar nuevas técnicas que permitan su desarrollo con el fin de mejorar la calidad del servicio asistencial ofrecido.

El objetivo de este trabajo fue implementar la técnica de Hibridación in situ Fluorescente (FISH) en dicho servicio. Se realizó un estudio observacional transversal analítico. Se incluyeron muestras provenientes de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de cromosopatías sexuales X y/o Y realizado por citogenética convencional. Se aplicó la técnica de FISH y se compararon ambos resultados. Se estudió el resultado de citogenética convencional, resultado del FISH, porcentaje de mosaicismo detectado por citogenética convencional y porcentaje de mosaicismo en FISH.

Se analizaron 24 muestras; 19 presentaron alteraciones numéricas, 3 alteraciones estructurales y 2 ambas. Las alteraciones numéricas fueron síndrome de Turner, síndrome de Klinefelter, síndrome XXX y síndrome XYY. Acorde a lo esperado, hubo concordancia en los diagnósticos realizados por ambas técnicas. Para el síndrome de Turner, 8 de las 12 muestras correspondieron a mosaicismo, no existiendo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los porcentajes del mismo por citogenética convencional y FISH. Los síndromes de Klinefelter y XYY se presentaron en forma libre en ambas técnicas. Para el síndrome XXX, se observó mediante FISH en tres de las muestras una línea normal (46,XX) en un porcentaje cercano al cut off.

A partir de esta investigación se podrá realizar la técnica de FISH en el Laboratorio de Citogenética, extenderla a otras patologías y posibilitar la capacitación de recursos humanos; cumpliendo con el objetivo de consolidar este laboratorio como centro de referencia académica nacional.

*Palabras clave:* FISH, citogenética, cromosopatías sexuales, diagnóstico, Facultad de Medicina UdelaR.



## INTRODUCCIÓN

Las técnicas de bandeo cromosómico constituyen el Gold estándar para el análisis citogenético. Sin embargo, las mismas están limitadas a la detección de rearrreglos que involucran más de 2 megabases de ADN. Por otro lado, es dificultosa la identificación de alteraciones complejas. En la actualidad, la técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH) complementa los estudios convencionales de bandeo dando una mayor precisión al diagnóstico, siendo ampliamente utilizada a nivel mundial. Dicha técnica permite localizar de forma inmediata y precisa mediante sondas con secuencias específicas de ADN, en qué cromosoma y en cual región está presente la secuencia de interés, así como la utilización de secuencias específicas de cada cromosoma para su numeración. A diferencia de la citogenética convencional que requiere la realización de cultivos celulares para la obtención de células mitóticas, el FISH puede ser realizado tanto en células mitóticas como en células interfásicas, lo que permite realizar la técnica sin necesidad de esperar los tiempos de división celular.

En nuestro país la técnica FISH fue introducida para el diagnóstico clínico en el año 2005 en el área de diagnóstico de citogenética hematológica del Servicio de Hematología del Hospital Maciel, en colaboración estrecha con el Laboratorio de Citogenética de Facultad de Medicina.

Desde hace varios años funciona en la Facultad de Medicina, Universidad de la República (UdelaR), el Laboratorio de Citogenética en el Departamento de Genética, y en el año 2005 se consolidó para el diagnóstico con inclusión de pacientes del medio asistencial. Se utiliza el diagnóstico citogenético convencional para el estudio de alteraciones cromosómicas constitucionales y adquiridas. Hasta la fecha existe un registro de 2338 estudios citogenéticos realizados a pacientes procedentes de instituciones públicas y privadas. 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, con el objetivo de consolidar este laboratorio como centro de referencia académica nacional.

En este sentido, esta investigación tiene como objetivo implementar la técnica de FISH en el Laboratorio de Citogenética de la Facultad de Medicina, con el fin de brindar en un futuro cercano un diagnóstico más completo y preciso de las alteraciones cromosómicas en los casos que éste sea requerido. Por ello se aplicará la técnica de FISH sobre muestras a las que ya se realizó anteriormente diagnóstico de cromosopatía sexual mediante citogenética convencional, gold estándar en el

diagnóstico de estas patologías. Se compararán los resultados obtenidos con estas dos técnicas, no esperando encontrar diferencias entre ambas.

## **Marco teórico**

La *Genética Médica* se ha desarrollado en los últimos años definida como la aplicación del conocimiento al diagnóstico, seguimiento y tratamiento de enfermedades secundarias a alteraciones cuantitativas, cualitativas o funcionales del complemento génico normal y su transmisión a la descendencia. Se trata de una especialidad médica que incide transversalmente en otras con las que se vinculan, dado que existe una gran variabilidad de signos y síntomas que van desde lo prenatal hasta el envejecimiento y el compromiso de diferentes órganos desde la piel al sistema nervioso central. Se ocupa además no solo del individuo enfermo, sino de toda su familia.

