



**OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO DE LINFOCITOS PARA OBTENCIÓN DE
CROMOSOMAS Y ANÁLISIS DE FRAGILIDAD:
IMPORTANCIA EN X FRÁGIL Y DÉFICIT COGNITIVO**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C. 2019**



**OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO DE LINFOCITOS PARA OBTENCION DE
CROMOSOMAS Y ANÁLISIS DE FRAGILIDAD:
IMPORTANCIA EN X FRÁGIL Y DÉFICIT COGNITIVO**

**LORENA ACOSTA GALEANO
DANIEL SEBASTIÁN BEJARANO VELANDIA
ANGY JOHANA BENAVIDES HERNÁNDEZ**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE BACTERIÓLOGO Y
LABORATORISTA CLÍNICO**

ASESOR

RUTH MELIDA SANCHEZ MORA. MSc. PhD.

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C. 2019**

DEDICATORIA

En primer lugar, agradezco a Dios, a mi madre, mi tío y todas mis tías por apoyarme en mis proyectos de vida y confiar en la realización de los mismos además de brindarme su apoyo, confianza y cariño incondicional, también quisiera agradecer a Luis reyes (el mago) por acompañarme, escucharme y en especial por ser mi polo a tierra en todo este proceso y enseñarme que el mañana empieza hoy, a Natalia Caicedo, Tatiana Huertas, Dana Rodríguez, Lina Morillo, Camilo Rojas, Sara Lengua, Michael Camelo y Angy Benavides por no solo confiar en mi si no por demostrarme la motivación para continuar y seguir adelante con cada una de las utopías y sueños que solo aparecen en mi mente y por ultimo pero no menos importante a mi hermano Daniel Bejarano no solo por estar a mi lado incondicionalmente en cada paso de este proceso si no por ser parte de esta meta cumplida además de enseñarme que en la vida hay muchos caminos y muchas opciones que elegir pero que sobre todo esto siempre debes seguir tus sueños.

Lorena Acosta Galeano

A Dios por darme la fuerza y valor necesarios para afrontar cada reto que se me presenta en la vida, a mis padres Xiomara Velandia y Victor Bejarano, mis pilares fundamentales, quienes han hecho de mí el hombre que soy, por su amor y apoyo incondicional, sus enseñanzas para la vida y por tener siempre la palabra precisa para impulsarme a continuar. A mi familia por hacer parte de mi camino, por siempre creer en mí y animarme a entregar la mejor versión en cada momento, por enseñarme a disfrutar el presente y a valorar cada detalle de la vida. A mi novia y compañera de vida Nathalia García por su amor y entrega sin condición, quien me ha enseñado a perseverar, a confiar en mis capacidades, a no desfallecer y sobre todo a buscar la felicidad y sonreír sin importar la situación. A mis ángeles del cielo a quienes siempre llevo en mi corazón y en mi memoria y quienes guían mi caminar. A Lorena Acosta, la hermana que me dio este camino y quien me ha enseñado que se puede soñar tan alto como se quiere llegar.

Daniel Sebastián Bejarano Velandia

A mi mamá Adriana Hernández por estar en cada momento apoyándome, brindándome sus consejos cuando más lo necesitaba, haciendo todo lo posible para que yo pudiera lograr mis sueños, siempre creyendo en mí, sacrificándose día a día por mi bienestar. A mi tío Henry Benavides por ser parte primordial desde el inicio de este proceso hasta el final, brindándome su ayuda en cada momento tanto moral como económicamente, ya que sin él la culminación de este proyecto no hubiese sido posible. A mi abuelita María Hilda Tarapuez por creer en mí, darme ánimos cuando sentía desfallecer, preocuparse por mí en cada momento crucial y complicado en este proceso, darme el apoyo que yo necesitaba y estar pendiente de mí en cada paso que daba.

Angy Johana Benavides Hernandez

AGRADECIMIENTOS

Expresamos los más sinceros agradecimientos a nuestra asesora la doctora Ruth Melida Sanchez Mora MsC. PhD. por su apoyo y orientación incondicional en la elaboración del presente trabajo de investigación; su valiosa dirección, exigencia y constancia, que nos animó a dar lo mejor de nosotros en este camino y cada uno de los que emprendamos en adelante; y por su aporte en nuestro proceso de formación personal y profesional como enseñanza para la vida.

De igual manera agradecemos a la universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por brindarnos su apoyo académico durante el proceso de elaboración del presente trabajo de grado, y por ser el punto de partida para nuestra vida profesional a través de los conocimientos de calidad aportados a cada uno de nosotros durante nuestra vida universitaria.

Al semillero de Biotecnología y Genética del programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico por su acompañamiento en el desarrollo de ésta actividad académica, el aporte intelectual, motivación y mejoramiento continuo de nuestro espíritu investigativo.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN EJECUTIVO	10
OBJETIVOS.....	12
INTRODUCCIÓN	13
1. ANTECEDENTES.....	15
2. MARCO TEÓRICO	18
2.1. CULTIVO DE LINFOCITOS	18
2.1.1. Técnicas de coloración de cromosomas	20
2.1.2. Sitios frágiles en los cromosomas.....	21
2.2. SÍNDROME DE X FRÁGIL.....	22
2.2.1. Etiología	22
2.2.2. Características.....	23
2.2.3. Patrón de herencia	24
2.2.4. Paradoja de Sherman.....	26
2.3. SÍNDROME X FRÁGIL Y DÉFICIT COGNITIVO.....	27
2.3.1. Prevalencia.....	28
2.3.2. Gen FMR1	29
2.3.3. Tipos de alelos	30
2.3.4. Proteína FMRP	31
2.3.5. Actividad neuronal proteína FMRP	32
3. DISEÑO METODOLÓGICO.....	34
3.1. DETERMINACIÓN DE LA POBLACIÓN, MUESTRA, CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN EN EL ESTUDIO.	34
3.2. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS.	36
3.2.1. Recolección de datos	36
3.2.2. Optimización de las técnicas de cultivo de linfocitos para obtención de cromosomas..	37
3.2.2.1. Optimización de cultivo convencional de linfocitos a partir de Sangre periférica	37
3.2.2.2. Optimización del cultivo para análisis de fragilidad cromosómica	39
3.2.2.3. Tinción de Giemsa.....	40
3.2.4. Bando G	40
4. RESULTADOS.....	42

4.1. OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CULTIVO DE LINFOCITOS PARA OBTENCION DE CROMOSOMAS	42
4.1.1. Optimización del Cultivo convencional de linfocitos	42
4.1.2. Optimización de la Tinción de Giemsa.....	48
4.2. OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO PARA EVALUACIÓN DE FRAGILIDAD CROMOSÓMICA	49
4.2.1. Inducción de fragilidad y resultados de la coloración con Giemsa	50
4.3. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE REFERENCIA PARA EL SXF.....	51
4.1.1. Análisis de la población de estudio	54
5. DISCUSION	61
CONCLUSIONES	66
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS.....	71
ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO	71
ANEXO 2. ENCUESTA	73
ANEXO 3. LISTA DE ABREVIATURAS	75

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Patrón de herencia del SXF	25
Figura 2. Genealogía paradoja de Sherman	27
Figura 3. Representación esquemática del gen FMR1.....	29
Figura 4. Manifestación fenotípica del gen FMR1	30
Figura 5. Regulación de la síntesis de proteínas mediada por FMRP..	32
Figura 6. Preparados cromosómicos observados al microscopio invertido en objetivo de 10X con distintas cantidades de PHA.....	43
Figura 7. Preparados cromosómicos observados en objetivo de 40x obtenidos en medio RPMI-1640 con diferentes cantidades de Suero Fetal Bovino	44
Figura 8. Metafases obtenidas a partir de tiempos distintos de exposición a Colchicina	45
Figura 9. Cambios en el tiempo de incubación en presencia de solución hipotónica	46
Figura 10. Optimización del protocolo de coloración con Giemsa.....	48
Figura 11. Estandarización de bandeos G. Preparados cromosómicos obtenidos a partir de cultivo de linfocitos de sangre periférica, sometidos a contacto con tripsina a diferentes tiempos	49
Figura 12. Metafases obtenidas en medio TC- 199.....	50
Figura 13. Fragilidad y rupturas cromosómicas inducidas en medio TC-199 con adición de MMC	51
Figura 14. Tipos de deficiencias presentes en la población de niños del “Colegio Ciudad de Bogotá” ...	52
Figura 15. Características fenotípicas presentes durante el desarrollo-primera infancia de los niños participantes del estudio	53
Figura 16. Número de características asociadas a SXF presentes en el individuo de cada familia.....	54
Figura 17. Número de características fenotípicas presentes durante el desarrollo-primera infancia por familia.....	55
Figura 18. Genealogía Familia 1	56
Figura 19. Genealogía Familia 2.....	57
Figura 20. Genealogía Familia 3.....	58
Figura 21. Genealogía Familia 4.....	58
Figura 22. Genealogías con menor grado de correlación genética	59

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variación del número de tripletes CGG en el gen FMR1	31
Tabla 2. Características sociodemográficas de la población control de estudio.....	34
Tabla 3. Características sociodemográficas de la población de referencia.....	35
Tabla 4. Protocolo para la obtención de muestras de sangre periférica.	36
Tabla 5. Protocolo de cultivo convencional de linfocitos en medio RPMI 1640 de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.....	37
Tabla 6. Protocolo de cultivo convencional de linfocitos en medio RPMI 1640 optimizado.....	38
Tabla 7. Protocolo de siembra para cultivo de fragilidad cromosómica en medio TC-199.	39
Tabla 8. Optimización del volumen de sangre acorde al grado de proliferación celular.	42
Tabla 9. Optimización de la cantidad de mitógeno (PHA) acorde al grado de proliferación celular.....	43
Tabla 10. Proceso de shock térmico y fijación	47
Tabla 11. Protocolo de cultivo convencional de linfocitos optimizado	47



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA.**

Optimización del cultivo de linfocitos para obtención de cromosomas y análisis de fragilidad: importancia en x frágil y déficit cognitivo

RESUMEN EJECUTIVO

La fragilidad cromosómica se refiere a aquellas regiones de ADN susceptibles a desarrollar fracturas debido al debilitamiento de la cromatina en un proceso de replicación tardía, estas regiones se denominan sitios frágiles, los cuales se presentan comúnmente y son restauradas gracias a un proceso de reparación nucleotídica, sin embargo algunas de estas regiones evaden el sistema de reparación y se manifiestan en alteraciones asociadas a enfermedades genéticas como lo es el Síndrome de X Frágil.

El síndrome de X Frágil es un trastorno genético hereditario ligado al cromosoma X, región Xq27.3, causado por un defecto molecular en la región 5' no traducida (5'UTR) del gen FMR1, debido al incremento en el número de repeticiones del trinucleótido CGG que ocasiona la inactivación del gen y por lo tanto, la falta de síntesis de la proteína FMRP necesaria para el desarrollo normal del cerebro, siendo considerado una de las principales causas de deficiencia cognitiva; entre las técnicas de diagnóstico se encuentra el cultivo de linfocitos con inducción de fragilidad para la obtención de metafases y visualización de sitios frágiles en el cromosoma X.

En el presente trabajo de investigación se realizó la optimización del cultivo convencional de linfocitos así como del cultivo para evaluación de fragilidad cromosómica en la universidad Colegio Mayor de Cundinamarca siendo éste un aporte al proceso académico para el programa de bacteriología y laboratorio clínico, con impacto en estudios de fragilidad cromosómica en

poblaciones con deficiencia cognitiva, como es el caso de niños pertenecientes al programa de inclusión de un Colegio ubicado en la localidad de Tunjuelito al sur de Bogotá, a quienes se les realizó un proceso de Tamizaje basado en características y antecedentes familiares compatibles con el Síndrome de X Frágil.

Palabras clave: Síndrome de X Frágil, Fragilidad cromosómica, Déficit cognitivo, Cultivo de linfocitos, Optimización.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Optimizar el cultivo convencional de linfocitos humanos y el cultivo para análisis de fragilidad cromosómica a partir de sangre periférica en medios RPMI 1640 y TC-199 en la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, necesarios para el análisis de casos de deficiencia cognitiva asociada al Síndrome de X Frágil.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las cantidades, tiempos de exposición a reactivos y condiciones adecuadas para la obtención de metafases de buena calidad para su observación y análisis.
- Comprobar la eficiencia del método utilizado para la evaluación de fragilidad cromosómica mediante la inducción de sitios frágiles y rupturas en medio TC-199.
- Caracterizar una población de niños con déficit cognitivo por medio de entrevistas y encuestas enfocadas a la obtención de información personal y familiar, relacionada con criterios asociados al Síndrome de X Frágil.

INTRODUCCIÓN

La evaluación de fragilidad cromosómica consiste inicialmente en la implementación de una técnica citogenética por medio del cultivo celular, para la obtención de metafases y la visualización de sitios frágiles, que se produce cuando la secuencia de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) alcanza cierto tamaño en su replicación nucleotídica que produce debilitamiento de la cromatina en una zona específica, conocido citogenéticamente como sitio frágil, el cual se expresa como una laguna isocromática en el cromosoma metafásico reflejando en microscopia de luz un estrechamiento en la región que se presenta(1).

Los sitios frágiles en los cromosomas son específicos y heredables, susceptibles a presentar gaps o fracturas cuando el cromosoma es expuesto a inhibición parcial de la secuencia de ADN, estos constituyen áreas de cromatina que no se compactan adecuadamente durante la mitosis debido a que presentan una replicación más tardía que el resto del cromosoma, existen sitios frágiles que son comunes en todos los individuos, sin embargo hay sitios frágiles que conllevan a alteraciones genéticas en el ADN representando casos como el SXF (Síndrome de X frágil)(1,2).

El SXF es un trastorno hereditario monogénico ligado al cromosoma X, región Xq 27.3, que afecta principalmente a los varones teniendo una incidencia en la población mundial correspondiente a 1 caso por cada 5000 hombres, mientras que en el género femenino es menos frecuente con un estimado de 1 caso por cada 8000 mujeres, siendo además una de las causas hereditarias más comunes de deficiencia cognitiva(3).

En Colombia se estima que 12 de cada 100 personas en condición de discapacidad, presentan limitaciones permanentes para entender o aprender, según cifras publicadas en el año 2005 por el departamento nacional de estadísticas DANE(4), sin embargo no existen datos específicos de deficiencia cognitiva ni estudios de su asociación genética en la población(5), sumado a la falta de métodos asequibles en el sistema de salud, que dificulta la identificación etiológica causante de esta condición.

El presente trabajo de investigación se realizó con la finalidad de optimizar las técnicas citogenéticas de cultivo convencional de linfocitos y de análisis de fragilidad cromosómica en la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, como aporte al desarrollo de procesos académicos e investigativos para el programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico; así como para la

evaluación de fragilidad cromosómica en personas que presentan deficiencia cognitiva sin un origen establecido.

Teniendo en cuenta lo anterior se tomó como población control para la optimización de las técnicas de cultivo celular, muestras sanguíneas correspondientes a tres estudiantes de la Universidad, sin antecedentes familiares de deficiencia cognitiva ni trastornos genéticos. De igual manera para el estudio de fragilidad cromosómica se tomó como población de referencia un grupo de niños con déficit cognitivo como diagnóstico base, pertenecientes al programa de inclusión de un Colegio ubicado en la localidad de Tunjuelito al sur de Bogotá, utilizando como estrategia inicial de tamizaje encuestas enfocadas a obtener antecedentes familiares que permitan la construcción de genealogías en cada caso, y el análisis de las mismas frente al patrón de herencia característico del SXF.

Por lo anterior este proyecto pretende ser el punto de partida para futuras investigaciones enfocadas a la determinación de la prevalencia de fragilidad cromosómica asociada al SXF, debido a que en la actualidad son escasos los antecedentes de investigación enfocados a este fin.

1. ANTECEDENTES

En el año 1985 el grupo de investigación de Giraldo et al.(6) perteneciente al Instituto Nacional de Salud de Colombia, realizó la investigación de fragilidad del cromosoma X en tres familias no relacionadas remitidas al grupo de Genética de la institución para diagnóstico citogenético por retardo mental. Fueron evaluados 15 individuos con cuadro clínico equivalente, consistente en retardo mental, macroorquidismo y anomalías menores, que presentaban un patrón de herencia ligada al sexo. En las tres familias se elaboró historia clínica incluyendo antecedentes familiares y genealogía para evaluación del patrón de herencia y se realizó análisis citogenético en medio TC-199 y tinción de Giemsa para evaluación del sitio frágil en el cromosoma X, encontrando evidencia del mismo en los varones de dos de las familias.

En 1987 Castro y Cuenca(7) llevaron a cabo un estudio en el Hospital nacional de Niños de Costa Rica, enfocado en el tamizaje del sitio frágil del cromosoma X en un grupo de 56 individuos, entre niños y jóvenes con deficiencias mentales, pertenecientes al Centro Nacional de Educación Especial "Fernando Centeno Güell". La población de estudio fue dividida en 3 subgrupos, clasificando en el primero individuos de ambos sexos con antecedentes familiares compatibles con deficiencia mental ligada al cromosoma X, en el segundo grupo varones con rasgos faciales o conductuales compatibles y en el tercer grupo a los demás individuos con deficiencia mental sin causa evidente. Para el tamizaje se obtuvo muestra de sangre heparinizada de todos los individuos, la cual fue sometida a protocolo de cultivo de linfocitos en medio TC-199, deficiente en ácido fólico, con tinción convencional para la evaluación de fragilidad cromosómica. En los preparados obtenidos en portaobjetos se analizaron 100 metafases por muestra, considerando positivo el hallazgo del sitio frágil en el cromosoma X de al menos 2 metafases, y estas a su vez pasaron a un proceso de bandedo cromosómico para su confirmación. Como resultado se obtuvo la presencia del sitio X frágil en 3 individuos pertenecientes al grupo 1 y 2 (5% de la población), siendo este estudio uno de los primeros en evaluar la existencia del síndrome en pacientes con deficiencia mental de Latinoamérica.

Para el año 1991 el grupo de genética del entonces Instituto Nacional de Salud de Colombia encabezado por la microbióloga Elizabeth Silva(8) estandarizó la técnica de cultivo de linfocitos para la obtención de metafases con la finalidad de evaluar fragilidad en el cromosoma X, para lo cual se empleó un medio deficiente en folatos como lo es el medio TC-199 y la tinción uniforme

de preparados cromosómicos con colorante Giemsa. El éxito en la estandarización de este y otros protocolos, permitió la creación del manual de procedimientos de citogenética humana que ha sido útil para el desarrollo de trabajos de investigación y como base para procesos diagnósticos en nuestro país.

Como segundo trabajo con la población del centro de educación especial "Fernando Centeno Güell" en 1996 Castro y Cuenca(9) investigaron la presencia del sitio frágil del cromosoma X, en 118 individuos con edades comprendidas entre 6 y 15 años, con deficiencia mental de leve a severa de acuerdo a su índice de coeficiente intelectual (40 mujeres y 78 hombres), mediante la misma metodología citogenética de su anterior estudio basada en el medio TC-199 y tinción estándar. Como resultado se obtuvieron 9 cariotipos anormales, de los cuales en 5 se detectó la fragilidad del cromosoma X, siendo 4 pacientes masculinos y 1 femenino, que permiten concluir que el SXF es una causa importante de deficiencia cognitiva a considerar.

Fernández et al.(10) en 2001, realizaron un trabajo enfocado al diseño de un método de preselección de niños candidatos a estudios genéticos frente al SXF basado en seis criterios clínicos asociados al mismo, para el cual fueron analizados pacientes varones entre 2 y 10 años con retraso mental de causa desconocida, a los cuales aparte del test se les realizó el estudio molecular necesario para conocer el número de repeticiones del trinucleótido CGG (Citocina – Guanina- Guanina), con el que se confirma la presencia o ausencia de la mutación del gen FMR1 y por consiguiente la utilidad del test de preselección.

En Ricaurte, Valle en el año 2001 Payan et al.(11), identificaron una alta prevalencia de retardo mental en los habitantes, y elaboraron la genealogía de 35 familias con individuos afectados por esta condición, encontrando un patrón sugestivo de herencia ligada al cromosoma X. Por otro lado en la evaluación física de la población de estudio se encontraron características compatibles con el SXF tanto en hombres como en mujeres, por lo cual se confirmó el diagnóstico a 28 de los individuos mediante cariotipo, en medio con depleción de folatos, y con base en estos resultados se determinó la prevalencia del síndrome en la población.

En 2006 Alliende et al.(12), desarrollaron una investigación en la cual se realizó el tamizaje clínico a 99 individuos chilenos de sexo masculino por medio del análisis de características compatibles con el SXF, y se correlacionó con los resultados del análisis molecular, con la finalidad de determinar la utilidad del tamizaje clínico como indicio de la presencia del síndrome. Como

resultado del estudio se identificaron 21 individuos con mutaciones completas y 2 que presentaron mosaicismo, los cuales fueron comparados con individuos negativos frente a la mutación, con el fin de especificar las características clínicas que presentan diferencias significativas entre los dos grupos analizados y que en consecuencia corresponden a características sugerentes del SXF que se encontraron asociadas en mayor frecuencia a la presencia de la mutación.

