

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

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

ASESOR: RUTH MELIDA SANCHEZ MORA, MSc. PhD.

LORENA ACOSTA GALEANO
DANIEL SEBASTIÁN BEJARANO VELANDIA
ANGY JOHANA BENAVIDES HERNÁNDEZ

UNIVERSIDAD
COLEGIO MAYOR DE
CUNDINAMARCA



INTRODUCCIÓN

SITIOS FRÁGILES

Representan porciones cromosómicas específicas y heredables.

Cuando el cromosoma es expuesto a inhibición parcial de la replicación del ADN se generan gaps o fracturas en el mismo.

Son heredados de forma codominante, hallándose en la misma ubicación en todas las células de un individuo

Suelen presentarse sin alteraciones fenotípicas ni trastornos.

Se clasifican en :

- Raros
- Intermedios
- Comunes

SINDROME DE X FRÁGIL

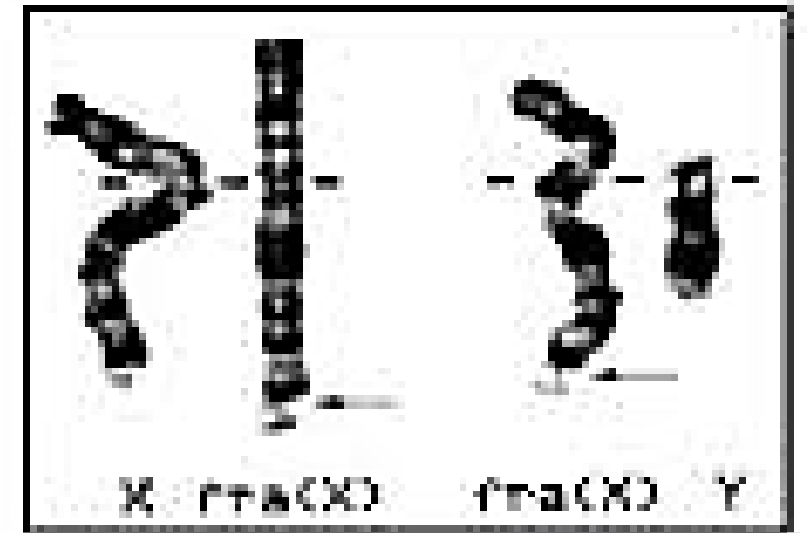
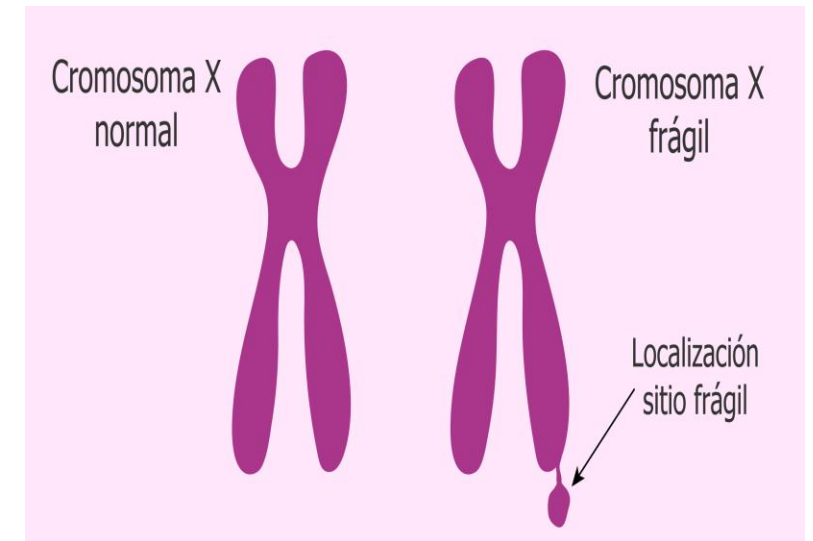
Es una enfermedad genética heredada a través del cromosoma X

Descrito por primera vez por Martin y Bell en 1943

Una de las principales causas de déficit cognitivo

Trastorno genético dominante

Defecto molecular en la región 5' UTR del gen FMR1, debido al incremento en el número de repeticiones del trinucleótido CGG



CARACTERÍSTICAS

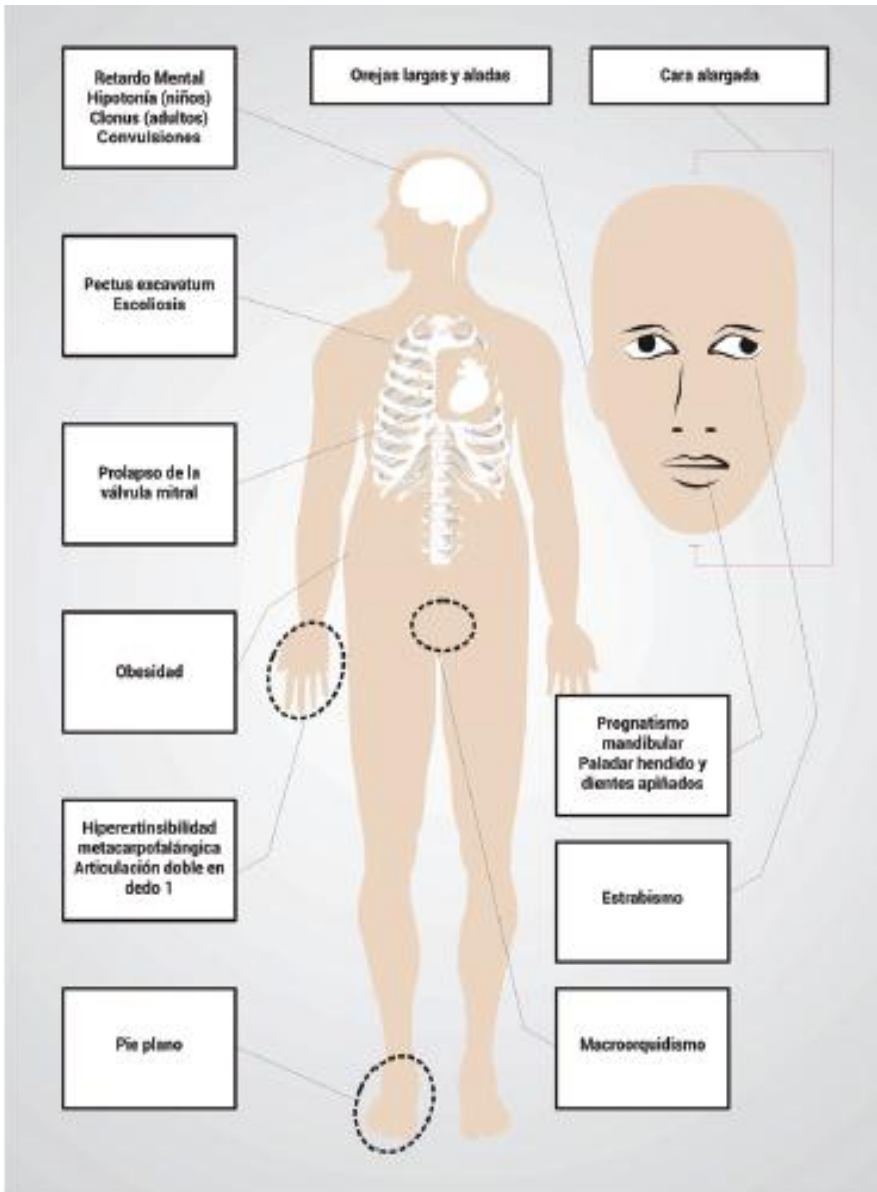
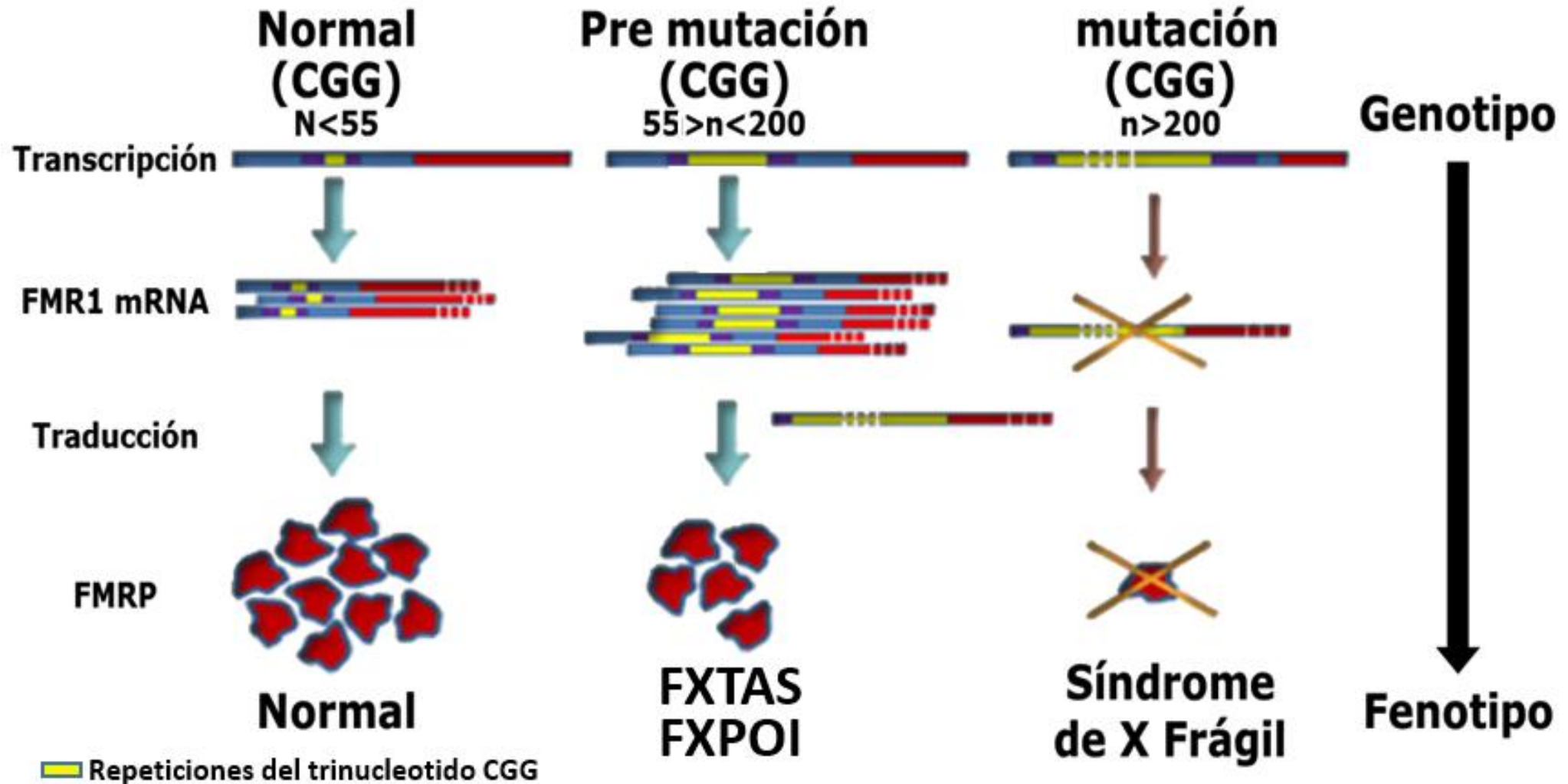


Tabla 2. Características clínicas de los pacientes con la mutación completa y el síndrome del gen x frágil.