Las enfermedades genéticas se clasifican en:

- 1- Trastornos monogénicos: son causados por la mutación puntual de un gen en uno o ambos cromosomas del par homólogo. Suelen denominarse mendelianas debido a que se heredan siguiendo las leyes de Mendel. Su modo de herencia está determinado por la ubicación cromosómica del gen afectado (autosoma/cromosoma sexual) y por el fenotipo, dominante o recesivo. En este sentido, existen 4 modelos básicos de herencia monogénica: autosómica dominante, autosómica recesiva, ligada al X dominante y ligada al X recesiva. Presentan una incidencia poblacional de aproximadamente 1/10.000, afectando como grupo al 2% de la población. Suelen ser trastornos de la edad pediátrica, el 10% se manifiesta en la pubertad y el 1% en la adultez.
- 2- Trastornos cromosómicos: Se refiere a la alteración de los cromosomas, pudiendo ser estas numéricas o estructurales y afectar a uno o más autosomas, cromosomas sexuales o ambos simultáneamente. El tipo más frecuente y el de mayor relevancia clínica es la aneuploidía. La gran mayoría de estas conducen a embriones inviables. Así, se ha observado que el 35% de los abortos espontáneos son aneuploides. El uso extendido de la reproducción asistida ha permitido comprobar que el 56,5% de los cigotos eran aneuploides. La aneuploidía está presente en el 0,3% de los recién nacidos vivos.
- 3- Trastornos multifactoriales: El modelo de herencia multifactorial o compleja es aquel que resulta de complejas interacciones entre varios factores de predisposición, incluido el genotipo en uno o varios loci y diversas exposiciones ambientales que desencadenan, aceleran o incrementan el proceso de la enfermedad. Las enfermedades con herencia multifactorial se producen como consecuencia de factores ambientales que actúan sobre individuos con determinado genotipo. Estas tienden a recurrir

en las familias sin presentar patrones genealógicos característicos. Se presentan en el 5% de la población pediátrica y en más del 60% de la población general. (Solari, 2011) (Thompson & Thompson, 2001).

### *Cromosomas*

En este trabajo, las enfermedades genéticas a tratar serán las cromosomopatías. Un *cromosoma* es considerado como el máximo nivel de empaquetamiento del ADN durante la división celular. Cada cromosoma en esta etapa, está formado por una molécula de ADN duplicada altamente condensada. La palabra cromosoma deriva del griego *chromo* (color) y *soma* (cuerpo). En un cromosoma mitótico podemos reconocer las siguientes estructuras: brazo corto (p), brazo largo (q), centrómero y telómero. El *centrómero* es una región estrecha, que suele recibir el nombre de constricción primaria y divide al cromosoma en dos brazos. En los seres humanos los centrómeros están compuestos por cientos de miles de pares de bases. La ubicación del centrómero en el cromosoma permite clasificarlos en cuatro tipos, metacéntricos (centrómero ubicado aproximadamente en el medio del cromosoma, por ejemplo, cromosoma 3), submetacéntrico (centrómero desplazado hacia un extremo, por ejemplo, cromosoma 6), acrocéntrico (centrómero cerca del extremo del cromosoma, por ejemplo, cromosoma 13) y telocéntrico (centrómero en el extremo del cromosoma, no existe en seres humanos). Los *telómeros* son los extremos de los cromosomas. Su principal función es brindarle estabilidad al cromosoma evitando que las cromátidas hermanas se adhieran entre sí. La secuencia telomérica que se repite en los telómeros humanos es CCCTAA, que puede presentarse entre 250 y 1500 repetidos. Las células somáticas humanas contienen dos copias de cada cromosoma (diploides) una heredada de la madre y otra del padre. Los cromosomas materno y paterno de una pareja se denominan cromosomas homólogos. La célula humana contiene 46 cromosomas, 22 pares de *autosomas* y un par de *cromosomas sexuales*, XX en la mujer y XY en el hombre (genes del Y, se encuentran en hemigocisismo en el hombre). Se denomina *cariotipo* al 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*. En cierta manera la línea celular normal equilibra los efectos patológicos de la línea aneuploide (Solari, 2011).

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 (ISCN, 2013).

### *Citogenética*

La citogenética es la rama de la genética que se encarga de la evaluación del genoma a nivel celular, a través de un microscopio. Esto solo es posible en cromosomas mitóticos. Las enfermedades genéticas, incluidas las cromosomopatías, son diagnosticadas mediante el estudio del cariotipo humano. Para su realización se realiza preferentemente cultivo de linfocitos de sangre periférica, durante 72hs, a 37°C. 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. Existen diferentes técnicas de tinción mediante las cuales es posible detectar a lo largo de cada cromosoma bandas alternantes de mayor o menor tinción, que forman un patrón estable y característico de cada cromosoma, permitiendo la identificación precisa de cada cromosoma y de regiones particulares dentro de cada brazo cromosómico. Así, el patrón de bandas forma la base para la confección del cariotipo. El patrón estándar utilizado para el bandeo es el llamado G, que utiliza para la tinción el colorante Giemsa luego de la exposición a tripsina. Las bandas están relacionadas con la composición predominante de bases en el ADN. Las bandas oscuras del bandeo G representan regiones cuyo ADN es rico en adenina y timina, mientras que las bandas claras corresponden a pares guanina-citosina. Asimismo, puede considerarse que las bandas oscuras representan regiones del ADN cromosómico relativamente pobres en genes (20% del total de los genes), y funcionalmente son regiones tendientes a la represión génica. Mientras que las bandas claras contienen la mayoría de los genes de mantenimiento, son funcionalmente activas y se replican precozmente (Solari, 2011).

