

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



"Identificación de alteraciones numéricas y estructurales de cromosomas sexuales mediante Hibridación in situ Fluorescente (FISH) y técnicas citogenéticas clásicas"

TESIS

Que a opción al Título de Maestro en Ciencias
con Especialidad en Biología Celular

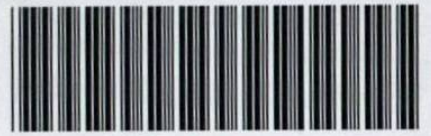
Presenta

Q.B.P. Julie Belle Silva Cudish

Monterrey, N. L.

Julio, 1998

TM
QH605
S5
C.1



1080087095

BCU' 3 NO. 10. 1. 1A 1 unit PAS
JE USA G RZA #1217 OTE.
CO' TERMINAL
MONTERREY, N L. MEX CO
TEL. 374-02-53

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**“Identificación de Alteraciones Numéricas y Estructurales de Cromosomas Sexuales
Mediante Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH) y Técnicas Citogenéticas Clásicas”**

TESIS

Que a Opción al Título de Maestro en Ciencias con Especialidad en Biología Celular

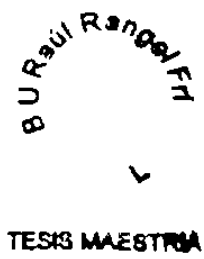
Presenta

Q.B.P. Julie Belle Silva Cudish

Monterrey, N.L.

Julio, 1998

T H S



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

"Identificación de Alteraciones Numéricas y Estructurales de Cromosomas Sexuales
Mediante Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH) y Técnicas Citogenéticas Clásicas"

TESIS

Que a Opción a Título de Maestro en Ciencias con Especialidad en Biología Celular

PRESENTA

Q.B.P. Julie Belle Silva Cudish

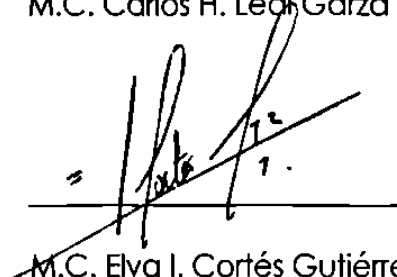
COMISION DE TESIS

PRESIDENTE:



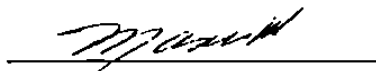
M.C. Carlos H. Leal Garza

SECRETARIO:



M.C. Elva I. Cortés Gutiérrez

VOCAL:



Dr. Mario Morales Vallarta

Agradecimientos

En unas pocas líneas es casi imposible agradecer a todos y cada una de las personas que a lo largo de la realización de esta tesis me han ayudado de alguna forma para lograr terminar este trabajo. Sin embargo quiero mencionar a algunos

- 1.- M.C. Elva I. Cortés y M.C. Carlos Leal. Elva mil gracias por aguantarme, y por todo el apoyo y consejos que me distes a lo largo de mi estancia en el laboratorio. Maestro Carlos, muchísimas gracias por permitirme trabajar en su laboratorio y por su apoyo moral.
- 2.- Dr. Mario Morales Vallarta. Gracias por tener fe en mí y todo el apoyo y sugerencias que me brindó desde que empecé la maestría.
- 3.- M.C. Martha Davila y M.C. Elisamaría Leal. A ustedes quiero tomar esta oportunidad para volver a expresar mi agradecimiento por todo el apoyo y amistad que me brindaron a lo largo de la realización de este trabajo.
- 4.- A los Químicos Guillermo Quiroga y Yolanda Aznar. Muchas gracias por permitirme el acceso a material y equipo de su laboratorio para llevar a cabo FISH y por todo el apoyo desinteresado que me brindaron.
- 5.- Dr. Ricardo Hernandez y Dr. Ricardo Jalomo del Hospital número 23 del I.M.S.S. quienes participaron al enviar oportunamente todas las muestras sanguíneas que fueron incluidas en este trabajo. Muchas gracias.
- 6.- Dra. Diana Leal Cavazos, del laboratorio de Biología Molecular del CIBIN. Muchas gracias por los consejos técnicos que me distes y también el permitir utilizar equipo de tu laboratorio.
- 7.- Dra. Lisa Schaffer. Ph.D del Kleberg Cytogenetics Laboratory del Baylor College of Medicine, Texas, E.U.A., por sus valiosas sugerencias para implementar la técnica de FISH.
- 8.- Al Dr. Curtis Thompson, M.D., de la Universidad de California, San Francisco, CA, E.U.A., por sus valiosos consejos y desinteresada ayuda.
- 9.- Dra. María Julia Verde Star, subdirectora de postgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas, por su apoyo en permitirme realizar la maestría en Biología Celular.
- 10.- Al Dr. Antonio Luna y Sr. Francisco Treviño, por su apoyo para la realización de las fotografías tomadas del microscopio epifluorescente.
- 11.- A todos del CIBIN que de muchas maneras me apoyaron e hicieron que mi estancia en el laboratorio fuera fructífera.
- 12.- Por último pero sin ser menos importante, a mi familia, especialmente a mi esposo quien sin su apoyo y comprensión, ni si quiera hubiera podido soñar con la posibilidad de obtener la maestría.

Carlos, Alejandro y Kyralina

A ti Ronald

INDICE

RESUMEN	1
IMPORTANCIA	2
ANTECEDENTES	3
A.1 GENERALIDADES	3
A.2 HIBRIDACION <i>in situ</i> FLUORESCENTE (FISH)	5
A.3 FISH EN EL ESTUDIO DE LOS CROMOSOMAS X y Y	10
ORIGINALIDAD	12
HIPOTESIS	13
OBJETIVOS	14
MATERIAL Y METODOS (FIGURA 1 Y ANEXO 2)	15
B.1 POBLACION ESTUDIADA	15
B.2 TECNICAS DE LABORATORIO	15
B.3 ANALISIS ESTADISTICO	28
RESULTADOS	29
DISCUSION Y CONCLUSIONES	34
PERSPECTIVAS	38
ANEXO 1 Resultados de las Tablas 1 al 4	39
ANEXO 2 Fotografías de Casos Clínicos Presentados en la Tabla 2	44
ANEXO 3 Reactivos y Soluciones Necesarios para Bando G y C, y FISH	51
LITERATURA CITADA	59

RESUMEN

La identificación de anomalías de los gonosomas aunque frecuentemente se dificulta, es importante su detección eficiente para un adecuado tratamiento del paciente. Tomando en cuenta lo anterior, se han introducido técnicas que permiten el análisis cromosómico a nivel molecular como lo es la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH). La hipótesis del presente proyecto es: las anomalías tanto numéricas como estructurales de los cromosomas sexuales serán detectadas en forma más eficaz y sensible mediante la técnica citogenética-molecular de FISH en comparación con las técnicas citogenéticas clásicas de bandeado G y bandeado C, lo que se reflejaría en un asesoramiento genético más adecuado para el paciente. Los objetivos son: 1) Implementar la técnica de FISH para la detección rápida y sensible de anomalías numéricas y estructurales de los cromosomas X y Y tanto en núcleos interfásicos como en metafases obtenidas de pacientes con diagnóstico clínico de ambigüedad sexual o de alguna anomalía en gonosomas. 2) Detectar tanto anomalías en cromosomas sexuales que son difíciles de observar mediante las metodologías citogenéticas clásicas o alteraciones numéricas que se encuentren en muy baja proporción (mosaico) en la población celular. 3) Comparar la sensibilidad de detección de la técnica de FISH con las técnicas citogenéticas clásicas (bandeo G y bandeado C). Material y métodos: Se incluyeron 34 pacientes del Hospital Regional de Especialidades No. 23 del IMSS con diagnóstico clínico de: Síndrome Turner (n=10), Síndrome Klinefelter (n= 3), genitales ambiguos (n=11), amenorrea primaria (n= 6), disgenesia gonadal (n=3), y oligospermia (n=1) referidos al laboratorio de Citogenética del Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN) para estudio citogenético-molecular. De cada paciente se obtuvieron células metafásicas a partir de cultivo de linfocitos de sangre periférica estimulados con fitohemaglutinina. Para identificar a los cromosomas por su patrón de bandas específico, se realizó tinción de bandeado G y C de acuerdo a metodologías habituales de laboratorio. La técnica de FISH se realizó tanto a nivel metafase, como en núcleos interfásicos empleando las sondas moleculares alfa satélite específicas para los cromosomas X (DXZ1) y Y(DYZ3) de acuerdo a la metodología propuesta por Cremer y Pinkel. Los resultados de la técnica de FISH concordaron con aquellos obtenidos mediante bandeado G y bandeado C. A través de FISH, se logró observar aneuploidías tanto a nivel interfase como metafase. También, se observaron en 3 pacientes referidos por sospecha de anomalía gonosómica, alteraciones estructurales del cromosoma X (dicéntrico, deleción, isocromosoma) en forma de mosaico cuyo origen (casos dicéntricos) se pudo determinar, situación que no se logró mediante las técnicas clásicas de tinción de bandeado G y bandeado C. Cabe mencionar que usando la técnica de FISH, se obtuvieron resultados específicos ya que únicamente se observó fluorescencia en los cromosomas de interés, y además en un menor tiempo a comparación con las técnicas de bandeado. Tomando en cuenta todo lo anterior, podemos concluir que la técnica de FISH por su sensibilidad, especificidad, rapidez, y por la ventaja de poder estudiar alteraciones tanto a nivel interfase como a nivel metafase, es una herramienta muy útil para apoyar el diagnóstico clínico y permitir realizar y obtener mayor información de trabajos de investigación a nivel cromosómico.

IMPORTANCIA

Un importante renglón en los problemas de salud pública lo constituyen las anomalías genéticas de la población humana, debido a que éstas afectan a los individuos de todas las edades y estratos sociales y su frecuencia informada ha aumentado progresivamente con el paso del tiempo. Dentro de estas anomalías, las pertenecientes a los cromosomas sexuales representan aproximadamente el 14% de los pacientes referidos a nuestro laboratorio para estudio cromosómico; de tal forma que es de suma importancia un diagnóstico oportuno, de cualquier alteración de los cromosomas X y Y, esto con el fin de evitar a futuro el desarrollo de problemas tanto físicos como psicológicos, o reducir sus consecuencias, mediante tratamientos hormonales o quirúrgicos, permitiendo al paciente llevar una vida lo más normal posible (1).

Aunque las técnicas utilizadas en citogenética clásica permiten la identificación de alteraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales, se requiere del desarrollo de metodologías citogenéticas moleculares para aumentar la sensibilidad en el diagnóstico, en un tiempo lo más breve posible, lo que permitiría una mejor comprensión sobre la pronóstico, tratamiento futuro de estos pacientes, y sobre las causas que originan dichos padecimientos.

Siendo consciente de esta problemática, se presenta este proyecto con la finalidad principal de implementar y establecer en nuestro medio, la técnica de FISH para la detección de anomalías cromosómicas en pacientes con ambigüedad sexual.

ANTECEDENTES

A.1 GENERALIDADES

Con el progreso de las técnicas de cultivo *in vitro*, y la obtención de mejores preparaciones cromosómicas debido al uso de soluciones hipotónicas y de colchicina, a finales de los 60s inicios de los 70s, fue posible la identificación y clasificación de los cromosomas en el humano. Posteriormente, surgen diversas técnicas citogenéticas denominadas "de bandeó" que tiñen regiones cromosómicas específicas. Ejemplo de ello están las técnicas de bandeó G (Giemsa), bandeó C (del centrómero), bandeó R (en reversa), y bandeó T (del telómero)(2,3).

Estas técnicas de citogenética clásica (3) aunque permiten la identificación de alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales, poseen algunas limitaciones, entre las que podemos mencionar:

- 1.- Se requiere de que las células estén en división y que de ellas, se obtengan cromosomas en el estado de metafase; un proceso que difícilmente se puede automatizar (4).
- 2.- Para una óptima interpretación se necesitan laminillas que contengan excelente preparaciones con la morfología y tamaño cromosómico adecuado. Lo anterior significa una inversión considerable de tiempo y trabajo por parte de expertos en el área (4).
- 3.- La selección celular que se hace para los estudios citogenéticos, ocasionalmente puede generar una mala y ambigua interpretación de los resultados esperados; ya que las células que proliferan *in vitro*, pueden no ser representativo de la población original. Esto es especialmente problemático en estudios cromosómicos de células tumorales (5,6).

4.- Una complicación adicional es la dificultad para la obtención de metafases analizables en ciertos tejidos o células, como por ejemplo en médula ósea, y tumores sólidos (7-9).

5.- Rearreglos que involucran regiones cromosómicas muy pequeñas son difíciles de detectar mediante las técnicas de tinción clásica (10).

6.- Finalmente, estas técnicas no permiten la investigación *in situ* ni la localización cromosómica en núcleos interfásicos (4).

Muchas de estas dificultades han sido parcialmente subsanadas mediante la implementación en 1969, de la técnica de hibridación *in situ* utilizando isótopos radioactivos principalmente Tritio (^3H) (11-14). El fundamento de esta técnica consiste en la aplicación de ADN o ARN específico, previamente procesado y marcado con isótopos radioactivos a una porción de tejido o frotis celular que posee como "sustrato" su ADN o ARN inmovilizados. La identificación de la secuencia específica nucleotídica, se determina mediante autoradiografía, por la unión complementaria entre la secuencia marcada radioactivamente y la secuencia específica de la muestra (15).

Inicialmente, esta técnica se empleó para localizar secuencias repetitivas de ARN ribosomal o satélite (16). Posteriormente a partir de 1981, diversos investigadores perfeccionaron la técnica de hibridación *in situ* lo suficiente para permitir la localización cromosomal de secuencias del ADN de una sola copia clonados en plásmidos (17-19). De tal forma que el uso de la hibridación *in situ* junto con la inmunquímica, mediante el empleo de anticuerpos policlonales o monoclonales, o con la histoquímica, a través del uso de enzimas, ofrece al investigador, una oportunidad de explorar el contenido genético en su sitio de expresión dentro de la célula, y puede proveer evidencia de que si una secuencia genética determinada es transcrita o no (14,15).

Dentro de los sistemas de detección en la hibridación *in situ*, el método isotópico fue el primero en ser empleado con ^3H como marcador. Actualmente, también se emplea Yodo 125 (^{125}I), Azufre 35 (^{35}S), y Fósforo 32 (^{32}P) (15-19,20); y aunque se sigue utilizando como método de detección de material genético, este

sistema presenta diversas desventajas como son: consume mucho tiempo (la detección puede tardar semanas a un mes), carece de alta resolución topológica necesaria para realizar una detallada localización de secuencias génicas pequeñas (21), además de que su uso requiere de un manejo especial, con un lugar de desecho adecuado, y trámites de permiso necesarios para el uso de isótopos radioactivos.

Tomando en consideración lo anterior, surgen técnicas de hibridación *in situ* no isotópicas. En estas técnicas, se emplean ya sea reacciones asociadas con enzimas como la Fosfatasa alcalina o Peroxidasa de rábano; o colorantes fluorescentes como son la Rodamina, Isotiocianato de fluoresceína (FITC), 4,6-Diamino-2-fenilindol (DAPI), o Rojo Texas ("Texas Red"). Al combinarse la técnica de hibridación *in situ* con la detección fluorescente donde secuencias nucleotídicas de ADN específicas teñidas con colorantes fluorescentes, se unen complementariamente a las secuencias nucleotídicas "sustrato", surge lo que se denomina Hibridación *in situ* Fluorescente o FISH ("Fluorescent *in situ* Hybridization") (16,22).

A.2 HIBRIDACION *in situ* FLUORESCENTE (FISH)

Los primeros intentos de la técnica de FISH, empezaron en 1977 con Rudkin y Stollar quienes describieron un nuevo método para la detección del gen ARN 5S mediante híbridos ARN-ADN en preparaciones citológicas de *Drosophila melanogaster* observados mediante el uso del colorante fluorescente Rodamina (23,24).

Posteriormente a partir de 1980, el desarrollo de esta técnica ha permitido establecer las siguientes ventajas:

1.- Aumento de la Sensibilidad en la Detección Cromosómica.

a) Uso de Haptenos

Bauman y colaboradores en 1980, usando sondas de ARN directamente marcadas en su región terminal 3' con un fluorocromo comercial, desarrollaron un método directo de hibridación *in situ*. El ARN que provenía de diferentes fuentes como son: insectos, tripanosomas, y adenovirus de cultivos de tejido humano, fue marcado con Rodamina; estos estudios concluyeron que por su rapidez y el hecho de no tener que emplear radioactividad para el marcaje, facilitaban la introducción de la técnica de hibridación *in situ* para el diagnóstico citopatológico (23,25).