Características	Sexo	
	Hombre	Mujer*
Facial	Orejas grandes y prominentes (75-78%)	Orejas grandes y prominentes (75-78%)
	Cara alargada	Cara larga
	Prognatismo mandibular (80% hombres adultos)	Prognatismo mandibular
	Paladar hendido	Frente prominente
Oftalmológico	Cabeza grande	
	Estrabismo (8%)	Estrabismo (8%)
Oído	Errores refractivos	Errores refractivos
	Sordera debida a alta recurrencia de infección en oídos	
Neurológico	Convulsiones (23%)	Convulsiones (23%)
	Hipotonía (niños)	Hipotonía (niños)
	Clonus (adultos)	Clonus (adultos)
	Reflejo positivo palmomental	Reflejo positivo palmomental
Psiquiátrico	Contacto visual pobre	Contacto visual pobre
	Desordenes, déficit de atención, hiperactividad	
	Ansiedad	
	Comportamiento motor repetitivo	
	Características autistas	
Desarrollo	Agresión y crisis de angustia	
	Retardo mental	Retardo mental
	Déficit Cognitivo y del lenguaje (repetitivo al final)	Déficit Cognitivo y del lenguaje (repetitivo al final)
	Pie plano	
Ortopédico	Hiperextensibilidad articular metacarpofalángica	
	Escoliosis	
	Doble articulación en el primer dedo	
Tórax	Pectus excavatum	
Genitourinarias	Macro orquidismo (95% hombres adultos)	
Cardiovasculares	Anormalidades cardiacas (prolapso de la válvula mitral)	
Otros	Obesidad, dientes apiñados, talla alta o baja	

* La mayoría de las características fenotípicas se han descrito en pacientes hombres con SXF, las mujeres generalmente presentan características similares aunque en la mayoría de casos menos severas.

GENÉTICA



ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

Eficacia de un test clínico como preselección de niños con sospecha de síndrome X frágil

Effectiveness of a clinical checklist in the preselection of children with suspicion of fragile X syndrome

I. Fernández Carvajal^a, A. Blanco Quirós^a, J. Fernández Toral^b, J.J. Tellería Orriols^a, M.J. Alonso Ramos^a, A. Sanz Cantalapiedra^a, J.F. Martín Rodríguez^c, R. Palencia Luances^d

^a Instituto de Biología Molecular y Genética (IBGM)

^b Unidad de Genética. Hospital Central de Oviedo

^c Área de Estadística. Universidad de Valladolid

^d Servicio de Pediatría. Hospital Clínico de Valladolid

Iatreia

Print version ISSN 0121-0793

Abstract

SALDARRIAGA-GIL, Wilmar et al. Síndrome X frágil en una Familia Colombiana. *Iatreia* [online]. 2018, vol.31, n.1, pp.76-85. ISSN 0121-0793. <http://dx.doi.org/10.17533/udea.iatreia.v31n1a07>.

Retardo mental ligado al sexo. Presencia y ausencia de X frágil

Alejandro Giraldo, Elizabeth Silva, Marta Lucia Bueno, Cecilia Crane, Ximena Pedraza, Antonio Bermúdez, Claudia Abaunza, Carlos Restrepo

Tamizaje clínico y análisis de mutaciones en el gen FMR1 en 99 varones con características clínicas del síndrome de X-frágil

Clinical screening and FMR1 gene mutation analysis in male patients with Fragile X syndrome

M. Angélica Alliende R.¹, Teresa Aravena C.², Alf Valiente G.³, Bianca Curotto L.⁴, Lorena Santa María V.³, Fanny Cortés M.⁵

OBJETIVOS

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.

DISEÑO METODOLÓGICO

DISEÑO METODOLÓGICO

Como control
NO presentan
características
afines al SXF

- Control: Estudiantes bacteriología y laboratorio clínico.
- Referencia: Niños del programa de inclusión de un colegio al sur de Bogotá

POBLACIÓN

MUESTRA

- Control: 3 estudiantes de bacteriología y laboratorio clínico
- Referencia: 25 niños de 23 Familias seleccionadas

Con
características
físicas
fácilmente
reconocibles

Soporte en
indagación
de preguntas
de manera
personal

Encuestas dirigidas a padres de familia de los niños propósito de la población de referencia

TÉCNICA DE
RECOLECCIÓN
DE DATOS

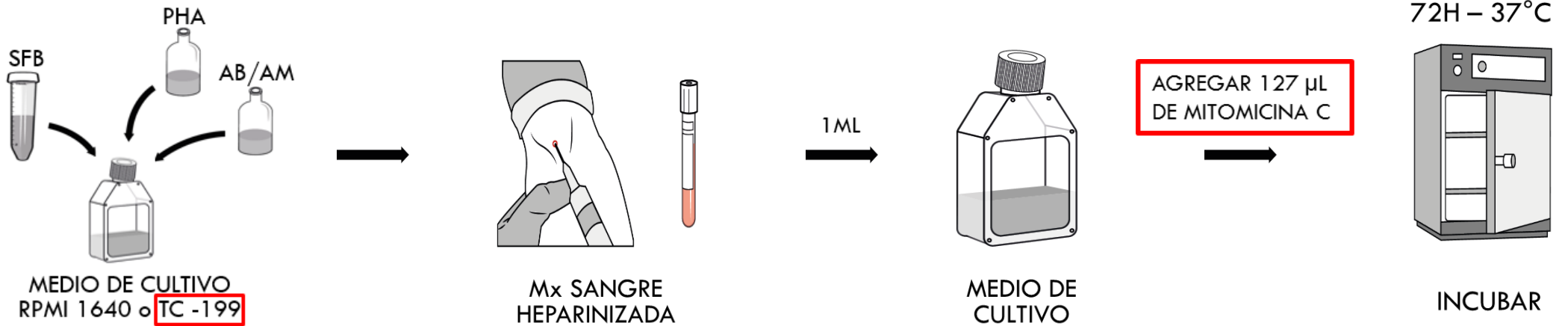
TECNICA DE
TRABAJO

Optimización de las técnicas de cultivo convencional y de fragilidad cromosómica

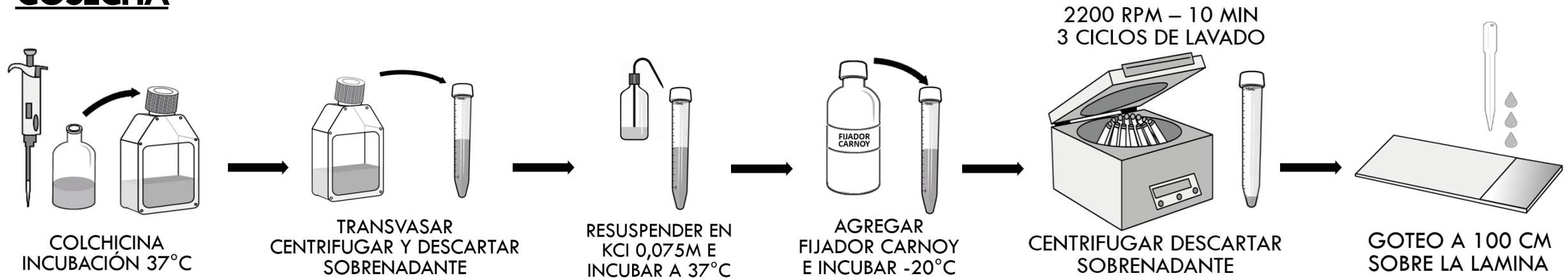
Medios
RPMI 1640
TC 199

CULTIVO DE LINFOCITOS PARA OBTENCIÓN DE CROMOSOMAS

SIEMBRA



COSECHA



RESULTADOS

OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO CONVENCIONAL DE LINFOCITOS

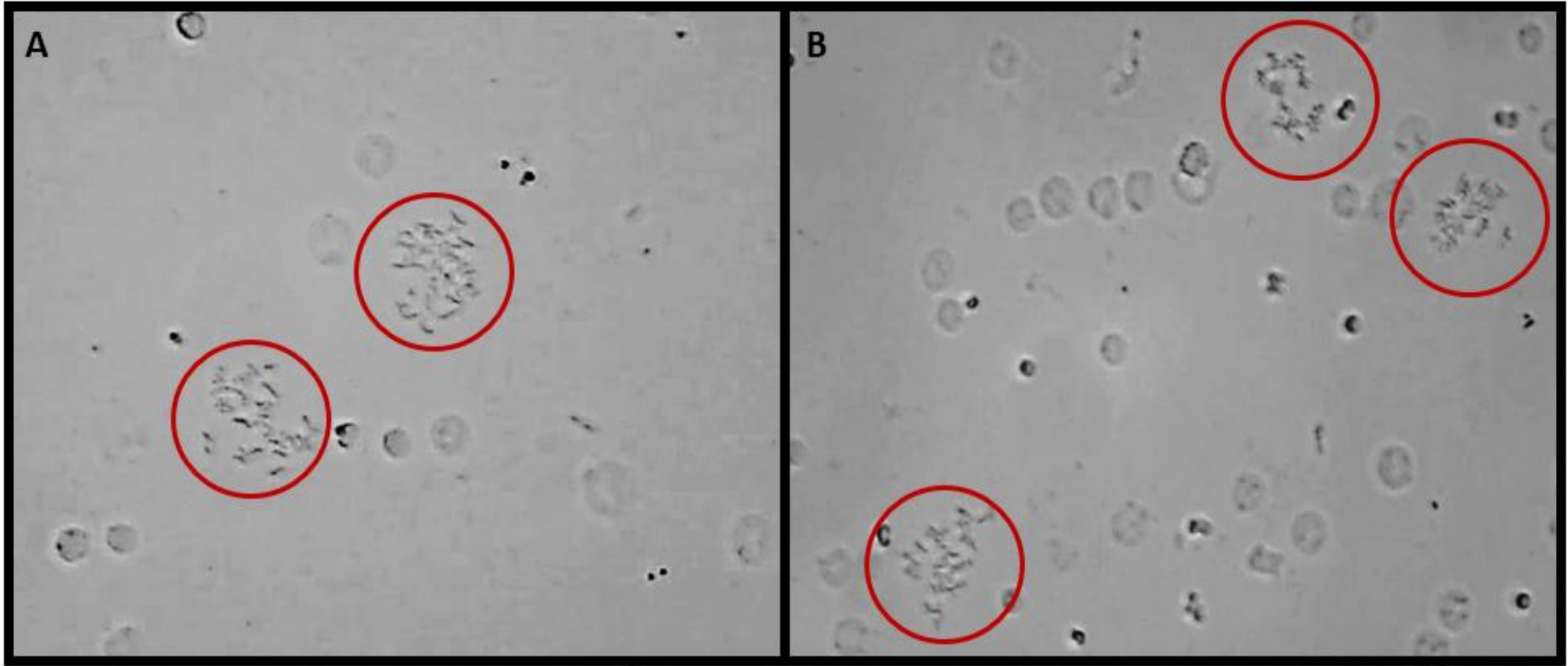
Optimización del volumen de sangre

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

Optimización del mitógeno (PHA)