### *Trastornos cromosómicos*

A través del análisis del cariotipo podemos describir diferentes tipos de alteraciones cromosómicas. Éstas se clasifican en dos grandes grupos: alteraciones del número de cromosomas y alteraciones de su estructura. Las alteraciones numéricas se clasifican en poliploidía si es un múltiplo exacto (por ejemplo 46, 69, 92) del número haploide (23); y aneuploidía si no es un múltiplo exacto de número haploide. Así, uno o más cromosomas excedentes (trisomía), o uno o más cromosomas faltantes (monosomía) son casos de aneuploidía. La única monosomía viable en la especie humana es la del cromosoma X (Síndrome de Turner). Es importante resaltar que la mayoría de las cromosomopatías sexuales que serán tratadas en este trabajo son del tipo numérico. Las alteraciones estructurales son variadas y sus efectos son más complejos; incluyéndose dentro de estas a: las deleciones,

las duplicaciones, las inversiones, las translocaciones, los isocromosomas y sitios frágiles cromosómicos.

### *Citogenética molecular*

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, pediatría, medicina reproductiva, anatomía patológica, hematología y oncología.

El método FISH es una técnica desarrollada a fines de 1980, a partir de procedimientos de hibridación radioactiva utilizados para mapear genes humanos. El desarrollo del FISH para examinar la presencia o ausencia de una determinada secuencia de ADN o para evaluar el número o la organización de un cromosoma o de una región cromosómica ha revolucionado tanto la investigación citogenética como la citogenética clínica. Esta confluencia del enfoque molecular y citogenético (citogenética molecular) ha aumentado de manera sustancial tanto el rango como la precisión de los análisis cromosómicos sistemáticos.

La técnica FISH implica la hibridación de una sonda (segmento de ADN) marcada, 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). 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 activa 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:

-Sondas de locus específicos: constituidas por una única secuencia genómica contigua simple la cual se une a una región específica de un cromosoma; permitiendo detectar la presencia, la ausencia o la localización de un determinado gen.

-Sondas centroméricas: son generadas a partir de secuencias repetitivas encontradas en centrómero de cada cromosoma y se utilizan para determinar si un individuo tiene o no el número correcto de cromosomas. Estas sondas también pueden usarse junto con las "sondas de locus específicos" para determinar si a un individuo le falta material genético de un cromosoma en específico.

-Sondas de cromosomas enteros: son, de hecho, colecciones de sondas más pequeñas, cada una de las cuales se une a una secuencia diferente a lo largo de un cromosoma específico, resultando el marcaje

de cada cromosoma con un color único. Son útiles para examinar anomalías cromosómicas estructurales, por ejemplo, translocaciones.

Con el FISH se pueden detectar y caracterizar anomalías cromosómicas en extendidos de metafase y células en interfase. Algunas de sus aplicaciones son las siguientes: estudios constitucionales, detección de microdeleciones, microduplicaciones, rearrreglos crípticos subteloméricos, duplicaciones y cromosomas marcadores, estudios prenatales, estudio de aberraciones cromosómicas adquiridas (por ejemplo, neoplasias hematológicas), entre otros.

Recientemente se han desarrollado nuevas técnicas que aumentan aún más la potencia del FISH para el análisis de los cromosomas humanos. Entre ellas destacamos: cariotipado de espectro (SKY), FISH multicolor (M-FISH), entre otras.

En nuestro país la técnica FISH fue introducida para el diagnóstico clínico en el año 2005 en el área de diagnóstico de citogenética hematológica del Servicio de Hematología del Hospital Maciel, en colaboración estrecha con el Laboratorio de Citogenética de Facultad de Medicina.

Desde hace varios años funciona en la Facultad de Medicina, Universidad de la República (UdelaR), el Laboratorio de Citogenética en el Departamento de Genética, y en el año 2005 se consolidó para el diagnóstico con inclusión de pacientes del medio asistencial. Se utiliza el diagnóstico citogenético convencional para el estudio de alteraciones cromosómicas constitucionales y adquiridas. Hasta la fecha existe un registro de aproximadamente 2000 estudios citogenéticos realizados a pacientes procedentes de instituciones públicas y privadas. 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, con el objetivo de consolidar este laboratorio como centro de referencia académica nacional.

### *Cromosomopatías sexuales*

El presente proyecto se enfoca en las cromosomopatías sexuales, siendo éstas anomalías cromosómicas frecuentes. Existe orientación clínica que sugiere la posibilidad de una cromosomopatía sexual: retraso en el crecimiento, en el inicio de la pubertad, amenorrea, infertilidad y genitales ambiguos. En estos pacientes está indicada la realización de estudios citogenéticos o moleculares (Thompson & Thompson 2001).

Las cromosomopatías sexuales más frecuentes en recién nacidos vivos y fetos son: las trisomías, distinguiéndose Síndrome Klinefelter (47,XXY y variantes), Síndrome XYY (47,XYY), Trisomía X

(47,XXX). La monosomía del X (45,X y variantes, síndrome de Turner) es menos frecuente en recién nacidos vivos, pero es la anomalía cromosómica más reportada en abortos espontáneos.