Fernández et al.(13) en 2010 desarrollo una investigación enfocada a la revisión de las dificultades escolares de lectura y escritura en niños y adolescentes diagnosticados con SXF destacando aspectos como la adquisición, evolución e intervención dada su relevancia en la enfermedad, teniendo como objetivo analizar los factores que dan lugar a disfunciones comunicativas en esta población, destacando así la gran diferencia entre niños y niñas con la enfermedad en torno a estas habilidades y su proceso de enseñanza.

En el año 2016 Mingarro et al.(14) desarrollo un trabajo en el cual se describe la importancia del consejo genético en su fin como proceso comunicativo para informar, educar y aclarar dudas sobre la enfermedad genética del SXF, por medio del cual se logró realizar un árbol genealógico de un paciente de 12 años de edad obteniendo resultados positivos en uno de sus familiares por parte de la rama materna que fue diagnosticado previamente con SXF tras estudio genético. A partir de ese momento toda la rama materna fue sometida a estudio genético encontrando que tanto la madre del paciente como las hermanas eran portadoras sanas de la enfermedad.

En el año 2016 Saldarriaga et al.(15), desarrollaron un estudio descriptivo a una familia de Cali, Colombia en el cual se evaluaron nueve individuos con discapacidad intelectual de etiología desconocida, mediante pruebas moleculares de ADN para diagnóstico de SXF. Así mismo realizaron pruebas en cascada a todos los miembros disponibles de la familia, encontrando individuos con mutación completa y premutación. Dicha investigación se realizó con la finalidad de contribuir a estudios epidemiológicos del síndrome en Colombia, demostrando además la importancia del diagnóstico no solo en las personas afectadas, sino también en los demás individuos pertenecientes a la familia para evaluar la herencia y la posibilidad de manifestación en las siguientes generaciones.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. CULTIVO DE LINFOCITOS

El cultivo de linfocitos a partir de sangre periférica es una técnica utilizada en el campo de la citogenética para la detección de anormalidades o alteraciones genéticas que pueden ser la causa de diferentes patologías en los seres humanos, evidenciables en el análisis de cromosomas por medio de microscopía. Representa un método poco invasivo, eficaz y sencillo para la obtención del material genético condensado en estas estructuras, que provee un número adecuado de células en división(16).

El proceso de obtención de cromosomas es llevado a cabo en dos etapas claras, definidas como siembra y cosecha; la primera fase consiste en la adición de sangre periférica heparinizada a cajas de cultivo con adición de un medio esencial mínimo tal como RPMI 1640 suplementado con SFB (Suero Fetal Bovino), PHA (fitohemaglutinina) y AB/AM (Antibiótico/Antimicótico)(16). El medio RPMI-1640 desarrollado por Moore et al., consiste en un sistema de amortiguación de bicarbonato y mezcla de aminoácidos y vitaminas, utilizado ampliamente para cultivo de células humanas, principalmente linfocitos, así como para células de modelos animales, en ensayos de estimulación(17).

Por su parte el SFB consiste en una mezcla compleja de albúminas, factores de crecimiento e inhibidores del crecimiento(18), representa uno de los componentes más importantes de los medios de cultivo celular utilizado para propiciar el crecimiento in vitro de células, por su aporte de aminoácidos, proteínas, vitaminas, carbohidratos, lípidos, hormonas, factores de crecimiento, minerales y oligoelementos(19).

La PHA consiste en una glicoproteína de tipo lectina, procedente de legumbres y plantas oleaginosas, caracterizada por su capacidad de unión a carbohidratos componentes de glicanos, ubicados en la membrana de los eritrocitos, causando hemaglutinación. Consiste en el aditivo principal necesario para la proliferación in vitro de linfocitos humanos gracias a su efecto mitogénico, demostrado en cultivos de diferentes estirpes celulares(20).

La adición de antibióticos no representa un elemento fundamental para el crecimiento celular, sin embargo se hace necesaria para el control del desarrollo microbiano causante de contaminación durante el proceso de cultivo y es de especial cuidado teniendo en cuenta la potencial interferencia

que puede llegar a causar en el metabolismo de células sensibles, por lo cual es recomendada la aplicación de una baja cantidad(21).

Por otra parte, la etapa de cosecha consiste en una serie de procesos necesarios para la obtención de células en metafase, pasadas 72 horas de incubación a 37°C, entre los que se destacan la detención del ciclo celular por adición de colchicina, la disgregación de membranas causada por el tratamiento con solución hipotónica Cloruro de Potasio 0.075M (KCl 0.075M), la fijación y extendido de cromosomas en lámina en presencia de solución Carnoy (Metanol-Ácido acético 3:1) y la tinción con colorante de Giemsa para la observación al microscopio de estructuras cromosómicas(22).

La colchicina es un alcaloide de origen natural presente en diferentes especies de plantas, principalmente en *Colchicum autumnale*, su utilidad radica en un potente efecto antitumoral y en el caso de cultivo celular en la acción antimicótica, dada por la unión $\alpha\beta$ -tubulina, comportándose como un agente desestabilizante de los microtúbulos del huso mitótico crucial para la división celular(23).

Posterior a la detención del ciclo celular las células son sometidas a un proceso de shock hipotónico en presencia de una solución KCl 0.075M, generando el movimiento de moléculas al interior de las mismas logrando un aumento en su volumen y facilitando la lisis de las membranas en el proceso de fijación y extendido de los preparados, permitiendo la observación de las metafases(16).

Como paso final del proceso de cosecha, la fijación de los preparados se enfoca en impedir modificaciones o procesos autolíticos que puedan sufrir las células obtenidas y mantener su estructura morfológica sin que ocurran cambios notorios. Este efecto se logra por medio del fijador Carnoy, el cual posee un excelente poder de difusión y penetración celular altamente utilizado en el campo de la citogenética previo a la tinción de núcleos y especialmente de cromosomas(24). Por último, se realizará el extendido de la preparación en láminas portaobjetos, por medio de un proceso de goteo que se realiza a una altura mínima de 100cm, que permite por efecto de la gravedad la ruptura de las membranas de los linfocitos obtenidos liberando los cromosomas de interés para el consiguiente proceso de tinción.

Cabe resaltar que en el ámbito del cultivo celular de linfocitos para análisis de cromosomas, pueden ser empleados otros medios con fines específicos; tal es el caso del medio TC-199, utilizado principalmente para la detección y observación de sitios frágiles o rupturas debido a que es un medio deficiente en folatos, los cuales resultan ser necesarios para la producción y expresión de ADN(25).

2.1.1. Técnicas de coloración de cromosomas

La coloración de Giemsa uniforme es una tinción utilizada para la observación detallada de células sanguíneas, bacterias e incluso parásitos; actualmente es utilizada en el área de la citogenética para observar la condensación del ADN en procesos mitóticos. Esta coloración está basada en un colorante tipo Romanowsky a fin a componentes biológicos de naturaleza aniónica como el ADN, por su contenido de colorantes básicos como el azul de metileno y azur B, que se unen específicamente a las regiones ricas en A-T (Adenina-Timina), otorgándole un color purpura a los cromosomas obtenidos en las metafases a observar(26).

El proceso de bandeado cromosómico se realiza cuando los cromosomas entran a un proceso de desnaturalización o digestión enzimática y una posterior coloración con Giemsa, para que estas bandas se puedan evidenciar al momento de la observación, existen diferentes tipos de bandeado como el Bando G, Bando Q, Bando R, Bando C y Bando T(8). En la técnica de Bando G los cromosomas obtenidos a partir de células en metafases son expuestos de manera controlada a tripsina, una enzima hidrolasa encargada de romper los enlaces entre aminoácidos y un proceso posterior de tinción con Giemsa, a partir del cual se obtiene un patrón de bandas característico de cada par de cromosomas.

Las bandas oscuras se dan por la tinción de las proteínas con una mayor cantidad de puentes disulfuro o regiones ricas en pares A-T por lo cual son más resistentes al proceso de digestión enzimática causada por la tripsina, mientras que las bandas claras son proteínas con una mayor cantidad de grupos sulfhidrilos. El proceso de bandeado cromosómico, como técnica diferencial constituye una opción diagnóstica en la en el área de la citogenética humana, para la detección de alteraciones numéricas o estructurales del material genético condensado en forma de cromosomas(8).

2.1.2. Sitios frágiles en los cromosomas

Los sitios frágiles representan porciones cromosómicas específicas y heredables, susceptibles a presentar gaps o fracturas cuando el cromosoma es expuesto a inhibición parcial de la replicación del ADN(2,27).

Al día de hoy se han identificado alrededor de 130 sitios frágiles, los cuales constituyen áreas de cromatina que no se compactan apropiadamente durante la mitosis debido a que presentan una replicación tardía, en relación al resto del cromosoma y son heredados de forma codominante, hallándose en la misma ubicación en todas la células de un individuo o familia (1).

Los sitios frágiles se clasifican basados en su frecuencia poblacional en tres grupos principales: **Raros:** presentes en un individuo por varios cientos de personas, que pueden llegar a considerarse exclusivos de la familia del paciente y no presentarse en otros grupos(2,28).

Intermedios: de los cuales existen dos más frecuentes en una población determinada(28).

Comunes: son universales y forman parte de la arquitectura cromosómica normal; por lo tanto, todos los individuos los portamos de forma normal en nuestros cromosomas(2,28).

Los sitios frágiles normales suelen presentarse como variantes sin alteraciones fenotípicas ni trastornos presentes correspondientes a regiones o bandas cromosómicas que aparecen a simple vista en microscopia de luz como una interrupción no coloreada o gaps de ancho variable, diferenciándose de los sitios frágiles intermedios o raros, en la proporción de metafases en las cuales se pueden encontrar en un individuo (entre un 0 y un 20% de las metafases observadas)(28).

Los sitios frágiles comunes son inocuos, mientras que en algunos estudios, los de frecuencia intermedia o rara, se han descrito asociados con malformaciones congénitas, anomalías cromosómicas esporádicas y mayor predisposición a enfermedades malignas(28).

Entre los principales factores implicados en la fragilidad cromosómica transitoria in vitro, se encuentran los compuestos tóxicos con acción clastogénica, definidos como agentes físicos o químicos capaces de producir daño del ADN. Se conoce que existen tóxicos que pueden aumentar la fragilidad cromosómica, siendo uno de ellos la MMC (Mitomicina C)(29).

2.2. SÍNDROME DE X FRÁGIL

El SXF también conocido como síndrome de Martin Bell en honor a los investigadores que lo caracterizaron y que reportaron los primeros casos en 1943(30), es una condición genética causante de discapacidad cognitiva, y se describe como la mutación en el gen FMR1(Fragile X Mental Retardation 1) del cromosoma X, encargado de producir la proteína FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein) que controla la síntesis proteica en la neurona postsináptica (15,31).

Las personas que presentan este síndrome tienen una alta perspectiva de vida solo si el síndrome se diagnostica a corta edad y si cumple adecuadamente con el tratamiento de medicamentos que pueden controlar los síntomas físicos y las terapias sociales necesarias para que el paciente se desarrolle de una manera adecuada en su entorno(32).

Se trata entonces de una enfermedad heredada que afecta a varios integrantes de una misma familia ya sea de forma indirecta, como portadores o directa con la presentación del fenotipo propio del SXF.

2.2.1. Etiología

El SXF es causado por la alteración en la producción normal de la proteína FMRP, la cual en su función biológica actúa transportando el ARNm (Ácido Ribonucleico mensajero) del núcleo a través del citoplasma y localiza el ARNm dendrítico en donde reprime la síntesis de proteínas sinápticas en el sistema nervioso controlando así los cambios físicos que alteran las condiciones sinápticas relacionadas con el desarrollo de aprendizaje y la memoria(33).

El gen FMR1 ubicado en el brazo largo del cromosoma X posición 27.3, en condiciones normales tiene un patrón de ADN repetitivo de hasta 44 trinucleotidos CGG en la región promotora 5'UTR. Sin embargo la mutación del mismo genera una expansión en el número de repeticiones por encima de 200, que conllevan a la subsecuente metilación y silenciamiento transcripcional del gen y por consiguiente, a la deficiencia o total ausencia en la producción de la proteína FMRP(34), lo que resulta en el desarrollo de problemas de aprendizaje, deterioro cognitivo y anormalidades del comportamiento.

Más del 99% de los casos del síndrome se dan por el aumento en las repeticiones CGG sin embargo el 1% es causado por una variedad de mutaciones que incluyen deleciones, complicaciones macroscópicas, mutaciones reguladoras y mutaciones sin sentido(3).

En la actualidad se conocen 65 mutaciones en el gen FMR1 incluido la repetición del trinucleótido CGG en la región 5' UTR. Más de la mitad de estas son deleciones gruesas, que varían desde varios cientos hasta millones de pares de bases y frecuentemente incluyen todo el gen FMR1; así como también se incluyen mutaciones reguladoras o puntuales, duplicaciones, mutaciones de tres y cuatro puntos sin sentido, dos deleciones pequeñas, una mutación de empalme, una inserción y una organización compleja(3).

2.2.2. Características

El SXF se manifiesta con un fenotipo variable que comprende manifestaciones físicas, cognitivas y conductuales, las cuales dependen de factores puntuales como el género y la edad del individuo afectado, así como la cantidad de proteína FMRP que se produce, el número de repeticiones CGG y el grado de metilación que presente el gen FMR1 en cada caso(31).

Cuando los niveles de FMRP están levemente disminuidos se presenta una leve afectación emocional y dificultades en el aprendizaje, acompañado de un coeficiente intelectual normal, mientras que cuando existe una disminución considerable o ausencia total de esta proteína se desarrolla un déficit cognitivo severo produciendo retardo mental(31).

Existen diferencias claras en cuanto al género, que atienden claramente a la dotación de cromosomas sexuales, las mujeres suelen manifestar menor sintomatología al disponer de dos cromosomas X, razón por la cual uno compensa los problemas funcionales del otro(35) por tanto, la severidad del fenotipo varía desde la presencia de características físicas y deficiencias cognitivas, hasta la ausencia de fenotipo físico con leves problemas en el proceso de aprendizaje(31); mientras que en los hombres las manifestaciones físicas y conductuales son evidentes puesto que al contar con un único cromosoma X no existe mecanismo alguno para compensar la funcionalidad de la proteína FMRP causada por la deficiencia en su producción.

Dentro de las características físicas destacan la forma alargada de la cara, mandíbula prominente, gingivitis, periodontitis, orejas de gran tamaño, frente amplia, tono muscular bajo, pie plano,

hiperlaxitud de articulaciones, deficiencias auditivas y visuales y macroorquidismo en el caso específico del género masculino(36), el cual aparece en la pubertad y permite diferenciar en esta etapa hombres posiblemente afectados con el SXF de aquellos que tienen discapacidad cognitiva no asociada a SXF(31).

Por otro lado las características conductuales y cognitivas más frecuentes comprenden discapacidad intelectual y del lenguaje además de problemas psicomotores e hiperactividad. De igual manera a estas condiciones pueden estar asociados signos como lo son retraso en el habla, retraso al momento de gatear o caminar, aversión al contacto visual, aleteo constante e incluso morderse las manos o dedos constantemente(36).

Alrededor del 30% de los casos de SXF no presentan los rasgos fenotípicos clásicos, ni antecedentes familiares de discapacidad cognitiva, manifestándose únicamente como retraso del lenguaje o trastorno de déficit atencional con o sin hiperactividad. El compromiso cognitivo se manifiesta precozmente, con retraso del desarrollo psicomotor, movimientos repetitivos, posturas inusuales, pobre contacto ocular y aislamiento social; un 85% de los hombres afectados y de un 25 a 30% de las mujeres tienen un coeficiente intelectual menor de 70%, siendo el hallazgo más frecuente encontrar en las mujeres un nivel de inteligencia normal o limítrofe. En algunos casos el retraso psicomotor puede ser leve o incluso ser inicialmente normal, manifestándose posteriormente como un trastorno de aprendizaje(37).

Hay signos importantes que se presentan con poca frecuencia, pero pueden llegar a ser graves o prolongar el tratamiento como lo son: otitis recurrentes que pueden afectar de forma permanente la audición y convulsiones en un 25% de los varones afectados. Estas convulsiones pueden ser de forma generalizada o localizarse en una parte del cuerpo, pueden comenzar a una edad temprana alrededor de los 6 y los 24 meses de edad por lo cual en la mayoría de los casos se incluye de manera permanente el tratamiento con anticonvulsivante(37,38).

2.2.3. Patrón de herencia

El síndrome de X frágil tiene una herencia ligada al sexo dominante con penetrancia incompleta y expresividad variable, que atiende a la ubicación del gen involucrado en esta condición, reflejando una clara predominancia en el sexo masculino con respecto al femenino(39,40).

Los casos del síndrome que se presentan en hombres se deben a que heredan el cromosoma X con la mutación haciendo deficiente la producción de proteína FMRP; en el caso de las mujeres al presentar un cariotipo XX cuando presentan la mutación en el gen FMR1 la síntesis de dicha proteína es compensada por el mismo gen en el otro cromosoma por lo cual no se generan las características propias de la enfermedad, pero serán portadoras de la misma(41).

La heredabilidad del SXF de una generación a otra depende netamente del estado del gen FMR1 de los progenitores, existiendo la posibilidad de desarrollo de la enfermedad cuando al menos uno de ellos presenta la mutación completa, lo que da paso a distintas probabilidades de genotipo en su descendencia (Figura 1).

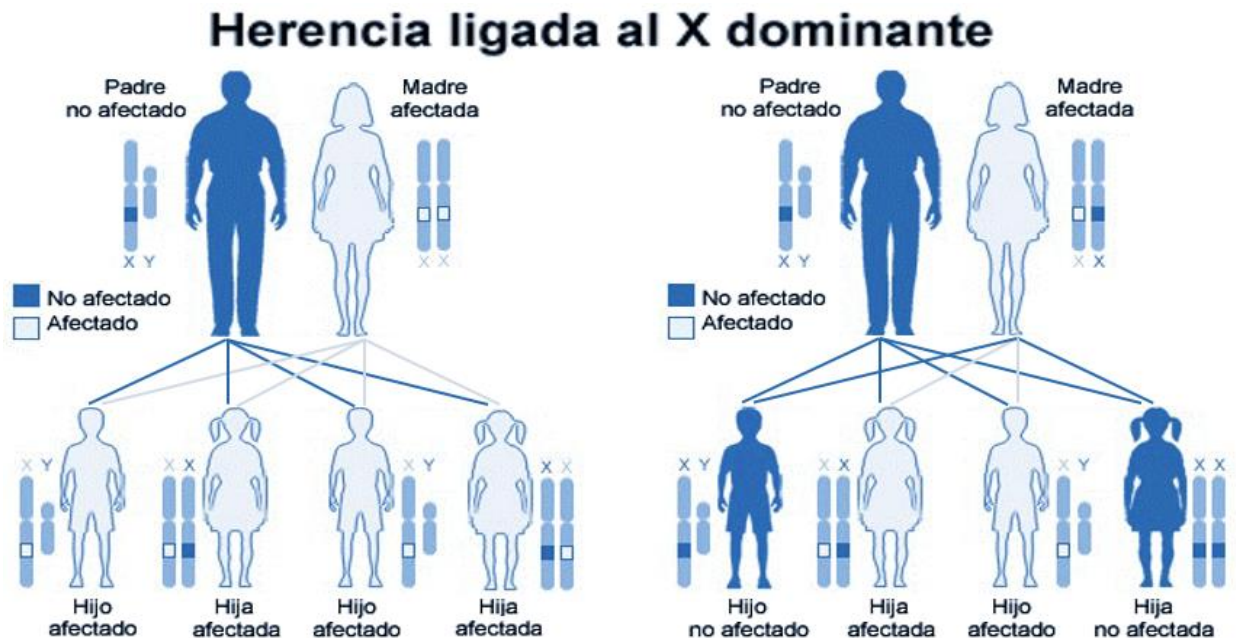


Figura 1. Patrón de herencia del SXF. Tomado y modificado de García Lorente L. *Síndrome X frágil: fisiopatología y posibilidades actuales de diagnóstico y tratamiento* (42).

El caso más común se da en la descendencia de mujeres portadoras del síndrome y de hombres que no presentan ninguna alteración en el gen FMR1, en el cual existe un 50% de probabilidad de que sus hijos varones se vean afectados en caso de heredar el cromosoma alterado y un 50% de probabilidad de obtener descendencia sana. Así mismo para el caso de la descendencia femenina, a pesar de tener las mismas probabilidades de genotipo, únicamente serán portadoras en caso de heredar la mutación(42).

De igual manera existen eventos menos frecuentes asociados a la descendencia de progenitores afectados por el SXF. Por un lado, cuando la mujer es la que presenta una mutación completa en sus cromosomas sexuales, todos los hijos varones se verán afectados por el síndrome, puesto que de forma estricta heredan el cromosoma Y procedente del padre y por consiguiente alguno de los cromosomas X mutados de la madre, mientras que las hijas presentaran un cromosoma X afectado y uno sano que las convierte en portadoras de esta condición genética(42).