A pesar de las ventajas observadas, este método de hibridación directa presentaba algunas limitaciones en su sensibilidad, especialmente cuando se trataba de una sonda molecular pequeña ya que no había forma de poder amplificar su señal. Para resolver esto, se emplearon procedimientos inmunocitoquímicos usando anticuerpos anti-fluorocromo para la amplificación de dichas señales fluorescentes, aumentando así la sensibilidad en la detección. Desde entonces, varios procedimientos para la modificación de ácidos nucleicos mediante el uso de haptenos químicos y enzimáticos se han utilizado (23).

La presencia de los haptenos, siendo moléculas pequeñas quienes sin inducir una reacción inmunológica, son capaces de reaccionar y unirse a anticuerpos específicos (26), poseen como ventaja, el que no afectan las propiedades de hibridación de la sonda y se puede lograr el aumento de sensibilidad deseada (23). En 1981, Langer y colaboradores, unieron covalentemente la Biotina (hapteno) a la Uridina, se observó que estos nucleótidos marcados no solamente eran eficientes sustratos para diversas polimerasas del ADN o ARN *in vitro*, sino que también con ellos, se podía amplificar la señal fluorescente, situación ideal para trabajos tipo inmunofluorescencia o para la detección y localización de secuencias específicas muy pequeñas en cromosomas (27). Dentro de los haptenos, el más utilizado es la Biotina; aunque cabe mencionar otros tales como: la Acetilaminofluorene (AAF), Digoxigenina, y modificaciones químicas realizadas con mercurio también se han empleado (16,21,27-31).

En 1986, Pinkel y colaboradores describieron el uso de FISH con el uso de haptenos, para la clasificación de cromosomas y detección de alteraciones de los mismos. ADN marcado con Biotina fue hibridado con los cromosomas bajo estudio y posteriormente detectado mediante Avidina la cual estaba unida a Fluoresceína. Cuando era necesario, también empleaban anticuerpos anti-avidina con Fluoresceína para aumentar la señal deseada. Se estudiaron cromosomas humanos de líneas celulares híbridas humano-hamster tanto a nivel de células en interfase como en metafase usando como sonda ADN genómico humano. Como resultado de su trabajo, pudieron marcar cromosomas específicos, detectar alteraciones cromosómicas estructurales como son las translocaciones, y cuantificar el ADN bajo estudio. Así mismo pudieron corroborar la especificidad de dicha metodología molecular debido a que los cromosomas humanos de la línea celular humano-hamster se tiñeron de manera uniforme e intensa tanto en metafases como en interfases cuando se utilizó como sonda, ADN genómico humano (32).

b) Hibridación Competitiva

Innovaciones a la técnica de FISH con el fin de aumentar más su sensibilidad se llevaron a cabo en 1987 por Landegent y colaboradores. Un producto conteniendo una alta concentración de secuencias de ADN repetitivas y baja concentración de ADN renaturalizado como lo es Cot-1 ADN, fue empleado para reducir la interferencia de la señal fluorescente deseada por parte de las secuencias repetitivas (tales como Alu y Kpn) comunes en el genoma humano. Se realizó lo que denominaron una hibridación competitiva, ya que simultáneamente al hibridizar, agregaron tanto la sonda como el competidor. Obtuvieron buenos resultados ya que el competidor Cot-1 no interfirió en el proceso de hibridación entre la sonda y cromosoma, además no se enmascaró la señal deseada por la presencia de secuencias repetitivas dentro de la sonda (4).

Esta innovación permitió mayor flexibilidad para escoger el tipo de sonda deseada, desde aquellas que consistían de una copia de ADN sin secuencias repetidas, hasta aquellas con secuencias altamente repetitivas como las encontradas en la heterocromatina o en regiones alfa satélites. Cabe mencionar que también al realizar

la hibridación *in situ* competitiva se reducía el riesgo de pérdida de material genético evitando tener que eliminar las secuencias repetitivas existentes en la sonda antes de llevarse a cabo la hibridación (21).

En 1988, Pinkel y colaboradores, desarrollaron el proceso llamado "Chromosome Painting" o pintado de cromosomas. Ellos informaron que al llevar a cabo la hibridación competitiva (llamada también como Supresión Cromosomal *in situ* (CISS)) usando bibliotecas enteras específicas para los cromosomas 4 y 21 como sondas, y como competidor ADN genómico humano, se obtiene una coloración intensa y específica de los cromosomas 4 y 21 completos tanto en metafases como en núcleos interfásicos (33).

c) FISH "multicolor"

Modificaciones recientes de la técnica FISH en los 90's, incluyen lo que se denomina FISH multicolor, en la cual dos o más sondas son simultáneamente hibridizadas a los cromosomas y subsecuentemente, diversas regiones cromosómicas se pueden observar a la vez bajo el microscopio fluorescente por sus diferentes colores. Con los avances actuales se puede utilizar esta técnica para localizar y ordenar secuencias específicas hasta de 500 pb de ADN dentro del cromosoma (34-36) y se puede obtener una alta resolución tal que se permite observar secuencias génicas de menos de 100 kb de distancia entre sí (37). Esta técnica se ha aplicado en conjunto con el uso de un analizador de imágenes para estudios genéticos especializados como son de tumores sólidos (38).

d) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Actualmente, se están haciendo grandes esfuerzos para obtener un mayor número de sondas y de mejor calidad. Como sondas, se han utilizado secuencias específicas clonados en plásmidos, bacteriófagos, cósmidos, o vectores tipo cromosomas artificiales de levadura (YAC) . Con el uso de la técnica de microdissección cromosomal con subsecuente amplificación mediante el uso del PCR del fragmento cromosómico disectado, se han logrado obtener sondas de alta calidad permitiendo así una mayor sensibilidad al llevar a cabo la técnica de FISH (39,40).

Mediante la técnica de PRINS ("PRimed IN Situ labeling") empleando sondas tipo oligonucleotídicas, se obtiene una identificación cromosómica rápida, sensible, simple, y confiable. Para esto, son utilizados oligonucleótidos específicos previamente sintetizados como sondas e iniciadores ("primers"), se lleva a cabo el acoplamiento de ésta al loci *in situ* a nivel cromosómico, seguido por una elongación de la cadena nucleotídica mediante la participación del DNA polimerasa para finalmente a través de la vía directa o indirecta de detección de la técnica de FISH, se localice el sitio cromosomal al cual se le unió dicha sonda (41)

2. Permite el Análisis Cromosómico Molecular a Nivel Interfase

En 1986, surgió lo que el Dr. Cremer y colaboradores denominaron "Citogenética Interfásica". En su trabajo, llevaron a cabo tanto la hibridación isotópica (con ^3H) como la no-isotópica (empleando Fosfatasa alcalina y FITC) utilizando como sonda ADN centromérico (repetitivo) del cromosoma 18 de 684 pb. Concluyeron que bajo condiciones adecuadas de rigurosidad durante la hibridación esta sonda se podía utilizar para la localización del cromosoma 18 tanto en metafases como en núcleos interfásicos (42).

3.- Permite el Análisis Cromosómico Molecular en Células Difíciles de Cultivar

No solamente se dedicó tiempo al perfeccionamiento de la técnica de FISH, sino que también se empezó a aplicar esta novedosa técnica en células difíciles de cultivar como son las provenientes de tumores sólidos (5,43-45) o de médula ósea (46,47) con el fin de detectar alteraciones cromosómicas, investigar sobre el cromosoma Filadelfia en pacientes con leucemia, y para el seguimiento de pacientes después de un trasplante de médula ósea.

4.- Es Util en el Diagnóstico Citopatológico

La técnica de FISH también se ha utilizado para la detección de virus de interés clínico-patológico tales como el Epstein-Barr (44), y virus del papiloma humano causante principal de cáncer cervicouterino (48,49).

A.3 FISH EN EL ESTUDIO DE LOS CROMOSOMAS X y Y

En 1984, G.A. Rappold y colaboradores realizaron los primeros estudios sobre la identificación y topografía de los cromosomas sexuales (X y Y) utilizando la técnica de hibridación *in situ* en núcleos interfásicos (50).

Posteriormente en 1985, J. Burns y colaboradores establecen la gran sensibilidad y rapidez de la técnica de hibridación *in situ* con peroxidasa como sistema de detección para el estudio del cromosoma Y en diferentes tipos de tejidos (51).

La técnica de FISH multicolor también se ha aplicado para el estudio de aneuploidías de cromosomas humanos en espermatozoides. Estudios realizados en 1994 por Bischoff y colaboradores en diversos cromosomas entre ellos los sexuales del espermatozoide humano, les permitieron concluir que esta técnica es muy útil para determinar la frecuencia de aneuploidía; basándose en sus resultados, concluyeron que la frecuencia de alteraciones cromosómicas numéricas varían entre 1% a 19% (52). En 1995, se llevaron a cabo estudios semejantes empleando dos o tres colorantes fluorescentes para la detección de diversas sondas centroméricas entre ellas las correspondientes a los cromosomas X y Y concluyendo que, la técnica de FISH permite un rápido tamizaje de anomalías numéricas cromosómicas en células espermáticas con resultados confiables (53,54). En 1996, Coignet y colaboradores adaptaron el protocolo de PRINS a espermatozoides humanos maduros empleando secuencias oligonucleotídicas específicas para diversos cromosomas incluyendo para cromosoma X como sondas, con el fin de estudiar la nodisjunción en espermatozoides humanos (55).

En México, recientemente en 1995, Carnevale y colaboradores utilizaron con éxito la técnica de FISH empleando sondas específicas de la región centromérica de X y Y, para identificar marcadores sexuales de

origen desconocidos en siete pacientes con Síndrome de Turner y una con ambigüedad sexual (56). Posteriormente en 1996, los mismos autores empleando estas mismas sondas, aplicaron la técnica de FISH a células epiteliales de la mucosa oral de pacientes con Síndrome de Turner y de Klinefelter así como con disgenesia gonadal (57)

La identificación de los cromosomas X y Y por medio de la técnica de FISH, también ha sido de gran utilidad en estudios relacionados al cáncer. Investigadores tales como Duram y Pino, utilizando una sonda específica para los cromosomas X y Y, estudiaron a pacientes sometidos a trasplante de médula ósea, y a través del FISH, pudieron determinar el porcentaje de éxito del trasplante. Además comprobaron, que empleando la técnica de FISH, se estaba ante una técnica rápida, sensible, que permite la cuantificación celular, sin tener que cultivar médula ósea *in vitro* para llegar al diagnóstico clínico (8,45).

ORIGINALIDAD

La aplicación de la técnica de Hibridación *in situ* Fluorescente (Fluorescent *in situ* Hybridization, "FISH") para estudios biológicos se está expandiendo rápidamente, esta tecnología innovadora ha revolucionado aspectos importantes en estudios genéticos, citogenéticos, diagnóstico prenatal, en tumores, estudios radiológicos, y de investigación básica (22).

Sin embargo en nuestra región, el presente proyecto representa el primer intento de implementación de esta metodología molecular para ofrecer un diagnóstico citogenético más eficiente en pacientes con diagnóstico clínico de ambigüedad sexual.

HIPOTESIS

Las anomalías tanto numéricas como estructurales de los cromosomas sexuales, serán detectadas en forma más eficaz y sensible mediante la técnica citogenética-molecular de Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH) en comparación con las técnicas citogenéticas clásicas de bandeado G y bandeado C, lo que se reflejará en un asesoramiento genético más adecuado y preciso para el paciente.

OBJETIVOS

- 1.- Implementar la técnica de Hibridación *in situ* Fluorescente ("Fluorescent *in situ* Hybridization, FISH") para la detección eficiente de anomalías numéricas y estructurales de los cromosomas X y Y tanto en núcleos interfásicos como en metafases obtenidas de pacientes con diagnóstico clínico de ambigüedad sexual o posible anomalía gonosómica.
- 2.- Detección de anomalías estructurales en cromosomas X y Y que son difíciles de detectar mediante las metodologías citogenéticas clásicas, o alteraciones numéricas que se encuentran en muy baja proporción (mosaico) en la población celular.
- 3.- Comparar la sensibilidad de detección de la técnica de FISH con las técnicas citogenéticas clásicas de bandeado G y C.

MATERIAL Y METODOS (FIGURA 1 Y ANEXO 3)

B.1 POBLACION ESTUDIADA

En el presente estudio, se incluyeron muestras de sangre periférica provenientes de pacientes con diversas alteraciones en los gonosomas así como de individuos sanos las cuales fueron divididos en 2 grupos:

1.- Control Positivo: un grupo de 5 individuos (3 mujeres y 2 hombres sanos) cuyo cariotipo no reveló ninguna alteración numérica o estructural con respecto a sus cromosomas X o Y, fueron utilizados como control "positivo" para verificar la actividad y especificidad de las sondas moleculares.

2.- Pacientes: fueron incluidos 34 pacientes provenientes del Hospital Regional de Especialidades número 23 del Instituto Mexicano del Seguro Social (I.M.S.S.), referidos a nuestro laboratorio para estudio citogenético-molecular por presentar diagnóstico clínico de ambigüedad sexual o de alguna anomalía en los gonosomas. Los pacientes incluidos dentro de este proyecto presentaban diversos diagnósticos clínicos entre ellos: genitales ambiguos (n=11), Síndrome de Turner (n=10), Síndrome de Klinefelter (n=3), amenorrea primaria (n=6), disgenesia gonadal (n=3), y oligospermia (n=1).

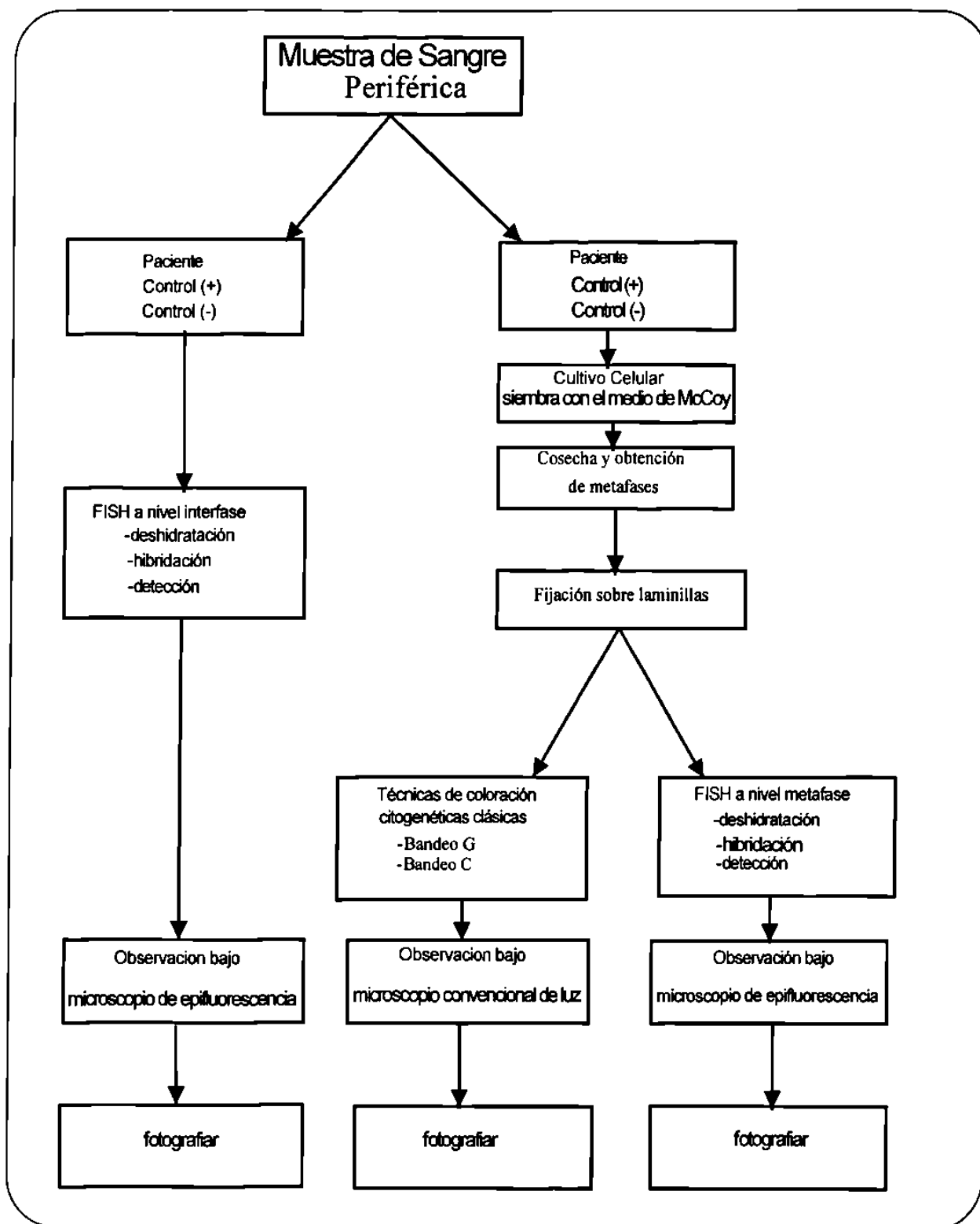
Control Interno: únicamente al inicio de la implementación de la técnica de FISH, al azar a tres muestras de los pacientes fijadas sobre portaobjetos, además de agregarles la(s) sonda(s) de interés, se les agregó la sonda alfa satélite para cromosoma 8 (D8Z1) como testigo del proceso de la hibridación.