En primer lugar, el *Síndrome de Klinefelter* tiene una incidencia de alrededor de 1 cada 1000 nacidos vivos. La etiología de este síndrome se divide en partes aproximadamente iguales entre no disyunción meiótica materna (correlacionada con la edad materna) y no disyunción meiótica paterna (sin correlación estrecha con la edad paterna). El cariotipo más frecuente en este síndrome es el 47,XXY con una frecuencia de 80%; pudiéndose observar diversas variantes con menor frecuencia: 48,XXX, 49,XXXXY, 48,XXYY comprenden al 5%, y el 15% restante corresponden a mosaicismos. En la medida que aumenta el número de cromosomas X se observa una gradual disminución de coeficiente intelectual y mayor asociación de malformaciones (óseas, sinostosis radiounlar; facies tipo mongoloides, disminución marcada en el recuento de crestas dérmicas en los dermatoglifos y malformaciones cardiovasculares). El signo clínico fundamental para su diagnóstico es el microorquidismo (la longitud del testículo varía entre menos de 1,5 y 2,5 cm). La patogenia de esta disgenesia testicular está ligada a la presencia de dos cromosomas X en la línea germinal masculina, resultando en esterilidad. Aquellos pacientes que poseen cierto grado de espermatogénesis es porque presentan mosaicismo con una línea celular 46,XY, que es la que probablemente provee las células germinales remanentes. Fenotípicamente los pacientes son altos, delgados, con piernas largas en relación al resto del cuerpo. También presentan cierto grado de disminución del coeficiente intelectual, que se manifiesta por dificultades escolares y psicológicas.

Por otra parte, el *Síndrome XYY* presenta una incidencia de 1 cada 1000 nacimientos. Los dos cromosomas Y son heredados del padre, por lo cual el origen de esta condición es la no disyunción paterna principalmente en la segunda división meiótica, no existe relación con la edad de los progenitores. Una característica a destacar es que los varones XYY no tienen tendencia a transmitir este cariotipo a su descendencia. Esto se debe a que las células XYY están sometidas a una selección más estricta a nivel testicular que en otros tejidos. Más allá de su cariotipo anormal y algunos signos menores, no se manifiesta con alteraciones de su fenotipo. El único rasgo somático asociado regularmente a esta condición es la elevada estatura que empieza a observarse en la niñez; el tamaño dentario también puede estar aumentado. En forma variable puede haber criptorquidia y sinostosis radiocubital. Se ha evidenciado que estos pacientes tienen mayor riesgo de problemas de comportamiento y educacionales, como son los problemas de atención, hiperactividad e impulsividad.

Con respecto a la *Trisomía del cromosoma X*, ésta presenta una relación marcada con la edad materna; se considera que la mayoría de los casos se originan por no disyunción materna. La incidencia del cariotipo 47,XXX es de 1 en 1000 nacidas vivas. El fenotipo se expresa principalmente en el

desarrollo neurológico y psíquico, con la reducción del coeficiente intelectual y leves signos de malformación (hipertelorismo y esqueléticos), la fertilidad no está afectada y la transmisión de un cromosoma adicional es improbable. Otros cariotipos posibles son: 48,XXXX y 49,XXXXX, esta variante se asocia a mayor retraso en el coeficiente intelectual.

Por último, el *Síndrome de Turner* fue descrito antes de conocerse su vinculación con una anomalía cromosómica. Clínicamente se caracteriza por amenorrea primaria, ausencia de cambios puberales femeninos, estatura baja, cuello membranoso o en esfinge y cubito valgo. A su vez adquieren mayor gravedad las posibles malformaciones viscerales, como la coartación aortica, el riñón en herradura o la duplicación del uréter. Otro aspecto de interés es la presencia de disgenesia ovárica en el adulto. En el feto 45,X las gónadas presentan ovocitos pero la ausencia del segundo cromosoma sexual lleva a la degeneración en la época prenatal. Su incidencia es de 1 en 2500 nacimientos, pero la incidencia de la monosomía del X en abortos es mucho mayor, alrededor del 7%, es decir 350 veces mayor que la incidencia en nacidas. Estos se producen principalmente por defectos cardíacos y los higromas, siendo característica de los embriones con monosomía sexual completa. Asimismo, la monosomía total y libre del cromosoma X se presenta en el 55% de los casos de este síndrome, correspondiendo los restantes casos a mosaicismos, aberraciones estructurales de cromosoma X y otras alteraciones cromosómicas. Por otra parte, los casos en los que hay mosaicismos con una línea celular normal presentan un cuadro más atenuado, mientras que aquellos en los cuales hay mosaicismo patente de una línea celular con un cromosoma Y o presentan un fragmento de éste, tienen riesgo aumentado de desarrollar un gonadoblastoma.

La mayoría de los casos de este síndrome se origina en un accidente en la meiosis del padre, posiblemente por irregularidades en la disyunción del par XY; no presentando relación con la edad materna (Solari, 2011) (Thompson & Thompson, 2001).



## OBJETIVOS

### **Objetivo general**

Implementar la técnica FISH en el Laboratorio de Citogenética, Depto. de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República, durante el período comprendido entre julio y setiembre de 2016.

### **Objetivos específicos**

1. Comparar los resultados de la técnica FISH con los obtenidos mediante la técnica gold estándar para el diagnóstico de cromosopatías sexuales.
2. Evaluar la detección de mosaicismos con la técnica FISH en comparación con la citogenética convencional.