Por otro parte en caso de ser el hombre quien presenta la mutación completa en su cromosoma X, se heredará éste mismo a la totalidad de sus hijas haciéndolas portadoras, o dando paso al desarrollo de ésta condición en casos infrecuentes en que se herede de la madre otro cromosoma alterado; mientras que la probabilidad de que hereden la mutación a sus hijos es completamente nula debido a que siempre aportan el cromosoma Y a su genotipo(42).

2.2.4. Paradoja de Sherman

Dentro del patrón de herencia del SXF cabe mencionar que al día de hoy se conoce la presencia de un fenómeno de anticipación, gracias a estudios realizados por Sherman et. al desde 1985(43), consistente en la posible aparición de la enfermedad dentro de una misma familia con manifestaciones clínicas más severas y tempranas en las siguientes generaciones y la posibilidad de que varones normales puedan ser portadores y transmitir la enfermedad a todas sus hijas haciéndolas igualmente portadoras (figura 2)(40).

Acorde a la “paradoja de Sherman” en el SXF existen entonces mutaciones dinámicas, que se describen como zonas polimórficas de repeticiones de tripletes (CGG)_n, y un estadio de premutación inestable en el gen FMR1, que se origina cuando en esta zona se encuentra una expansión en un rango de 55-200 tripletes CGG(40).

En esta zona de repeticiones, ocurre un fenómeno de inestabilidad, debido a la pérdida de tripletes AGG que hay cada 9-11 repeticiones, encargados de mantener la estabilidad del gen, lo que desencadena un mayor riesgo de cambio en el número de tripletes (CGG)_n al pasar a la siguiente generación familiar, hasta expandirse a tamaños que duplican y hasta quintuplican el número de repeticiones presentes en la región 5'UTR(31,40).

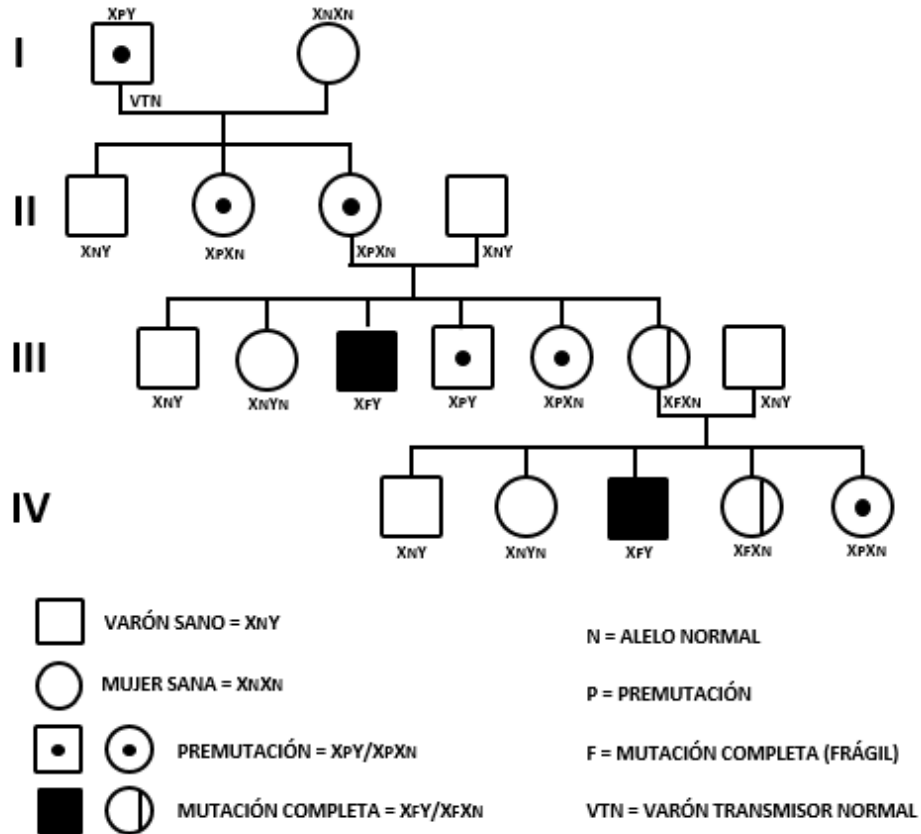


Figura 2. Genealogía paradoja de Sherman. Tomado y modificado de Calvo Medina R. Síndrome X frágil: eficacia en el ensayo experimental con antioxidantes de un trastorno genético del neurodesarrollo infantil (40).

2.3. SÍNDROME X FRÁGIL Y DÉFICIT COGNITIVO

El término déficit cognitivo es derivado del concepto de discapacidad intelectual, anteriormente conocido como retraso mental, que se puede presentar a varios niveles y es definido como una disposición funcional específica en lo que se refiere a procesos cognitivos, habilidades de comprensión y estilos de pensamiento, entendidos como herramientas esenciales en el procesamiento de la información en relación directa con los procesos de aprendizaje(44).

Esta condición puede darse a causa de diferentes eventos, en su mayoría asociados a factores de riesgo perinatales, que deben ser tenidos en cuenta como indicio de su posible etiología; entre los cuales destacan factores como prematuridad, bajo peso al nacer, problemas respiratorios, hipoxia perinatal, problemas metabólicos, hiperbilirrubinemia, retraso de crecimiento intrauterino y condiciones genéticas(45,46).

El SXF hace parte del grupo de condiciones genéticas causantes de déficit cognitivo, siendo una de las principales causas de tipo hereditario de esta condición(10,31,37); sin embargo no en todos los individuos se manifiesta con la misma severidad, por lo que es necesario aclarar que muchos de los niños afectados pueden llegar a superar sin problemas un test de inteligencia alcanzando un coeficiente intelectual cercano al normal, asociado a dificultades en procesos de interacción social y vida escolar, con problemas de aprendizaje en áreas como matemáticas, lógica y aspectos abstractos(40), sin embargo existe variabilidad de afectación intelectual siendo siempre menor en mujeres y en pacientes con mosaicismos.

El grado de limitación cognitiva y la manera de procesar la información con mayor complejidad sobre todo a nivel verbal, tiene implicación directa en el proceso de aprendizaje, que si bien no tiene un desarrollo común se puede lograr en cierta medida por imitación de actos repetitivos; es importante resaltar la afectación conductual que se presenta en personas afectadas por el síndrome, relacionada principalmente a problemas de desarrollo del lenguaje, desempeño en la comprensión de la relación causa y efecto, y resolución de conflictos, lo cual aumenta de forma exponencial el nivel de estrés que manejan las personas a causa del SXF(40).

2.3.1. Prevalencia

En la actualidad se estima que la prevalencia de la mutación completa del SXF en la población mundial corresponde a 1 caso por cada 5000 hombres, mientras que en el género femenino es más infrecuente con un estimado de 1 caso por cada 8000 mujeres(3).

De igual manera la prevalencia de personas que conviven con la premutación corresponde a 1 caso en 250-813 en hombres, mientras que tiene una mayor frecuencia en el género femenino, con alrededor de 1 caso en 110-170 en mujeres, debido a la alta probabilidad de contar con un cromosoma X normal que se encarga de compensar la producción de proteína FMRP(34).

Por otra parte, en portadores de la premutación es posible encontrar condiciones médicas asociadas, entre los cuales se encuentran la depresión, ansiedad, cefalea migrañosa, hipertensión, apnea del sueño, enfermedades mediadas por el sistema inmune, FXTAS (Síndrome de temblor y ataxia asociado al X frágil) y FXPOI (Falla ovárica prematura asociada al X frágil) que se han descrito en los últimos 10 años(31,47).

El FXTAS ocurre en aproximadamente el 40% de los hombres con la premutación y el 16 % de las mujeres, mientras que FXPOI ocurre en 16-20% de las mujeres con la premutación(31).

Sin embargo la prevalencia puede variar en distintas partes del mundo por las diferencias étnicas o raciales en haplotipos que podría predisponer las alteraciones en el triplete CGG(34); siendo un claro ejemplo la población colombiana del corregimiento de Ricaurte del municipio de Bolívar, al norte del Valle del Cauca, en donde se ha identificado una prevalencia elevada de discapacidad intelectual correspondiente a 39 individuos en 1,124 habitantes, de los cuales se estima que existe 1 caso por cada 19 hombres y 1 caso por cada 46 mujeres de SXF(11).

2.3.2. Gen FMR1

El gen FMR1 es un gen humano altamente conservado compuesto por 17 exones que se extienden a lo largo de 38kb en el locus Xq27.3, responsable de la codificación de la proteína FMRP necesaria para el desarrollo y el mantenimiento de la plasticidad neuronal(48).

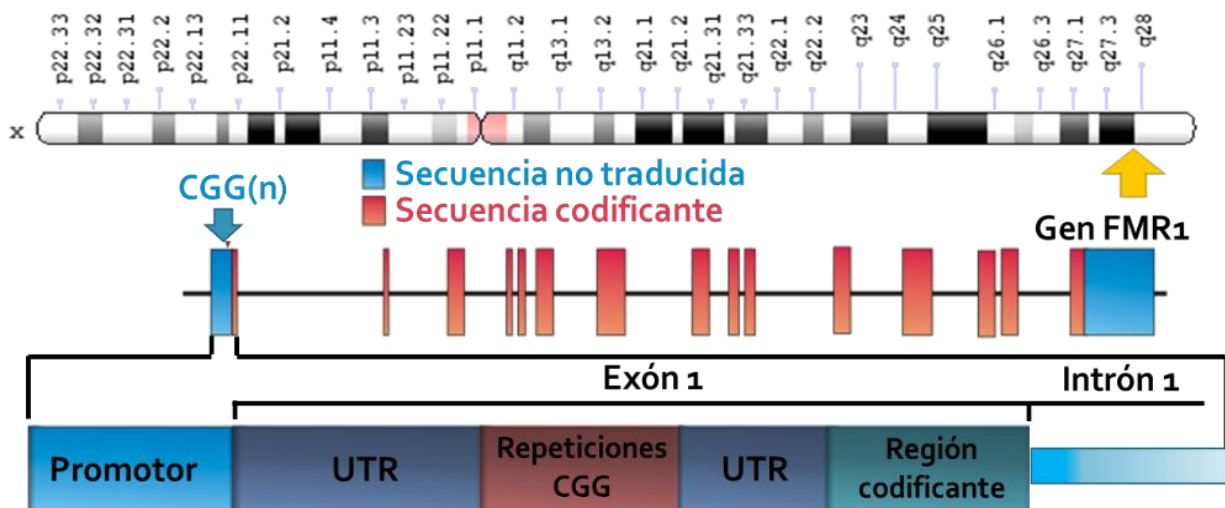


Figura 3. Representación esquemática del gen FMR1. Fuente: Los autores.

En la región 5'UTR del primer exón del gen se localiza una secuencia compuesta por repeticiones en tándem del trinucleotido CGG en condiciones normales, que se expande debido a la mutación y que permite describir 4 tipos de alelos que pueden evidenciarse frente al SXF (figura 3)(33).

2.3.3. Tipos de alelos

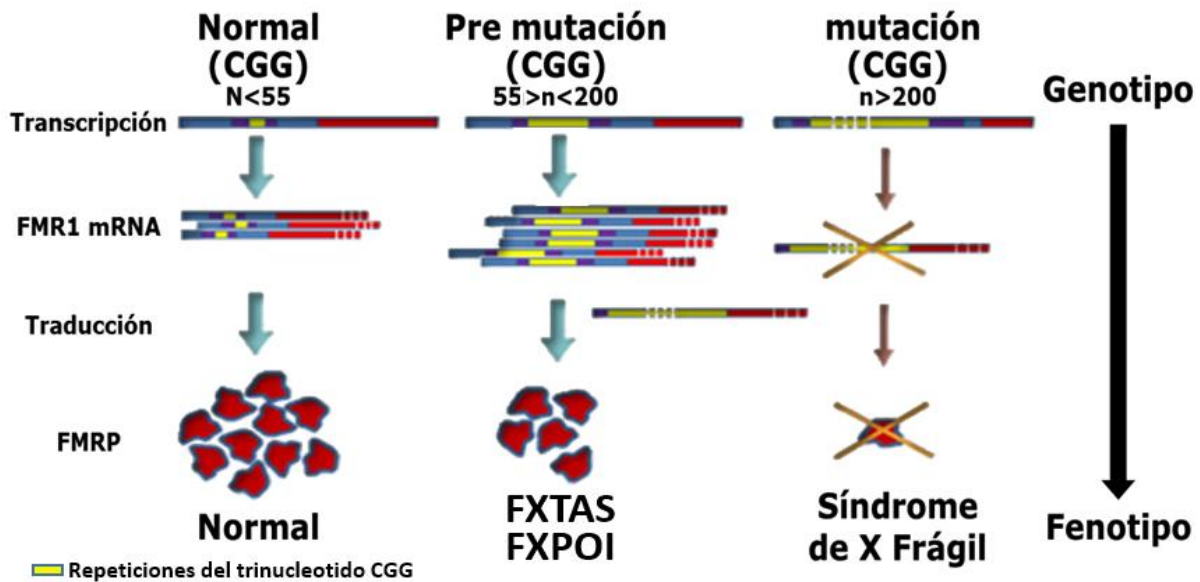


Figura 4. Manifestación fenotípica del gen FMR1. Tomado y modificado de Berman et al. *Mouse models of the fragile X premutation and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome* (49).

Normal: 5-44 repeticiones

En la mayoría de individuos se presentan de 5 a 44 repeticiones del trinucleotido CGG en el gen FMR1 en condiciones normales, sin relación alguna con la existencia del SXF, ni su heredabilidad(31,42).

Intermedio o zona gris: de 45 a 54 repeticiones

Los individuos con una cantidad intermedia de repeticiones (alrededor de 45 a 54) no presentan el SXF. Sin embargo, en este caso específico, existe una expansión en el número de trinucleotidos y por consiguiente una mayor probabilidad de presentar síntomas leves(42,50).

Premutación: de 55 a 200 repeticiones

En individuos que presentan entre 55 a 200 repeticiones, se habla de la existencia de alelos premutados, que si bien no dan paso al desarrollo del SXF, puede permitir la aparición de otro trastorno asociado con el cromosoma X Frágil, como el FXTAS o el FXPOI(39,50). Además, las personas con una premutación pueden tener hijos con una premutación o con mutación completa por fenómenos expansivos en la región 5'UTR(31).

Mutación completa (SXF): Más de 200 repeticiones

En individuos que presentan una mutación completa del gen FMR1 se estima un número de repeticiones por encima de 200, que se traduce en la existencia del SXF. En estos individuos se produce la metilación de las bases de citosina y esto conlleva a un silenciamiento de la transcripción y ausencia de la proteína FMRP responsable de la discapacidad intelectual(48).

Tabla1. Variación del número de tripletes CGG en el gen FMR1

(CGG)n	Isla CpG	FMRP	ESTATUS	FENOTIPO
6-54	No metilada	Positivo	Normal	Normal
55-200	No metilada	Positivo	Premutación	FXPOI/ FXTAS/ otros Penetrancia reducida
>200	Metilada	Negativo	Mutación completa	SXF, varones afectados 50% mujeres afectadas

Tomada y modificada de Milà Recasens M. El Síndrome X frágil(51).

2.3.4. Proteína FMRP

FMRP es una proteína de unión al ARN (Ácido Ribonucleico) que juega un papel fundamental en la regulación de proteínas por medio de señales de localización y de exportación nuclear además de contener dos zonas de interacción proteína-proteína. Los niveles de expresión de la FMRP difieren según el tejido y el tipo de célula de un mismo tejido, estando presente principalmente en cerebro, testículos, placenta y en neuronas(52).

En las neuronas su función es primordial puesto que se liga selectivamente a ARNm y forma un complejo ribonucleoproteico mensajero que se asocia con los polirribosomas, siendo un proceso fundamental al regular la traducción de otras proteínas para el desarrollo y plasticidad sináptica (figura 4). Los cambios significativos dentro de la plasticidad sináptica son esenciales en el desarrollo del aprendizaje, procesamiento de información y almacenamiento de la memoria(37).

La activación de la plasticidad sináptica es promovida por la síntesis de proteínas y está coordinada principalmente por la acción de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) siendo este punto la base de la teoría mGluRs del SXF(42).

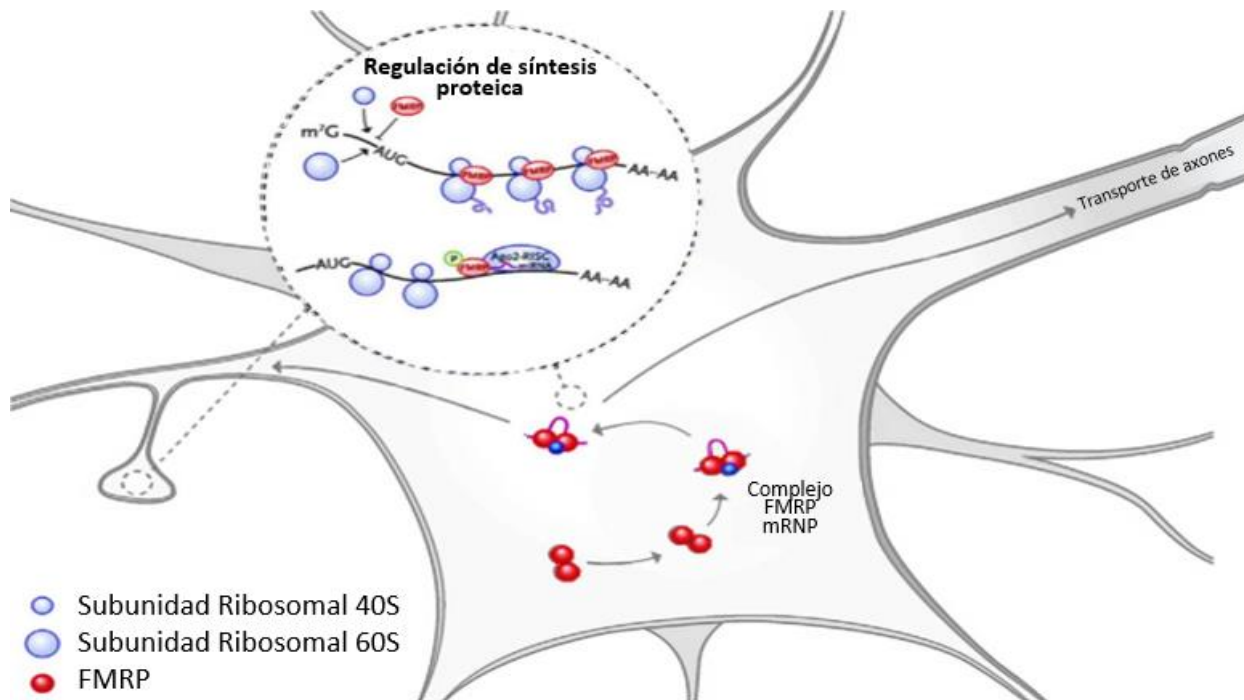


Figura 5. Regulación de la síntesis de proteínas mediada por FMRP. Tomado y modificado de Domingo R. Líneas de investigación en el tratamiento del síndrome X frágil (53).

2.3.5. Actividad neuronal proteína FMRP

La FMRP es necesaria para la internalización de receptores AMPA (glutamato) que participan en los fenómenos de inhibición a largo plazo o debilitamiento de uniones sinápticas, así como para la síntesis de proteínas, es activada por los receptores mGluRs implicados en la potenciación a largo plazo(50).

El glutamato representa un aminoácido esencial en la estimulación de receptores mGluRs induciendo la traducción local de ARNm en la sinapsis neuronal, así mismo la síntesis de proteínas estimula la internalización de receptores AMPA que resulta importante para la plasticidad sináptica a largo plazo. En este proceso la FMRP regula negativamente la transcripción y reduce la internalización de los receptores AMPA, así en consecuencia a la falta de la FMRP en el SXF, la internalización de receptores AMPA se encuentra aumentada debilitando posteriormente el proceso sináptico a causa del aumento de la traducción de proteínas(42).

Aunque está comprobado que FMRP es un regulador negativo, hay algunas evidencias que muestran una función positiva en la traducción de ARNm tales como los que codifican las subunidades del receptor ácido γ -aminobutírico (GABA) ($\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, y δ) que

requiere estar en equilibrio para la activación, sincronía neuronal y facilitación en el movimiento e integración de la información en el cerebro, así en investigaciones previas los niveles de este receptor se encuentran significativamente reducidos en el neocórtex y cerebelo de ratón positivos para la mutación del gen FMR1(42).

Por consiguiente se cree que el deterioro cognitivo, ansiedad, hiperactividad, autismo y epilepsia en niños con SXF se debe entonces a un desequilibrio de los sistemas GABA y glutamato.

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. DETERMINACIÓN DE LA POBLACIÓN, MUESTRA, CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN EN EL ESTUDIO.

3.1.1. Población Control: Estudiantes de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca sin antecedentes familiares de déficit cognitivo y/o SXF.

Muestra: Muestras de sangre de tres estudiantes de Bacteriología y Laboratorio Clínico, empleadas para el proceso de optimización de los protocolos de cultivo convencional y análisis de fragilidad cromosómica a partir de linfocitos humanos.