B.2 TECNICAS DE LABORATORIO

De cada uno de los pacientes y controles sanos incluidos en este estudio, se obtuvieron 5cc de sangre periférica (ver figura 1), para llevar a cabo los estudios de bandeado G, y bandeado C, además de FISH. 2 a 3 gotas

Figura 1

DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO A SEGUIR
AL RECIBIR MUESTRAS DE SANGRE PERIFERICA



de sangre se utilizaron para preparar frotis sanguíneos sobre portaobjetos limpios y desengrasados, con el fin de llevar a cabo FISH a nivel interfase. La sangre periférica restante, se empleó para microcultivos de linfocitos para la obtención de metafases y poder realizar las técnicas de tinción de bandeó G y bandeó C y FISH a nivel metafase.

Los métodos para la obtención de cromosomas, y las técnicas de tinción para el estudio citogenético (bandeo G, bandeó C) y molecular (FISH), se describen a continuación.

Obtención de Metafases a partir de Cultivos de Linfocitos de Sangre Periférica, y Técnicas de Tinción Bandeo G y Bandeo C.

Se obtuvieron preparaciones cromosómicas a partir de microcultivos de sangre periférica de acuerdo a técnicas convencionales de Moorhead y colaboradores (3) adaptado en el laboratorio de citogenética del Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN) del I.M.S.S.. De los 5 portaobjetos con metafases fijadas con solución de Carnoy, 3 fueron empleadas para las técnicas clásicas citogenéticas y los demás para la técnica de FISH.

a) Microcultivo de Linfocitos

Equipo

- incubadora de CO₂
- baño de agua con tapa, para temperaturas de 36 °C
- campana de flujo laminar o área estéril para el cultivo de células
- centrifuga clínica
- refrigerador +4 °C

- congelador -4°C
- microscopio de luz convencional y de contraste de fase

Material

- frascos de cultivo de vidrio con capacidad de 10 ml
- pipetas de vidrio de 1, 5 y 10 ml, pipetas Pasteur
- jeringas y agujas desechables estériles de 5 ml
- mechero bunsen
- medio McCoy 5A-Modificado
- suero fetal de ternera descomplementado ($60^{\circ}\text{C}/30'$)
- Fitohematoglutinina
- solución de antibiótico (Streptomycin-Penicilina) (10 mg/ml)
- KCl (0.58%)
- Colchicina (10 $\mu\text{l}/\text{ml}$)
- Solución de Carnoy (Acido Acético glacial:Metanol, 3:1)
- suero fisiológico

Procedimiento

1.- En campo estéril, agregar al frasco de cultivo estéril lo siguiente empleando material previamente esterilizado: 4 ml medio McCoy 5A-modificado, 1 ml suero fetal descomplementado, 0.3 ml Fitohematoglutinina, antibiótico 2-3 gotas, y 2 gotas de heparina empleando jeringa con aguja desechable estéril.

- 2.- Inocular 0.6 ml de sangre periférica al frasco estéril con medio McCoy y demás componentes. Mezclar sin crear burbujas de aire, e incubar a 37 °C en cámara con CO₂ por 76 hrs.
- 3.- Agregar 0.3 ml de colchicina a los cultivos con el fin de inhibir la formación de huso acromático y bloquear la división celular en metafase, e incubar de nuevo a 37 °C por 40 minutos.
- 4.- Transferir los cultivos a tubos cónicos y centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos. Eliminar sobrenadante.
- 5.- Agregar 5 ml de KCl 0.58%, resuspender el paquete celular e incubar en baño de agua a 36 °C por 60 minutos. Esto es con el fin de hinchar las células para facilitar la observación de los cromosomas.
- 6.- Agregar 0.5 ml de solución de Carnoy y mezclar perfectamente. Centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos y eliminar el sobrenadante.
- 7.- Agregar 5 ml de solución de Carnoy y mezclar con ayuda de pipeta pasteur limpio.
Centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos, y eliminar sobrenadante.
- 8.- Repetir lo anterior 2 veces (paso 7) empleando 4 ml de solución de Carnoy. Al finalizar la última lavada, agregar aproximadamente (según tamaño del botón) 0.2 ml de solución de Carnoy fresco.
- 9.- Gotear (1-2 gotas) la muestra sobre un portaobjeto limpio y desengrasado, dejar secar inclinado a temperatura ambiente, y observar bajo microscopio de contraste de fase. Guardar dentro de cajas limpias y oscuras a temperatura ambiente y dejar “envejecer” dichas laminillas por 15 días antes de teñirse según procedimiento de la técnica de bandeo G o bandeo C.

Para identificar a los cromosomas por su patrón de bandas específicos, se realizó la técnica de bandeo G y C de acuerdo a metodologías habituales de laboratorio ajustándose a condiciones del laboratorio de citogenética del CIBIN (3). Anormalidades observados bajo microscopio de luz convencional, fueron identificados siguiendo el criterio de clasificación cromosómica previamente establecido (58).

b) Técnica de Tinción de Bandeo G

Material y Equipo

- cajas para laminillas de vidrio, 10.0x11.5x7.5 cm
- frascos de vidrio Coplan con 40 ml de capacidad
- baño de agua 36 °C
- microscopio de luz convencional 16X, 40X, 100X
- tripsina liofilizada
- suero fisiológico
- solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8
- colorante de Giemsa o Wright
- agua destilada

Procedimiento

- 1.- Dejar envejecer las laminillas por 15 días guardándolas a temperatura ambiente, en cajas para laminillas oscuras con tapa, sin exponerlas al polvo.
- 2.- Introducir las laminillas a una solución de tripsina al 0.025% a 36 °C por 1-2 minutos, controlando la actividad de la tripsina bajo el microscopio.
- 3.- Lavar usando suero fisiológico a 36 °C, agitando por unos segundos.
- 4.- Teñir con Giemsa o Wright en amortiguador de fosfatos pH 6.8 durante aproximadamente 5 minutos controlando bajo microscopio de luz convencional.
- 5.- Lavar con agua destilada y secar al aire.

c) Técnica de Tinción Bando C

Material y Equipo

- cajas para laminillas de vidrio de 10.0x11.5x7.5 cm
- frascos de vidrio Coplan con 40 ml de capacidad
- baño de agua 60 °C
- microscopio de luz convencional 16X, 40X, 100X
- HCl
- Ba(OH)₂
- SSC
- Etanol

Procedimiento

- 1.- Envejecer las laminillas previamente goteadas con muestra dejándolas dentro de cajas oscuras con tapa a temperatura ambiente por 1-2 semanas.
- 2.- Introducir las laminillas en una solución de HCl 0.2N por 1 hora a temperatura ambiente.
- 3.- Enjuagar con agua desionizada y dejar secar a temperatura ambiente.
- 4.- Introducir las dentro de cajas de vidrio para laminillas con Ba(OH)₂ al 5% por 40 minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Enjuagar en a) H₂O desionizada, b) Etanol 70%, y c) Etanol absoluto todo a temperatura ambiente.
- 6.- Introducir las laminillas a una solución de 2X SSC a 60 °C por 1 hora. Al terminar, apagar el baño de agua y dejar ahí la caja de vidrio con las laminillas para que gradualmente baje la temperatura hasta llegar a temperatura ambiente. Al día siguiente se sacan los portaobjetos.
- 7.- Enjuagar las laminillas con H₂O desionizada a temperatura ambiente. Dejar secar

8.- Teñir empleando colorante de Wright o Giemsa con solución amortiguadora de fosfatos, controlando bajo microscopio de luz convencional.

d) Hibridación In situ Fluorescente (FISH)

Equipo

- baños de agua con tapa para temperaturas de 36 °C, 43 °C, 72 °C
- microcentrifuga para tubos eppendorf de 0.5 ml y 1.5 ml
- centrifuga para tubo cónico
- vortex
- congelador a -20 °C
- refrigerador a +4 °C
- micropipetas de hasta 20 µl, 200 µl y 1000 µl de capacidad
- incubadora de 37 °C
- balanza analítica
- microscopio epifluorescente 10X, 40X, 62X, 100X y con cámara fotográfica integrada
- filtros para microscopio epifluorescente para DAPI y triple banda (DAPI/FITC/Rojo Texas)(rango de excitación de 400-570nm).
- microscopio de contraste de fase con 10X, y 40X

Material

En los tres pasos básicos de esta técnica se utilizaron los siguientes reactivos (ver también anexo 1):

- 20X SSC, 2X SSC, 0.1X SSC
- soluciones de 70%, 80%, 90%, 95%, y 100% de etanol
- solución desnaturalizadora
- solución para la hibridación
- sondas: cromosoma X alfa satélite (DXZ1), cromosoma Y alfa satélite (DYZ3), y cromosoma 8 alfa satélite (D8Z1) como control (ONCOR, Inc).
- solución PBD
- colorantes fluorescentes Rodamina, Isotiocianato de fluoresceína (FITC) unidos a los anticuerpos Anti-deoxigenina y Avidina respectivamente (ONCOR, Inc.)
- 4,6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) (ONCOR, Inc.)
- solución estabilizadora "anti-fade" (Sigma, Inc.)
- solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

además:

- guantes de polietileno estériles
- eppendorf de polietileno claras y oscuras de 1.5µl y 0.5µl estériles
- pipetas de vidrio de 1, 5, y 10 ml; probetas de 50, 100, 1000 ml; vasos de precipitado; puntillas de polietileno para micropipetas previamente mencionados; frascos oscuros para almacenar líquidos. Todo previamente esterilizados.
- portaobjetos de 25 x 75 mm nuevos, limpios y desengrasados; cubreobjetos de 22 x 22 mm y de 22 x 40 mm de vidrio nuevos y limpios, cubreobjetos de polietileno de 25 x 65 mm.
- frascos de vidrio tipo Coplin 40 ml de capacidad

- cajas para laminillas de vidrio de 10.0 x 11.5 x 7.5 cm
- cajas de plástico oscuras para almacenar laminillas
- caja de plástico con tapa de 9.5 x 19.5 x 5.0 cm que servirá como cámara húmeda para incubación
- hielo
- recipientes para contener hielo
- pinzas de punta plana para filtros
- pegamento tipo “cola de caballo”
- aplicadores de madera
- película fotográfica a color de 1600 ASA

Procedimiento

FISH a Nivel Metafase

En este proyecto, se llevó a cabo la técnica de FISH basándonos en la descrita por Pinkel (33), Cremer (39), y ONCOR, Inc. (59).

Antes de iniciar los pasos básicos de esta técnica, se observaron las laminillas bajo microscopio de contraste de fases con el fin de localizar metafases así como detectar la presencia de citoplasma. Idealmente, las laminillas empleadas tenían máximo dos semanas de envejecimiento.

- deshidratación

Para realizar el primer paso de la técnica de FISH que consiste en la deshidratación de las muestras fijadas sobre portaobjetos limpios y desgrasados, primero se sometieron dichas laminillas a una solución de 40 ml de 2X SSC, dentro de un frasco Coplin a baño maría, 37 °C (temperatura dentro del frasco) por 30 minutos. Posteriormente, se les introdujeron a soluciones de 70%, 80%, y 95% de etanol a temperatura ambiente por 2 minutos cada una (40 ml de cada solución en frascos Coplin). Por último, se dejaban secar las laminillas a

temperatura ambiente lejos de corrientes de aire con el fin de no alterar la morfología cromosómica. Si no se podía continuar a los siguientes pasos, se guardaban dentro de cajas para laminillas oscuras para protegerlas del polvo, por no más de dos semanas. Si al término de este tiempo no se podían procesar, se guardaba la caja oscura con las laminillas a -20°C por no más de un mes.

-desnaturalización

Realizado lo anterior, las laminillas se colocaron en 40 ml de solución desnaturalizadora a 70°C dentro de un frasco Coplin limpio, no estéril, por 2 minutos. La temperatura se medía dentro del frasco independientemente de la temperatura externa. Para evitar ruptura del frasco, éste se introducía primero a un baño de agua a 40°C por aproximadamente 10 minutos antes de pasarlo al baño de 70°C . Si había citoplasma en las laminillas, se alargaba el tiempo de incubación por 15 segundos más.

Hay que destacar que por cada laminilla puesta en la solución de desnaturalización, se le aumentaba 1°C tomando en cuenta que la presencia de cada portaobjeto, disminuía un grado centígrado a la solución afectando la calidad de desnaturalización de la muestra. Se colocaban no más de 4 laminillas por cada frasco de Coplin. En este paso no solo era crítico la temperatura, sino también el tiempo en que se exponía la muestra a la solución desnaturalizadora. Tiempo de más, o arriba de la temperatura ideal para desnaturalizar, se corría riesgo de que la muestra perdiera su morfología cromosómica y no se lograra observar claramente la señal fluorescente.

Inmediatamente después de la desnaturalización del ADN, los portaobjetos son puestos en baños sucesivos de 70%, 80%, 90%, y 100% de etanol frío, 2 minutos en cada uno y se secaban con aire a temperatura ambiente.

Por otro lado, se preparó la sonda con su solución de hibridación. Para ello, a $1\mu\text{l}$ de sonda específica (DXZ1, DYZ3, o D8Z1), se le agregó $10\mu\text{l}$ de solución de hibridación. Se aseguró que la mezcla estuviese

perfectamente homogenizado sometiendo al tubo eppendorf con sonda y solución de hibridación, a centrifugación (8000 rpm, aprox. 10 segundos), agitación con vortex, y de nueva cuenta centrifugación. Se colocó el tubo eppendorf con la mezcla, en un baño de agua a 70 °C por 5 minutos con el fin de desnaturalizar la sonda, manteniéndose en hielo hasta su uso.

- hibridación

Al ADN desnaturalizado de la muestra fijada sobre la laminilla seca, se le agregó la mezcla de sonda y solución de hibridación, para luego colocar un cubreobjeto de vidrio de 22x22 mm, procurando evitar la formación de burbujas de aire debajo del cubreobjeto, y sellar con pegamento. Esto último se lograba aplicando una capa generosa del pegamento por las orillas externas del cubreobjeto. Seco el pegamento, se colocaban las laminillas dentro de la cámara húmeda, se tapaba, y se introducían en incubadora a 37 °C por 1-12 horas.

-detección

Después del período de incubación, con cuidado, se levantaba el pegamento de las orillas utilizando las pinzas para filtros con punta plana. Para eliminar el exceso de sonda, las laminillas con sus cubreobjetos, se introducían dentro de una serie de soluciones de 2X, y .1X de SSC, y finalmente 1X PBD (40 ml de cada solución en frascos coplin limpios) por 2 minutos en cada solución a temperatura interna de 37 °C.

Cabe mencionar que no se quitaba el cubreobjeto con las pinzas para evitar maltratar la muestra, y que de aquí en adelante, la muestra siempre se mantenía húmeda con el fin de evitar que partículas de polvo se pegaran a su superficie dificultando la interpretación de los resultados.

Realizado lo anterior, se les agregó 10 µl de los colorantes Rodamina y FITC, se cubrió con cubreobjeto de plástico, y se colocaron sobre soportes para introducirlos a baño de agua a 43 °C. Esto fue con el fin de que las laminillas estuvieran tiñéndose en oscuridad y en medio húmedo, con temperatura debajo del cubreobjeto de plástico de 37 °C. Al término de 30 minutos se eliminó el exceso del colorante, introduciendo

las laminillas dos veces a solución de IX PBD (40 ml en frasco Coplin limpio, no estéril) a temperatura ambiente por 2 minutos cada uno. Finalmente se agregó 10 μ l del colorante fluorescente DAPI como contraste, eliminando el exceso con gasas limpias, y se colocaron en cajas oscuras para laminillas por un mínimo de 5 minutos antes de observarse bajo microscopio epifluorescente con filtro de triple banda (DAPI/FITC/Rojo Texas).