Volumen de PHA (μl)	N° Celulas en división	Indice Mitotico (%)
50	14	28
75	19	38
100	23	46

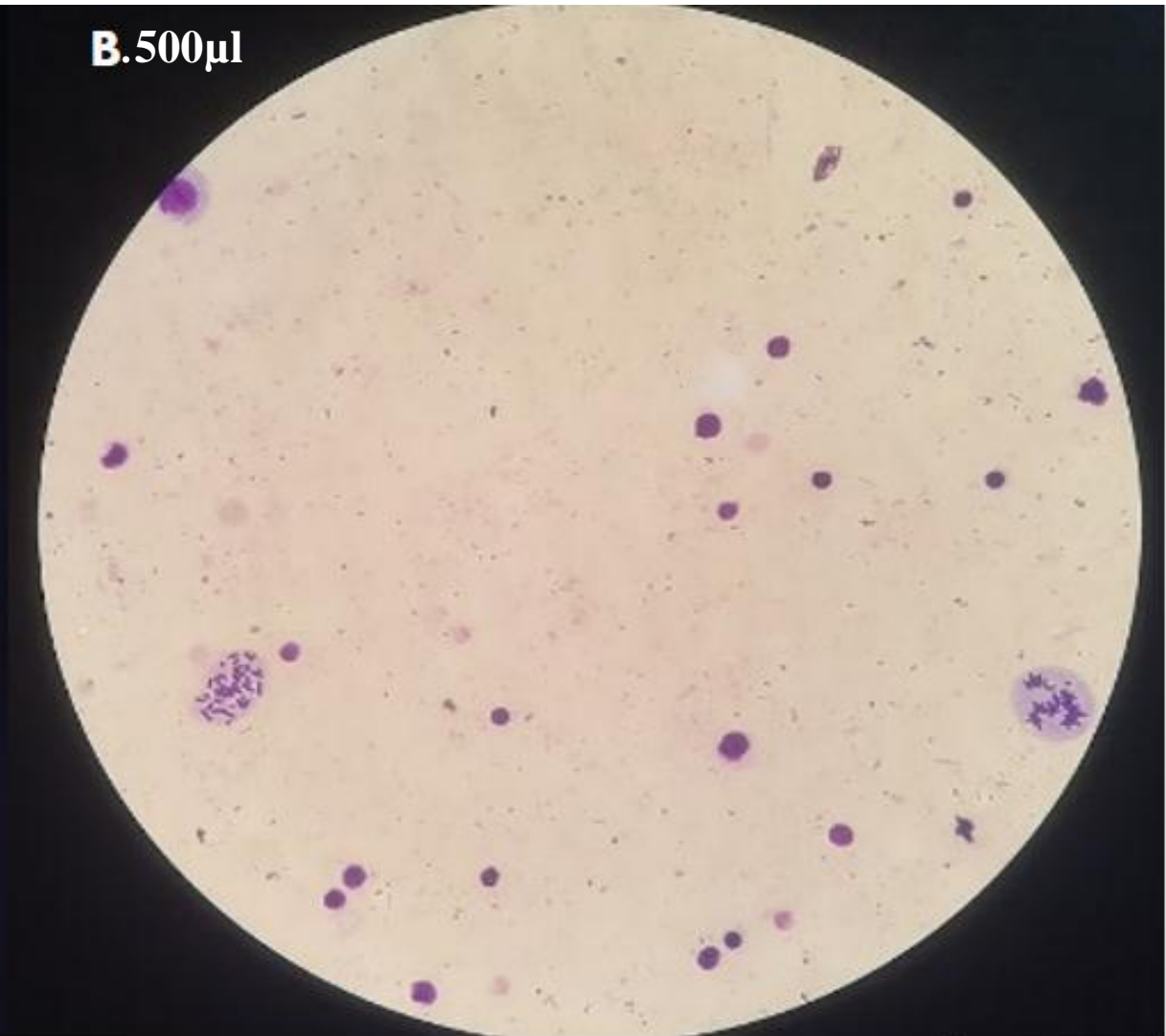
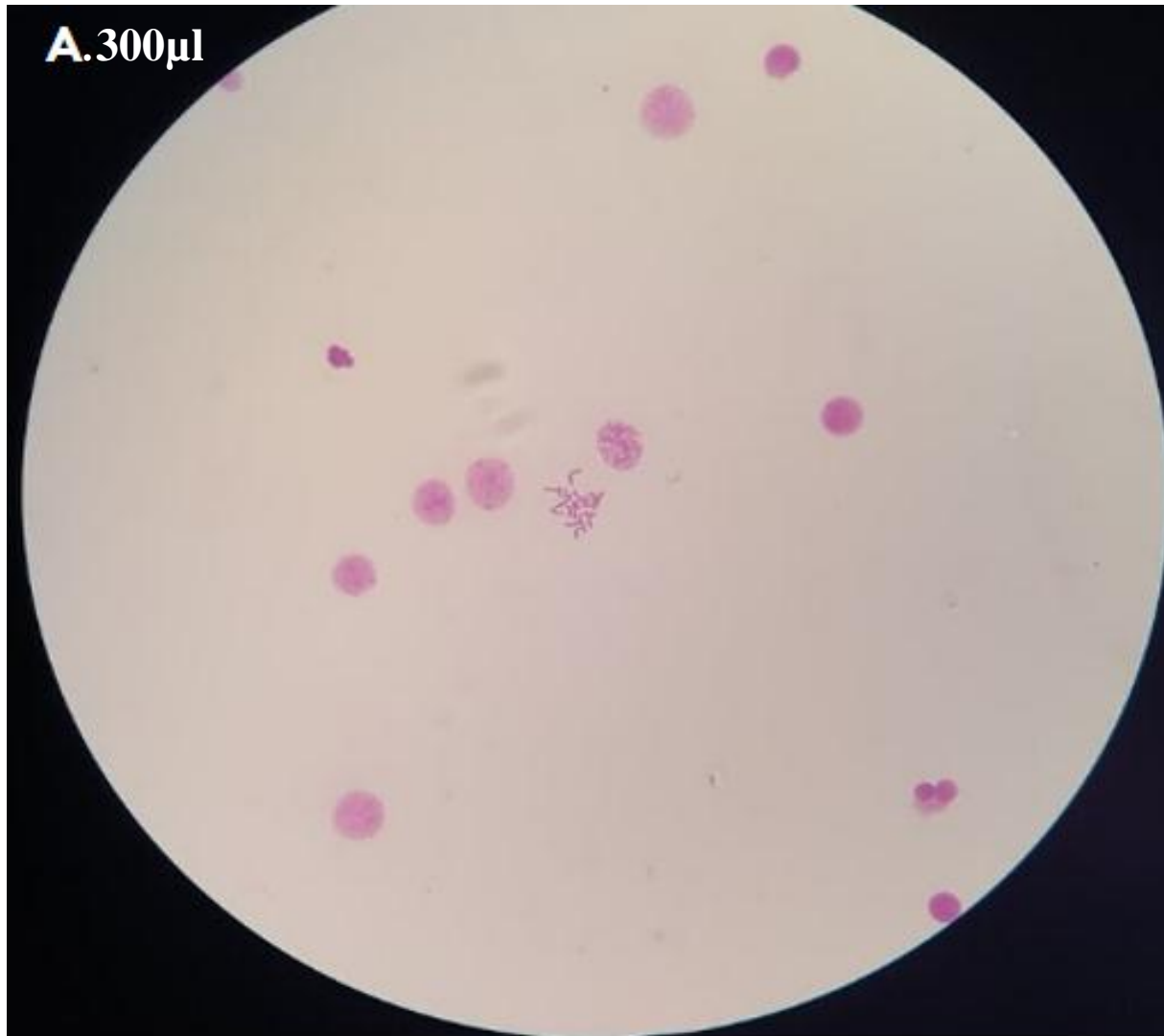
PREPARADOS CROMOSÓMICOS OBSERVADOS AL MICROSCOPIO INVERTIDO EN OBJETIVO DE 10X CON DISTINTAS CANTIDADES DE PHA



A. fitohemaglutinina en cantidad de 75 μ l.

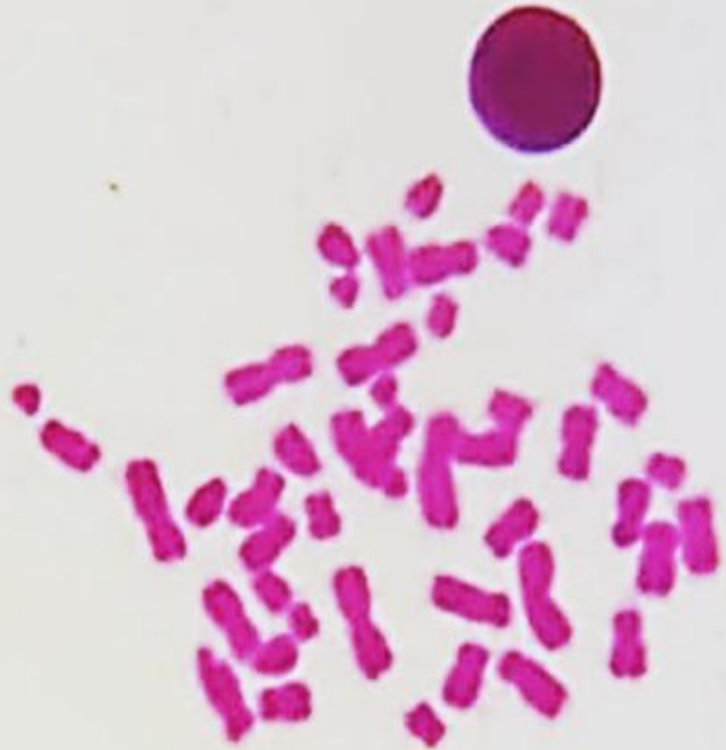
B. fitohemaglutinina en cantidad de 100 μ l.