Tabla 2. Características sociodemográficas de la población control de estudio.

CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN CONTROL	
MUESTRA	n = 3
EDAD MÍNIMA	21 Años
EDAD MÁXIMA	23 Años
GÉNERO	Masculino 1 Femenino 2
NIVEL DE ESTUDIOS	Educación superior
ÁREA	Urbana
NIVEL SOCIOECONÓMICO	3
LOCALIDAD(ES)	Engativá, Teusaquillo, Puente Aranda
INSTITUCIÓN	Universidad Colegio Mayor De Cundimarca
CIUDAD	Bogotá D.C.

Fuente: Los autores.

3.1.2. Población de referencia: Niños pertenecientes al programa de inclusión de un colegio ubicado en la localidad de Tunjuelito al sur de Bogotá.

Muestra: 25 individuos encuestados con el fin de caracterizar una población con manifestaciones cognitivas y conductuales, así como antecedentes familiares de posible asociación al SXF, que presenta relevancia en el estudio, por falta de un diagnóstico específico o adicional al déficit cognitivo de base.

Tabla 3. Características sociodemográficas de la población de referencia.

CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE REFERENCIA	
MUESTRA	n = 25
EDAD MÍNIMA	5 Años
EDAD MÁXIMA	18 Años
GÉNERO	Masculino 21 Femenino 4
NIVEL DE ESTUDIOS	Educación Básica-Media
ÁREA	Urbana
NIVEL SOCIOECONÓMICO	2
LOCALIDAD(ES)	Tunjuelito
INSTITUCIÓN	Colegio del sur de Bogotá
CIUDAD	Bogotá D.C.

Fuente: Los autores.

La propuesta del presente trabajo de investigación fue presentada y aprobada por la rectoría y comité de coordinación docente del colegio en cuestión, bajo el acompañamiento permanente de una trabajadora social del mismo. Los participantes voluntarios firmaron el consentimiento informado en donde se explica la participación en el estudio y se establece la utilización y el tratamiento confidencial de los datos obtenidos (Anexo 1).

Criterios de Inclusión:

- Estudiantes sin antecedentes de fragilidad en su familia.
- Niños con déficit cognitivo de origen desconocido.
- Niños con antecedentes familiares de discapacidad cognitiva, además de signos y síntomas compatibles con fragilidad en el cromosoma X.
- Niños cuyos hermanos y/o familiares varones presentan un fenotipo similar, compatibles con fragilidad en el cromosoma X.

Criterios de Exclusión:

- Estudiantes con antecedentes de fragilidad.
- Niños con problemas cognitivos de causa conocida diferentes a fragilidad en el cromosoma X (hipoxia al nacer, Síndrome de Down, otros).
- Niños con discapacidades físicas y motoras no relacionadas con déficit cognitivo.

3.2. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS.

3.2.1. Obtención de muestras sanguíneas de la población control

Las muestras procedentes de la población control se obtuvieron mediante la técnica de venopunción, que consiste en la obtención de sangre periférica recolectada en tubos de sistema al vacío tapa verde (aditivo: heparina sódica) como se describe a continuación:

Tabla 4. Protocolo para la obtención de muestras de sangre periférica.

PROTOCOLO DE VENOPUNCIÓN
1. Seleccionar el sitio de venopunción (preferiblemente la vena media del antebrazo).
2. Colocar el torniquete alrededor de la parte superior del brazo.
3. Desinfectar el sitio de elección con alcohol etílico al 70%.
4. Introducir la aguja (venoject vacutainer calibre 16mm) en un ángulo de 45°.
5. Recolectar la sangre en el tubo con sistema al vacío (tapa verde) hasta el indicador.
6. Retirar el torniquete.
7. Retirar el tubo del sistema y mezclar por inversión 8 a 10 veces.
8. Retirar la aguja.
9. Colocar una torunda de algodón seco.
10. Hacer presión aproximadamente 5 min o hasta que se detenga el sangrado.

Fuente: Los autores.

3.2.1. Recolección de datos

Para la caracterización de la población de referencia y la elaboración de las genealogías, se realizaron encuestas con diecinueve preguntas (cerradas y abiertas) enfocadas a obtener información relacionada con antecedentes familiares o condiciones puntuales asociadas al SXF, presentes en cada caso específico, así como información socioeconómica (Anexo 2).

Estas encuestas se analizaron una a una de forma manual enfocándose en la cuantificación de los porcentajes de las deficiencias abordadas en la población y en la identificación de manifestaciones que guiarían a la sospecha de fragilidad cromosómica.

De igual manera para la elaboración de las genealogías se entrevistó a la familia de cada individuo propósito, como soporte a la información referida en las encuestas, con lo cual se obtuvo información de las últimas tres generaciones que permitió evaluar la posible presencia/ausencia de un patrón de herencia en cada caso.

3.2.2. Optimización de las técnicas de cultivo de linfocitos para obtención de cromosomas

Se optimizaron las técnicas de cultivo convencional y de fragilidad cromosómica, a partir de linfocitos de sangre humana, tomando como base el protocolo existente en la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca (Tabla 5). Se realizaron cambios puntuales al protocolo original, de acuerdo a revisión de literatura, relacionados con los tiempos de exposición y volúmenes, tanto de muestra a sembrar, como de reactivos, tales como PHA, SFB, KCl 0.075M, colchicina y fijador Carnoy; necesarios para una buena obtención y análisis de metafases.

Tabla 5. Protocolo de cultivo convencional de linfocitos en medio RPMI 1640 de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

PROTOCOLO PARA EL CULTIVO CONVENCIONAL DE LINFOCITOS (UCMC)	
Siembra	
1.	Adicionar 3.5ml de medio de cultivo RPMI 1640.
2.	Adicionar 35µl de solución de antibióticos (2%).
3.	Adicionar 300µl de suero fetal bovino (5-10%).
4.	Adicionar 50µl de fitohemaglutinina.
5.	Adicionar 600µl de sangre heparinizada.
6.	Incubar la preparación por 72 horas a 37°C.
Cosecha	
1.	Agregar 200µl de colchicina por 20 minutos a 37°C
2.	Centrifugar a 2200 RPM durante 10 minutos y descartar el sobrenadante.
3.	Adicionar 5ml de solución hipotónica (KCl) a 37°C por 20 minutos.
4.	Agregar 1ml de fijador y llevar a -20°C durante 20 minutos.
5.	Centrifugar a 2200 RPM durante 10 minutos y descartar el sobrenadante.
6.	Agregar 4ml de fijador y resuspender el boton celular.
7.	Centrifugar a 2200 RPM durante 10 minutos y descartar el sobrenadante.
8.	Desprender el boton celular y repetir el punto 6 y 7 de 3 a 4 veces.
9.	Descartar sobrenadante y agregar fijador ajustando turbidez del boton celular.
10.	Extender 4 o 5 gotas de la preparación sobre una lámina pretratada con fijador a -20°C.

Fuente: Los autores.

3.2.2.1. Optimización de cultivo convencional de linfocitos a partir de Sangre periférica

La totalidad de los ensayos se realizaron por triplicado, utilizando las mismas condiciones de siembra e incubación: 3,5ml de medio RPMI 1640, 35µl de antibiótico/antimicótico y 72 horas de incubación a 37°C, cambiando únicamente el volumen o tiempo de incubación del reactivo o espécimen a evaluar (Tabla 6).

Para todos los ensayos se realizó el proceso de cosecha y se gotearon los preparados cromosómicos en láminas portaobjetos, las cuales se evaluaron en el microscopio invertido en objetivos de 10X y 40X, y posteriormente se realizó un proceso de tinción mediante la técnica de coloración de Giemsa para su evaluación en el microscopio óptico en objetivos de 10X y 100X.

A continuación se muestra el protocolo de cultivo convencional de linfocitos optimizado señalando los cambios realizados al mismo.

Tabla 6. Protocolo de cultivo convencional de linfocitos en medio RPMI 1640 optimizado.

PROTOCOLO PARA EL CULTIVO CONVENCIONAL DE LINFOCITOS OPTIMIZADO
Siembra
1. Adicionar 3.5ml de medio de cultivo RPMI 1640.
2. Adicionar 35µl de solución de antibióticos (2%).
3. Adicionar 500µl de suero fetal bovino (12,5%).
4. Adicionar 75µl de fitohemaglutinina.
5. Adicionar 1000µl de sangre heparinizada.
6. Incubar la preparación por 72 horas a 37°C.
Cosecha
1. Agregar 200µl de colchicina por 30 minutos a 37°C.
2. Centrifugar a 2200 RPM durante 10 minutos y descartar el sobrenadante.
3. Adicionar 5ml de solución hipotónica (KCl) a 37°C por 30 minutos.
4. Agregar 1ml de fijador Carnoy.
5. Centrifugar a 2200 RPM durante 10 minutos y descartar el sobrenadante.
6. Agregar 4ml de fijador, resuspender el boton celular e incubar a -20°C durante 20 minutos.
7. Agregar 3ml de fijador, resuspender el boton celular e incubar a -20°C durante 10 minutos.
8. Centrifugar a 2200 RPM durante 10 minutos y descartar el sobrenadante.
9. Agregar 4ml de fijador y resuspender el boton celular.
10. Centrifugar a 2200 RPM durante 10 minutos y descartar el sobrenadante.
11. Repetir los pasos 9 y 10 de dos a tres veces hasta obtener un sobrenadante transparente.
12. Descartar sobrenadante y agregar fijador ajustando turbidez del boton celular.
13. Extender 4 o 5 gotas de la preparación sobre una lámina pretratada con fijador a -20°C.

Fuente: Los autores.

Es importante tener en cuenta que el Fijador Carnoy y la Solución Hipotónica deben ser preparados para cada extracción de cromosomas y mantenerse a -20°C y a 37°C respectivamente, para asegurar la calidad de los preparados.

Cabe aclarar que el ajuste de turbidez consiste en diluir el botón celular en Fijador Carnoy fresco de tal manera que la suspensión resultante presente una concentración celular adecuada, es decir que no esté muy concentrada (suspensión blanca) ni muy diluida (transparente).

3.2.2.2. Optimización del cultivo para análisis de fragilidad cromosómica

Para la evaluación de fragilidad cromosómica se optimizó la técnica de cultivo convencional descrita anteriormente, con cambio de medio RPMI 1640 por medio TC-199, en relación a lo descrito en el manual de procedimientos de citogenética humana del Instituto Nacional de Salud de Colombia(8), como se presenta en la tabla 7.

Para la optimización del cultivo de fragilidad cromosómica se realizaron 2 ensayos por triplicado: I) Siembra y cosecha de acuerdo al protocolo de referencia de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; II) Siembra y cosecha acorde al protocolo optimizado para el cultivo convencional de linfocitos descrito anteriormente (Tablas 5 y 6).

Los preparados cromosómicos goteados en láminas portaobjetos se evaluaron al microscopio invertido en objetivos de 10X y 40X, se tiñeron con la coloración de Giemsa y finalmente se evaluaron en microscopio óptico en objetivos de 10X y 100X.

Tabla 7. Protocolo de siembra para cultivo de fragilidad cromosómica en medio TC-199.

PROTOCOLO DE CULTIVO PARA ANALISIS DE FRAGILIDAD OPTIMIZADO
Siembra
1. Adicionar 3.5ml de medio de cultivo TC-199.
2. Adicionar 35µl de solución de antibióticos (2%).
3. Adicionar 500µl de suero fetal bovino (12,5%).
4. Adicionar 75µl de fitohemaglutinina.
5. Adicionar 1000µl de sangre heparinizada.
6. Adicionar 127µl de Mitomicina C.
7. Incubar la preparación por 72 horas a 37°C.
Cosecha
1. Agregar 200µl de colchicina por 30 minutos a 37°C.
2. Centrifugar a 2200 RPM durante 10 minutos y descartar el sobrenadante.
3. Adicionar 5ml de solución hipotónica (KCl) a 37°C por 30 minutos.
4. Agregar 1ml de fijador Carnoy.
5. Centrifugar a 2200 RPM durante 10 minutos y descartar el sobrenadante.
6. Agregar 4ml de fijador, resuspender el boton celular e incubar a -20°C durante 20 minutos.
7. Agregar 3ml de fijador, resuspender el boton celular e incubar a -20°C durante 10 minutos.
8. Centrifugar a 2200 RPM durante 10 minutos y descartar el sobrenadante.
9. Agregar 4ml de fijador y resuspender el boton celular.
10. Centrifugar a 2200 RPM durante 10 minutos y descartar el sobrenadante.
11. Repetir los pasos 9 y 10 de dos a tres veces hasta obtener un sobrenadante transparente.
12. Descartar sobrenadante y agregar fijador ajustando turbidez del boton celular.
13. Extender 4 o 5 gotas de la preparación sobre una lámina pretratada con fijador a -20°C.

Fuente: Los autores.

Para comprobar la eficacia del método se utilizó como agente inductor de fragilidad en las muestras de la población control, Mitomicina C (MMC), un agente clastógeno inductor de aberraciones en el ADN, utilizado en citogenética para inducción de fragilidad cromosómica(29).

Se sembraron 4 cajas de cultivo: 2 de medio RPMI 1640 y 2 de medio TC-199, adicionando 1,27 μ l de MMC en el momento de la siembra a una de las cajas de cada medio (tabla 7), dejando las otras dos bajo las condiciones de siembra convencionales (control negativo de fragilidad).

Una vez pasadas las 72 horas de incubación se realizó el proceso de cosecha y se analizaron los preparados cromosómicos obtenidos en microscopio óptico, posterior al proceso de tinción con colorante Giemsa.

3.2.2.3. Tinción de Giemsa

La optimización de la técnica de coloración empleada, se realizó a partir de las láminas resultantes del proceso de cosecha de los ensayos de optimización del cultivo convencional de linfocitos.

Para la tinción de Giemsa se siguió el protocolo del Manual de Prácticas de Genética de la Universidad Autónoma de México con respecto a la exposición de los preparados cromosómicos durante 10 minutos a una solución de Giemsa al 8% diluida en buffer Sorensen pH 6,8 (2ml de solución madre de Giemsa para cada 25ml de preparación) y posterior lavado con agua de grifo para retirar el excedente de colorante (54,55).

La solución buffer pH 6.8 se elaboró a partir de una mezcla de solución A (KH_2PO_4) y solución B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en partes iguales, de acuerdo a lo descrito en el manual de procedimientos de citogenética humana del Instituto Nacional de Salud(8) y el grupo de Radiooncología del Centro Alemán de Investigación del Cáncer (56); el cual fue verificado por medio de un pH-metro.

3.2.4. Bando G

Se optimizó la técnica de bando G de acuerdo al protocolo establecido en la Universidad Autónoma de México(58), consistente en un tiempo de exposición de 10 segundos en tripsina diluida al 0.025% en solución salina, con posterior lavado con agua de grifo.

Una vez tripsinizadas las láminas portaobjetos se sometieron al proceso de tinción optimizado en el estudio, con colorante de Giemsa por 20 minutos, se enjuagaron nuevamente y se dejaron secar al ambiente, para su posterior evaluación en microscopio óptico.

4. RESULTADOS

4.1. OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CULTIVO DE LINFOCITOS PARA OBTENCIÓN DE CROMOSOMAS

4.1.1. Optimización del Cultivo convencional de linfocitos

Volumen de sangre

Como primer ensayo para la optimización del cultivo convencional de linfocitos se determinó la cantidad de metafases obtenidas en relación al volumen de sangre periférica empleado en el proceso de siembra. Los volúmenes de muestra evaluados fueron 600µl, 800µl y 1000µl, sembrados bajo las condiciones de cultivo mencionadas anteriormente, con adición de 50µl de Fitohemaglutinina y 300µl de Suero Fetal Bovino.

Se determinó la presencia de metafases en los preparados cromosómicos evaluándolos al microscopio invertido, seguido de un proceso de tinción con colorante de Giemsa, de acuerdo al protocolo de referencia descrito en la metodología para este fin. Las preparaciones coloreadas se evaluaron en microscopio óptico para la determinación del índice mitótico (IM), como indicador del grado de proliferación celular, teniendo en cuenta la relación existente entre el número de células en división respecto al número total de células por campo óptico en objetivo de 10X.

Tabla 8. Optimización del volumen de sangre acorde al grado de proliferación celular.

Optimización del volumen de sangre		
Volumen de muestra (µl)	N° Celulas en división	Indice Mitotico (%)
600	4	8
800	9	18
1000	15	30

Fuente: Los autores.

Se determinó como volumen ideal a sembrar en el medio de cultivo 1000µl de sangre periférica, por su asociación a un mayor grado de proliferación celular (IM 30%) con respecto a los demás volúmenes evaluados en este ensayo, como se evidencia en la tabla 8.

Fitohemaglutinina (PHA)

Para establecer la cantidad de mitógeno óptimo para la proliferación de linfocitos, se realizaron 3 ensayos bajo las mismas condiciones de cultivo, con adición de 300 μ l de SFB y 1ml de sangre periférica, variando en cada uno la cantidad de PHA (50 μ l, 75 μ l y 100 μ l). Los preparados cromosómicos se evaluaron y se tiñeron como se describió anteriormente, enfocándose en la cantidad de células en división obtenidas en relación a la cantidad de mitógeno. En la tabla 9 se muestra el número de células en división observadas en promedio por campo en objetivo de 10X, para los 3 volúmenes de fitohemaglutinina evaluados, así como el índice mitótico obtenido para los mismos, evidenciando una relación directamente proporcional entre el volumen de reactivo y el grado de proliferación por preparación, siendo mayor con adición de 100 μ l de PHA.

Tabla 9. Optimización de la cantidad de mitógeno (PHA) acorde al grado de proliferación celular.

Optimización del mitógeno (PHA)		
Volumen de PHA (μ l)	N° Celulas en división	Indice Mitotico (%)
50	14	28
75	19	38
100	23	46

Fuente: Los autores.

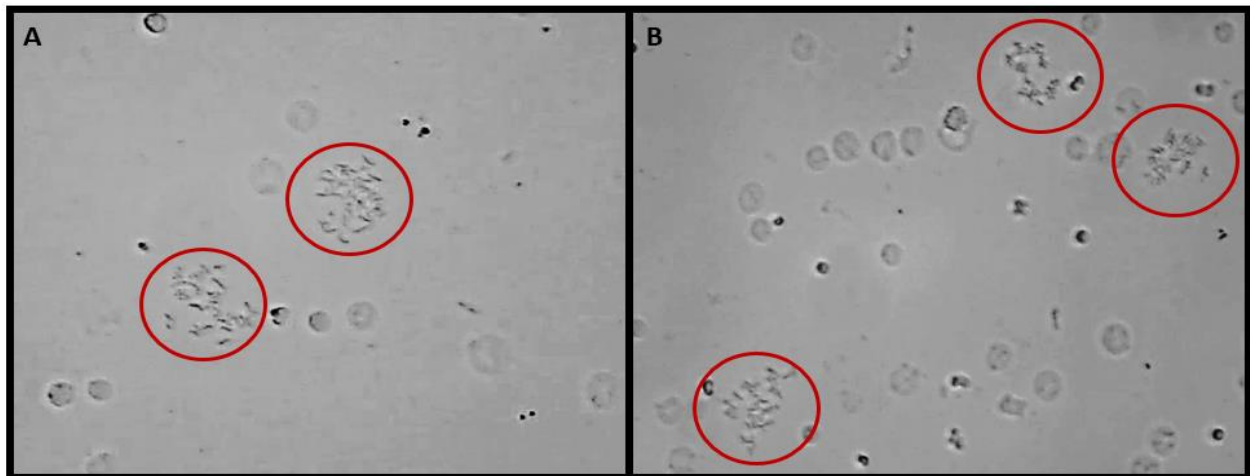


Figura 6. Preparados cromosómicos observados al microscopio invertido en objetivo de 10X con distintas cantidades de PHA. **A.** fitohemaglutinina en cantidad de 75 μ l. **B.** fitohemaglutinina en cantidad de 100 μ l. Fuente: Los autores.

De igual manera se observó que la cantidad de reactivo influye directamente en el grado de aglutinación de las células obtenidas en el cultivo, así como de partículas que generan ruido en las láminas portaobjetos, por lo cual a pesar de ser 100 μ l la cantidad de PHA con mayor efecto de inducción de ciclo celular en los linfocitos, también es la que produce en mayor cantidad este efecto secundario; por tal razón se estableció como cantidad de mitógeno a utilizar 75 μ l de PHA, teniendo en cuenta el buen grado de estimulación de linfocitos y la ausencia de aglutinación en los preparados obtenidos (ver figura 6).

Suero fetal bovino

Los cultivos previos con adición de 300 μ l de SFB mostraron un desarrollo *in vitro* aceptable de los linfocitos en relación a parámetros de tamaño y densidad celular. Con la finalidad de mejorar dichas condiciones se realizaron 2 ensayos para evaluar cantidades de 300 μ l y 500 μ l de SFB, proporcionando en ésta última una mayor cantidad de factores de crecimiento al medio de cultivo.