En cada individuo, se analizaron 300 células interfásicas tomando en cuenta el criterio establecido por Kuo, Hopman (60), y 10-50 metafases basándose en el criterio establecido por la asociación de tecnólogos citogenéticos (Association of Cytogenetic Technologists (ACT))(61). Células representativas fueron fotografiados utilizando película ektachrome ASA 1600, con 20-30 segundos de exposición (59). Para núcleos interfásicos se determinó el porcentaje de frecuencia de aparición de las señales fluorescentes.

FISH a Nivel Interfase

Para probar la técnica de FISH en interfase, primeramente se procedió a realizar un frotis de sangre sobre la laminilla con ayuda de un segundo portaobjeto colocado sobre la gota de sangre del paciente o control. Por capilaridad, la gota se esparcía a lo largo del portaobjeto al momento de detenerse, con movimiento rápido, se deslizó el segundo portaobjeto con el fin de extender perfectamente la muestra de sangre sobre el primer portaobjeto. Hecho lo anterior, se dejó secar a temperatura ambiente la laminilla alejada de corrientes de aire por 10 minutos. Posteriormente se introdujo esta a a 40 ml de solución de Carnoy (ácido acético glacial: metanol, 1:3) incubándose por 15 minutos a temperatura ambiente con el fin de eliminar los eritrocitos dejando solo los leucocitos; y de nuevo, se dejó secar la laminilla a temperatura ambiente alejada de corrientes de aire. Se procedió a llevar a cabo la prueba de FISH por medio de desnaturalización simultánea rápida; en ella, después de secarse perfectamente la muestra, se procedió a introducir la laminillas en soluciones de 70, 90 y

100% de etanol a temperatura ambiente, 2 minutos cada una, dejando por último, secar a temperatura ambiente. Luego, se le agregó 10 µl de la solución de hibridación previamente mezclada con 1 µl de la sonda de interés. Hecho lo anterior, se colocó un cubreobjeto limpio de 22 x22 mm evitando la formación de burbujas, y se sellaba con pegamento gomoso, dejando secar a temperatura ambiente sin corrientes de aire, para lograr un sello adecuado alrededor del cubreobjeto. Terminado lo anterior, se procedía a introducir rápidamente la laminilla a un horno a 90 °C por 1 minuto 30 segundos. Finalmente éste se transfería a la cámara húmeda y se incubaba a 37 °C por mínimo una hora (máximo toda la noche). Se continuaba la técnica de FISH siguiendo los mismos pasos previamente descritos para la eliminación del exceso de sonda así como la detección de la señal fluorescente.

B.3 ANALISIS ESTADISTICO

Se utilizó la prueba de coeficiencia de varianza para determinar el número mínimo confiable de núcleos interfásicos a observar. Así mismo, se aplicó la prueba no paramétrica de Mc Nemar ($p < 0.05$) para poder comparar resultados de la técnica de bandeo G y FISH. En los casos donde se utilizaron las tres técnicas citogenéticas de diagnóstico (bandeo G, bandeo C, y FISH), los resultados se compararon a través de la prueba estadística no paramétrica de Cochran empleando las tablas de Tate y Brown ($p < 0.05$)(62). Se empleó el programa SPSS para computadora como apoyo para realizar las pruebas estadísticas (63).

RESULTADOS

De los 34 pacientes provenientes del Hospital Regional de Especialidades número 23 del I.M.S.S., 7 de ellos presentaron alguna alteración ya sea numérica o estructural del cromosoma X, y a 12 pacientes más, se les determinó su sexo cromosómico.

A Nivel Metafase: Análisis Cromosómico con Bando G, Bando C, y Mediante la Técnica de FISH

A 11 pacientes con ambigüedad sexual, se les realizó la tinción diferencial de bando G y FISH, y se observó que ambas técnicas concordaron con respecto a los resultados obtenidos. En la tabla 1 (ver anexo 1), puede observarse que 5 de ellos eran del sexo femenino y los restantes masculinos. Se detectó una señal fluorescente en la región centromérica del cromosoma X al aplicarle a la muestra la sonda DXZ1, e igualmente se observó una señal fluorescente en la región centromérica del cromosoma Y al agregar la sonda DYZ3; para ambos casos, se observó la presencia de dichos cromosomas al llevar a cabo la técnica de bando G.

Cabe mencionar que aunque los resultados para ambas técnicas fueron los mismos, el tiempo dedicado para la detección de las sondas fluorescentes fue más rápido mediante la técnica de FISH; además, la localización de los cromosomas sexuales a través de esta técnica, fue muy precisa.

Los 23 pacientes restantes con cuadro clínico de sospecha de anomalía gonosómica, se les realizó las técnicas de bando G, en algunos casos, cuando era requerido, la de bando C, además de FISH. De estos 23 pacientes, 7 presentaron alteraciones tanto numéricas o estructurales relacionados con el cromosoma X (ver tabla 2, del anexo 1).

Se detectaron 2 pacientes que presentaban únicamente alteraciones numéricas como son el paciente con cuadro clínico de probable Síndrome de Klinefelter, al cual al realizar la técnica de FISH, se observó la presencia de 4 cromosomas X y un cromosoma Y. Resultado también detectado con la técnica de bandeo G, por lo tanto, presentaba el Síndrome 49,XXXXY. Así mismo, otra paciente con probable Síndrome de Turner se le confirmó dicho síndrome al observar una señal fluorescente en la región centromérica de un cromosoma X, sin la presencia del cromosoma Y. Este resultado también se observó al llevarse a cabo la técnica de bandeo G.

Las restantes 5 pacientes del sexo femenino, presentaban tanto aneuploidías como alteraciones estructurales en el cromosoma X. Cuatro de ellas presentaban mosaicismo con frecuencias diversas, inclusive en una de ellas, mediante la técnica de FISH se logró detectar una tercera línea celular en muy baja frecuencia (3.7%) la que no fue posible detectarla mediante las técnicas citogenéticas clásicas, la fórmula cromosómica de este paciente fue: (45,X[37]/46,X,dic(Xq)[15]/47,X,dic(Xq),dic(Xq)[2]. ish Xcen (DXZ1 ++; DXZ1 ++x2). Para aquellas pacientes que se les llevó a cabo tanto la tinción de bandeo G como la de bandeo C por sospecha de presentar un segundo centrómero, se logró visualizarse, pero no fue posible establecer el origen del segundo centrómero. Al llevar a cabo FISH para estas pacientes con cromosoma X dicéntrico, no solamente se pudo confirmar la presencia de mosaicismo en la población celular, y la presencia del cromosoma X dicéntrico, sino también se logró determinar que el origen del segundo centrómero provenía de otro cromosoma X; ya que, al agregar la sonda DXZ1, se observaron dos señales fluorescentes en un mismo cromosoma X. Ejemplo de ello, es la paciente previamente mencionada, así como la que presentaba probable Síndrome de Turner con cariotipo de 45,X[29]/46,X,dic(Xq)[6]. ish Xcen (DXZ1 ++), y la que presentaba amenorrea primaria con cariotipo 46,XX[15]/46,X,dic(Xq)[11]. ish Xcen (DXZ1 ++)(ver anexo 2).

En las pacientes con amenorrea primaria con cariotipo 46,X,i(Xq). ishXcen (DXZ1 x1) y disgenesia gonadal con cariotipo 46,XX[19]/46,X,del(X)(qter→q23:)[11]. ish Xcen (DXZ1 +), ambas con alteraciones estructurales en cromosoma X, al llevar a cabo la técnica de FISH se pudo confirmar que en la alteración estructural no estaba involucrado material alfa satélite del centrómero ya que se observó únicamente una señal fluorescente en la región centromérica del cromosoma X.

A Nivel Interfase: FISH

Con respecto a los resultados observados a nivel de núcleos interfásicos obtenidos al realizar la técnica de FISH en frotis sanguíneo, y aquellos observados en núcleos interfásicos obtenidos a partir de microcultivos de linfocitos, para ambos casos, los resultados fueron semejantes. Al comparar los resultados obtenidos con la técnica de FISH a nivel metafase y a nivel de núcleos interfásicos (ver tablas 3 y 4, anexo 1), los señales fluorescentes observados en mayor frecuencia dentro de los núcleos interfásicos, coincidía con la presencia del cromosoma en cuestión en las laminillas con metafases. En este estudio, se consideraron solo aquellos núcleos en los que las señales fluorescentes estaban bien definidas y separadas una de la otra, se excluyeron aquellos núcleos dañados, doblados o sobrepuestos, núcleos con residuos celulares o con grupos de bacterias y aquellos con contornos no bien definidos.

Al analizar las señales fluorescentes no solamente se observaban de diferentes colores (el centrómero del cromosoma X era de color rojo por la Rodamina, y del cromosoma Y era de color verde por el colorante FITC) sino también se presentaban en diferentes tamaños. Esto, se detectó en dos situaciones. Una, porque la región centromérica del cromosoma X era de mayor tamaño que del cromosoma Y, y por ello, la señal fluorescente para el cromosoma X era de mayor tamaño a comparación con la del cromosoma Y. La segunda, en las pacientes con cromosoma X dicéntrico. Cuando se observaron dos señales juntas del mismo tamaño con respecto una a la otra, y de menor tamaño

a comparación con la del cromosoma X , podíamos sospechar de un cromosoma dicéntrico. Esto se confirmó en todas las pacientes al observarse el cromosoma X dicéntrico a nivel metafase.

Implementación de la Técnica de FISH

La técnica citogenética-molecular de FISH, se logró implementar y adaptar a las condiciones del laboratorio de citogenética del Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN), IMSS. Se logró obtener resultados a partir de una hora después de la hibridación (cuando se realizó FISH a nivel interfase con frotis sanguíneos) hasta a 12 horas después (con FISH a nivel metafase). Al observarse los resultados bajo microscopio epifluorescente tanto de núcleos interfásicos como de metafases, se detectó especificidad sin hibridación cruzada por parte de las sondas, debido a que únicamente se observaron señales fluorescentes donde hubiese material alfa satélite del cromosoma X, cromosoma Y o cromosoma 8.

Para lograr lo anterior, algunas modificaciones se hicieron a la técnica de FISH descrita por Pinkel y Cremer como por ejemplo: en el paso de las series de lavados para eliminar el exceso de sonda, posteriores a la de la solución de post lavado de formamida al 65% a 43 °C. Inicialmente utilizamos lavados por duplicado con soluciones de 2X y 0.1X de SSC a 37 °C, seguido por un lavado con solución de 1X de PBD a temperatura ambiente. Al tratar de llevar a cabo en forma más eficiente este etapa de la técnica, probamos únicamente la solución de formamida al 65% a 47 °C, seguido por un lavado a temperatura ambiente por duplicado empleando solución fresca cada vez, de 1X PBD. Obtuvimos los mismos resultados para ambos sistemas de lavados; por ello, se decidió realizar el segundo método de post lavado por considerarla más eficiente. Con respecto a las soluciones de etanol, inicialmente todas las soluciones de etanol se preparaban frescas para cada experimento; sin embargo, se notó que se podía emplear la misma solución de etanol para varios experimentos antes de tener que desecharse, obteniéndose buenos resultados. Lo mismo se aplicó con la solución de desnaturalización. Esta solución que inicialmente se preparaba fresca para cada experimento, se optó por

utilizarla varias veces antes de desecharse, procurando guardarla en frasco de vidrio previamente esterilizado a +4 °C. Se desecharon estas soluciones al momento de que estuviese presente partículas o al tener sospecha de crecimiento de hongos.

Análisis Estadístico

Al tratar de aplicar las pruebas no paramétricas de Cochran o de McNemar mediante el uso del programa SPSS para Windows, se detectó que por la pequeña población incluida en este proyecto, debido a la baja frecuencia dentro de la población general de estos padecimientos, no se pudo recopilar suficiente evidencia desde punto de vista estadístico, para poder rechazar la hipótesis nula. Con la prueba de McNemar, p fue igual a 0.0833, y para la prueba de Cochran fue de 0.0498.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos concluir que la técnica de FISH presenta diversas ventajas sobre las técnicas de citogenética clásica. Primero, detectamos que es una técnica específica debido a que únicamente se observaron señales fluorescentes que correspondían a material alfa satélite de los cromosomas X y Y. No se presentó hibridación cruzada ya que no se observaron señales fluorescentes simultáneas en otras regiones cromosómicas de los mismos cromosomas mencionadas o en otros. Esto concuerda con reportes anteriores donde se menciona que la técnica de FISH facilita la identificación más precisa de las alteraciones cromosómicas (65). Además, notamos que las sondas DXZ1, DYZ3, y D8Z1, son químicamente estables ya que aún después del año de la fecha en que se adquirieron, todavía se podían utilizar observándose buena hibridación, y no requieren de un sistema especial para su desecho, como es el caso para sondas radioactivas, confirmándose lo descrito anteriormente (14).

También es una técnica muy sensible ya que se lograron detectar alteraciones que se presentaban en baja frecuencia en forma de mosaico; ejemplo: caso clínico de probable Síndrome de Turner con cariotipo $45,X[29]/46,X,dic(Xq)[6].ishXcen(DXZ1++)$. La frecuencia de la línea celular de $46,X,dic(Xq)$ fue del 18%, a comparación del 82% de la línea celular más frecuente $45,X$. Inclusive, mediante la técnica de FISH, se logró identificar el origen de las alteraciones en cromosoma X, situación que no siempre ocurrió mediante las técnicas de bandeado G y bandeado C. Ejemplo de ello fue el caso clínico de Síndrome de Turner con tres líneas celulares ($45,X[37]/46,X,dic(Xq)[15]/47,X,dic(Xq),dic(Xq)[2].ishXcen(DXZ1++,DXZ1++x2)$), la paciente con Amenorrea primaria (cariotipo $46,XX[15]/46,X,dic(Xq)[11].ishXcen(DXZ1++)$) y otro caso clínico de Síndrome de Turner (resultados no presentados en las tablas) con cariotipo $45,X/46,X,+mar$. A esta última, al llevar a cabo la técnica de FISH, se observó que este marcador cromosómico era un cromosoma Y dicéntrico.

Algo interesante que se detectó al llevar a cabo este trabajo, era que identificado el origen del centrómero como proveniente de otro cromosoma X en estas pacientes con infertilidad, no encontramos hasta la fecha, previos reportes donde mencionen estos dos eventos en una paciente. Sería interesante empleando la técnica segundo de FISH, poder seguir investigando las posibles relaciones y causas de infertilidad con la presencia de un cromosoma X dicéntrico.

Con los resultados de este trabajo, se apoya lo descrito anteriormente por diversos autores de que a través de la técnica de FISH, se puede detectar diversas mutaciones cromosómicas como son deleciones cromosómicas, la identificación de cromosomas desconocidos o derivados de los mismos (marcadores), así como el análisis y diagnóstico de aneuploidías entre otras(66,67,68).

Así mismo, se pudo observar las ventajas previamente mencionadas por otros investigadores sobre el uso de haptenos como son la Biotina y Deoxigenina, los cuales no solamente permite incrementar la sensibilidad de la técnica de FISH, sino que también permiten el análisis de varias cromosomas simultáneamente (69).

Otra ventaja es que es una técnica muy rápida ya que se logró obtener resultados a partir de 8 horas una vez realizado los frotis sanguíneos para FISH a nivel interfase. Inclusive, una vez obtenidas las laminillas con metafases, se podía obtener resultados 24 a 48 horas después, confirmándose observaciones previas de otros investigadores (10).

La técnica de FISH es confiable ya que lo que se observó en mayor frecuencia a nivel interfase coincidía con lo observado a nivel metafase empleando esta misma técnica. Así mismo, para los pacientes con alteraciones numéricas en los gonosomas, los resultados observados en mayor frecuencia con la técnica de FISH a nivel interfase, coincidían con aquellas obtenidas mediante las técnicas de bandeado G y bandeado C a nivel metafase. Inclusive en las pacientes con alteraciones estructurales en el cromosoma X, se podía sospechar de la posibilidad de alteración estructural a nivel interfase, lo que sería confirmada al observarse los cromosomas a

nivel metafase teñidas con Rodamina. Podemos entonces concluir que FISH es una técnica confiable que permite la detección de aneuploidías tanto a nivel metafase como en núcleos interfásicos. Este último siendo de gran ventaja, ya que con las técnicas de bandeado G y bandeado C, se requiere de cultivos celulares y la obtención de excelentes metafases para el análisis cromosómico.

Al observar las señales fluorescentes en los núcleos interfásicos, se pudo detectar que no siempre éstas se presentaban en el mismo número en cada núcleo interfásico. Esto no solamente se observaba en los pacientes con mosaicismo en sus líneas celulares sino también en los controles normales así como aquellos pacientes (caso clínico 1, 4) sin mosaicismo. Esto concuerda con reportes anteriores (70) que mencionan que se debe a factores tales como el estado de división en que se encuentre el núcleo al momento de la hibridación, que tan compacto esté su ADN, o que pueda estar la señal oculta debido a que esté al otro lado del núcleo de donde se esta observando. Se considera que mientras estas señales se observen en baja frecuencia (menos del 5%), es normal (71). Estos factores consideramos a igual que previos autores, no deberían mermar las múltiples ventajas que posee la técnica de FISH que compensan por lo anterior, sin embargo se deben de considerar a la hora de interpretar los resultados a nivel de interfase.