## METODOLOGÍA

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 de acuerdo al protocolo estándar del laboratorio: se traspasaron las muestras a un tubo falcon de 15 ml, se agregó fijador 3:1 (solución de metanol y ácido acético en proporción 3:1) llevando hasta 3 ml, se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos, se extrajo el sobrenadante, se agregó 1ml de fijador 3:1 y se resuspendió, se gotea el pellet a 20 cm de distancia en láminas de vidrio previamente lavadas y se dejaron secar al aire. Se fijaron al vidrio (envejecimiento) colocando los extendidos por 30 minutos en plancha caliente a 90°C. 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. Se cubrió el área hibridizada con un cubre objetos. 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 contratinción con DAPI (*Vysis*). Las láminas se guardaron en el freezer durante 24 hs.

#### *Análisis Cromosómico por FISH*

Se examinaron los 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 (ISCN, 2013). 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, del 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.

#### ***Análisis estadístico***

Se realizó una comparación de proporciones de los diagnósticos obtenidos mediante la técnica FISH y los diagnósticos previamente obtenidos por citogenética convencional. Se aplicó el índice kappa para comparación de muestras dependientes y establecimiento de concordancia entre ambas técnicas. Para ello se utilizó el programa EPIDAT 3.1. Para el análisis de mosaicismo, se realizó comparación de proporciones a través de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para muestras dependientes.

#### ***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.

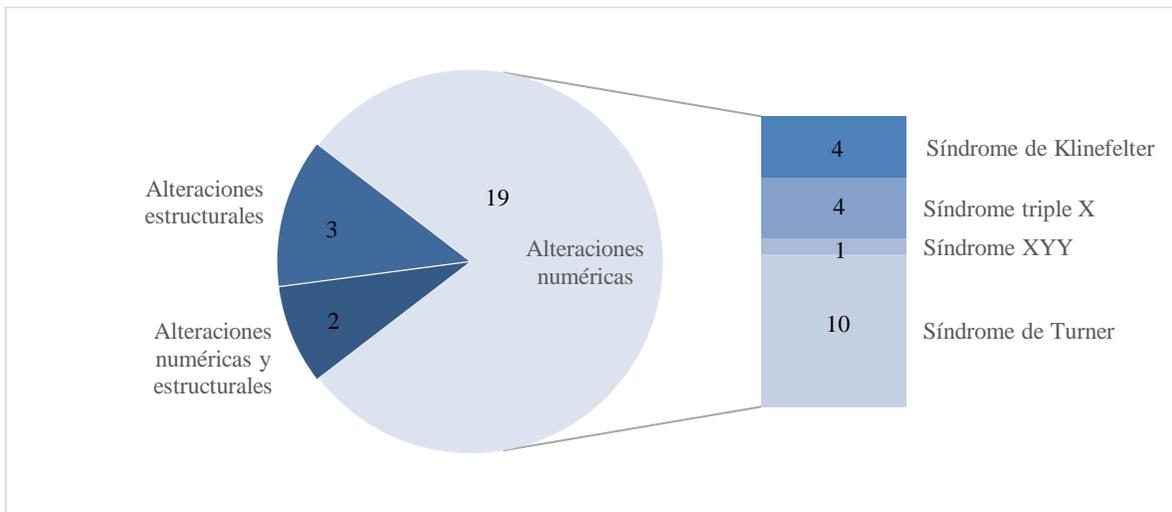


## RESULTADOS

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 1*).

Respecto a las alteraciones numéricas estudiadas: 10 presentaron síndrome de Turner, 4 síndrome de Klinefelter, 4 síndrome XXX y un caso presentó síndrome XYY. En relación a las alteraciones estructurales se analizaron tres muestras: una presentaba isocromosoma del X, una inversión del cromosoma X y una delección del cromosoma X. Dentro de las alteraciones numéricas y estructurales se hallaron dos síndromes de Turner con isocromosoma o delección del cromosoma X.

**Figura 1.** Distribución de cromosopatías sexuales en la muestra estudiada. n = 24



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. Por ejemplo, la *muestra 2* presentaba la fórmula cromosómica 45,X en las 20 metafases estudiadas mediante citogenética convencional, presentándose así la alteración en el 100% de las metafases. Mediante FISH se encontró la misma fórmula cromosómica en los 300 núcleos y/o metafases analizados, constituyendo también el 100%. Por tanto, este caso no constituye un mosaico

(detallado como NM en la tabla) dado que se halló la alteración en todas las células. En cambio, en la *muestra 7* se obtuvo la fórmula 45,X/46,XX por citogenética convencional, hallándose 3 metafases 45,X y 17 metafases 46,XX, presentándose así la alteración 45,X en el 15% de las metafases, constituyendo un mosaico (detallado con M en la tabla).

**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) (p22, q 21)[20]	100%	NM	46,XX [300]	100%	NM
23	46,XX del X (p2, 1,1)[20]	100%	NM	46,XX[300]	100%	NM
24	46,XX, i(x) (q10)[20]	100%	NM	46,XX[300]	100%	NM

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.