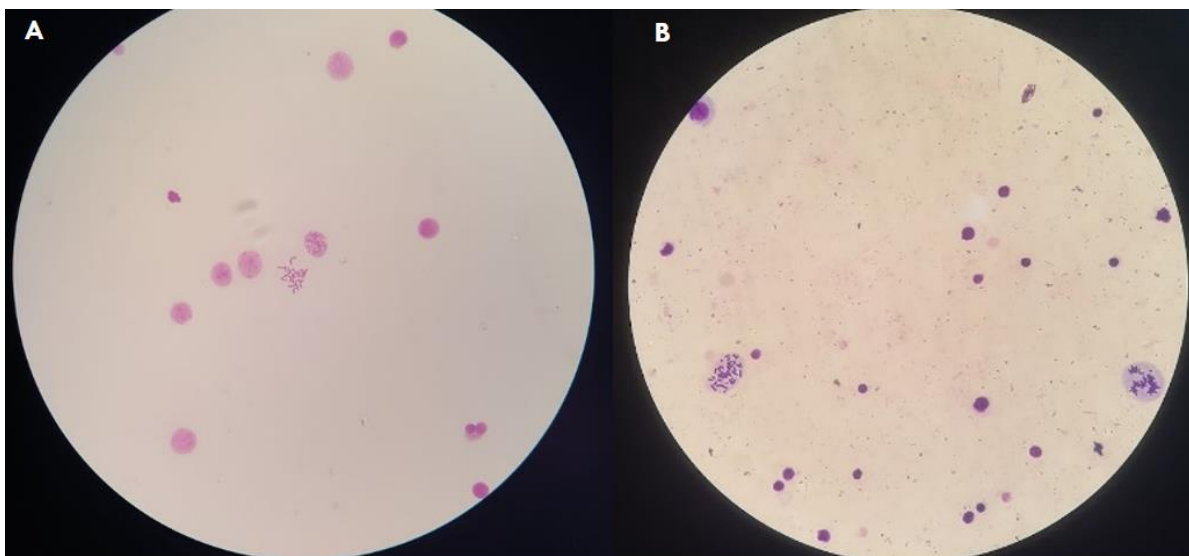


Figura 7. Preparados cromosómicos observados en objetivo de 40x obtenidos en medio RPMI-1640 con diferentes cantidades de Suero Fetal Bovino. **A.** 300 μ l SFB **B.** 500 μ l SFB. Fuente: Los autores.

Una vez cosechados y goteados en láminas portaobjetos, la evaluación al microscopio reflejó un mejor desarrollo celular en los cultivos con adición de 500 μ l de SFB (ver figura 7), por lo cual se estableció como el volumen ideal para suplementar el medio RPMI 1640, correspondiente a un suplemento del 12,5% con respecto al volumen total (4ml).

Colchicina

En los ensayos anteriores se evidenció un proceso eficaz de proliferación y detención del ciclo celular en etapa de metafase, reflejando un buen desempeño de la colchicina en la cantidad a la que fueron expuestos los cultivos a las 72 horas de incubación (200 μ l), sin embargo en los preparados resultantes de los mismos se observaron cromosomas de tamaño reducido que presentaban cromátides separadas en algunas metafases (ver figura 8).

Por lo anterior se realizaron 2 ensayos para evaluar el efecto de tiempos de exposición de 20 minutos y 30 minutos sobre la resolución de los cromosomas resultantes. Una vez goteados los portaobjetos se tiñeron y evaluaron con enfoque a la calidad de metafases obtenidas, encontrando que los cromosomas procedentes del cultivo con 30 minutos de exposición a colchicina se observaron más uniformes y de mayor tamaño con respecto a los resultantes de la exposición a 20 minutos del reactivo (figura 8).

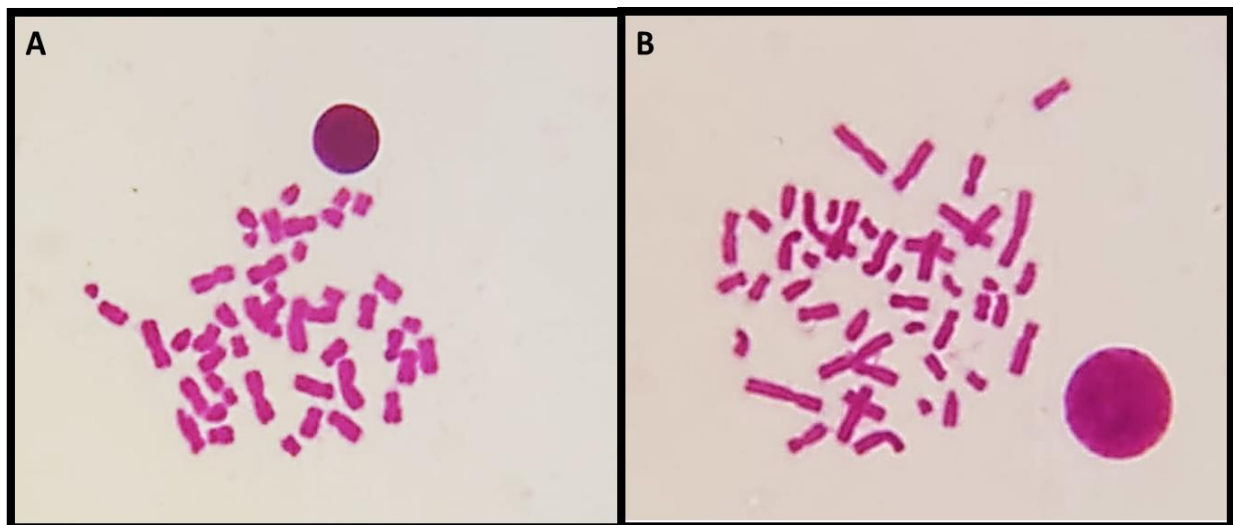


Figura 8. Metafases obtenidas a partir de tiempos distintos de exposición a Colchicina **A.** 20 minutos **B.** 30 minutos. Fuente: Los autores.

Solución hipotónica

En los preparados cromosómicos obtenidos en los ensayos anteriores, se evidenció la presencia de restos de membrana celular y de eritrocitos, a causa de un efecto insuficiente de la solución hipotónica (KCl 0.075M). Por lo anterior se decidió optimizar el proceso de choque hipotónico, evaluando la calidad de las metafases obtenidas a partir de muestras sometidas a 3 tiempos de

exposición diferentes a ésta solución (20, 25 y 30 minutos), utilizando en los 3 ensayos una temperatura de incubación de 37°C.

En la evaluación de las láminas obtenidas se observó una mejor distribución de los cromosomas en el campo microscópico conforme se aumentó el tiempo de exposición, siendo óptimas para análisis las metafases resultantes en el ensayo de 30 minutos de incubación en presencia de solución hipotónica, debido a la baja cantidad de cruces entre cromosomas y la ausencia de membrana celular, de igual manera se observó para este caso mayor eficacia de lisis celular, con respecto a los demás tiempos de exposición (ver figura 9).

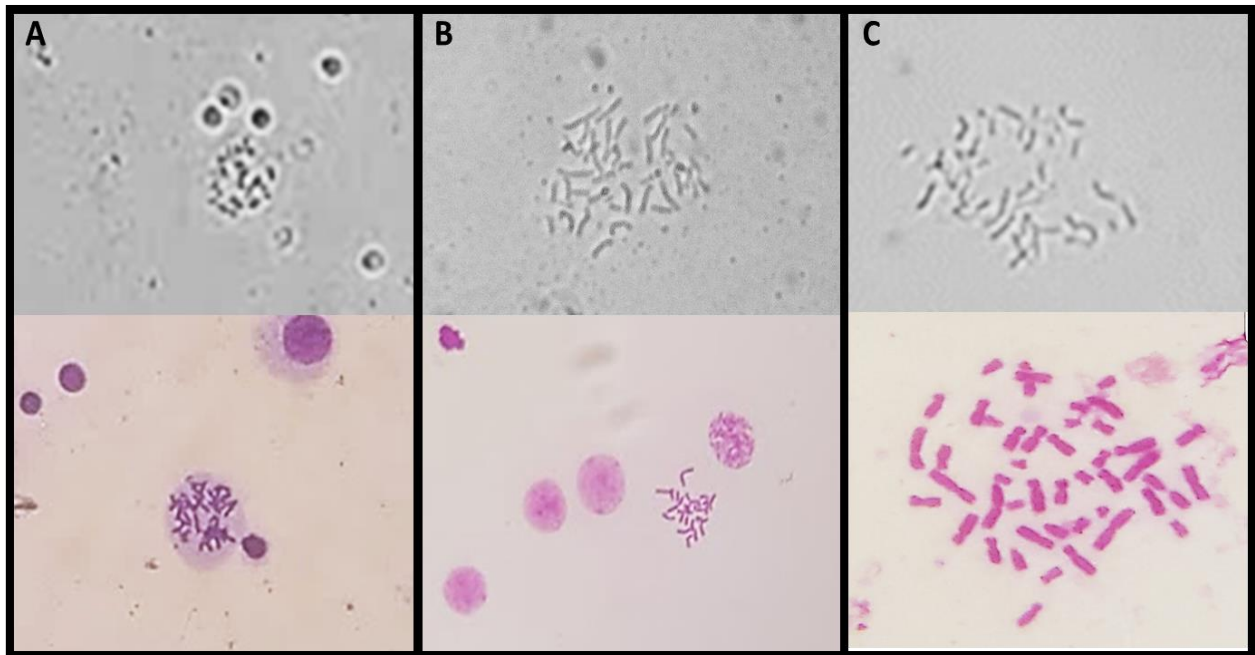


Figura 9. Cambios en el tiempo de incubación en presencia de solución hipotónica. **A.** 20 min de exposición a KCl **B.** 25 min de exposición a KCl **C.** 30 min de exposición a KCl. Fuente: Los autores.

Fijador Carnoy

En las etapas de cosecha de ensayos previos se realizó el proceso de shock térmico y fijación en presencia de fijador Carnoy en una sola fase, con la adición de 1ml de este reactivo una vez pasada la incubación en solución hipotónica, seguido de 20 minutos de incubación de las muestras a -20°C. En estas condiciones se obtuvieron resultados aceptables con respecto a la cantidad de

células fijadas en los portaobjetos y efectos indeseados ya mencionados como restos de membranas y de eritrocitos.

En consecuencia se decidió separar los procesos mencionados, llevando las muestras a un ciclo de centrifugación a 2200 rpm por 10 minutos una vez pasado el tiempo en solución hipotónica y agregado 1ml de fijador, descartando luego el sobrenadante y realizando posteriormente el proceso de fijación dividido en 2 pasos: I) adición de 4ml de fijador, re suspensión del botón celular e incubación durante 20 minutos a -20°C y II) adición de 3ml de fijador, re suspensión del botón celular e incubación durante 10 minutos adicionales a -20°C.

Para ambos ensayos se realizaron tres ciclos de lavado del botón celular obtenido con 5 ml de fijador Carnoy y posterior centrifugación a 2200 rpm por 10 min, hasta la obtención de un sobrenadante transparente.

Como resultado se obtuvieron preparados cromosómicos más limpios, con mayor número de células fijadas y ausencia de membranas celulares y eritrocitos, a causa de un efecto sinérgico entre los procesos optimizados de shock hipotónico y shock térmico.

Tabla 10. *Proceso de shock térmico y fijación*

SHOCK TERMICO Y FIJACIÓN (FIJADOR CARNOY)
1ml fijador - centrifugación 2200 rpm 10 min
4ml fijador - incubación 20 min -20°C
3ml fijador - incubación 10 min -20°C
Centrifugación 2200 rpm 10 min
3 ciclos de lavado (4ml de fijador y centrifugación 2200 rpm 10 min)

Fuente: Los autores.

Los parámetros optimizados en el cultivo convencional de linfocitos para la obtención de metafases se resumen en la tabla 11.

Tabla 11. *Protocolo de cultivo convencional de linfocitos optimizado*

RPMI 1640	PHA	SFB	AB	SANGRE	INCUBACIÓN	COLCHICINA	KCl 0.075 M
3.5ml	75µl	500µl	35µl	1 ml	72h - 37°C	200µl - 30 min	6ml - 30 min

RPMI 1640= medio de cultivo, PHA= fitohemaglutinina, SFB Suero Fetal Bovino, AB/AM= Antibiótico/Antimicótico

Fuente: Los autores.

4.1.2. Optimización de la Tinción de Giemsa

En un primer ensayo, se observó una coloración con una tonalidad rosa, obtenida a partir del seguimiento del protocolo con tiempo de tinción correspondiente a 10 minutos(54) y la formulación para la solución de trabajo de Giemsa al 8% en buffer fosfato de pH 6.8(55), tomados como punto de partida para este proceso, como se describe en la metodología. Teniendo en cuenta la necesidad de disolver la solución madre de colorante Giemsa en una solución buffer con pH 6.8 para la tinción de cromosomas(55,57), se realizó la medición de este parámetro al buffer Sorensen preparado en el anterior ensayo, correspondiente a un pH de 6,5.

Para la tinción de láminas de los siguientes ensayos se preparó la solución de trabajo de Giemsa al 8% con el buffer fosfato a pH 6.8 ajustado y se dejó en contacto con las láminas en el mismo tiempo de exposición empleado anteriormente. En la observación al microscopio óptico se evidenció una mejor calidad del proceso de tinción con la observación de metafases en tonalidades violáceas.

Finalmente en ensayos siguientes, se realizó la evaluación de dos tiempos de exposición para el proceso de tinción (10 minutos y 20 minutos), bajo las mismas condiciones utilizadas previamente, observando una tinción más uniforme en las láminas sometidas a 20 minutos de contacto con el colorante, como se evidencia en la figura 10.

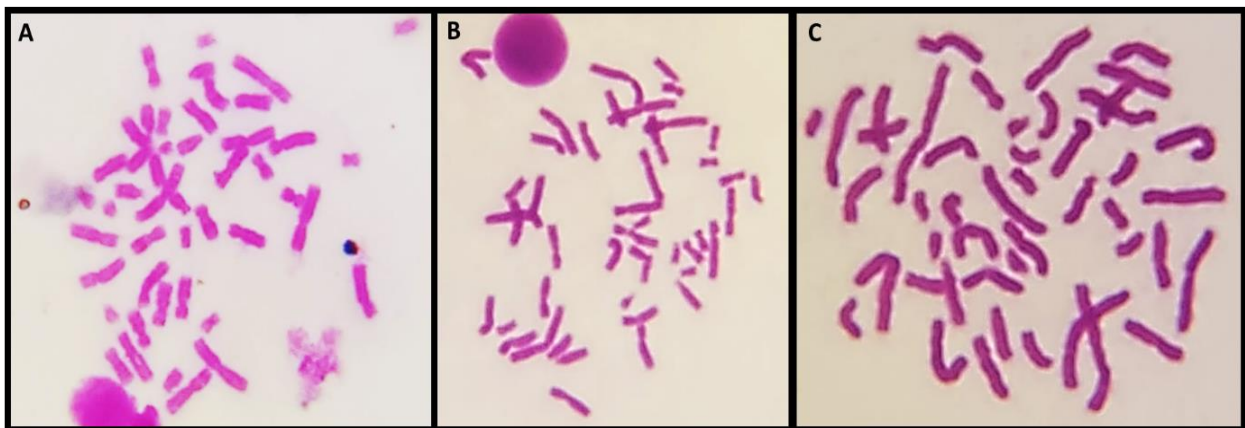


Figura 10. Optimización del protocolo de coloración con Giemsa **A.** Giemsa al 8% en buffer Sorensen pH 6,5 (10 minutos) **B.** Giemsa al 8% en buffer Sorensen pH 6,8 (10 minutos) **C.** Giemsa al 8% en buffer Sorensen pH 6,8 (20 minutos). Fuente: Los autores.

4.1.3. Optimización de Bando G con tripsina (GTG)

Siguiendo el protocolo descrito en la metodología, se evidenció en las metafases resultantes del proceso de bandedo GTG un patrón de bandas atípico de los cromosomas con baja resolución (figura 11 A), por lo cual se decidió evaluar el efecto de un tiempo de exposición mayor a la digestión proteica causada por la tripsina.

En un segundo ensayo las láminas se sometieron al mismo protocolo de bandedo descrito, cambiando únicamente la etapa de tripsinización a 20 segundos, mostrando mejores resultados en cuanto a la resolución y calidad de bandas presentes en los cromosomas, como se evidencia en la figura 11 B, permitiendo la identificación clara de los 23 autosomas y los dos cromosomas sexuales.

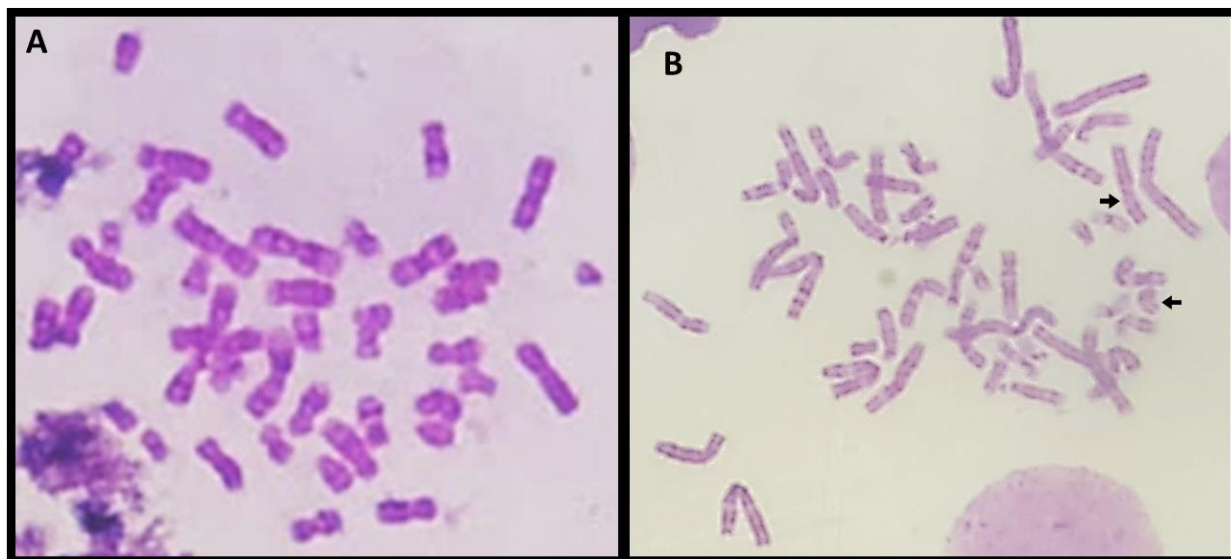


Figura 11. Estandarización de bandedo G. Preparados cromosómicos obtenidos a partir de cultivo de linfocitos de sangre periférica, sometidos a contacto con tripsina a diferentes tiempos. A. Tripsinización 10 segundos B. Tripsinización 20 segundos. Fuente: Los autores.

4.2. OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO PARA EVALUACIÓN DE FRAGILIDAD CROMOSÓMICA

En los ensayos planteados para la optimización del cultivo de análisis de fragilidad, se realizó un único cambio puntual en los protocolos, referente a la utilización de medio TC-199 en reemplazo de RPMI 1640; un medio deficiente en folatos ideal para la expresión de sitios frágiles.

En las láminas obtenidas como resultado del primer ensayo siguiendo el protocolo existente en la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, se observó un bajo grado de proliferación y de obtención de metafases, así como una mala distribución de los cromosomas en el espacio y un tamaño reducido de los mismos dificultando su análisis. En contraste la adecuación en medio TC-199 del protocolo de cultivo convencional de linfocitos optimizado en el estudio, reflejó resultados satisfactorios, obteniendo metafases de buena calidad en cuanto a tamaño distribución y número, por lo que la modificación de tiempos de exposición o volúmenes de reactivos para este caso no se realizó.



Figura 12. Metafases obtenidas en medio TC- 199. Fuente: Los autores.

4.2.1. Inducción de fragilidad y resultados de la coloración con Giemsa

Partiendo del protocolo optimizado para análisis de fragilidad descrito previamente, se hizo necesaria la inducción de expresión de sitios frágiles en las muestras de sangre periférica procedentes de la población control utilizando MMC, que permitiese la visualización de los mismos en los preparados obtenidos a partir del cultivo en medio TC-199 y demostrase la eficacia del método a través de un control positivo.

Las láminas resultantes de los cultivos con adición de MMC se observaron en busca de metafases, con especial enfoque a la observación de sitios frágiles o rupturas notorias, las cuales se evidenciaron en ambos cultivos como se muestra en la figura 13, mientras que en los cultivos sin

adición del mutágeno la totalidad de las metafases observadas se encontraban integras con respecto a su estructura.