Debido a la especificidad, sensibilidad de la técnica de FISH, nos dimos cuenta que al utilizar sondas alfa satélite de los cromosomas X y Y, tanto a nivel interfásico como en metafases, no siempre es necesario el uso de un control interno. Esto se confirmó con el uso de la sonda alfa satélite para el cromosoma 8 como control interno para la hibridación *in situ*.

Al emplear esta sonda como control interno para la hibridación a nivel interfase, nos dimos cuenta que al estar presentes las señales fluorescentes provenientes del cromosoma 8, se prestaba a confusión para interpretar los resultados especialmente en pacientes con aneuploidías. A nivel metafase, aunque la presencia de señales fluorescentes de la sonda alfa satélite del cromosoma 8 no interfería en la interpretación de los resultados relacionados con los gonosomas, debido a la especificidad y sensibilidad observada por parte de las sondas para

cromosoma sexuales, tampoco se necesitó continuar empleando esta sonda como control interno. Al no observar señal por parte de las sondas para cromosoma X o Y, podíamos concluir que estos no estaban presentes en el paciente.

Cabe mencionar donde sí es útil emplear un control interno tipo alfa satélite, es cuando se trabajan con sondas muy pequeñas, de secuencias únicas tal como el de cromosoma Filadelfia (resultados no presentados). Las señales son muy pequeñas, y por ello difíciles de detectar, por ello al tener un control interno, sirve para confirmar que las condiciones de la hibridación fueron las adecuadas y por ello, no interfirieron en la ausencia de las señales fluorescentes para cromosoma Filadelfia.

También se debe mencionar que las modificaciones técnicas previamente mencionadas que se hicieron en la técnica de FISH, permitió que la técnica fuese más eficiente ya que con menos reactivos se logró obtener resultados de buena calidad.

Por último, considerando todas las ventajas de la técnica de FISH anteriormente mencionados sobre las técnicas de citogenética clásica, FISH es una técnica de gran utilidad clínica, ya que con la detección de anomalías en el cromosoma X en baja proporción, la determinación del origen de estas, además de poder contribuir a la determinación del sexo en los pacientes con ambigüedad sexual, con el fin de proporcionarle al paciente la oportunidad de una vida lo más normal posible; también, se le puede proporcionar al experto clínico más información útil para el diagnóstico, y así lograr un consejo genético y por ello un tratamiento oportuno y eficiente para sus pacientes. Esto último es especialmente importante, ejemplo de ello: un caso clínico que a sus 16 años se le diagnosticó disgenesia gonadal, al llevar a cabo su estudio citogenético, se le detectó probable Síndrome de feminización testicular, ya que cromosómicamente era XY presentando rasgos fenotípicos femeninos (ver tabla 2).

PERSPECTIVAS

Considero que la técnica de FISH debe de existir en unidades clínicas donde llegue una gran población de pacientes, ya que por sus ventajas mencionadas, y por el hecho de que se puede aplicar con éxito en diversos tipos de tejidos como son sangre periférica fresca, microcultivo de linfocitos , médula ósea tanto fresca o cultivada, o tejido del epitelio cervical (resultados no presentados) se podría contribuir hacia la obtención de un diagnóstico clínico certero. Tomando en cuenta que se puede aplicar en tejidos como médula ósea o epitelio, se podría buscar posibles marcadores útiles en el diagnóstico y tratamiento de cancer cervicouterino y de leucemia. Además, esta versátil técnica se podría utilizar en diversas áreas de investigación tanto clínicas como básicas. Inclusive, basándose en los resultados de las pacientes con cuadro clínico de infertilidad a las cuales se les detectó la presencia del cromosoma X dicéntrico, se podría con la ayuda de la técnica de FISH, investigar más a fondo la posible relación a nivel cromosomal de estos dos eventos y contribuir a dar una posible explicación de la infertilidad en estas mujeres.

ANEXO 1

Resultados de las Tablas 1 al 4

TABLA 1

RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE LAS TECNICAS DE BANDEO G Y FISH EN PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLINICO DE AMBIGUEDAD SEXUAL

CASOS CLINICOS	BANDEO G	FISH⁽⁶⁴⁾
1, 2, 3, 4, 5	46, XX	46,XX. ish Xcen (DXZ1 x2)
6, 7, 8, 9, 10, 11	46, XY	46, XY. ish Xcen (DXZ1 x1), Ycen (DYZ3 x1)

**NUMERO TOTAL DE ESTUDIOS REALIZADOS PARA DETERMINACION DEL SEXO
CROMOSOMICO = 11**

TABLA 2

**RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE LAS TECNICAS
CITOGENETICAS CLASICAS Y FISH**

DIAGNOSTICO CLINICO	BANDEO G	BANDEO C	FISH⁽²⁴⁾
Probable Síndrome de Klinefelter	49,XXXXY		49,XXXXY. ish Xcen(DXZ1 x4), Ycen (DYZ3 x1)
Probable Síndrome de Turner	45,X/46,X,X(?)	45,X/46,X,dic(Xq)	45,X[29]/46,X,dic(Xq)[6]. ish Xcen(DXZ1 ++)
Probable Síndrome de Turner	45,X		45,X. ish Xcen (DXZ1 x1)
Probable Síndrome de Turner	45,X/46,X,X(?)	45,X/46,X,dic(Xq)	45,X[37]/46,X,dic(Xq)[15]/47,X,dic(Xq),dic(Xq)[2]. ish Xcen (DXZ1 ++, DXZ1++ x2)
Amenorrea primaria	46,XX/46,X,X(?)	46,XX/46,X,dic(Xq)	46,XX[15]/46,X,dic(Xq)[11]. ish Xcen (DXZ1 ++)
Amenorrea primaria	46,X,i(Xq)		46,X,i(Xq). ish Xcen(DXZ1x1)
Disgenesia gonadal	46,XX/46,X,del(X)(qter→q23:)		46,XX[19]/46,X,del(X)(qter→q23:)[11]. ish Xcen(DXZ1 +)
Disgenesia gonadal	46,XY		46,XY. ish Xcen(DXZ1 x1), Ycen (DYZ3 x1)

NUMERO TOTAL DE ESTUDIOS REALIZADOS = 23

NUMERO TOTAL DE CASOS CON ALTERACION ESTRUCTURAL O NUMERICA EN GONOSOMAS = 7

TABLA 3

**RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE LA TECNICA DE FISH A NIVEL INTERFASE Y
METAFASE UTILIZANDO LA SONDA ALFA SATELITE DXZ1 EN PACIENTES CON ANORMALIDADES EN
CROMOSOMA X**

Caso clínico	Cariotipo	Metafase observados Relación (%)	Núcleos analizados por FISH	Frecuencia de señales a nivel Interfase con FISH (%)						
				0	1	2	3	4	5	
DXZ1										
CM	46,XY	100	300	1.30	98.00	0.70	—	—	—	—
(1)	45,X	100	401	4.20	95.80	—	—	—	—	—
CF	46,XX	100	600	2.33	0.83	96.33	0.50	—	—	—
(2)	45,X/46, X ₂ dic(Xq)	82/18	793	—	88.27	—	11.73	—	—	—
(3)	46,XX/46, X ₂ dic(Xq)	58/42	335	5.10	—	65.70	29.30	—	—	—
(4)	49,XXXXY	100	306	0.65	—	1.31	6.86	91.18	—	—
(5)	46,XX/46,Xdel (X)(qter→q23;)	63/37	429	1.86	5.13	91.84	1.17	—	—	—
(6)	45,X/46,X,dic (Xq)/47,X,dic (Xq),dic(Xq)	69/28/4	565	5.66	85.31	—	8.67	—	—	0.35
(7)	46,X, ₁ (Xq)	100	438	2.05	1.37	95.89	0.68	—	—	—

CM - control masculino normal, control (+)

CF - control femenino normal, control (+)

DXZ1 - alfa satélite cromosoma X

TABLA 4

RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE LA TECNICA DE FISH A NIVEL INTERFASE Y METAFASE UTILIZANDO LA SONDA ALFA SATELITE DYZ3

Caso clínico	Cariotipo	Metafase Relación (%)	Núcleos analizados por FISH	Frecuencia de señales a nivel Interfase con FISH (%)			
				0	1	2	3
DYZ3							
CM	46,XY	100	515	2.50	97.50	—	—
(8)	46,XY	100	306	0.14	98.86	1.00	—
CF	46,XX	100	322	100	—	—	—

CM - control masculino normal, control (+)

CF - control femenino normal, control (+)

DYZ3- alfa satélite cromosoma Y

ANEXO 2

Fotografías de Casos Clínicos Presentados en la Tabla 2

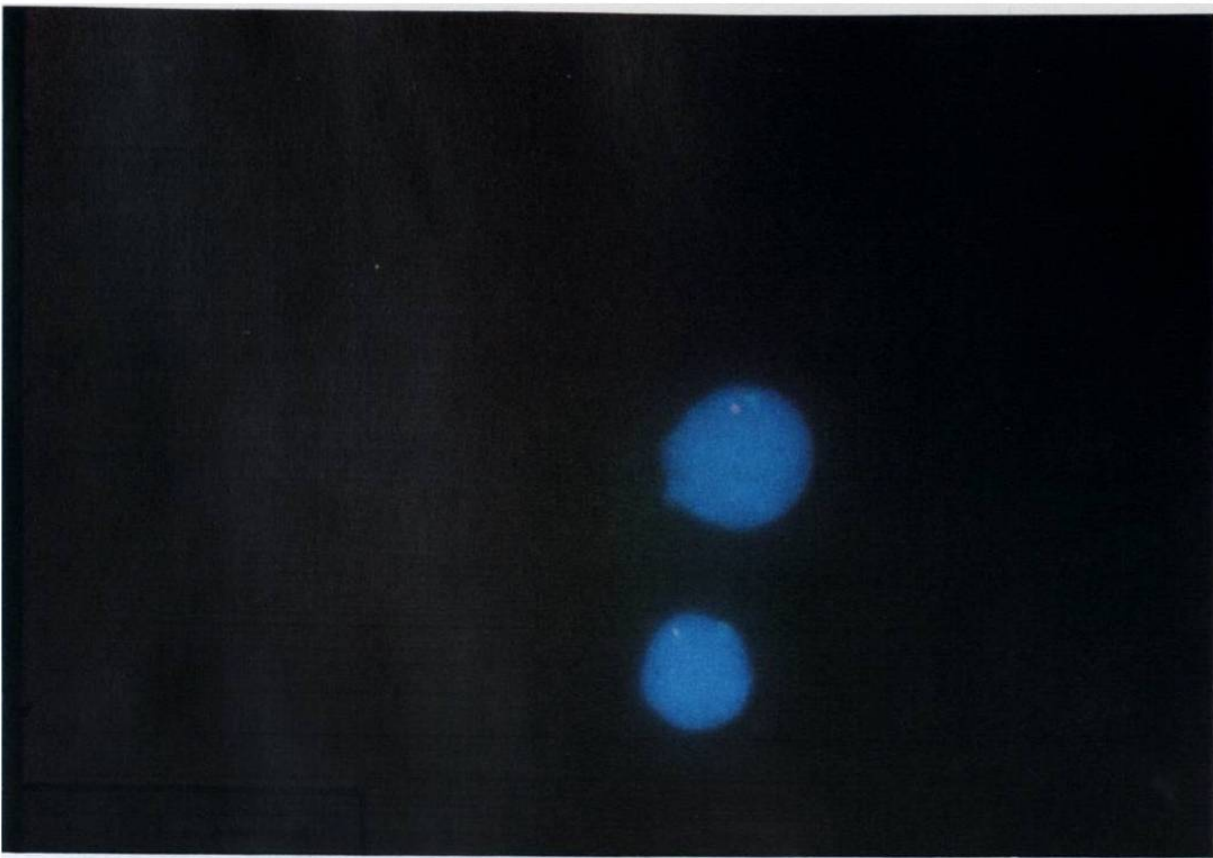


Fig. 2 Núcleo interfásico. 46,XY. ishXcen(DXZ1x1), Ycen(DYZ3x1). DXZ1 teñido con FITC, DYZ3 teñido con Rodamina.

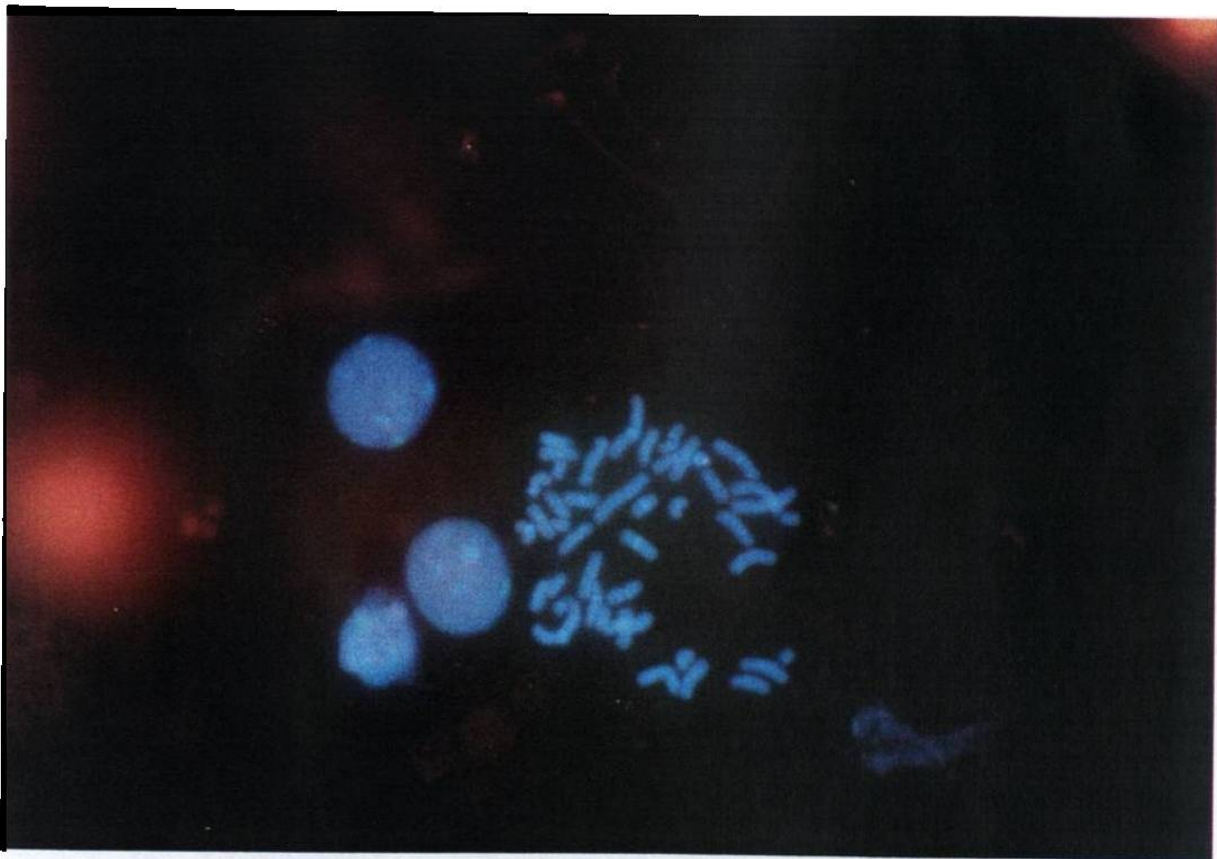


Fig. 3 A nivel metafase. 46,XY. ishXcen(DXZ1x1), Ycen(DYZ3x1). Centrómero del cromosoma X teñido de color verde (FITC), centrómero del cromosoma Y de color rojo (Rodamina).