PREPARADOS CROMOSÓMICOS OBSERVADOS EN OBJETIVO DE 40X OBTENIDOS EN MEDIO RPMI-1640 CON DIFERENTES CANTIDADES DE SUERO FETAL BOVINO

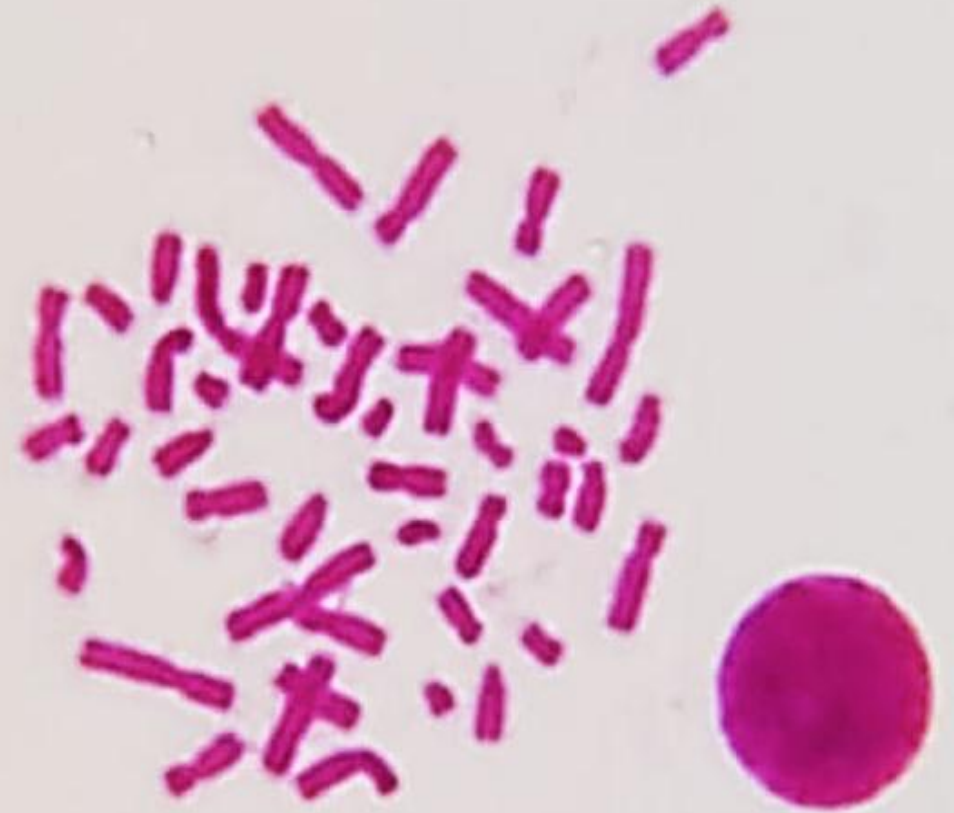


TIEMPOS DE EXPOSICIÓN A COLCHICINA

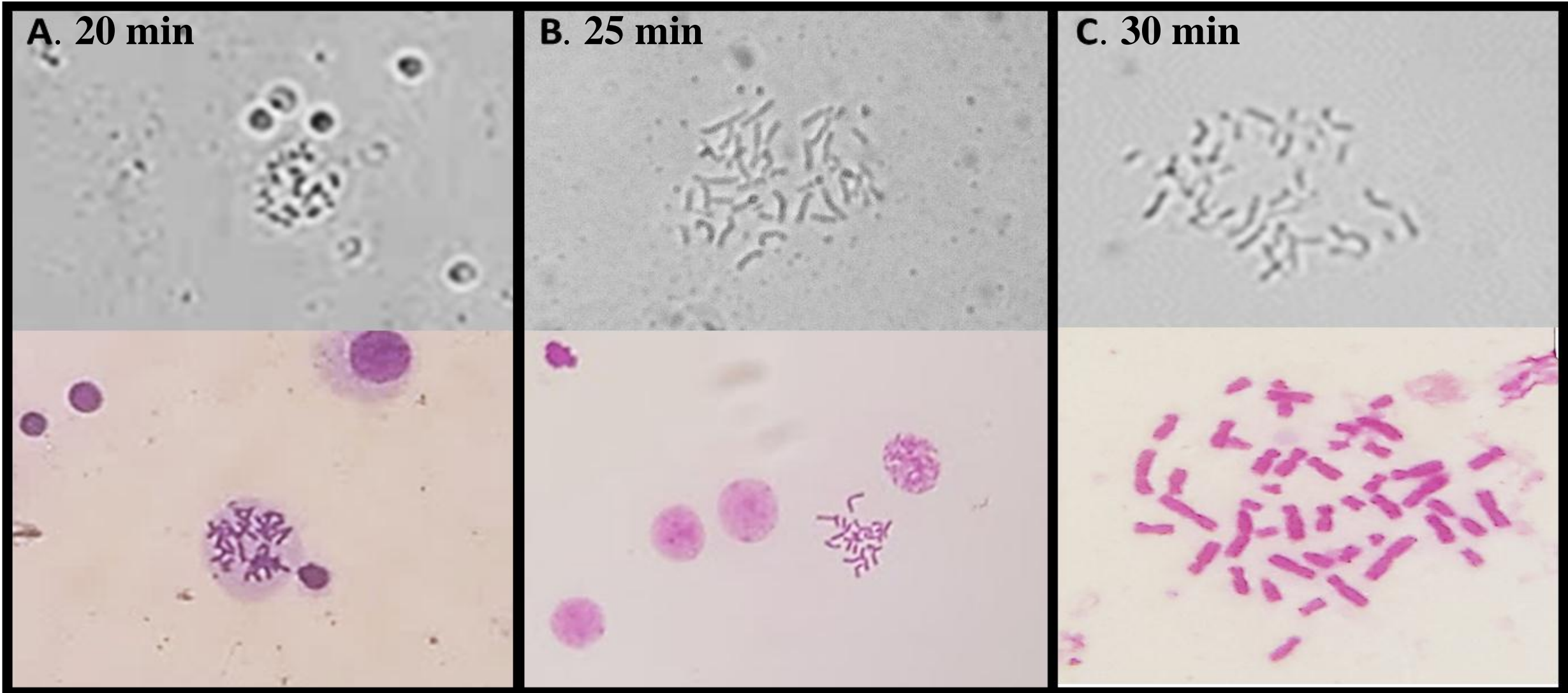
A. 20 minutos



B. 30 minutos



CAMBIOS EN EL TIEMPO DE INCUBACIÓN EN PRESENCIA DE SOLUCIÓN HIPOTÓNICA (KCL 0,075M)



SHOCK TERMICO Y FIJACIÓN

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= Antibiótico/Antimicótico

SHOCK TERMICO Y FIJACIÓN (FIJADOR CARNOY)

1ml fijador - centrifugación 2200 rpm 10 min

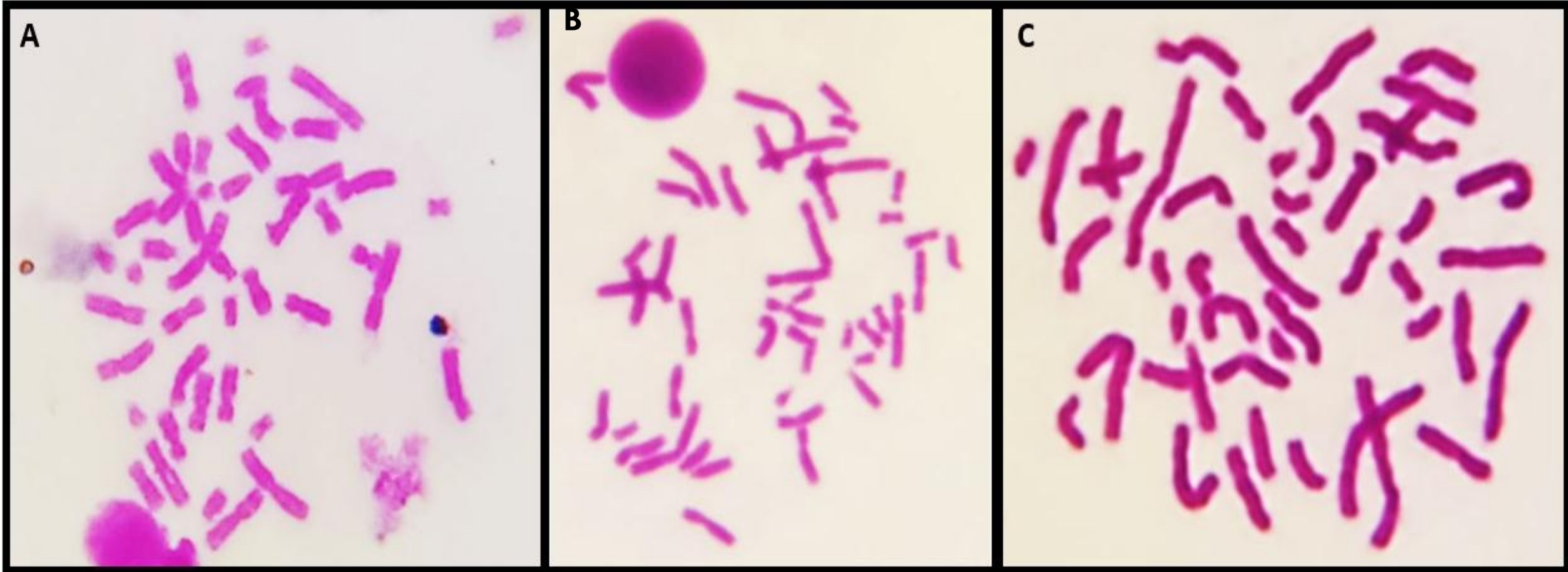
4ml fijador - incubación 20 min -20°C

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)

OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE COLORACIÓN CON GIEMSA

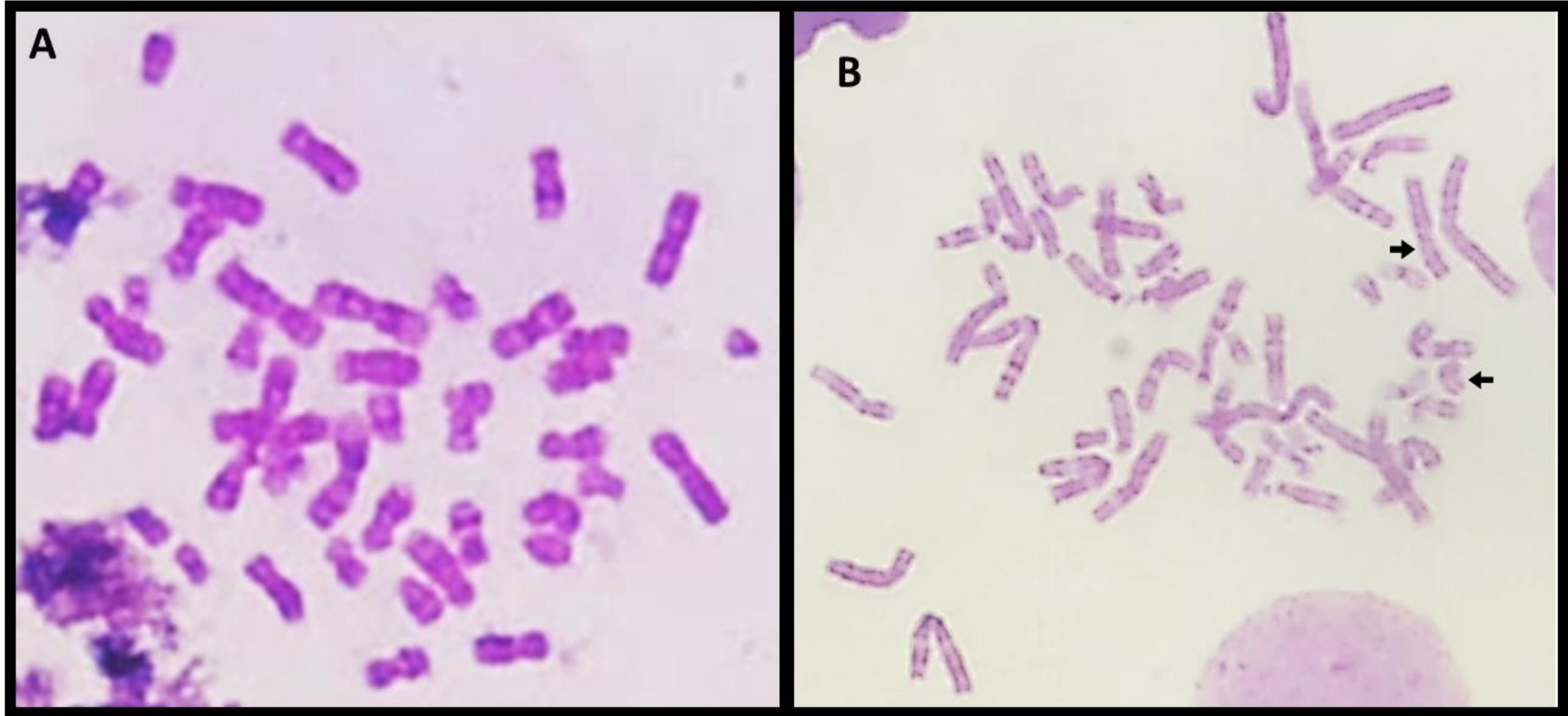


*A. Giemsa al 8% en
buffer Sorensen pH 6,5
(10 minutos)*

*B. Giemsa al 8% en
buffer Sorensen pH 6,8
(10 minutos)*

*C. Giemsa al 8% en buffer
Sorensen pH 6,8
(20 minutos)*

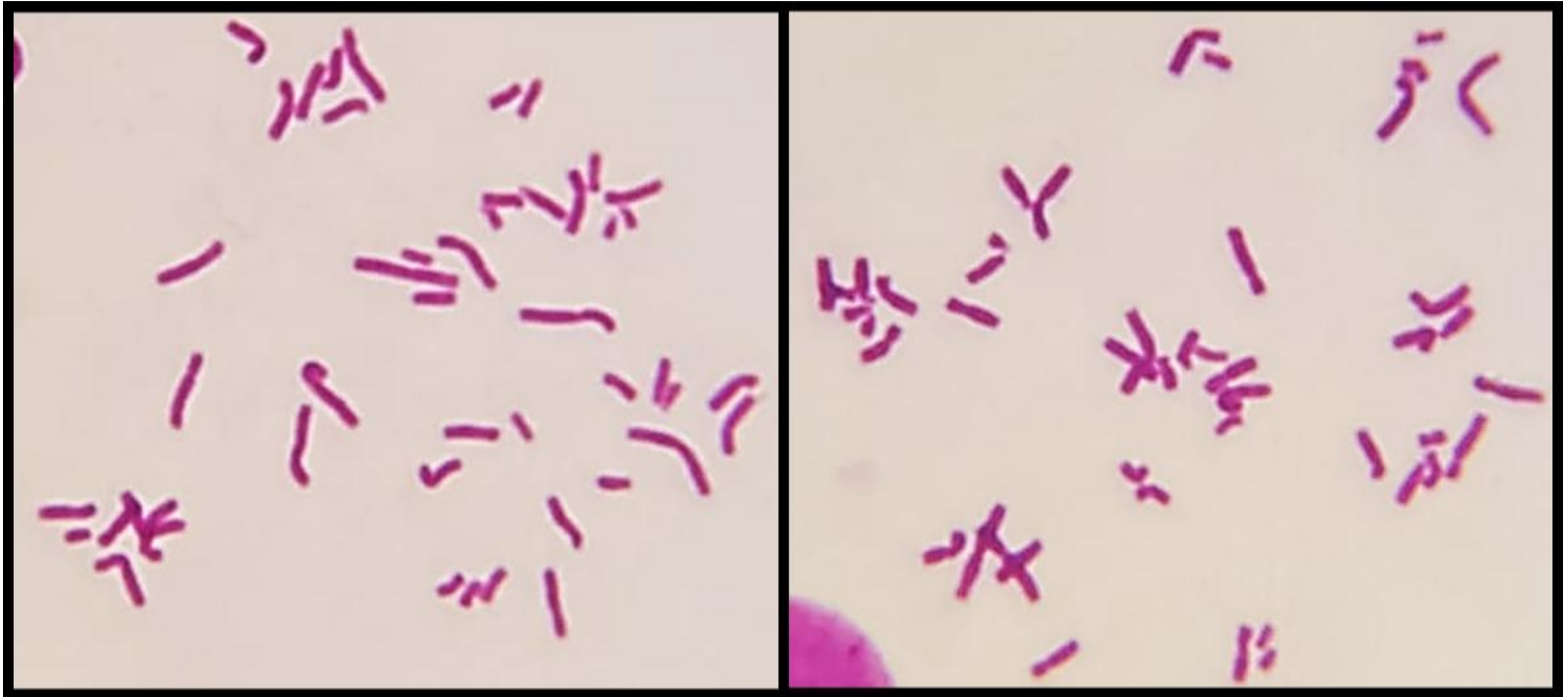
OPTIMIZACIÓN DE BANDEO G (GTG). PREPARADOS CROMOSÓMICOS CON DISTINTOS TIEMPOS DE EXPOSICIÓN A TRIPSINA



A. Tripsinización 10 segundos

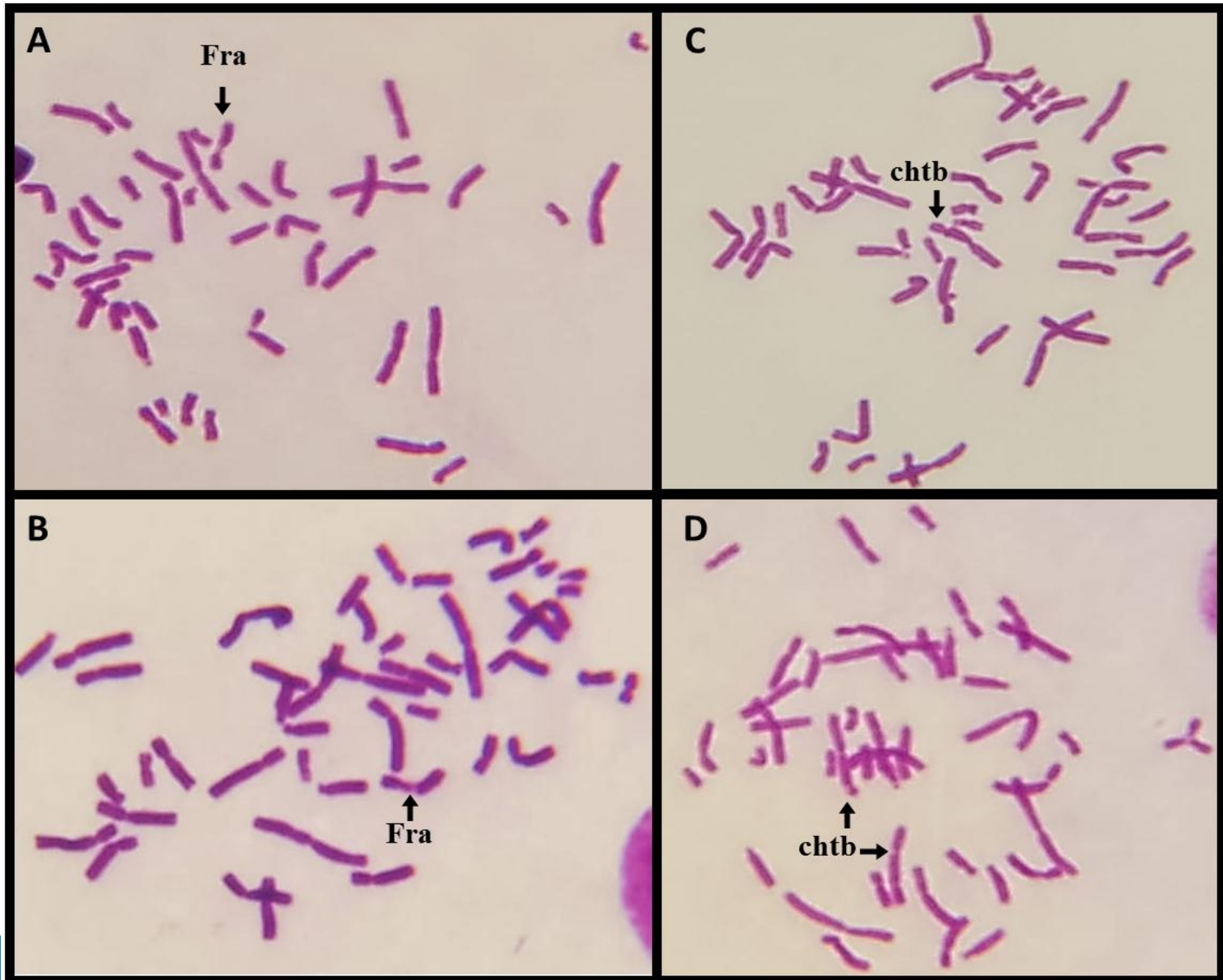
B. Tripsinización 20 segundos.

OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO PARA FRAGILIDAD CROMOSÓMICA



Metafases obtenidas en medio TC-199

INDUCCIÓN DE FRAGILIDAD CON ADICIÓN DE MITOMICINA C (MMC) EN MEDIO TC-199



A y B. fragilidad (*Fra*)

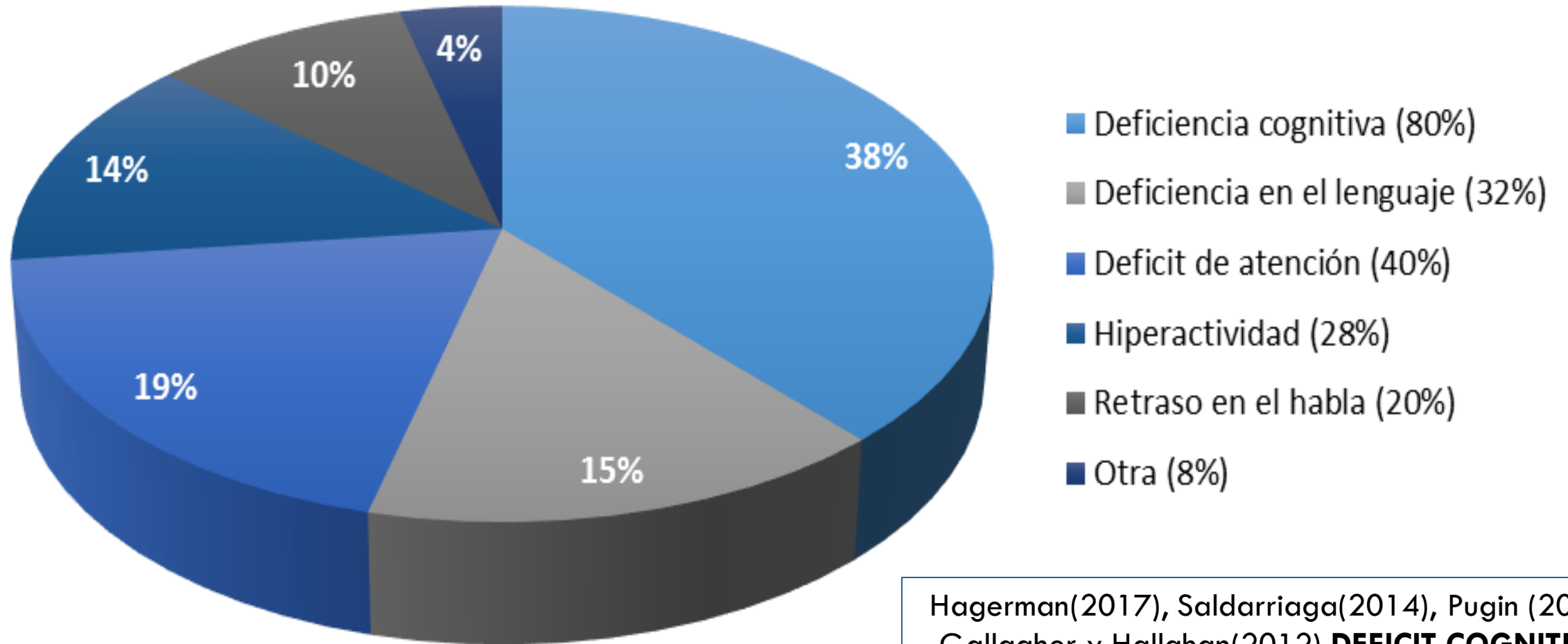
C y D. rupturas cromosómicas (*chtb*)

Bueno, Rengifo y Vergara (2013)

INDUCCIÓN DE FRAGILIDAD CON MMC

CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN ENCUESTADA

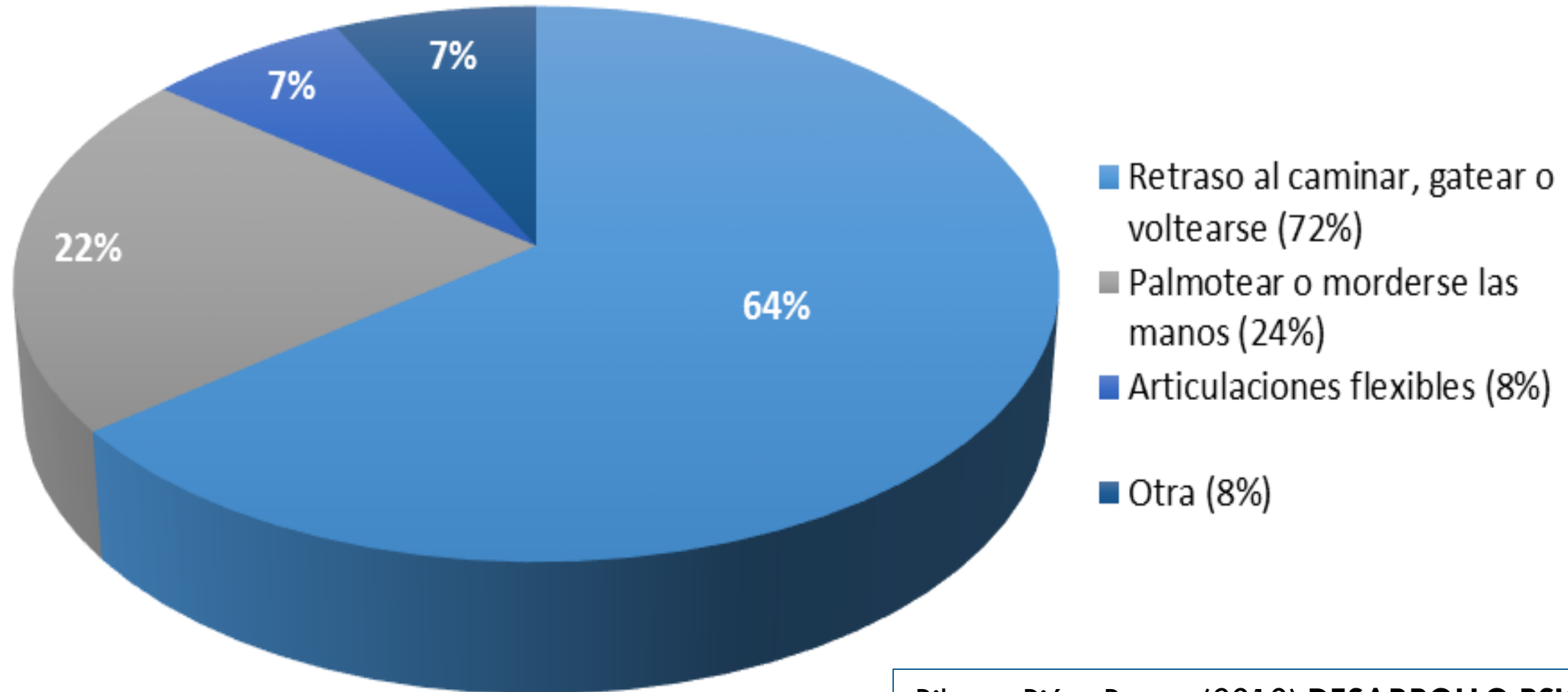
DEFICIENCIAS PRESENTES EN LA POBLACIÓN



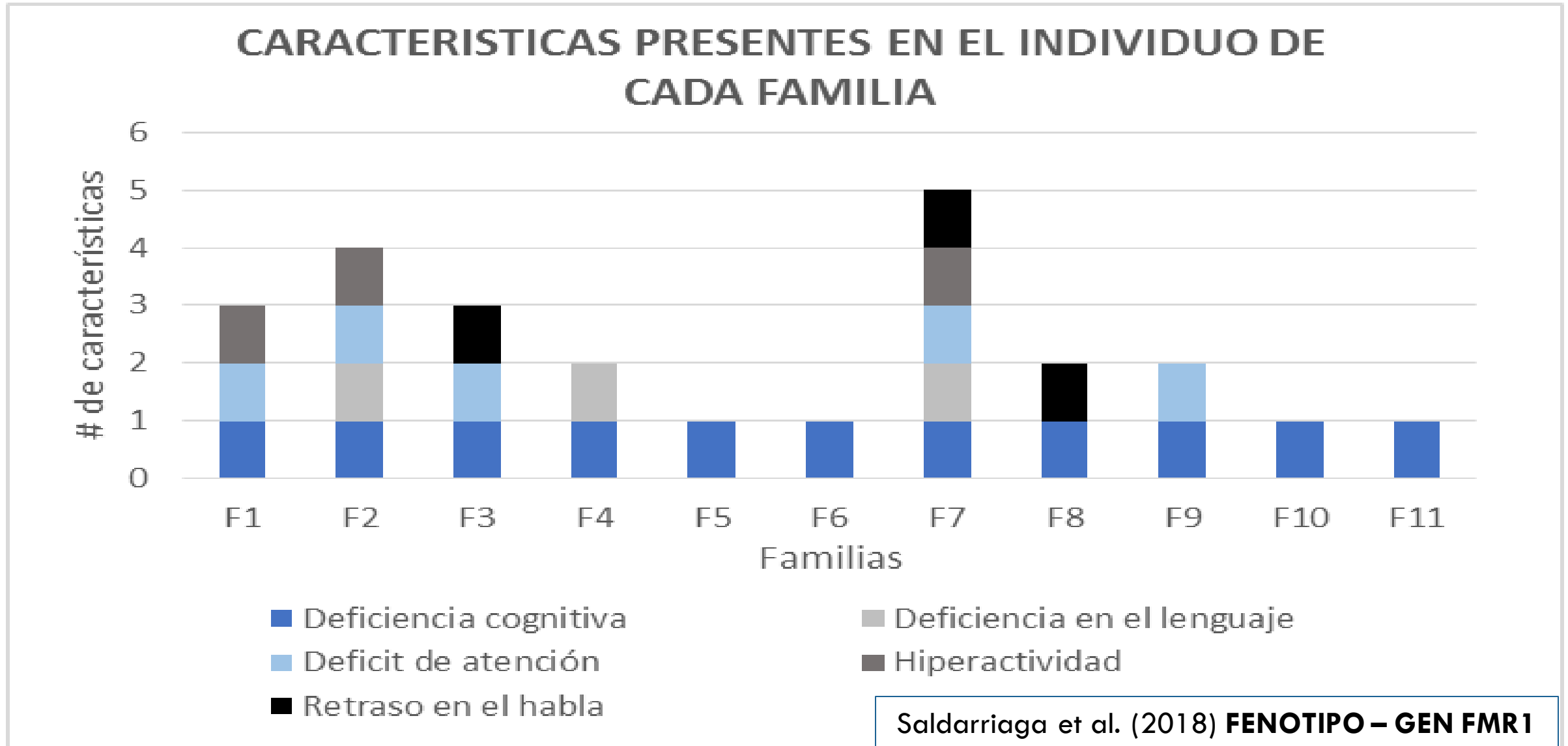
Hagerman(2017), Saldarriaga(2014), Pugin (2017),
Gallagher y Hallahan(2012) **DEFICIT COGNITIVO**

CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN ENCUESTADA

CARACTERÍSTICAS PRESENTES DURANTE EL DESARROLLO

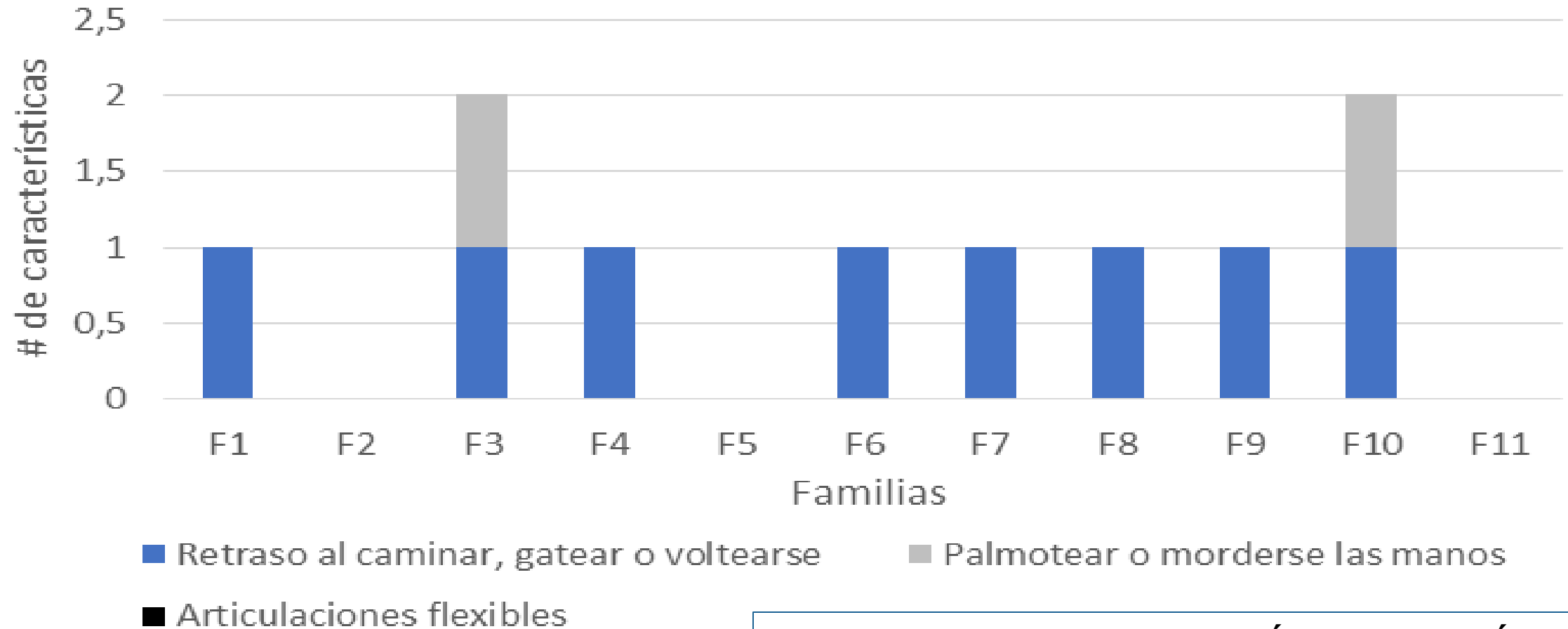


CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN ENCUESTADA



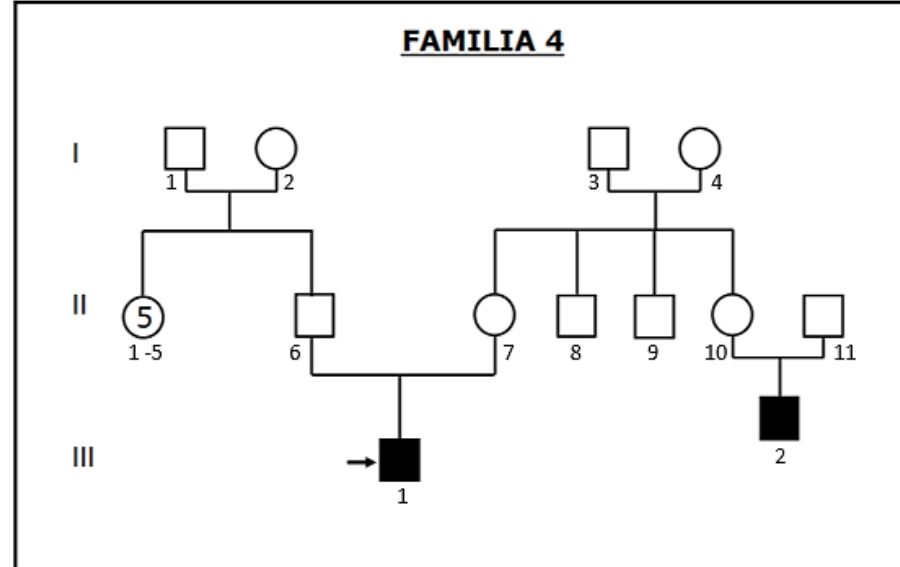
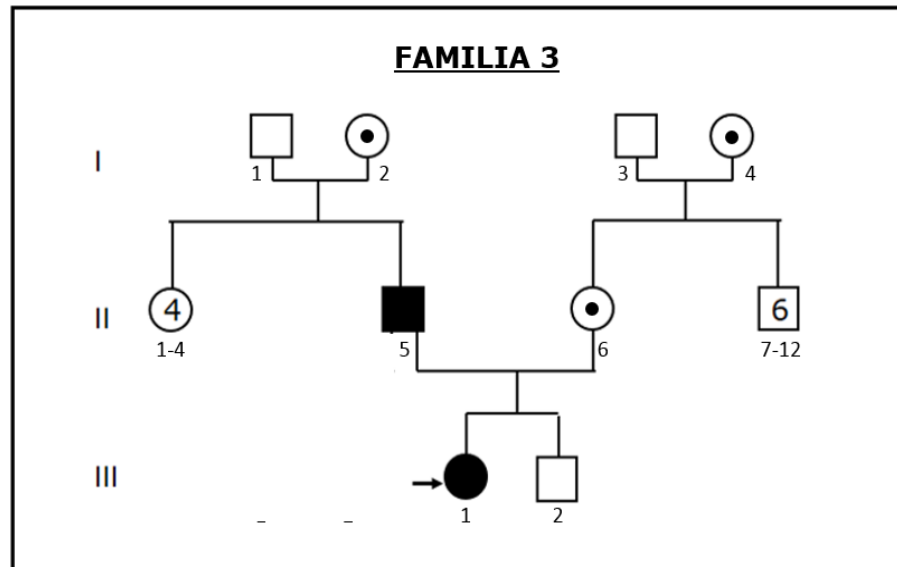
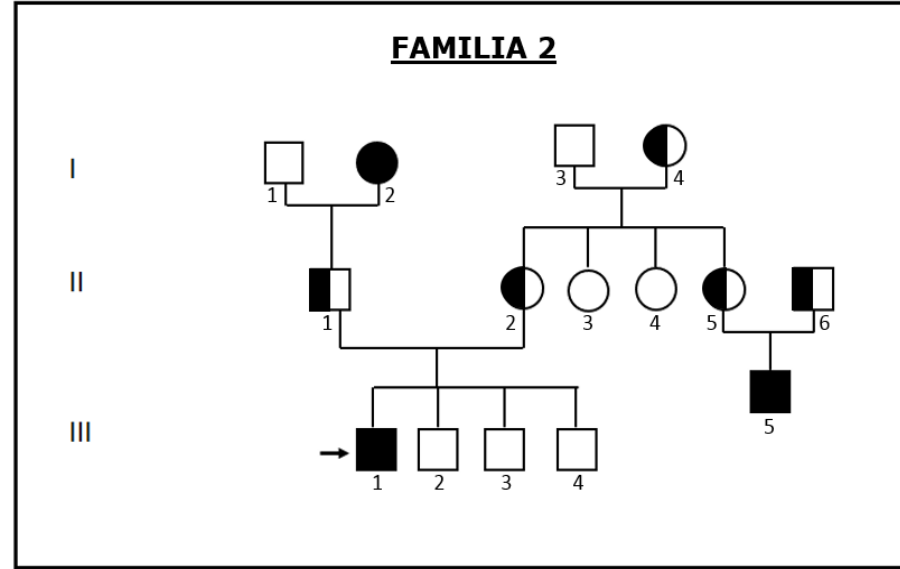
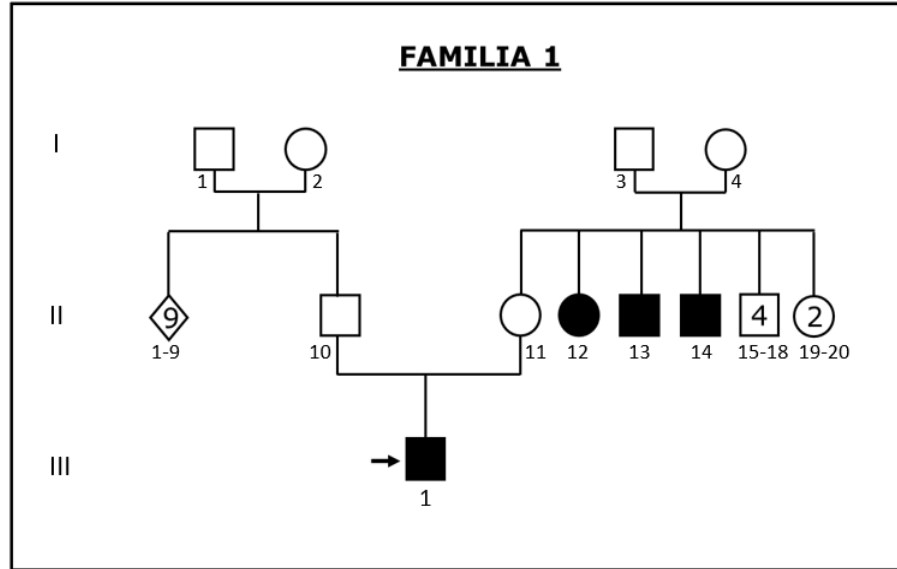
CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN ENCUESTADA