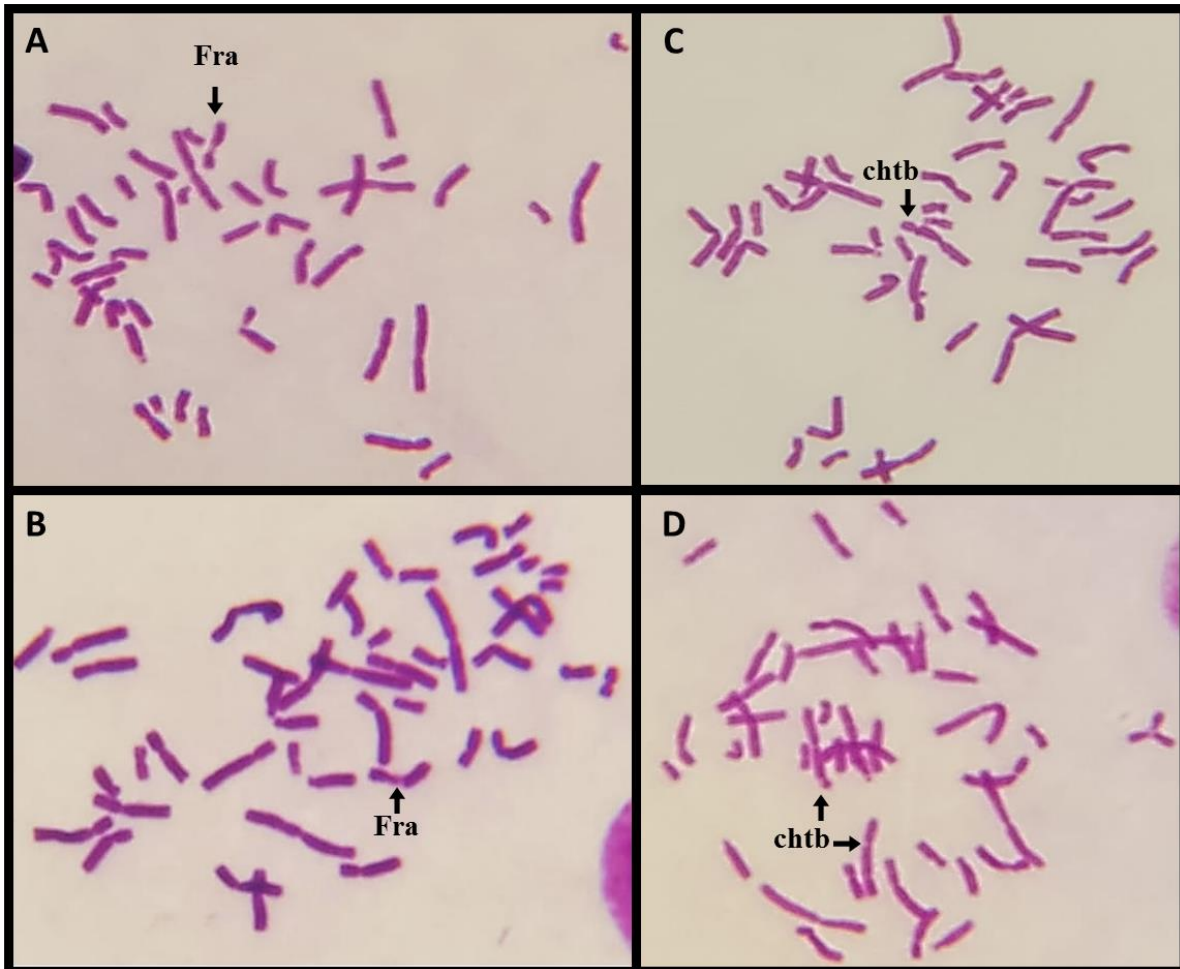


Figura 13. A y B. fragilidad (*Fra*) y C y D. rupturas cromosómicas (*chtb*) inducidas en medio TC-199 con adición de mitomicina C. Fuente: Los autores.

4.3. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE REFERENCIA PARA EL SXF

Con el fin de seleccionar una población de referencia con características afines al SXF, se aplicó una encuesta enfocada a la obtención de información personal y familiar, contrastada con los criterios de inclusión y exclusión para la selección de los participantes que pudieran ser candidatos de presentar déficit cognitivo asociado a fragilidad en el cromosoma X.

Cabe resaltar que para hacer uso de esta información cada persona que participo en el estudio acepto y firmo un consentimiento informado en el que se le explico el tratamiento confidencial de datos (anexo 1).

Para la selección y caracterización de la población se realizaron encuestas a 23 familias pertenecientes al programa de inclusión de un Colegio del sur de Bogotá cuyos niños presentan distintos tipos de deficiencias; de las cuales solo 11 cumplían con los criterios asociados a déficit cognitivo para estudio de fragilidad en el cromosoma X.

Cabe aclarar que se analizaron en total los antecedentes familiares y características fenotípicas de 25 infantes, considerando que 3 de ellos eran hermanos pertenecientes a la misma familia (F9).

Teniendo en cuenta que el SXF es una de las principales causas etiológicas de tipo hereditario de la deficiencia cognitiva, la encuesta realizada se dirigió a obtener información relacionada con procesos cognitivos, habilidades de comprensión y estilos de pensamiento que se han relacionado directamente con los procesos de aprendizaje.

De la población analizada el 16% de los individuos (4/25) fueron del género femenino y el 84% del género masculino (21/25). Al analizar las diferentes deficiencias en la población, se encontró que la mayoría de los encuestados reportaron dos o más deficiencias, obteniéndose así un total de 52 respuestas; de las cuales un 38% reflejó deficiencia cognitiva como condición base, correspondiente a un 80% de la población (20/25), siendo la principal característica de interés por su asociación al SXF (ver figura 14).

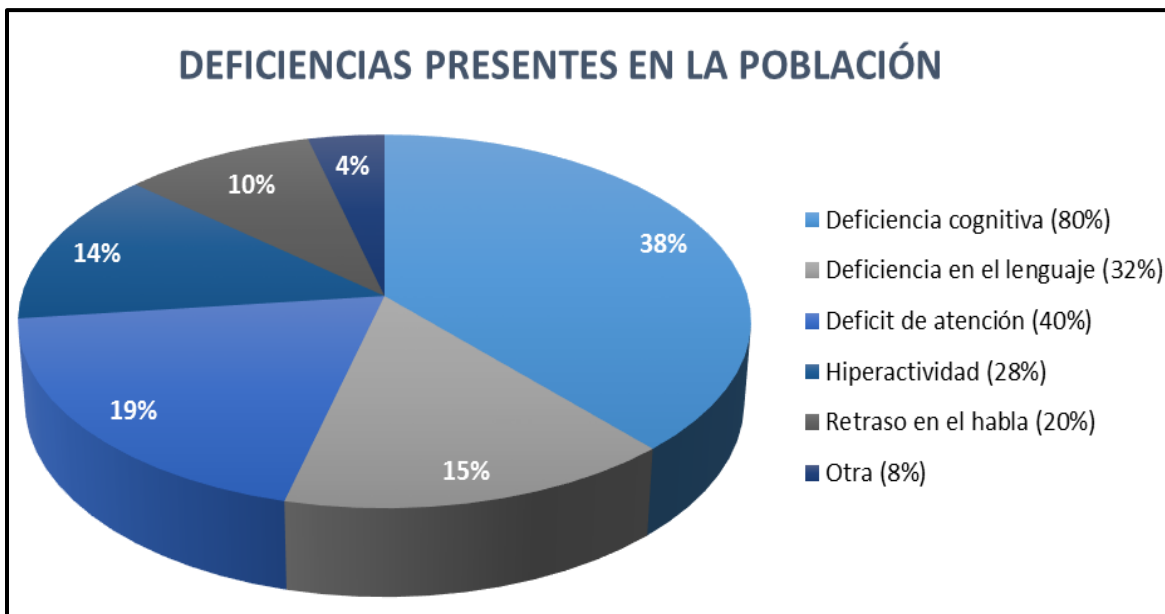


Figura 14. Tipos de deficiencias presentes en la población de niños del “Colegio Ciudad de Bogotá”. Fuente: Los autores.

De igual manera las familias encuestadas refirieron la existencia de deficiencias tales como deficiencia en el lenguaje en un 15%, déficit de atención en un 19%, hiperactividad en un 14% y retraso en el habla en el 10% de los casos; reflejando la existencia de las mismas en un 32%(8/25), 40%(10/25), 28%(7/25) y 20%(5/25) de la población respectivamente; deficiencias que adquieren impacto en el estudio puesto que son comportamientos relacionados con la presencia del síndrome (ver figura 14).

Por otro lado, se observó que un 4% de las respuestas se refirieron a otros tipos de condiciones no relacionadas tales como deficiencia de la hormona de crecimiento o bajo rendimiento escolar a causa de alteraciones ya diagnosticadas (epilepsia, discapacidades motoras, parálisis cerebral espástica, entre otras), correspondientes a un 8% de la población (2/25) (ver figura 14).

Así mismo se indagó sobre las características presentes durante el desarrollo relacionadas con el SXF, obteniendo así 28 respuestas asociadas. El retraso al caminar, gatear o voltearse, fue la característica predominante referida en un 64% de las respuestas, seguida de palmotear o morderse las manos en un 22% y articulaciones flexibles en un 7%; lo cual reflejó la presencia de las mismas durante el desarrollo del 72% (18/25), 24%(6/25) y 8% de la población (2/25) respectivamente, permitiendo inferir una posible correlación con patrones presentes en el SXF, ideales para estudios de fragilidad cromosómica (ver figura 15).

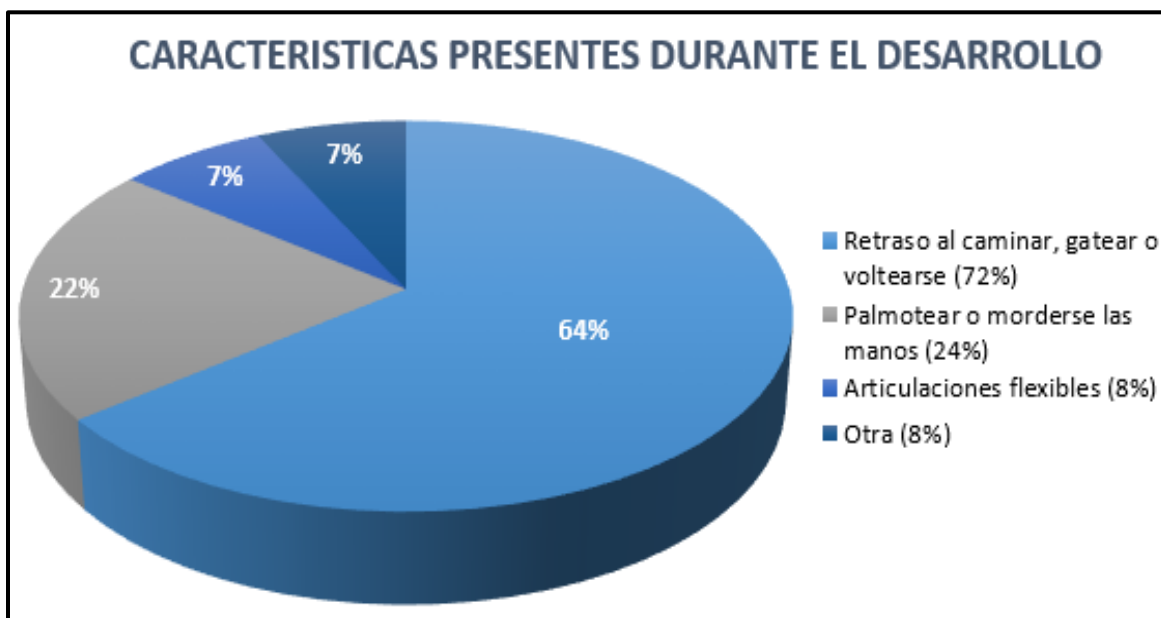


Figura 15. Características fenotípicas presentes durante el desarrollo-primera infancia de los niños participantes del estudio. Fuente: Los autores.

El 7% restante de las respuestas hace referencia a otras alteraciones presentadas durante el desarrollo, correspondientes al 8% de la población (2/25) que no presenta signos de interés en el estudio (ver figura 15).

4.1.1. Análisis de la población de estudio

Se seleccionó la población de estudio con 11 de los 20 individuos que presentaban déficit cognitivo, teniendo en cuenta que fueron excluidos 9 de ellos en la entrevista personal realizada a sus familias, por falta de conocimiento de antecedentes familiares para el análisis genealógico.

Una vez delimitada la población, se procedió a observar el número de características presentes (figura 14) en cada uno de los individuos objeto de estudio de cada familia (F1-F11), para analizar cuáles de ellos tienen un mayor grado de asociación al SXF de acuerdo al fenotipo presentado.

El mayor número de características se encontró en la familia 7 (F7) generación III individuo 1, correspondientes a déficit cognitivo, déficit de lenguaje, déficit de atención, hiperactividad y retraso en el habla, representando el caso de mayor compatibilidad con el SXF, seguido de la familia 2 (F2) generación III individuo 1, quien presentó 4 de estas características exceptuando el retraso en el habla (ver figura 16).

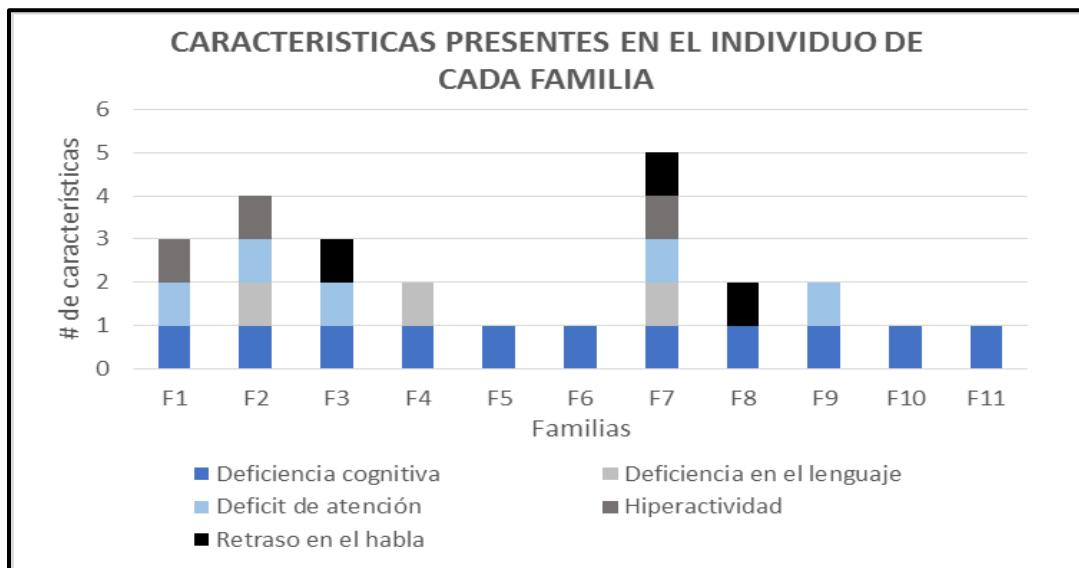


Figura 16. Número de características asociadas a SXF presentes en el individuo de cada familia. Fuente: Los autores.

El individuo 1 generación III familia 1 (F1) y el individuo 1 generación III familia 3 (F3) presentaron ambas 3 características de las evaluadas, coincidiendo en 2 de éstas (déficit cognitivo y de atención). De igual manera en los individuos propósito de las familias 4 8 y 9 (F4, F8 y F9) se observó el mismo número de características siendo la única en común el déficit cognitivo (ver figura 16).

Por otro lado, los individuos propósito en los que se evidenció el menor grado de asociación, corresponden a las familias 5, 6, 10 y 11 (F5, F6, F10 y F11) refiriendo como única característica el déficit cognitivo (ver figura 16).

Así mismo se evaluó el número de manifestaciones presentadas durante la etapa de desarrollo, comprendida desde la gestación hasta la primera infancia, encontrando como característica común a la mayoría de individuos propósito el retraso al caminar, gatear o voltearse, con excepción de los pertenecientes a las familias 2, 5 y 11 (F2, F5 y F11) (ver figura 17).

En el individuo 1 generación III familia 3 (F3) y en el individuo 1 generación 3 familia 10 (F10), se encontró además una característica adicional, correspondiente a palmotear o morderse las manos, presentando el mayor número de manifestaciones asociadas al SXF (ver figura 17).

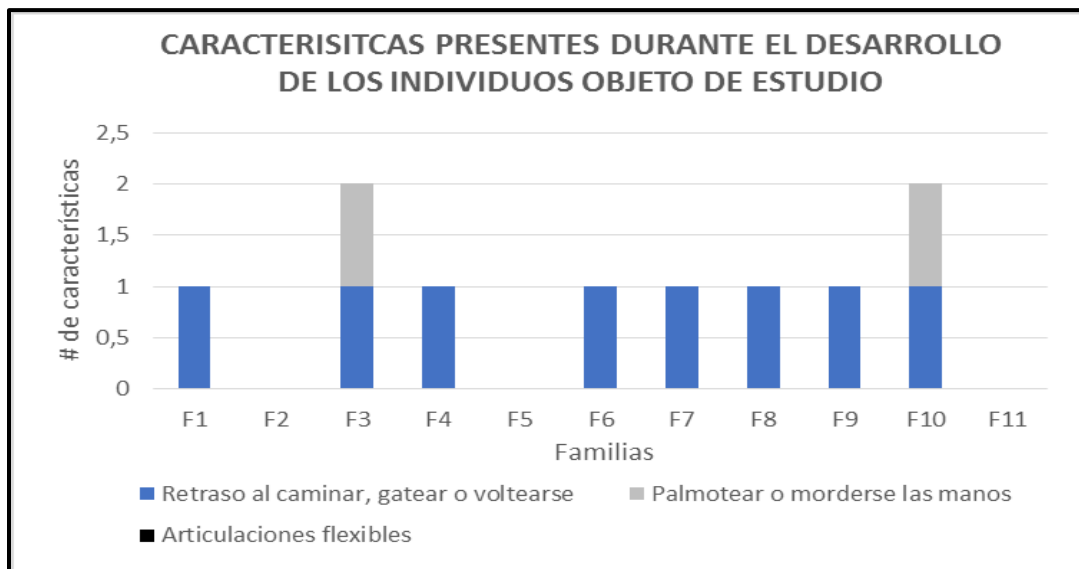


Figura 17. Número de características fenotípicas presentes durante el desarrollo-primera infancia por familia. Fuente: Los autores.

Análisis de genealogías

La evaluación de las 11 genealogías obtenidas se enfocó en la identificación de presencia/ausencia de un patrón de herencia específico para cada caso, dando un indicio puntual del grado de asociación genética con el déficit cognitivo presente en el individuo objeto de estudio de cada familia.

En las familias 1, 2, 3 y 4 (F1-F4) se evidencia la afectación de más de un individuo dentro de la misma generación o en al menos 2 generaciones, según la información obtenida a través de la entrevista realizada a las mismas.

Familia 1

Se sugiere un patrón de herencia dominante en el cual hay un predominio de afectación de individuos del género masculino en las tres generaciones. En la generación I se encontró la existencia de un pariente en primer grado de consanguinidad del abuelo materno que presenta déficit cognitivo, según la información referida por el grupo familiar (Dato no confirmado). De igual manera se observan individuos afectados en la generación II (individuos 12-13-14) y en la generación III (individuo 1), correspondientes a 3 hombres y 1 mujer.

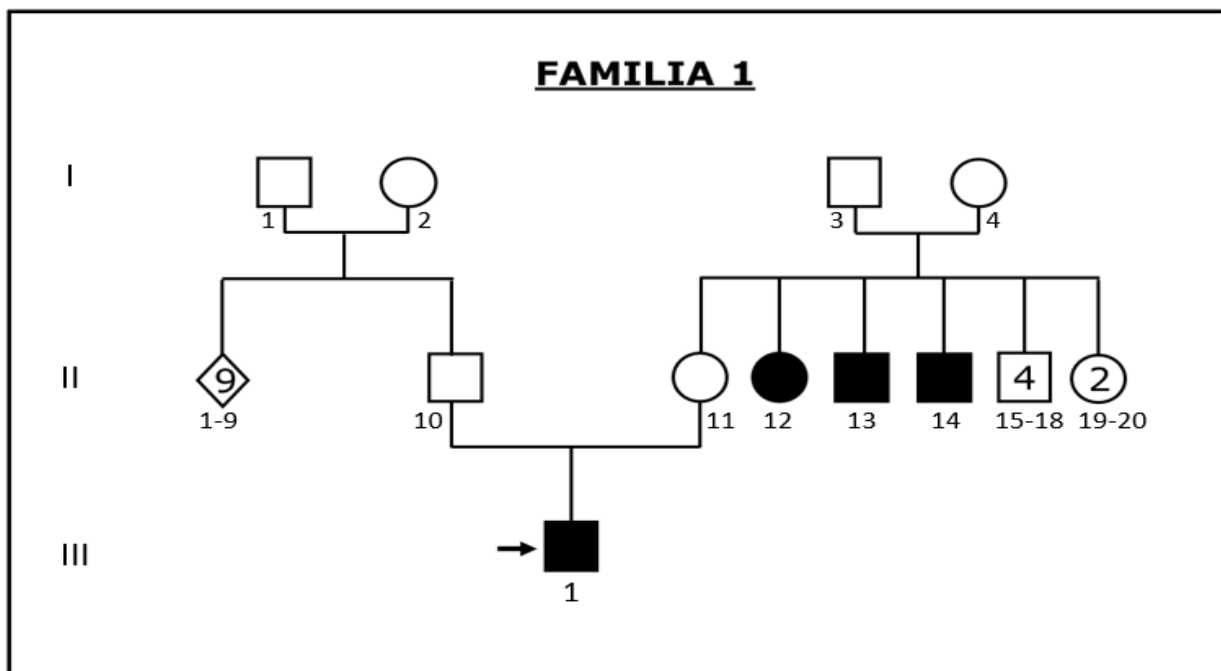


Figura 18. Genealogía Familia 1. Fuente: Los autores.