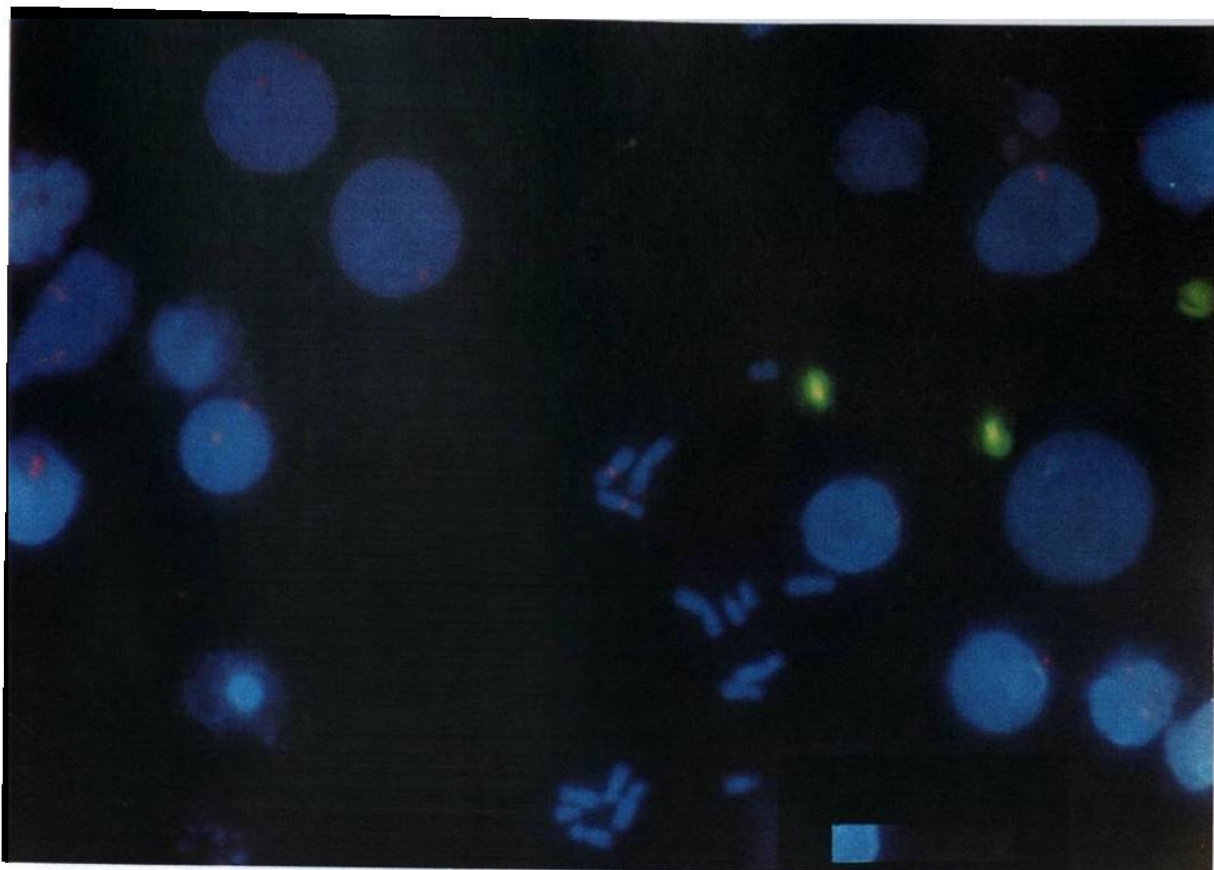


Fig. 4 Cromosomas X con DXZ1 a nivel metafase e interfase; centromeros de ambos cromosomas teñidos con Rodamina.

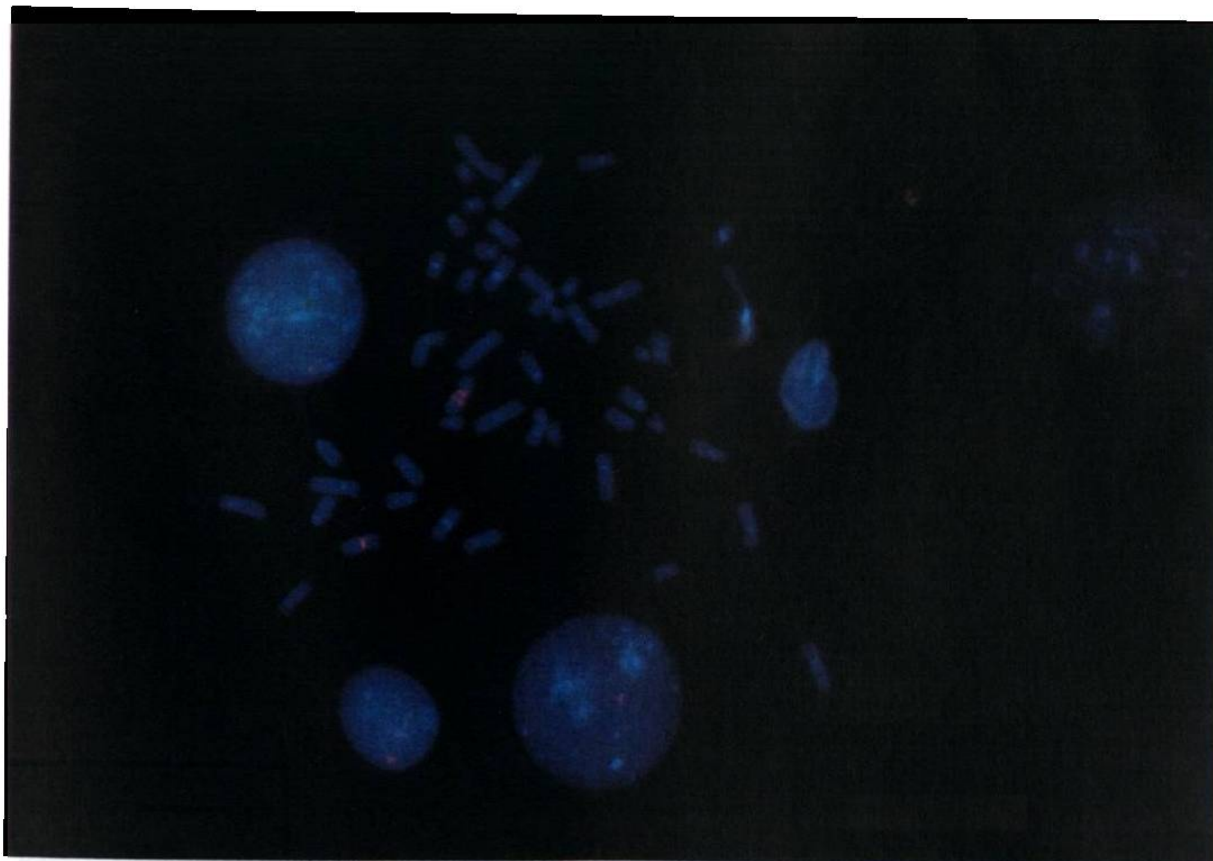


Fig. 5 Probable Síndrome de Turner. 45,X[29]46,X,dic(Xq)[6]. ishXcen(DXZ1++)

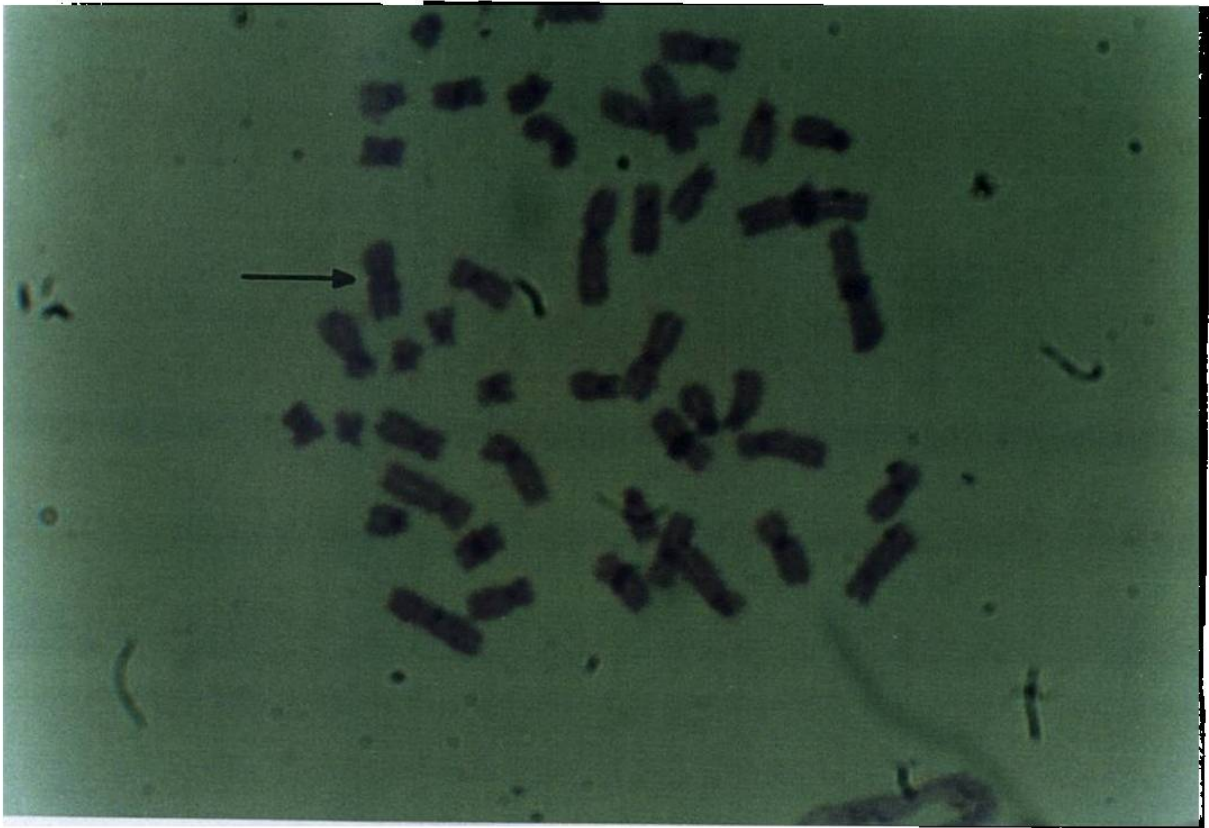


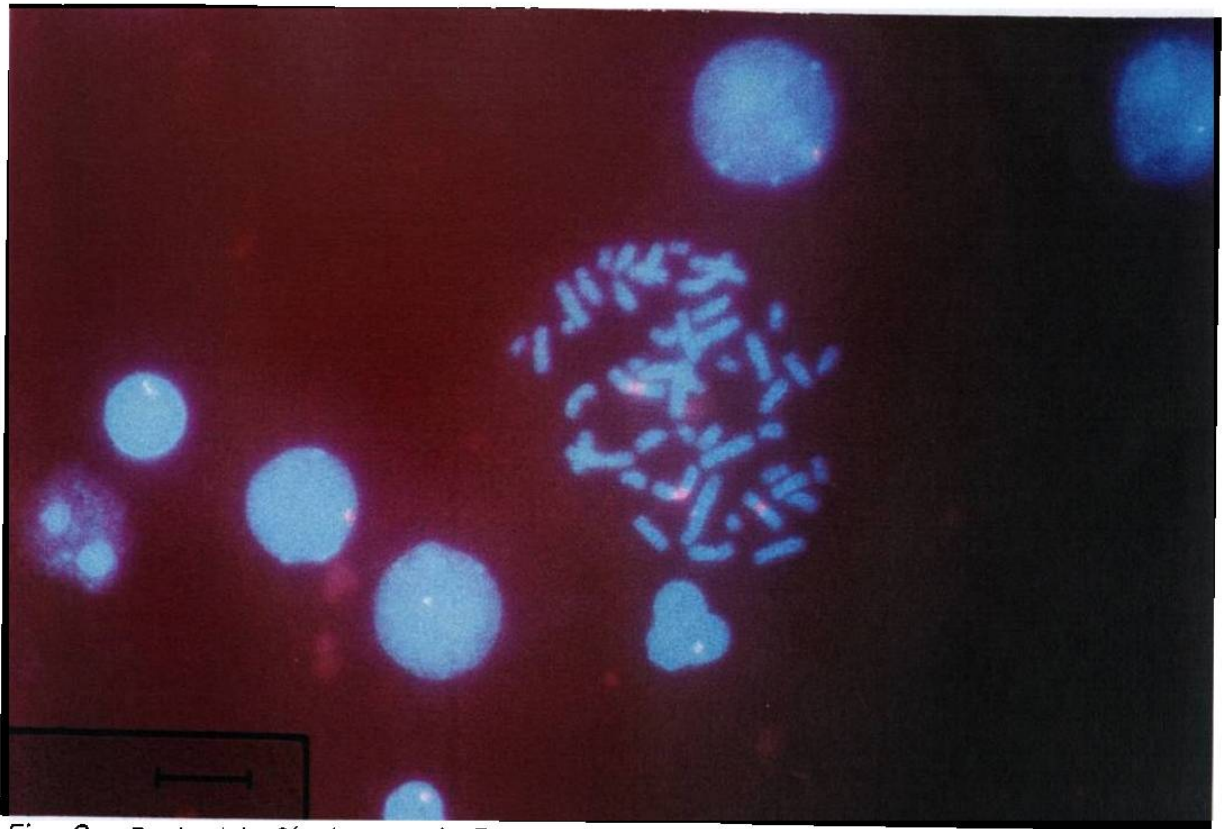
Fig. 6 Amenorrea primaria. 46,XX/46,X,dic(Xq). Ejemplo de resultados de Bando C donde se observa un cromosoma X dicéntrico cuyo origen del segundo centrómero se desconoce.



Fig.7 Amenorrea primaria. 46,XX[15]/46,X,dic(Xq)[11]. ish Xcen (DXZ1 ++). A nivel metafase.



Fig. 8 Misma paciente a nivel interfase.



*Fig. 9 Probable Síndrome de Turner.
 45,X[37]/46,X,dic(Xq)[15]/47,X,dic(Xq),dic(Xq)[2]. ish Xcen(DXZ1++, DXZ1++x2). Se muestra la línea celular de 47 cromosomas con dos cromosomas X dicéntricos.*

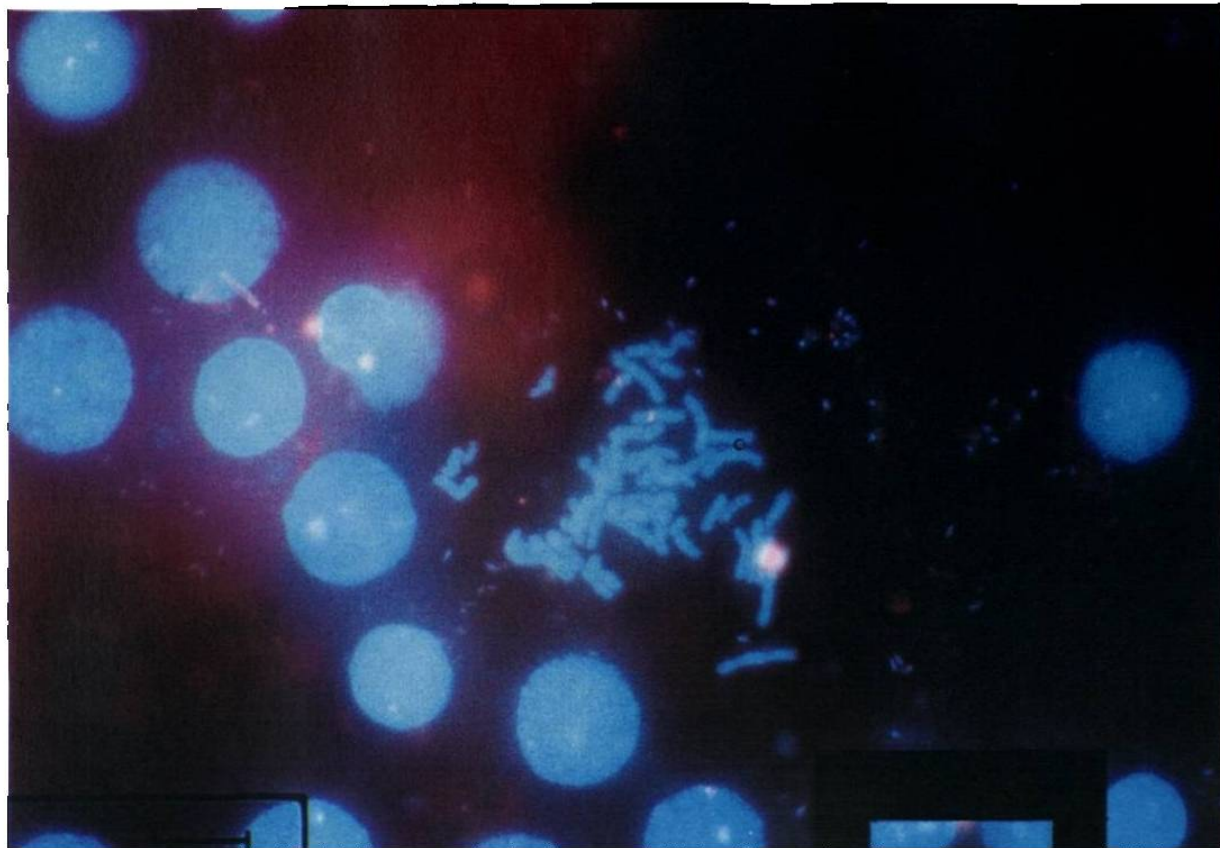


Fig. 10 Disgenesia gonadal. 46,XX[19]/46,Xdel(X)(qter→q23:)[11]. ish Xcen(DXZ1+).