### *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.

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 45X/46XX, 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 45X[16]/46XX[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 (Wiktor & Van Dyke 2005; Van Dyke & Wiktor 2006). Existen casos de mosaicismo 45X/47XXX/46XX para síndrome de Turner reportados en la literatura como muy poco frecuentes (Hitosugi & Matsuoka 1997) (Schwartz & Raffel 1992). 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 cromosomopatías numéricas y estructurales de tipo 45X/46X del (X)p 1,1 ter y 45X/46Xi (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.

#### *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.

#### *Síndrome XXX*

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

#### *Síndrome XYY*

Este síndrome solo se presentó en la *muestra 21* (47 XYY) presentándose por ambas técnicas como una cromosopatía libre.

### *Alteraciones cromosómicas estructurales*

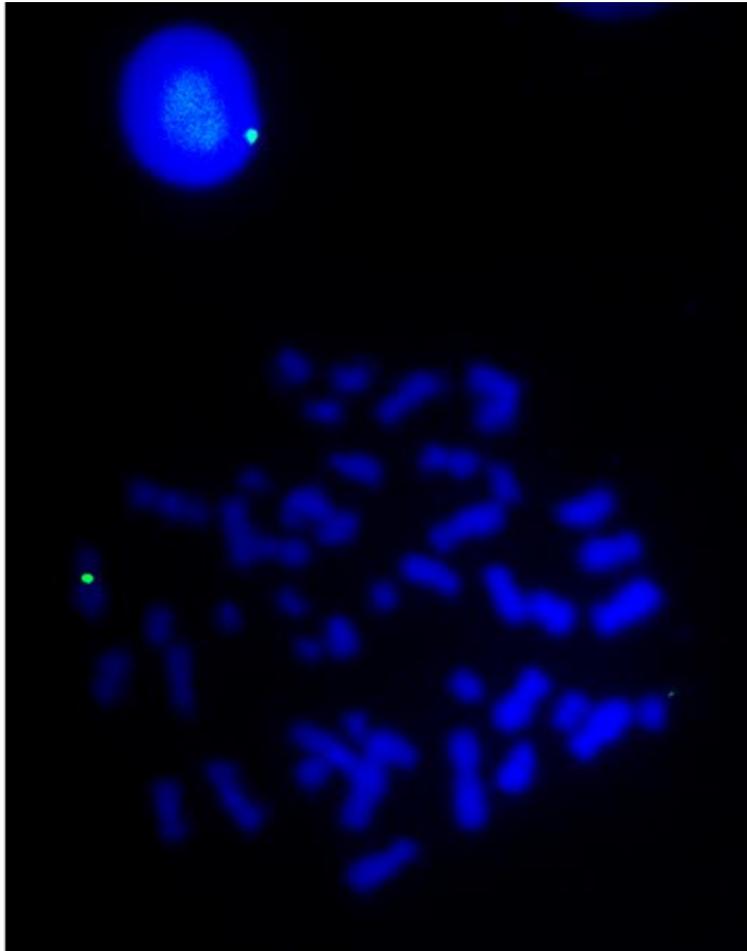
Se presentaron mediante citogenética convencional como inversión del X (*muestra 22*), deleción del X (*muestra 23*) e isocromosoma del X (*muestra 24*) en forma libre. La técnica de FISH no permite la detección de dichas alteraciones ya que estas no involucran el centrómero del cromosoma X marcado por 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 XXX (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.

### *Imágenes de casos representativos analizados por FISH*

En las *Figuras 2-5* se muestran ejemplos de imágenes obtenidas con el microscopio de epifluorescencia de metafases y/o núcleos interfásicos marcados con DAPI. En las mismas se observan las señales de las sondas utilizadas en la hibridización: el fluorocromo verde se encuentra marcando el centrómero del cromosoma X y el naranja al gen SRY del cromosoma Y. En la *figura 2* se muestra un ejemplo de síndrome de Turner 45,X; en la *figura 3* un síndrome de Klinefelter 47,XXY; en la *figura 4* un síndrome XXX y en la *figura 5* un síndrome XYY.

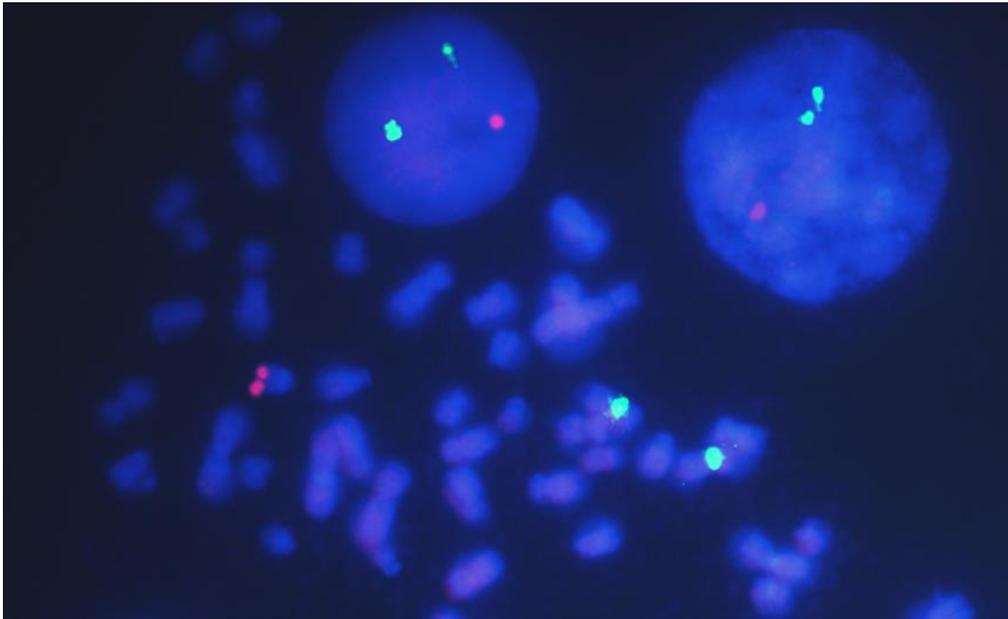
**Figura 2.** Análisis por FISH de un caso de síndrome de Turner.