Familia 2

El análisis de la genealogía permite sugerir un patrón de herencia autosómico recesivo para este caso, debido a la presencia de déficit cognitivo en más de un individuo (generación I individuo 2 y generación III individuos 1 y 5), sin afectación en todas las generaciones, ni predilección respecto al sexo. Por lo anterior se deduce la presencia de individuos portadores, con un alelo mutado, como es el caso del individuo 4, generación I y los individuos 1, 2, 5 y 6 de la generación II.

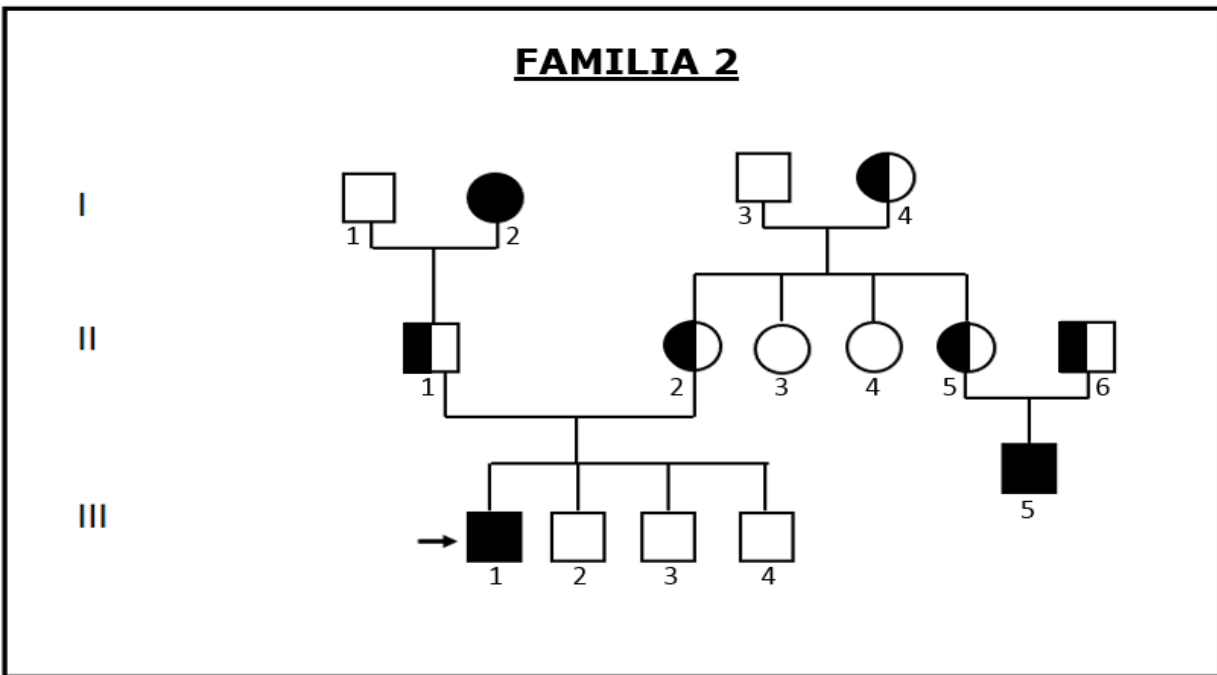


Figura 19. Genealogía Familia 2. Fuente: Los autores.

Se descarta la posibilidad que exista un alelo mutado en el cromosoma X teniendo en cuenta que el individuo 1 de la generación II no presenta afectación alguna, aun cuando hereda estrictamente uno de los cromosomas X de su progenitora (Individuo 2 generación I).

Familia 3

La genealogía de la familia 3 refleja una posible herencia ligada al sexo recesiva, siendo portador el individuo 2 generación I, quien hereda la posible afectación en el cromosoma X al individuo 5 generación II y este a su vez pasa su alelo mutado junto con un alelo mutado de su pareja (individuo 6 generación II) hacia el individuo 1 generación III, expresando este último la deficiencia cognitiva como resultado de la afectación de los 2 cromosomas X.

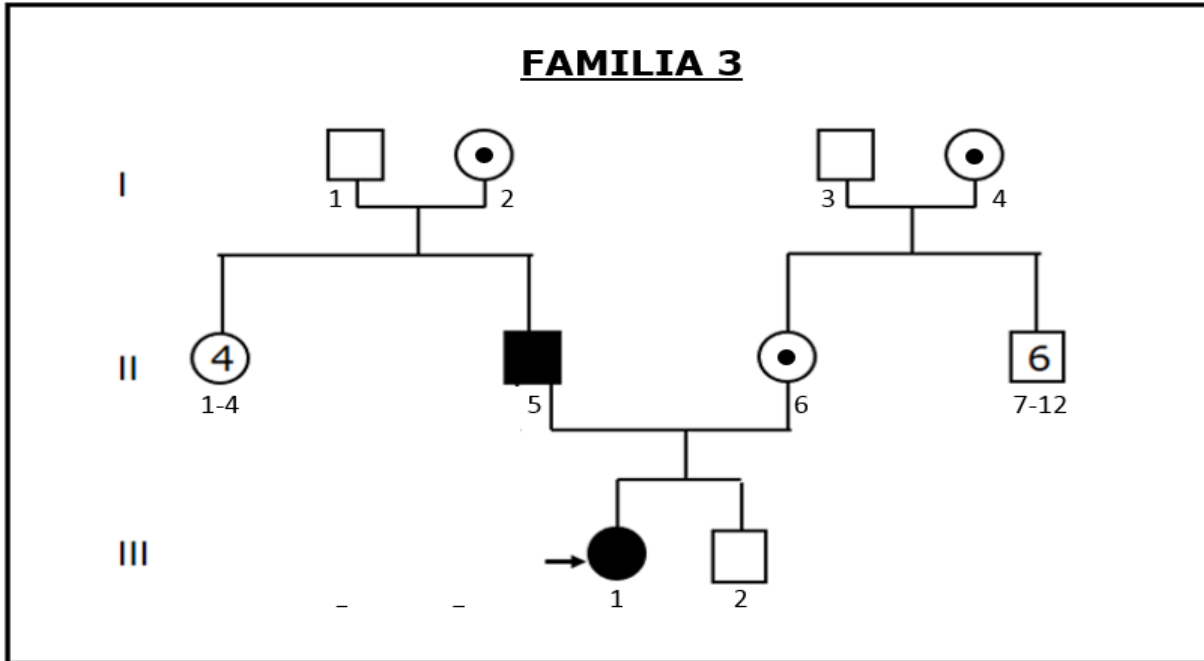


Figura 20. Genealogía Familia 3. Fuente: Los autores.

Familia 4

Se sugiere una herencia de tipo recesiva, con afectación de dos individuos en una sola generación (individuos 1 y 2 generación III), sin evidencia clara de origen autosómico o ligada al sexo, por falta de información referida en la encuesta familiar.

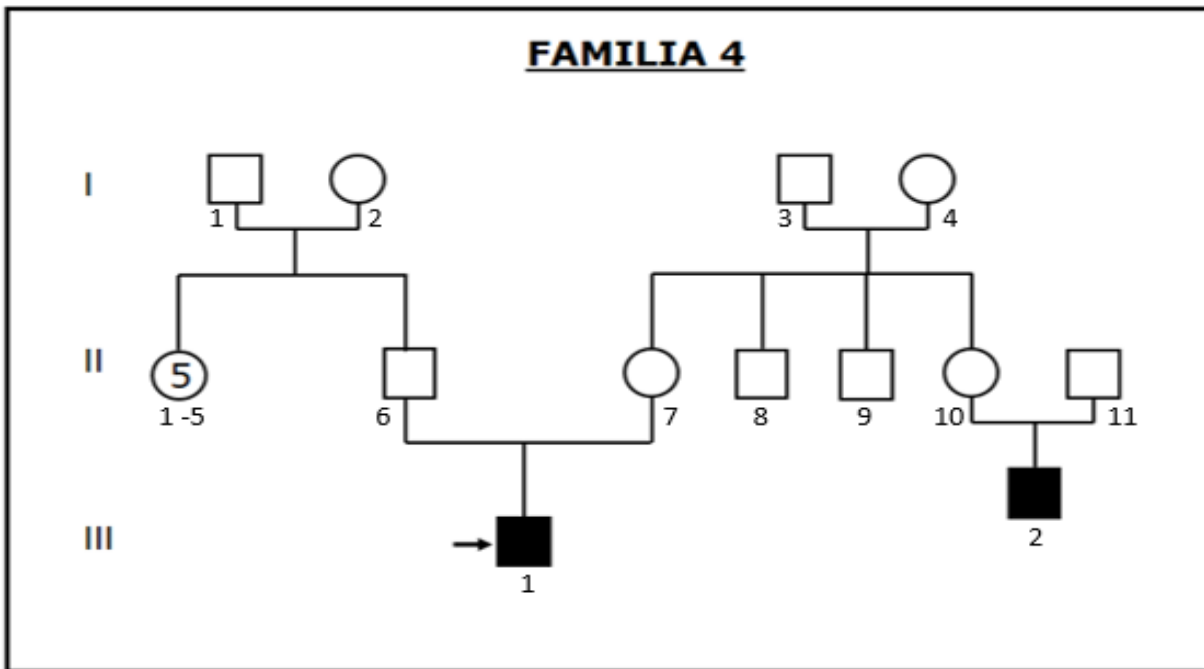


Figura 21. Genealogía Familia 4. Fuente: Los autores.

Familias 5-11

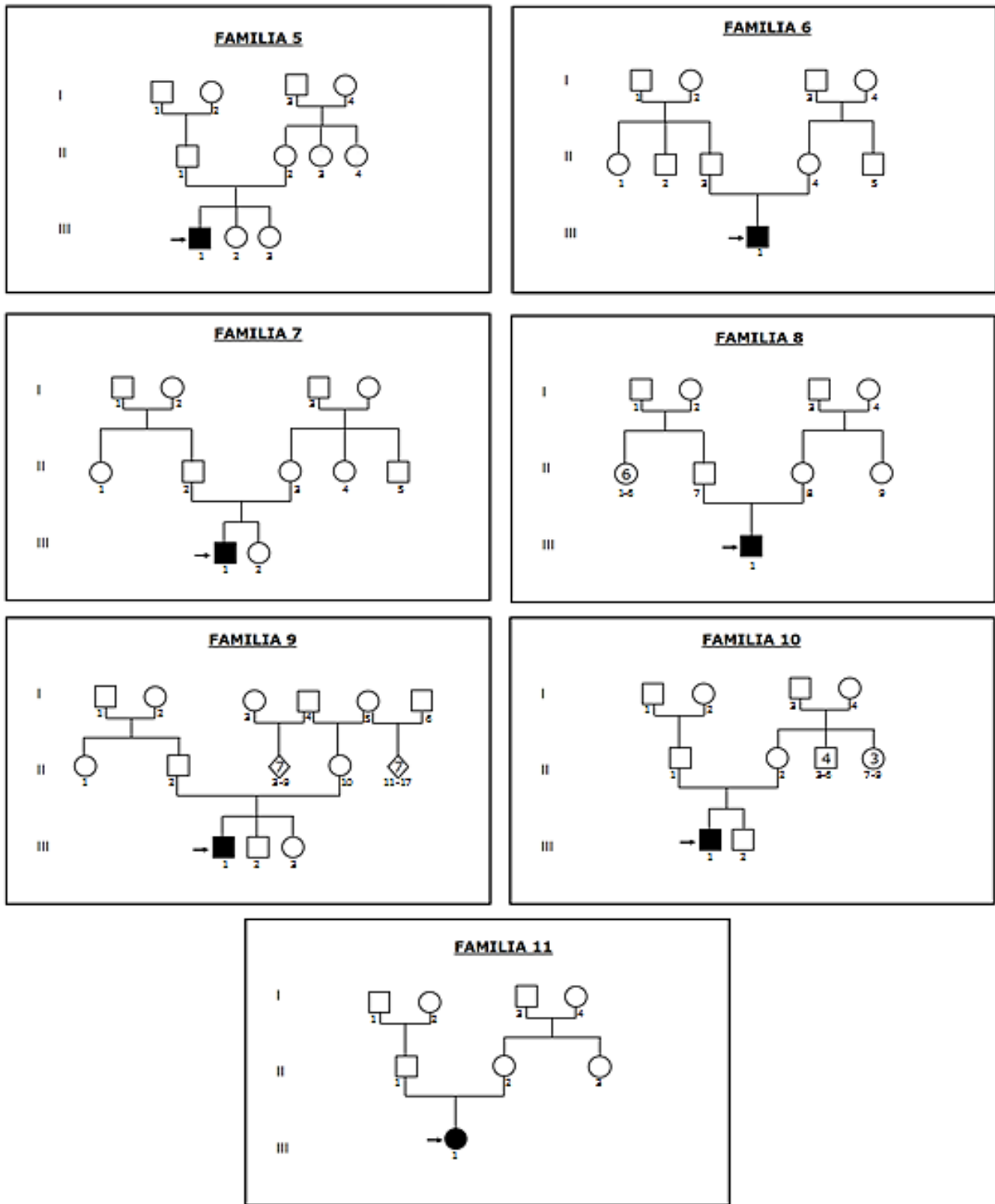


Figura 22. Genealogías con menor grado de correlación genética. Fuente: Los autores.

Las 7 familias restantes, ilustradas en la figura 22, no mostraron un patrón hereditario específico, puesto que solo se observa la presencia del déficit cognitivo en el individuo objeto de estudio de cada caso, sumado a la falta de información familiar adicional a la referida.

Por lo anterior no es posible afirmar, ni descartar con certeza una correlación genética como causa del fenotipo presente, ya que solo se observa en una generación de cada familia, siendo probable la existencia de una causa diferente para el déficit cognitivo en estos casos específicos.

5. DISCUSION

Los hallazgos obtenidos reflejan la correlación existente entre las características abordadas y evaluadas en la población de referencia con el SXF, haciendo énfasis en la deficiencia cognitiva encontrada en un 80% de los casos de estudio, entendida como discapacidad intelectual, que en relación a lo mencionado por varios autores puede tener un origen genético de tipo hereditario causado comúnmente por esta condición (31,34,37,47).

De igual manera a partir de la caracterización y selección de la población se evidenció como principal rasgo presente durante el desarrollo en un 64% de los casos retraso en aprender a caminar, gatear o voltearse, con asociación en menor grado a retraso en el desarrollo de otras funciones psicomotoras, afines con el SXF de acuerdo a lo descrito por Ribate, Pié y Ramos(38).

Los resultados obtenidos de las encuestas y entrevistas realizadas permitieron delimitar una población de referencia con características afines al SXF, evidenciando la importancia del proceso de preselección de individuos, como lo menciona Fernández et al.(10) en su estudio, ya que al tratarse de un síndrome las manifestaciones son variables y no se presentan de igual manera en toda la población. Lo anterior pone de manifiesto la necesidad de indagar no solo los rasgos clínicos del individuo sino también características asociadas al desarrollo y crecimiento del mismo, además de detalles familiares que pueden ser indicativos del grado de asociación genética de cada caso en específico.

Volviendo la mirada a manifestaciones fenotípicas asociadas en menor grado a la población descrita en los resultados presentados, como lo son el déficit del lenguaje, la hiperactividad, el retraso en el habla y comportamientos como morderse las manos; autores como Saldarriaga(15) infieren en que son completamente congruentes al SXF debido a que esta enfermedad es causada por el silenciamiento del gen FMR1 lo cual evita la producción de la proteína FMRP, involucrada en regulación de la estabilidad del ADN, que al verse afectada interfiere en el proceso de codificación de proteínas encargadas de la sinapsis y del desarrollo cerebral causando así discapacidades intelectuales relacionadas con procesos cognitivos y habilidades de comprensión.

Atendiendo estas consideraciones se encontró que independientemente de la asociación de las características mencionadas en la población estudiada correspondiente a niños vinculados al programa de inclusión de un colegio al sur de Bogotá, se hizo necesaria la evaluación de

antecedentes familiares enfocados a identificar posibles patrones de heredabilidad del síndrome, lo cual permitió la elaboración de genealogías por familia para tal fin.

En consecuencia se evidencio en 4 de las 11 familias correspondientes a la población delimitada, la presencia de déficit cognitivo en al menos dos generaciones, infiriendo además la posible existencia de portadores de la condición, asociados a diferentes patrones de herencia no necesariamente ligados al cromosoma X; en contraparte en estudios similares como es el caso del trabajo de investigación realizado por Payan y Saldarriaga(11) se elaboraron de manera similar genealogías a la población de estudio donde se demuestra como resultado un patrón sugestivo de herencia ligada al X en varias generaciones.

Asimismo se determinó la ausencia de un patrón de herencia evidente en las 7 familias restantes de las 11 familias seleccionadas para el estudio, a pesar de presentar características asociadas al síndrome; en consecuencia no es posible afirmar ni descartar con total certeza que la deficiencia cognitiva presente en los individuos propósito pertenecientes a estas familias esté dada por un origen genético, sin embargo se excluye el síndrome en cuestión como etiología del mismo y se concluye la necesidad de abordar en mayor grado la información familiar para estos casos puntuales.

El SXF se evidencia como una mutación en el cromosoma X, manifestada como un estrechamiento en el extremo distal del brazo largo, siendo posible su observación en metafases obtenidas a partir de cultivo celular de linfocitos, por lo tanto, se hizo necesario su optimización en el presente estudio para la visualización de estructuras cromosómicas y evaluación de fragilidad.

Si bien éste proceso se encuentra estandarizado en diferentes instituciones, la optimización del mismo representa un proceso de mejora continuo para la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca necesario antes de analizar cualquier resultado, debido a la existencia de factores que pueden interferir en el proceso como lo son la temperatura y condiciones propias del laboratorio y de los reactivos a emplear, así como las buenas prácticas de asepsia y desinfección de la infraestructura y equipos como se evidencia en el manual de procedimientos de citogenética humana del Instituto Nacional de Salud de Colombia(8).

Gracias a los ensayos puntuales descritos en el apartado de resultados se lograron optimizar las técnicas de cultivo convencional y de análisis fragilidad cromosómica realizando cambios

relacionados con tiempos de exposición, volúmenes de muestra a sembrar y de reactivos necesarios para la obtención y análisis de metafases. Dentro del proceso de optimización del cultivo convencional de linfocitos se determinó el volumen de sangre periférica ideal a emplear en el proceso de siembra (1000 μ l), teniendo en cuenta la necesidad que precisan las células sanguíneas de desarrollarse en un medio suplementado, sin que exista entre ellas competencia por superficie, vitaminas, proteínas y/o factores de crecimiento a causa de un volumen excesivo de las mismas, que desencadene mecanismos de apoptosis; y a su vez la dificultad en el análisis y visualización que representa el bajo desarrollo celular a causa de volúmenes insuficientes de muestra(59).

De igual modo se estableció como la mejor cantidad de mitógeno a utilizar 75 μ l de PHA, teniendo en cuenta el buen grado de estimulación de la proliferación de linfocitos y la ausencia de aglutinación en los preparados obtenidos. En comparación el manual de citogenética humana del Instituto Nacional de Salud de Colombia sugiere como cantidad optima de mitógeno a utilizar 200 μ l(8), que de ser empleado en las condiciones de cultivo descritas, causaría un elevado nivel de aglutinación en las células evitando la adecuada observación de metafases en el microscopio, por las características propias de esta lectinas(20).

Respecto al suplemento de vitaminas y factores de crecimiento, de acuerdo a lo descrito por Kragh(60) los medios de cultivo normales deben contener de 2 a 10 % de SFB; sin embargo en el proceso de optimización se determinó un suplemento del 12,5% con respecto al volumen total de medio a utilizar (4ml), reflejando preparados cromosómicos ideales con respecto a parámetros de tamaño y densidad celular como consecuencia de un aporte adecuado de nutrientes.

Finalmente en el proceso de optimización del cultivo convencional de linfocitos los cambios realizados en el proceso de fijación y lavados de la muestra en presencia de Fijador Carnoy permitieron la obtención de preparados cromosómicos más limpios, con mayor número de células fijadas y ausencia de membranas celulares y eritrocitos, a causa de un efecto sinérgico entre los procesos optimizados de shock hipotónico y shock térmico. Lo anterior responde a la eficacia del proceso de fijación que radica en la restricción de modificaciones que puedan sufrir las células, como es el caso de procesos autolíticos, manteniendo la estructura morfológica de las mismas como se describe en la revisión de técnicas histológicas realizada por Montalvo en el año 2010(24).