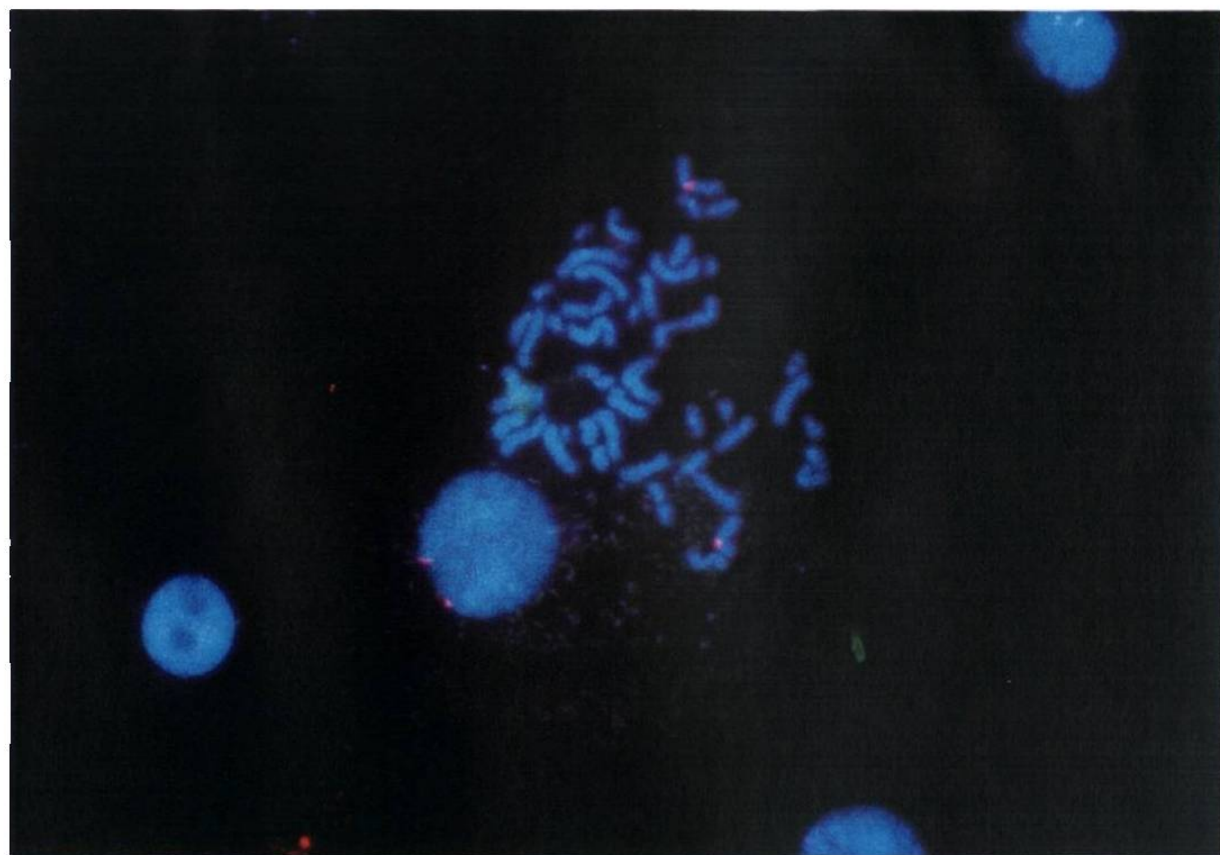


Fig. 11 Amenorrea primaria. 46,X,i(Xq). ish Xcen(DXZ1x1).

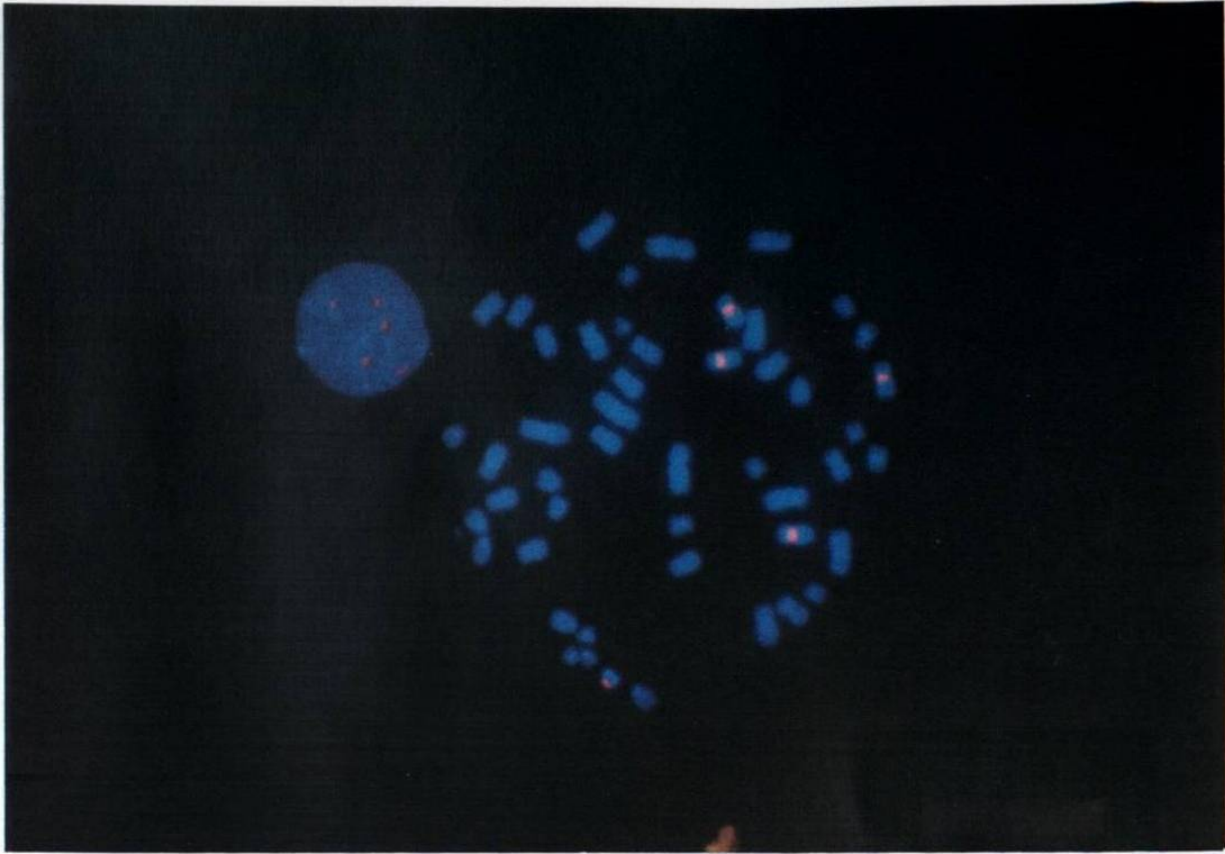


Fig. 12 Síndrome 49,XXXXY. 49,XXXXY. ishXcen(DXZ1x4), Ycen(DYZ3x1).

ANEXO 3

Reactivos y Soluciones Necesarios para Bando G y C, y FISH

TECNICA DE TINCION BANDEO G

Solución de Tripsina

Tripsina liofilizada - 0.025 g

Suero fisiológico - 100 ml

Mezclar perfectamente ambos componentes hacer crear espuma. Mantener en baño de agua a 36 °C. Preparar fresco.

Solución de Amortiguador de Fosfatos pH 6.8

Amortiguador 1:

Na_2HPO_4 0.06M- disolver 2.13 g en 250 ml de H_2O destilada

**Guardar a temperatura ambiente en frasco oscuro*

Amortiguador 2:

KH_2PO_4 0.06 M- disolver 2.04 g en 250 ml de H_2O destilada

**Guardar a temperatura ambiente en frasco oscuro*

Preparar la solución amortiguadora de fosfatos mezclando en relación 1:1 los amortiguadores 1 y 2. Preparar fresco.

Colorante de Giemsa o Wright

Wright: 0.28 g del colorante disolver en 100 ml de metanol con agitación continua por 2 horas.

Filtrar, y dejar reposar 3 días antes de utilizar por primera vez.

Al momento de teñir las laminillas, se agita el colorante por 30 minutos con agitación continua.

**Guardar en frasco oscuro a temperatura ambiente.*

Por cada laminilla, preparar un tubo de ensaye con 1.5 ml de solución de amortiguadora de fosfatos y 0.55 ml de colorante Wright o Giemsa. Mezclar y vaciar inmediatamente sobre la laminilla (para evitar precipitación del colorante).

TECNICA DE TINCION BANDEO C

HCl 0.2N- 1.67 ml HCl concentrado (18M) aforar a 100 ml con H₂O destilada

Ba(OH)₂ 5%- disolver 5 g de Ba(OH)₂ en 100 ml de H₂O destilada

Disolver con agitador magnético por 20 minutos, y filtrarse antes de usar.

Preparar fresco

2X SSC- 1.75 g NaCl

0.88 g Citrato de Sodio

100 ml H₂O destilada

Ajustar pH a 7.0 usando HCl 0.2N

**Guardar a temperatura ambiente en frasco oscuro*

Etanol 70%- 70 ml Etanol absoluto agregar 30 ml H₂O destilada

FISH

Solución de desnaturalización (formamida 70%/2X SSC)

Formamida - 28 ml

20X SSC - 4 ml

H₂O destilada o desionizada estéril - 8 ml

**Guardar en frasco estéril a +4 °C*

Solución de Hibridación (formamida 65%/2X SSC)

Para sondas tipo alfa satélite:

Total de volumen = 10 ml

Formamida - 6.5 ml

20X SSC - 1.0 ml

Dextran Sulfato (solución al 50%) - 2.0 ml

H₂O desionizada o destilada estéril - 0.5 ml

**Guardar en tubo eppendorf estéril a +4 °C*

Solución de Post-lavado de Formamida (formamida 65%/2X SSC)

Debido a la naturaleza de la sonda alfa satélite, conviene utilizar una solución de post-lavado de alta astringencia como es al 65%, con el fin de evitar la presencia de "fondo" o puntos fluorescentes en la laminilla que dificultan la interpretación de los resultados. Al iniciar por primera vez la técnica de FISH, se puede empezar con solución de post-lavado de menor concentración de 60% para reducir la probabilidad de

disminución de señal a cambio de algo de “fondo” fluorescente en la laminilla. Para sondas de menor tamaño como son de secuencias únicas (aprox. 1000 pb) se utiliza solución de postlavado al 50%.

El objetivo de emplear esta solución es para eliminar el exceso de sonda que no se unió al ADN de la muestra.

65%: 20X SSC - 4ml

H₂O desionizada o destilada estéril – 10 ml

Formamida (de alta pureza) - 26ml

60%: 20X SSC - 4ml

H₂O desionizada o destilada estéril - 12ml

Formamida (de alta pureza) - 24ml

**Guardar en frascos estériles a +4 °C*

20X SSC

Volumen total = 1 litro

NaCl (3M) - 175.3g

Citrato de Sodio (0.3M) - 88.2g

pH 7.4 utilizando HCl, y ajustar hasta volumen final con agua destilada estéril

**Guardar a temperatura ambiente*

Soluciones de 2X, 1X 0.1X SSC

Se preparan a partir de 20X SSC, preparando soluciones con volumen final de 250 ml con agua desionizada o destilada estéril y guardándose a +4 °C.

Solución Amortiguadora de Fosfatos (Post lavado) (PBD) pH=8.0

Esta solución se emplear para eliminar el exceso de colorante Rodamina, FITC antes de agregar el colorante de contraste DAPI.

Volumen total = 1 litro

Solución I - NaH_2PO_4 13.8g en 1 litro de agua destilada estéril

Solución II - Na_2HPO_4 14.2g en 1 litro de agua destilada estéril

Mezclar ambas soluciones para obtener pH 8.0 (a 900ml de Solución II, agregar aproximadamente 50 ml de Solución I)

Agregar 0.5 ml Np-40

**Guardar a +4°C*

Amortiguador de fosfatos (PBS) pH=7.0

Volumen total = 1 L

NaCl - 8.0 g

KCl - 0.2 g

Na_2HPO_4 - 0.92 g

KH_2PO_4 - 0.2 g

Disuelto en 1 L de H_2O destilada

**Guardar a +4 °C*

DAPI (4,6 Diamino-2- fenilindol)

Volumen final = 1.0 ml

Solución madre de DAPI 1mM: DAPI - 1mg

H₂O destilada o desionizada estéril - 1ml

Agitar en vortex

**Guardar en tubos eppendorf de 1.5 ml oscuro dentro de caja oscuro a -20°C*

Dihidrocloreuro de P- fenilenediamino (PPD) Solución Estabilizadora (“Anti-Fade”)

Volumen final = 10ml

PPD- 0.01 g

Glicerol (100%)- 9.0 m

Amortiguador de fosfatos (PBS) 1X- 1.0 ml

pH 7.0–8.0 ajustar con NaOH 0.1 M. Calentar a 37°C hasta estar completamente .odisuelto.

Preparar en frasco oscuro lo más rápido posible ya que esta solución es muy sensible a luz y temperatura.

**Guardar en frasco oscuro envuelto en papel aluminio a -20°C.*

Solución de trabajo DAPI- solución Estabilizadora

Volumen final = 2.5 ml

De la solución madre de DAPI (1mM) se prepara una solución de 0.4 µM

DAPI 1mM- 1.0 µl

Solución Estabilizadora - 2499 µl

Mezclar empleando vortex.

Se recomienda prepararse en eppendorf oscuro de 1.5 ml lo más rápido posible por la sensibilidad ya mencionada de la solución Estabilizadora.

**Guardar en tubos eppendorf oscuros en pequeñas alicuotas a -20 °C.*

Etanol

Para preparar las diferentes concentraciones de etanol (70%, 80%, 90%, 95% y 100%) se utiliza agua destilada estéril y se guardan en frascos previamente esterilizados. Se recomienda que el etanol que se vaya a emplear, sea de alta calidad y pureza con el fin de evitar contaminantes que puedan fluorescer y dificultar la interpretación de resultados.

LITERATURA CITADA

- 1.- Thompson J.S., M.W. Thompson; 1975; "Cromosomas Sexuales", **Genética Médica (segunda edición)**. Salvat Editores, S.A. España. p.163-184.
- 2.- Preston, R.J.;1989; A Short Journey From Classical to Molecular Cytogenetics; **Environ. and Molec. Mutat.**; 14:126-132.
- 3.- Salamanca Gómez, F.;1990;"Técnicas Citogenéticas", **Citogenética Humana, Fundamentos y Aplicaciones Clínicas**. Editorial Médica Panamericana, S.A. de C.V. México. p.341-358.
- 4.- Pinkel, D., J.W. Gray, B. Trask, G. van den Engh, J. Fuscoe, H. van Dekken; 1986; Cytogenetic Analysis by *In situ* Hybridization with Fluorescently Labeled Nucleic Acid Probes; **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**; L1:151-157.
- 5.- Cremer, T., P. Litcher, D.C. Ward, L. Manuelidis; 1988; Detection of Chromosome Aberrations in Metaphase and Interphase Tumor Cells by *in situ* Hybridization using Chromosome-specific Library Probes; **Hum. Genet.**; 80:235-246.
- 6.- Pérez Losada, A., S. Woessner, F. SolJ, M.R. Caballín, L. Florensa; 1993; "Pintado" Selectivo de Cromosomas Mediante Hibridación "*in situ*"; **Sangre**; 38(2): 151-154.
- 7.- Le Beau, M.; April 15, 1993; Detecting Genetic Changes in Human Tumor Cells: Have Scientists "Gone Fishing?"; **Blood**; 81(8):1979-1982.
- 8.- Litcher, P., T.Cremer, L.Manuelidis, D.C. Ward; 1988; Delineation of Individual Human Chromosomes in Metaphase and Interphase Cells by *in situ* Suppression Hybridization Using Recombinant DNA Libraries; **Hum. Genet.**; 80:224-234.
- 9.- Poddighe, P.J., O. Moesker, D. Smeets, B.H. Awwad, F.C.S. Ramaekers, A.H.N. Hopman; 1991; Interphase Cytogenetics of Hematological Cancer: Comparison of Classical Karyotyping and *in situ* Hybridization Using a Panel of Eleven Chromosome Specific DNA Probes; **Cancer Res.**; 51:1959-1967.
- 10.- Schaffer, L.G.; Octubre 1993; "Overview of FISH"; Curso Latinoamericano de Hibridación Fluorescente *In situ* (Latin American Fluorescent *in situ* Hybridization Workshop). **Universidad Autónoma de Nuevo León**, Monterrey, México, p. 1-15.
- 11.- Buongiorno-Nardelli, M., F. Amaldi; 1970; Autoradiographic Detection of Molecular Hybrids Between rRNA and DNA in Tissue Sections; **Nature**; 225:946-948.