Se observan imágenes obtenidas mediante la técnica de FISH. La sonda de color verde (CEP X) es específica para el centrómero del X. Se visualiza un núcleo interfásico y una metafase con una señal verde cada uno, indicando la presencia de un cromosoma X; representativas de un síndrome de Turner.

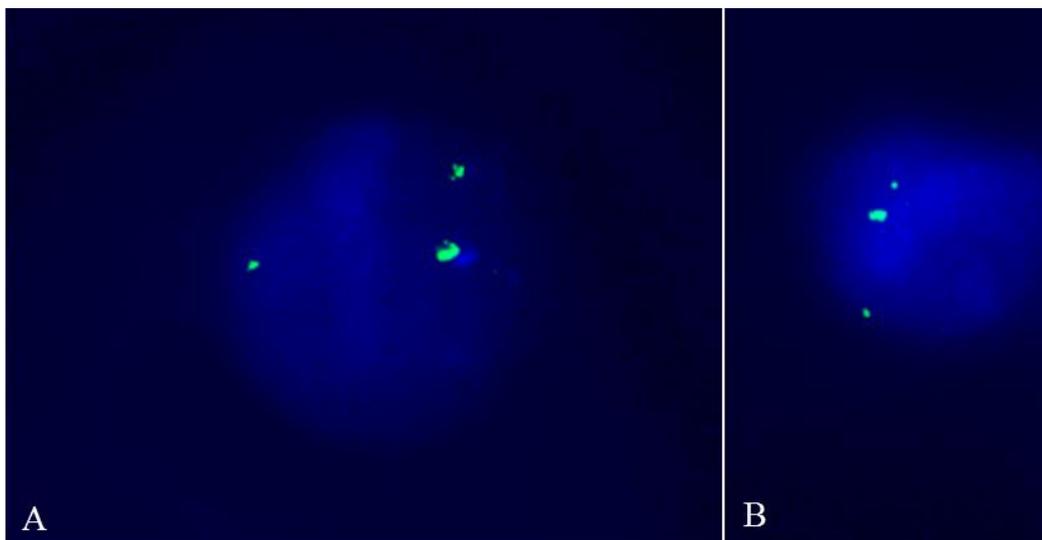
---

**Figura 3.** Análisis por FISH de un caso de síndrome de Klinefelter.



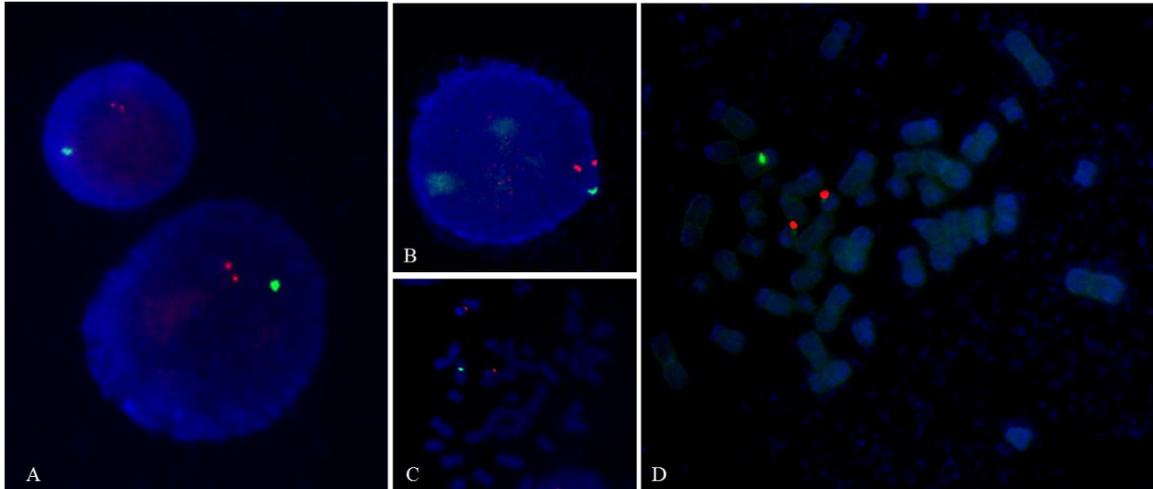
Se observan imágenes obtenidas mediante la técnica de FISH. La sonda de color naranja (LSI SRY) es específica de locus para el gen SRY del cromosoma Y y la sonda de color verde (CEP X) para el centrómero del X. Se visualizan dos núcleos interfásicos y una metafase con dos señales verdes y una señal naranja cada uno, representativos de un síndrome de Klinefelter.