La optimización de la Tinción de Giemsa se realizó a partir del ajuste de pH a 6.8 realizado al buffer fosfato utilizado para diluir el colorante preparado con iguales cantidades de KH_2PO_4 0.06M y $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.06M como se describe en manual de procedimientos de citogenética humana del Instituto Nacional de salud(8) y en la formulación presentada por el grupo de Radiooncología del Centro Alemán de Investigación del Cáncer(56). Sin embargo, se hizo necesario la implementación de un cambio en el tiempo de coloración, empleando 20 minutos de contacto con el colorante, el cual permitió la obtención de una tinción más homogénea de las estructuras cromosómicas, acorde a un mayor grado de unión del colorante por su contenido de azul de metileno (componente catiónico) a la cromatina, al ser esta última un componente biológico de naturaleza aniónica(26).

Para la optimización de Bando G con tripsina (GTG) se utilizó el mismo protocolo de bandedo descrito por la Universidad Autónoma de México(58), cambiando únicamente la etapa de tripsinización a 20 segundos, mostrando mejores resultados en cuanto a la resolución y calidad de bandas presentes en los cromosomas con respecto a los 10 segundos de exposición sugeridos para este reactivo.

Lo anterior se relaciona a la actividad enzimática de la tripsina con respecto a la digestión desnaturante de proteínas que permite la formación de las bandas más claras (bandas G negativas) en el tiempo establecido y por otro lado permite una mayor absorción de colorante en las regiones ricas en uniones A-T por la resistencia al tratamiento con la enzima dando lugar a bandas más oscuras (bandas G positivas); permitiendo así la obtención de un patrón de bandas característico para cada par de cromosomas como se describe en el estudio realizado por Saitoh y Laemmli(61).

Como ensayo final la optimización del cultivo de fragilidad cromosómica se realizó teniendo en cuenta el protocolo de referencia de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca en asociación a los cambios realizados al protocolo convencional de obtención de linfocitos optimizado en este estudio; el cambio de medio de cultivo RPMI 1640 por medio TC-199 se realizó con enfoque a mejorar la visualización de sitios frágiles en metafases, a causa de la deficiencia en folatos que presenta el medio y que resultan ser necesarios para la producción y expresión de ADN en los sitios frágiles, haciéndolos más notorios como lo describe Sutherland(62).

La inducción de sitios frágiles por medio de la aplicación de un agente clastógeno antitumoral como es la MMC, tiene relación con estudios de fragilidad cromosómica, entre los que cabe mencionar el estudio publicado por Bueno, Rengifo y Vergara(29), en el cual se inducen rupturas cromosómicas y fragilidad por medio de este agente con el fin de visualizar la capacidad de reparación del material genético en los linfocitos obtenidos en cultivo; siendo congruentes los resultados obtenidos en comparación a los del presente estudio correspondientes a la observación de rupturas y sitios frágiles presentes en los cromosomas visibles en microscopía óptica.

Finalmente cabe resaltar que en el presente estudio fue posible la optimización de procedimientos de gran aporte para procesos investigativos futuros en la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, los cuales se detallaron paso a paso para su posterior implementación en proyectos afines al presentado u otros enfoques en los que sean de utilidad.

CONCLUSIONES

- La optimización del protocolo para cultivo de linfocitos a partir de sangre periférica es de vital importancia antes de realizar cualquier tipo de prueba de análisis cromosómico ya que su obtención puede verse alterada por diferentes factores, siendo necesario realizar ajustes puntuales al procedimiento para garantizar resultados confiables y de calidad.
- La optimización del cultivo de linfocitos en medio TC-199 deficiente en folatos permitió la identificación de fragilidades y rupturas en diferentes cromosomas, a partir de la adición de MMC, demostrando su efecto inductor de aberraciones en el material genético a partir de muestras de la población control del presente estudio, así como la eficiencia del método.
- La elaboración de las genealogías de la población de referencia del estudio, además de la información recolectada con respecto a características puntuales asociadas al SXF permitió la selección de 11 familias candidatas a presentar déficit cognitivo asociado a causas genéticas y la identificación de posibles patrones de herencia en 4 familias con más de un individuo afectado por caso.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lukusa T, Fryns JP. Human chromosome fragility. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech.* 2008; 1779(1):3–16.
2. Debacker K, Kooy RF. Fragile sites and human disease. *Hum Mol Genet.* 2007;16(2):150–158.
3. Lyons JI, Kerr GR, Mueller PW. Fragile X Syndrome: Scientific Background and Screening Technologies. *J Mol Diagn.* 2015; 17(5):463–471.
4. Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). Censo General [Internet]. Bogotá: DANE; 2005. Disponible en: http://www.dane.gov.co/files/censos/discapacidad/preva_indices.pdf.
5. Espinosa E, Jefe G, Hmc-Umng N, Velasco H, Hmc G, Metodologico A, et al. Etiología del retardo mental en la población pediátrica que asiste a consulta de neuropediatría en el Hospital Militar Central e Instituto de Ortopedia Infantil Roosevelt Bogotá, Colombia, 1 agosto 2009 - 31 de enero de 2011 [Trabajo de grado]. Bogotá 2011.
6. Giraldo A, Silva E, Bueno ML, Crane C, Pedraza X, Bermúdez A, et al. Retardo mental ligado al sexo. Presencia y ausencia de X frágil. *Biomédica.* 1985;5(3–4):62-73.
7. Castro I, Cuenca P. Tamizaje de sitio frágil en el cromosoma X en una población de retardados mentales hallazgos preliminares. *Rev medica Hosp Nal Niños Costa Rica.* 1987;1(22):1–14.
8. Silva E, Crane C, Bermudez AJ, Bueno ML, Pedraza X, Giraldo A. *Citogenética Humana - Manual de Procedimientos [pdf]*. Bogotá: Toro González G, Osorio Fonseca E, 1991.
9. Castro Volio I, Cuenca Berger P. Frecuencia del Síndrome del Cromosoma X Frágil en la Escuela de Enseñanza Especial “Fernando Centeno Güell.” *Acta Pediltrica Costarricense.* 1996;10(3):99-105.
10. Fernández Carvajal I, Blanco Quirós A, Fernández Toral J, Tellería Orriolsa J.J, Alonso Ramosa M.J, Sanz Cantalapiedra A, Martín Rodríguez J.F. Eficacia de un test clínico como preselección de niños con sospecha de síndrome X frágil. *An Pediatría.* 2001;54:326–30.
11. Payán C, Saldarriaga W, Isaza C, Alzate A. Estudio de foco endémico de retardo mental en Ricaurte. Valle. *Acta biológica Colombiana.* 2001;6(2):88.
12. Allende R. MA, Aravena C. T, Valiente G. A, Curotto L. B, Santa María V. L, Cortés M. F. Tamizaje clínico y análisis de mutaciones en el gen FMR1 en 99 varones con características clínicas del síndrome de X-frágil. *Rev Chil Pediatr.* 2006;77(1):34–42.
13. Fernández L MP, Puente F A, Ferrando L MT. Síndrome X frágil: Desarrollo e intervención del lenguaje escrito. *Rev Chil Neuropsiquiatr.* 2010;48(3):219–31.
14. Mercedes M, Castillo M, Ejarque I, García A. Síndrome del cromosoma X frágil. 2017;10(1):54–7.

15. Saldarriaga-Gil W, Hagerman R, Salcedo MJ, Tassone F, Ramirez-Cheyne J, Silva M. Fragile x syndrome in a Colombian family. *Iatreia*. 2018;31(1):76–85.
16. Solari AJ. *Genética humana : fundamentos y aplicaciones en medicina*. 4a ed. Bogotá: Médica Panamericana; 2004.
17. Sigma. RPMI-1640 media [Internet]. Saint Louis, Missouri, 2011. Disponible en: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Formulation/r8758for.Par.0001.File.tmp/r8758for.pdf>
18. Lane BP, Miller SL. Preparation of large numbers of uniform tracheal organ cultures for long term studies. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 1976;12(2):147–148.
19. von Seefried A, MacMorine HG. The use of foetal, calf and adult bovine sera for the growth of serially subcultivated diploid cells. *Dev Biol Stand*. 1976;37:83–89.
20. Ruiz Álvarez V, Hernández Triana M. Aspectos bioquímicos de la fitohemaglutinina. Aplicaciones en terapéutica médica. ResearchGate.2004.
21. Perlman D. Use of antibiotics in cell culture media. *Methods Enzymol*. 1979;58:110–116.
22. Oliva Virgili R, Vidal Taboada JM. *Genoma humano: nuevos avances en investigación, diagnóstico y tratamiento*. Barcelona, España: Publicacions i Edicions, Universitat de Barcelona; 2006.
23. Bueno Zaragüeta O. *La estructura del dominio de Colchicina como base para el diseño y síntesis de compuestos con propiedades antimitóticas y antivascuales* [Tesis Doctoral]. Madrid; 2018
24. Montalvo C. Técnica Histológica [Internet]. 2010. Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal de Recursos en Linea/Apuntes/3_tecnica_histologica.pdf
25. Barch MJ. *The ACT cytogenetics laboratory manual*. 4a ed. USA: Wiley Blackwell; 2017
26. Perea Sasiaín J. Cien años del colorante de Giemsa. *Biomédica*. 2003;23(1):5-18
27. Durkin SG, Glover TW. Chromosome Fragile Sites. *Annu Rev Genet*. 2007;41(1):169–192.
28. Escribano G, Castillo S, Daher V, Salazar S, Tobella L. Principales factores que producen fragilidad cromosómica transitoria en los pacientes referidos para estudio citogenético. *Rev Hosp Clín Univ Chile*. 2009;20: 20–27.
29. Bueno M, Rengifo L, Vergara A. Laboratorio Clínico de Citogenética. *Rev Fac Med*. 2013;61(1)
30. Purdon Martin J, Bell J. A pedigree of mental defect showing sex-linkage. *J Neurol Psychiatry*. 1943;6(3–4):154–7.
31. Saldarriaga W, Tassone F, González-Teshima LY, Forero-Forero JV, Ayala-Zapata S HR. Fragile Syndrome. *Colomb Med*. 2014;45(4):190–8.

32. Talise M. Síndrome de X frágil [Internet]. Madrid: Rivas P.;2017. Disponible: <https://www.webconsultas.com/salud-al-dia/sindrome-de-x-fragil/sindrome-de-x-fragil-7204>
33. Castro-Volio I, Cuenca-Berger P. Trastornos del neurodesarrollo (síndrome X frágil) y neurodegenerativos (síndrome de temblor/ataxia) asociados al “crecimiento” de un gen. *Rev neurol.* 2005;40(7):431-437.
34. Hagerman RJ, Berry-Kravis E, Hazlett HC, Bailey DB, Moine H, Kooy RF, et al. Fragile X syndrome. *Nat Rev Dis Prim.* 2017;3(17065):1-19.
35. Medina Gómez B, García Alonso I. Síndrome X frágil: detección e intervención en el fenotipo conductual. *Int J Dev Educ Psychol.* 2014;2(1):145–154.
36. Salgado Cedillo I, Durán Gutiérrez A. Aspectos estomatológicos en el síndrome del X frágil. Revisión de la literatura y presentación de un caso clínico. *Rev Odontológica Mex.* 2014 ;18(4):236–240.
37. Pugin A, Faundes V, Santa María L, Curotto B, Aliaga S, Salas I, et al. Aspectos clínicos, moleculares y farmacológicos en los trastornos asociados a gen 1 del retraso mental del X frágil. *Neurología.* 2017;32(4):241–52.
38. Ribate Molina M, Pié Juste J, Ramos Fuentes F, Pediatría D, Molina RM, Juste PJ, et al. Síndrome De X Frágil. *Protoc diagn ter pediatr.* 2010;1(1):85–90.
39. Pintado E. El gen del X frágil y sus patologías [Internet]. Sevilla, España, 2014 Disponible en: http://www.sebbm.es/ES/divulgacion-ciencia-para-todos_10/acercate-a-nuestros-cientificos_107
40. Calvo Medina R. Síndrome X frágil: eficacia en el ensayo experimental con antioxidantes de un trastorno genético del neurodesarrollo infantil [Tesis Doctoral]. Málaga; 2016
41. Artigas J, Brun C, Gabau; E. Aspectos Clínicos y Neuropsicológicos del Síndrome X Frágil. *Rev Neurol Clin.* 2001;2:42–54.
42. García Lorente L. Síndrome X frágil: fisiopatología y posibilidades actuales de diagnóstico y tratamiento. Madrid, España; 2017
43. Sherman SL, Jacobs PA, Morton NE, Froster-Iskenius U, Howard-Peebles PN, Nielsen KB, et al. Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet.* 1985;69(4):289–299.
44. Ministerio de educación nacional (MEN). Orientaciones pedagógicas para la atención a estudiantes con discapacidad cognitiva. [Internet]. Bogotá; 2006. Disponible en: http://portalapp.mineducacion.gov.co/drupal/files/nee/docs/orientaciones_cognitiva1.pdf
45. Fernández Rego FJ. Efecto de los factores de riesgo biológico perinatales en el neurodesarrollo de los niños prematuros [Internet]. Lorca, España, 2017. Disponible en: <https://www.fundacionsaludinfantil.org/wp-content/uploads/2017/12/FernandezRego2017.pdf>

46. Anonimo. Factores de riesgo perinatales [Internet]. 2016. Disponible en: <https://www.bebesymas.com/salud-infantil/factores-de-riesgo-perinatales>
47. Gallagher A, Hallahan B. Fragile X-associated disorders: A clinical overview. *J Neurol*. 2012;259(3):401–413.
48. Milá M, Ramos F, Tejada MI, Aegh G, Ciberer /, Blesa L, et al. Guía clínica de las enfermedades asociadas al gen FMR1: síndrome X frágil, insuficiencia ovárica primaria y síndrome de temblor-ataxia. *Med Clin (Barc)*.2014;142:219–225.
49. Berman RF, Am Buijsen R, Usdin K, Pintado E, Kooy F, Pretto D, et al. Mouse models of the fragile X premutation and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *J Neurodev Disord*. 2014;6(25):1–16.
50. Lozano R, Rosero CA, Hagerman RJ. Fragile X spectrum disorders. *Intractable rare Dis Res*. 2014;3(4):134–146.
51. Milà Recasens M. El Síndrome X frágil. *Ed Cont Lab Clín*. 2015;20:32–40.
52. Lugones Botell M, Miyar Pieiga E, Ramírez Bermúdez M, Martínez La Fuente A. Síndrome frágil X. *Rev Cuba Med Gen*. 2006;22(3).
53. Domingo R. Líneas de investigación en el tratamiento del síndrome X frágil [Internet]. Murcia, España, 2016. Disponible en: <http://www.dgenes.es/wp-content/uploads/3895s-lineas-investigacion-tratamiento-xf.pdf>
54. Rodríguez-Arnaiz R, Becerra Bracho A. Manual de prácticas de genética y cuaderno de trabajo. 1a ed. Ciudad de México: Universidad Autónoma de México; 2005.
55. Arcturus Bioscience Inc. Application C. Molecular Analysis of Individual Chromosomes Enabled through Microdissection [Internet]. USA, 2008. Disponible en: https://research.missouri.edu/mcc/files/chromosome_protocol_6.pdf
56. Kuhlmann WD. Buffer solutions. *Division of Radiooncology*. 2006;(5):1–9.
57. Bennington JL. Diccionario enciclopédico del laboratorio clínico. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana; 2000.
58. Janet O. Técnica de Tinción Selectiva por Bandeado C y G. Mexico; 2016.
59. Anónimo. Introducción al cultivo celular [Internet]. Disponible en: http://www.ehu.es/biofisica/juanma/mbb/pdf/cultivo_celular.pdf
60. Kragh-Hansen U. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. *Pharmacol Rev*. 1981; 33(1):17-53.
61. Saitoh Y, Laemmli UK. Metaphase Chromosome Structure : Bands Arise from a Differential Folding Path of the Highly AT-Rich Scaffold. *Cell*. 1994;76:609–622.
62. Sutherland GR. Heritable Fragile Sites on Human Chromosomes I. Factors Affecting Expression in Lymphocyte Culture. *Am J Hum Genet*. 1979; 31:125-135.

ANEXOS

ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto de investigación titulado:
“OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO DE LINFOCITOS PARA OBTENCION DE CROMOSOMAS Y ANÁLISIS DE FRAGILIDAD: IMPORTANCIA EN X FRÁGIL Y DÉFICIT COGNITIVO ”

Directora de Proyecto: Ruth Mélida Sánchez Mora docente de Genética Universidad Colegio Mayor De Cundinamarca

Se solicita su participación en este proyecto de investigación, cuyo objetivo principal es realizar un tamizaje en una población de niños con problemas cognitivos para identificación de la presencia del cromosoma X frágil.

Su participación en el estudio es totalmente voluntaria. Si usted decide participar se le extraerá una muestra de sangre a su hijo(a) para el estudio de fragilidad cromosómica.

La toma de muestras de sangre puede provocar una sensación de ardor en el punto en el que se introduce la aguja en la piel y rara vez puede ocasionar un pequeño hematoma, que desaparecerá en pocos días, así como mareo en el momento de la extracción de sangre.

Se le pedirá su consentimiento para que con la muestra sangre se realice la obtención de cromosomas a partir de células sanguíneas para evaluación de fragilidad cromosómica.

De acuerdo a lo establecido anteriormente, Yo (acudiente) _____ identificado con C.C. _____ de _____ declaro bajo mi responsabilidad que he leído la hoja de información sobre el estudio y acepto que mi hijo _____ identificado con T.I _____ participe en el presente estudio.

Al firmar este consentimiento acepto que:

- Se me han explicado las características y el objetivo del estudio y los posibles beneficios y riesgos que puedo esperar del mismo.
- Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas y todas las preguntas fueron respondidas a mi entera satisfacción.
- Se me ha manifestado que la identidad de mi hijo(a) será confidencial y que se identificará cada muestra sanguínea con un número codificado.
- Entiendo que el objetivo del estudio es únicamente la identificación del síndrome X frágil y que las muestras que resulten negativas no entraran en otros estudios ajenos al mencionado y serán desechadas.

Nombre del acudiente

Firma de persona a cargo

Firma y Número de identificación

Fecha

- () 1.
- () 2.
- () 3.
- () 4.
- () 5. ¿más? ¿Cuántos? _____

5.2 ¿Cuántos de ellos son hombres?

5.3 ¿Alguno de los demás hijos presenta deficiencias? En caso de que sea afirmativo marque con una X cual

- () 1. Deficiencia cognitiva
- () 2. Deficiencia en el lenguaje
- () 3. Déficit de atención
- () 4. Hiperactividad
- () 5. Retraso en el habla
- () 6. Otra, especifique _____

5.4 ¿alguno de los demás hijos presenta deficiencias en el desarrollo? En caso de que sea afirmativo marque con una X cuales

- () 1. Retraso al caminar, gatear o voltearse
- () 2. Palmotear o morderse las manos
- () 3. Articulaciones flexibles
- () 4. Otro, especifique _____

5.5. ¿Sus padres han presentado algunas de las características anteriormente mencionadas?

- () Si. ¿Cuál? _____
- () No.

5.6. ¿Sabe si los padres de su pareja han presentado alguna de estas características?

- () Si. ¿Cuál? _____
- () No.

5.7. ¿Algún familiar del paciente ha presentado alguna de estas características?

- () Si. ¿Cuál? _____
- () No.

5.8. ¿Alguno de los familiares anteriormente mencionados ha sido diagnosticado?

- () Si. ¿Cuál? _____
- () No.

ANEXO 3. LISTA DE ABREVIATURAS

AB/AM: Antibiótico antimicótico.	mGluRs: Receptores metabotrópicos de glutamato.
ADN: Acido Desoxirribonucleico.	MMC: Mitomicina C.
AGG: Adenina-Guanina-Guanina.	Na₂HPO₄·2H₂O: Fosfato de sodio dibásico.
AMPA: Receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico.	PB: Pares de bases.
ARN: Ácido ribonucleico.	PHA: Fitohemaglutinina.
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.	RPM: Revoluciones por minuto.
A-T: Adenina-Timina.	RPMI-1640: Medio convencional para el cultivo de linfocitos (medio Roswell Park Memorial Institute).
CGG: Citosina Guanina Guanina.	SFB: Suero fetal bovino.
Chtb: Rupturas cromosómicas.	SXF: Síndrome de X Frágil.
FRA: Fragilidad.	TC-199: Medio específico para encontrar fragilidades cromosómicas.
FMR1: Fragile mental retardation 1.	UTR: Región no traducida.
FMRP: Fragile mental retardation protein.	Xq: Brazo largo del cromosoma X.
FXPOI: Falla ovárica prematura asociada al X frágil.	XX: Complemento cromosómico femenino (dos cromosomas X).
FXTAS: Síndrome de temblor y ataxia asociado al X frágil.	XY: Complemento cromosómico masculino (un cromosoma X y un cromosoma Y).
GTG: Bando G con tripsina y Giemsa.	
GABA: Receptor ácido γ -aminobutírico.	
IM: Índice mitótico.	
KH₂PO₄: Fosfato monopotásico.	