- 12.- Gall, J.G., M.L. Pardue; 1969; Formation and Detection of RNA-DNA Hybrid Molecules in Cytological Preparations; **Proc. Natl. Acad. Sci.**; 63:378-383.
- 13.- John, H.A., M.L. Bimstiel, K.W. Jones; 1969; RNA-DNA Hybrids at the Cytological Level; **Nature**; 223:582-587.
- 14.- Poggensee, M., J.N. Lucas; 1992; A Cytogenetic Technologist Looks at Fluorescence *in situ* Hybridization; **Applied Cytogenet.**; 18(1):1-5.
- 15.- Mitchell, B.S., D. Dharmi, U. Shumacher; 1992; *In situ*. a Review of Methodologies and Applications in the Biomedical Sciences; **Med. Lab. Sci.**; 49:107-118.
- 16.- Ferguson-Smith, M.A.; 1991; Invited Editorial: Putting the Genetics Back into Cytogenetics; **Am. J. Hum. Genet.**; 48:179-182.
- 17.- Gerhard, D.S., E.S. Kawasaki, F. Carter Bancroft, P. Szabo; 1981; Localization of a Unique Gene by Direct Hybridization *in situ*; **Proc. Natl. Acad. Sci USA**; 78(6): 3755-3759.
- 18.- Harper, M.E., A. Ulrich, G.F. Saunders; 1981; Localization of the Human Insulin Gene to the Distal End of the Short Arm of Chromosome 11; **Proc. Natl. Acad. Sci USA**; 78(7): 4458-4460.
- 19.- Harper, M.E., H.A. Barrera-SaldaZa, G.F. Saunders; 1982; Chromosomal Localization of the Human Placental Lactogen-Growth Hormone Gene Cluster to 17q22-24; **Am. J. Hum. Genet.**; 34:227-234.
- 20.- Malcolm, S., P. Barton, C. Murphy, M.A. Ferguson-Smith; 1981; Chromosomal Localization of a Single Copy Gene by *in situ* Hybridization- Human B Globin Genes on the Short Arm of Chromosome 11; **Ann. Hum. Genet.**; 45:135-141.
- 21.- Landegent, J.E., N. Jansen in de Wal, R.W. Dirks, F. Baas, M. van der Ploeg; 1987; Use of Whole Cosmid Cloned Genomic Sequences for Chromosomal Localization by Non-radioactive *in situ* Hybridization; **Hum. Genet.**; 77:366-370.
- 22.- Trask, B.J.; May 1991; Fluorescence *in situ* Hybridization: Applications in Cytogenetics and Gene Mapping; **TIG**; 7(5):149-154.
- 23.- Raap, A.K., R.W. Dirks, N.M. Jiwa, P.M. Nederlof, M. van der Ploeg; *In situ* Hybridization with Hapten-Modified DNA Probes; 1990; **Modern Pathology of AIDS and Other Retroviral Infections**; Racz P., A.T. Gluckman, J.C. Karger (eds). Basel, Karger, p. 17-28.
- 24.- Rudkin, G.T., B.D. Stollar; 1977; High Resolution of DNA-RNA Hybrids *in situ* by Indirect Immunofluorescence; **Nature**; 265:472-473.
- 25.- Bauman, J.G.J., J. Wiegant, P. Borst, P. van Duijn; 1980; A New Method for Fluorescence Microscopical Localization of Specific DNA Sequences by *in situ* Hybridization of Fluorechrome-labelled RNA; **Exp. Cell Res.**; 128:485-490.

- 26.- Stryer, L.; "Molecular Immunology"; 1988; **Biochemistry (third edition)**; W.H. Freeman and Company; U.S.A.; p.890.
- 27.- Langer, P.R., A.A. Waldrop, D.C. Ward; 1981; Enzymatic Synthesis of Biotin-labeled Polynucleotides: Novel Nucleic Acid Affinity Probes; **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**; 78(11):6633-6637.
- 28.- Furuta, Y., T. Shinohara, K. Sano, M. Meguro, K. Nagashima; 1990; *In situ* Hybridisation with Digoxigenin-labelled DNA Probes for Detection of Viral Genomes; **J. Clin. Pathol.**; 43:806-809.
- 29.- Heino, P., V. Hukkanen, P. Arstila; 1989; Detection of Human Papilloma Virus (HPV) DNA in Genital Biopsy Specimens by *in situ* Hybridization with Digoxigenin-labeled Probes; **J. Virol. Methods**; 26:331-338.
- 30.- Hopman, A.H.N., J. Wiegant, P. van Duijn; 1987; Mercurated Nucleic Acid Probes, A New Principle for Non-Radioactive *in situ* Hybridization; **Exp. Cell Res.**; 169:357-368.
- 31.- Kimpton, C.P., G. Corbitt, D.J. Morris; 1989; Detection of Cytomegalovirus DNA Using Probes Labelled with Digoxigenin; **J. Virol. Methods**; 24:335-346.
- 32.- Pinkel, D., T. Straume, J.W. Gray; 1986; Cytogenetic Analysis Using Quantitative, High-sensitivity Fluorescence Hybridization; **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**; 83:2934-2938.
- 33.- Pinkel, D., J. Landegent, C. Collins, J. Fuscoe, R. Segraves, J. Lucas, J. Gray; 1988; Fluorescence *in situ* Hybridization with Human Chromosome-specific Libraries: Detection of Trisomy 21 and Translocations of Chromosome 4; **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**; 85:9138-9142.
- 34.- Heppell-Parton, A.C., D.G. Albertson, R. Fishpool, P.H. Rabbitts; 1994; Multicolour Fluorescence *in situ* Hybridisation to Order Small, Single-copy Probes on Metaphase Chromosomes; **Cytogenet. Cell Genet.**; 66:42-47.
- 35.- Parra, I, B. Windle; 1993: High Resolution Visual Mapping of Stretched DNA by Fluorescent Hybridization; **Nature Genetics**; 5:17-21.
- 36.- Phipps, M.E., E.R. Maher, N.A. Affara, F. Latif, M.A. Leversha, M.E. Ferguson-Smith, Y. Nakamura, M. Lerman, B. Zbar, M.A. Ferguson-Smith; 1993; Physical Mapping of Chromosome 3p25-p26 by Fluorescence *in situ* Hybridisation (FISH); **Hum. Genet.**; 92:18-22.
- 37.- Lemieux, N., B. Malfroy, R. Fetni, M. Muleris, N. Vogt, C.L. Richer, B. Dutrillaux; 1994; *In situ* Hybridization Approach at Infragenic Level on Metaphase Chromosomes; **Cytogenet. Cell Genet.**; 66:107-112.
- 38.- Kallioniemi, K., O-P. Kallioniemi, D. Sudar, D. Rutovitz, J.W. Gray, F. Waldman, D. Pinkel; 1992; Comparative Genomic Hybridization for Molecular Cytogenetic Analysis of Solid Tumors; **Science**; 258:818-821.

- 39.- Lichter, P., A.L. Boyle, T. Cremer, D.C. Ward; 1991; Analysis of Genes and Chromosomes by Nonisotopic *in situ* Hybridization; **GATA**; 8(1):24-35.
- 40.- Ohta, T., T. Tohma, H. Soejima, Y. Fukushima, T. Nagai, K. Yoshiura, Y. Jimno, N. Niikawa; 1993; The Origin of Cytologically Unidentifiable Chromosome Abnormalities: Six Cases Ascertained by Targeted Chromosome-band Painting; **Hum. Genet.**; 92:1-5.
- 41.- Koch, J., J. Hindkjaer, S. Kølvrå, L. Bolund; 1995; Construction of a Chromosome-specific Oligonucleotide Probes (PRINS-primers) Useful for the Identification of Individual Human Chromosomes *in situ*; **Cytogenet. Cell Genet.**; 71:142-147.
- 42.- Cremer, T., J. Landegent, A. Bruckner, H.P. Scholl, M. Schardin, H.D. Hager, P. Devilee, P. Pearson, M. van der Ploeg; 1986; Detection of Chromosome Aberrations in the Human Interphase Nucleus by Visualization of Specific Target DNAs with Radioactive and Non-radioactive *in situ* Techniques: Diagnosis of Trisomy 18 with Probe L1.84; **Hum. Genet.**; 74:346-352.
- 43.- Hopman, A.H.N., F.C.S. Ramaekers, A.K. Raap, J.L.M. Beck, P. Devilee, M. van der Pleg, G.P. Vooijs; 1988; *In situ* Hybridization as a Tool to Study Numerical Chromosome Aberrations in Solid Bladder Tumors; **Histochem.**; 89:307-316.
- 44.- Lawrence, J.B., C.A. Villave, R.H. Singer; 1988; Sensitive, High-Resolution Chromatin and Chromosome Mapping *in situ*. Presence and Orientation of Two Closely Integrated Copies of EBV in a Lymphoma Line; **Cell**; 52:51-61.
- 45.- Thompson, C.T., P.E. LeBoit, P.M. Nederlof, J.W. Gray; 1994; Thick-section Fluorescence *in situ* Hybridization on Formalin-fixed, Paraffin-embedded Archival Tissue Provides a Histogenetic Profile; **Am. J. Pathol.**; 144:237-243.
- 46.- Dewald, G.W., C.R. Schad, E.R. Christensen, A.L. Tiede, A.R. Zinsmeister, J.L. Spurbeck, S.N. Thibodeau, S.M. Jalal; 1993; The Application of Fluorescent *in situ* Hybridization to Detect Mbc1/abl Fusion in Variant Ph Chromosomes in CML and ALL; **Cancer Genet. Cytogenet.**; 71:7-14.
- 47.- Durnam, D.M., K.R. Anders, L. Fisher, J. O'Quigley, E.M. Bryant, E.D. Thomas; 1989; Analysis of the Origin of Marrow Cells in Bone Marrow Transplant Recipients Using a Y-Chromosome-Specific *in situ* Hybridization Assay; **Blood**; 74(6):2220-2226.
- 48.- Callahan, D.E., A. Karim, G. Zheng, P.O. Ts, S.A. Lesko; 1992; Quantitation and Mapping of Integrated Human Papillomavirus on Human Metaphase Chromosomes Using a Fluorescence Microscope Imaging System; **Cytometry**; 13(5):453-461.
- 49.- Hori, T., H. Ichimura, M. Minamihisamatsu, E. Takahashi, M. Yamauchi, Y. Hama, O. Kurimura, M. Yamasaki, T. Kurimura; 1991; Chromosomal Insertion and Amplification of Human Papillomavirus 16 DNA Sequence in a Cell Line of Argrophil Small Cell Carcinoma of the Uterine Cervix; **Jpn. J. Cancer Res.**; 82(4):371-375.

- 50.- Rappold, G.A., T. Cremer, H.D. Hager, K.E. Davies, C.R. Muller, T. Yang; 1984; Sex Chromosome Positions in Human Interphase Nuclei as Studied by *in situ* Hybridization with Chromosome Specific DNA Probes; **Hum. Genet.**; 67:317-325.
- 51.- Burns, J., V.T.W. Chan, J.A. Jonasson, K.A. Fleming, S. Taylor, J. OD McGee; 1985; Sensitive System for Visualising Biotinylated DNA Probes Hybridised *in situ* : Rapid Sex Determination of Intact Cells; **J. Clin. Pathol.**; 38:1085-1092.
- 52.- Bischoff, F.Z., D.D.Nguyen, K.J. Burt, L.G. Shaffer; 1994; Estimates of Aneuploidy Using Multicolor Fluorescence *in situ* Hybridization on Human Sperm; **Cytogenet. Cell Genet.**; 66:237-243.
- 53.- Chevret, E., S. Rouseaux, M. Monteil, R. Pelletier, J. Cozzi, B. Sele; 1995; Meiotic Segregation of the X and Y Chromosomes and Chromosome 1 Analyzed by Three-color FISH in Human Interphase Spermatozoa; **Cytogenet. Cell Genet.**; 71:126-130.
- 54.- Spriggs, E.L., A.W. Rademaker, R.H. Martin; 1995; Aneuploidy in Human Sperm: Results of Two- and Three-color Fluorescence *in situ* Hybridization Using Centromeric Probes for Chromosomes 1, 12, 15, 18, X and Y; **Cytogenet. Cell Genet.**; 71:47-53.
- 55.- Coignet, L., A. Girardet, B. Andreó, J.P. Charlieu, F. Pellestor; 1996; Double and Triple *in situ* Chromosomal Labeling of Human Spermatozoa by PRINS; **Cytogenet. Cell Genet.**; 73:300-303.
- 56.- González-del-Angel, A., B. Blanco, V. del Castillo, A. Carnevale; 1995; Identificación de Cromosomas Sexuales Marcadores Mediante Hibridación *in situ* con Fluorescencia (FISH); **Rev. Invest. Clin.**; 47:117-125.
- 57.- Frías, S., G. Ordaz, B. Blanco, B. Molina, V. del Castillo, A. Carnevale; 1996; Detección de Aneuploidías por Hibridación *in situ* en Células de Mucosa Oral; **Rev. Invest. Clin.**; 48:355-360.
- 58.- Paris Conference (1971): Standardization in Human Cytogenetics; 1972; Birth Defects: Original Article Series, **The National Foundation, New York**; VIII:7.
- 59.- Oncor, Inc.; September, 1992; Dual Color Detection For Whole Cells or Metaphase Chromosomes; Fluorescence Microscopy; **Oncor, Inc., USA**.
- 60.- Kuo, W.L., H. Terjin, R. Segraves, D. Pinkel, M.S. Golbus, J. Gray; 1991; Detection of Aneuploidy Involving Chromosomes 13,18, or 21, by Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) to Interphase and Metaphase Amniocytes; **Am. J. Hum. Genet.**; 49:112-119.
- 61.- Association of Cytogenetic Technologists Task Force; 1989; Chromosome Analysis Guidelines Preliminary Report; **Karyogram**; 15(9):131-135.
- 62.- Zar, Jerrold H.; 1974; Biostatistical Analysis; Prentice-Hall, Inc. USA; p. 127, 177.

- 63.- Ferrán Aranaz, Magdalena; 1996; *SPSS Para Windows, Programación y Análisis Estadístico*; McGraw-Hill, EUA.
- 64.- Mitelman, Felix (ed); 1995; *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1995)*; S. Karger Medical and Scientific Publisher, USA; p. 94-99.
- 65.- Takano, T., Y. Yamanouchi, S. Kawashima, M. Date, S. Hashira, M. Kida, T. Abe, Y. Nakahori, Y. Nakagome; 1993; 11q Trisomy Detected by Fluorescence *in situ* Hybridization; *Clin. Genet.*; 44:324-328.
- 66.- Trask, B., G. van der Engh, D. Pinkel, J. Mullikin, F. Waldman, H. van Dekken, J. Gray; 1988; Fluorescence *in situ* Hybridization to Interphase Cell Nuclei in Suspension Allows Flow Cytometric Analysis of Chromosome Content and Microscopic Analysis of Nuclear Organization; *Hum. Genet.*; 78:251-259.
- 67.- Darfler, M.M., P.E. Nisson, P.C. Watkins; 1992; Painting Human Chromosomes by *in situ* Hybridization: Novel Reagent Systems for Chromosome Detection and Analysis; *Focus*; 14(2):58-61.
- 68.- Lawrence, J.B., R.H. Singer, J.A. McNeil; 1990; Interphase and Metaphase Resolution of Different Distances Within the Human Dystrophin Gene; *Science*; 249:928-932.
- 69.- Litcher, P., D.C. Ward; 1990; Is Non-isotopic *in situ* Hybridization Finally Coming of Age?; *Nature*; 342:93-95.
- 70.- Eastmond, D., M., Schuler, D.S. Rupa; December 1995; Advantages and Limitations of Using Fluorescence *in situ* Hybridization for the Detection of Aneuploidy in Interphase Human Cells; *Mutation Research*; 348:4; 153-162.
- 71.- Schliephacke, M., CIM Maier, G. Majlinger, J. Tomiuk, M. Leipoldt, P. Kaiser; 1996; The Evaluation of Gonosomal Mosaics: Lymphocyte Interphase Nuclei Analyzed by FISH; *Clin Genet*; 50:99-102.