**Figura 4.** Análisis por FISH de un caso de síndrome XXX.



Se observan imágenes obtenidas mediante la técnica de FISH. La sonda de color verde (CEP X) es específica para el centrómero del X. En A y B 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.

**Figura 5.** Análisis por FISH de un caso de síndrome XYY.



Se observan imágenes obtenidas mediante la técnica de FISH. 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 y B se observan tres núcleos interfásicos con dos señales rojas y una señal verde, lo que indica la presencia de dos cromosomas Y y un cromosoma X; lo que indica un síndrome XYY. En C y D se visualizan metafases con la misma alteración.



## 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 cromosomopatías sexuales por citogenética convencional y por FISH. Acorde a lo esperado, hubo concordancia en los diagnósticos realizados por ambas técnicas.

A pesar de la capacidad de la técnica de FISH para analizar un mayor número de núcleos interfásicos y/o metafases en menor tiempo, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas para la detección de mosaicismos en las patologías estudiadas.

Se concluyó que la citogenética convencional mantiene su rol como gold standard no sólo para el diagnóstico de cromosomopatías 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 escasez 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 patologías y posibilitar la capacitación de recursos humanos; cumpliendo con el objetivo de consolidar este laboratorio como centro de referencia académica nacional.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdelmoula NB, Amouri A, Portnoi MF, Saad A, Boudawara T, Mhiri MN, et al. Cytogenetics and fluorescence in situ hybridization assessment of sex-chromosome mosaicism in Klinefelter's syndrome. *Ann Genet.* 2004;47(2):163–75.
2. Chowdhury MR, Dubey S. Chapter 24 – Role of Cytogenetics and Molecular Genetics in Human Health and Medicine [Internet]. *Animal Biotechnology.* Elsevier; 2014. 451-472 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-416002-6.00024-9>
3. Griffiths A. J. F. *Genética.* 5ta edición. McGraw-Hill. 1993.
4. Hitosugi M, Matsuoka Y. Sertoli – Leydig cell tumour complicated by X chromosomal mosaicism. 1997;619–22.
5. Maciel-Guerra AT, De Paulo J, Santos AP, Guaragna-Filho G, Andrade JGR, Siviero-Miachon AA, et al. The use of fluorescence in situ hybridization in the diagnosis of hidden mosaicism: apropos of three cases of sex chromosome anomalies. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2012;56(8):545–51.
6. Okada H, Dobashi M, Yamazaki T, Fujisawa M, Arakawa S, Kamidono S. Fluorescence in situ hybridization analysis of sex-chromosome mosaicism in azoospermic men. *J Androl* [Internet]. 2001;22(6):970–2. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11700861](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11700861) \n <http://www.andrologyjournal.org/cgi/reprint/22/6/970.pdf>
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 Dec;12(12):1043-6.
8. Shaffer L. G., McGowan-Jordan J, Schmid M (eds). *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.* S. Karger, Basel. 2013.
9. Solari A.J. *Genética humana. Fundamentos y aplicaciones en medicina.* Editorial Médica Panamericana S.A. 1996.
10. Solari A.J. *Genética humana. Fundamentos y aplicaciones en medicina.* Editorial Médica Panamericana S.A. 2011.
11. Thompson & Thompson. *Genetics in medicine.* 6ta ed. Elsevier Science. 2001.

12. Van Dyke DL, Wiktor AE. Testing for sex chromosome mosaicism in Turner syndrome. *Int Congr Ser* [Internet]. 2006;1298:9–12. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0531513106005140>
13. Vorsanova SG, Yurov YB, Iourov IY. Human interphase chromosomes: a review of available molecular cytogenetic technologies. *Mol Cytogenet* [Internet]. 2010;3:1. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2830939&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
14. Wiktor AE, Van Dyke DL. Detection of low level sex chromosome mosaicism in Ullrich-Turner syndrome patients. *Am J Med Genet*. 2005;138 A(3):259–61.
15. Wolff DJ, Bagg A, Cooley LD, Dewald GW, Hirsch BA, Jacky PB, et al. Guidance for fluorescence in situ hybridization testing in hematologic disorders. *J Mol Diagn* [Internet]. 2007;9(2):134–43. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1867444&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
16. Yao-Shan Fan. *Molecular Cytogenetics. Protocols and Applications*. Humana Press Inc. 2002.



## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos en primer lugar a Leda Roche por el apoyo institucional brindado; así como también al Laboratorio de Citogenética por brindarnos los recursos materiales y a todo su equipo de trabajo, Burix Mechoso, Viviana Díaz, Sebastián Machado, Jorge Souto y Gabriela Cassinapor el apoyo brindado durante los meses de trabajo compartidos y por recibimos amablemente en su laboratorio.

Asimismo, queremos expresar nuestro agradecimiento a Valentina Colistro, Mariela Garau, Carlos Ortega docentes del Departamento de Métodos Cuantitativos; y a Carlos Zunnino docente de la Unidad Académica de Bioética quienes nos brindaron su apoyo a lo largo de este proceso.