CARACTERÍSTICAS PRESENTES DURANTE EL DESARROLLO DE LOS INDIVIDUOS OBJETO DE ESTUDIO

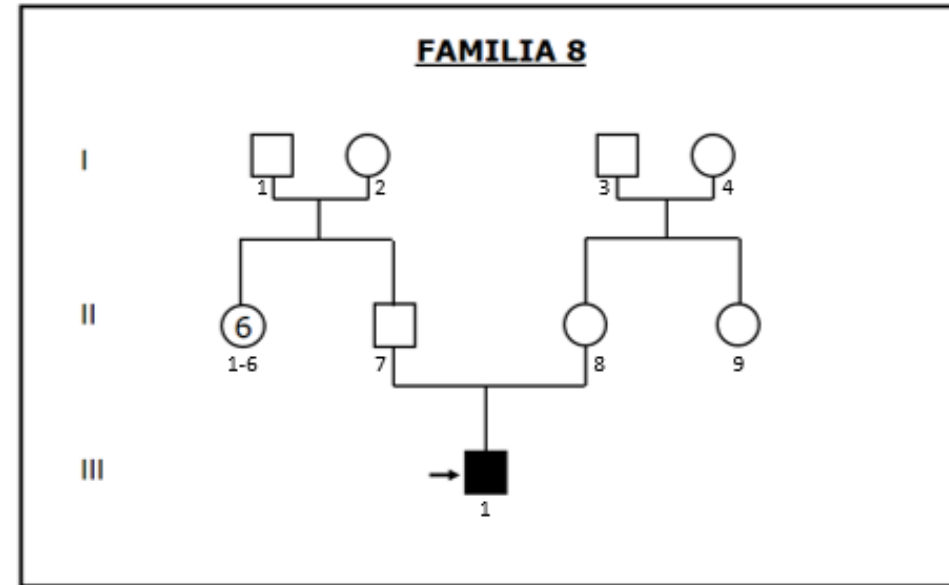
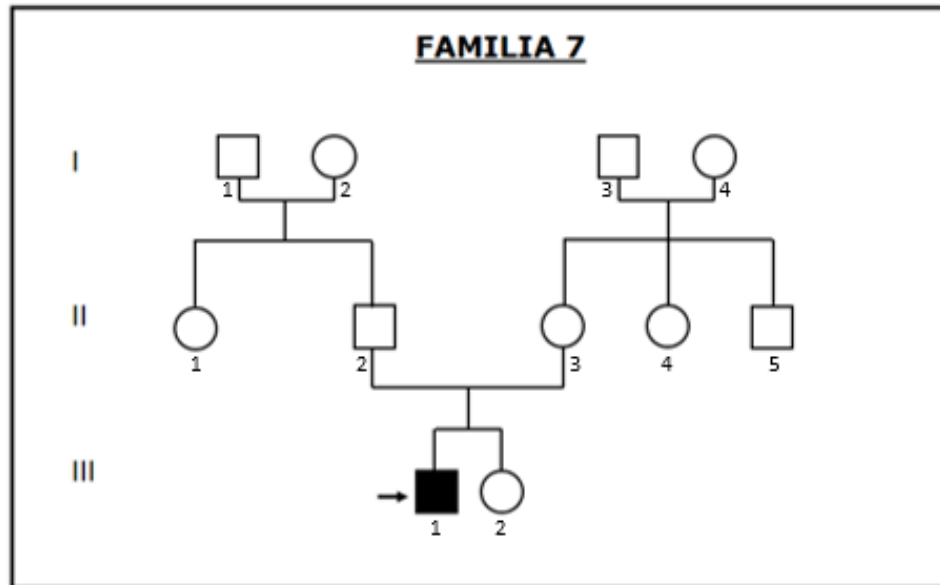
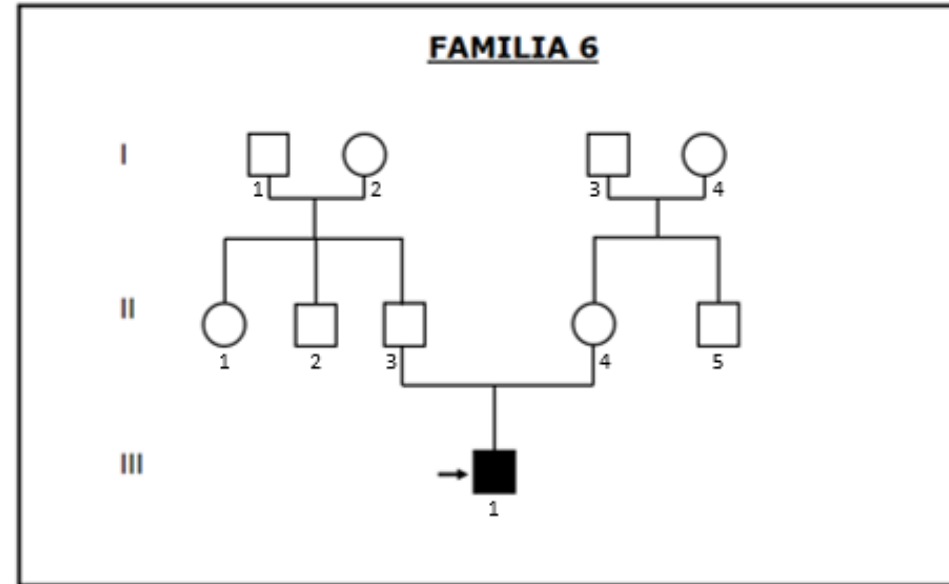
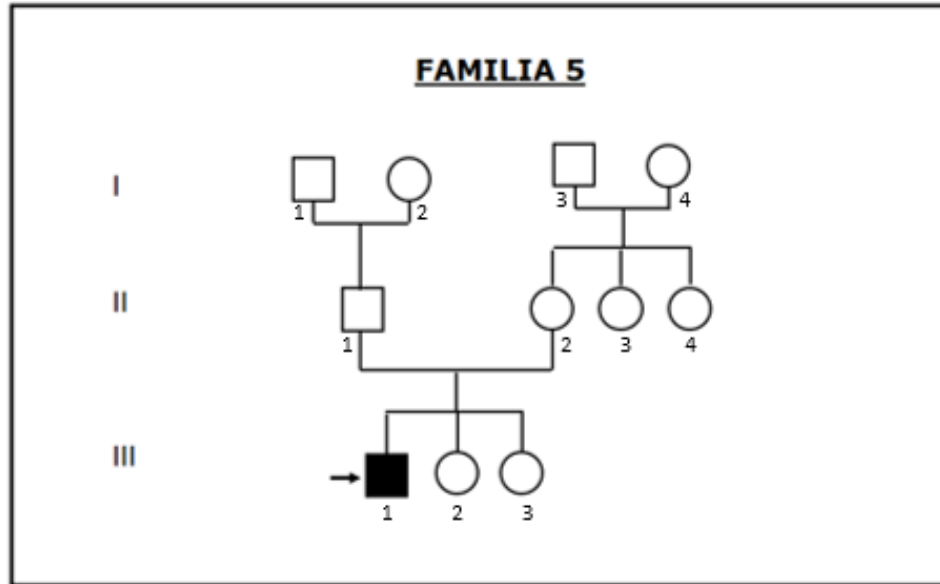


Fernández et al. (2001) **PRESELECCIÓN - CARACTERÍSTICAS**

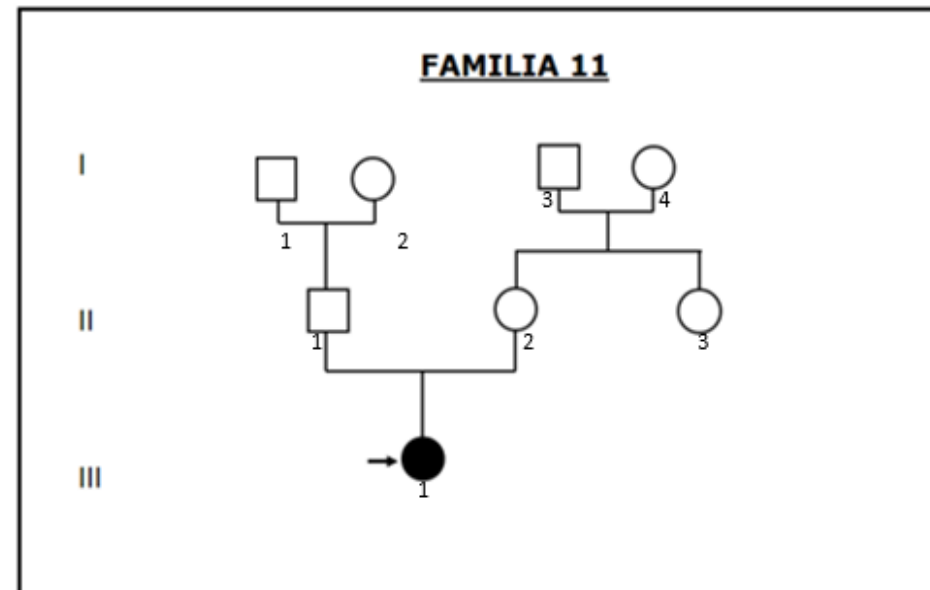
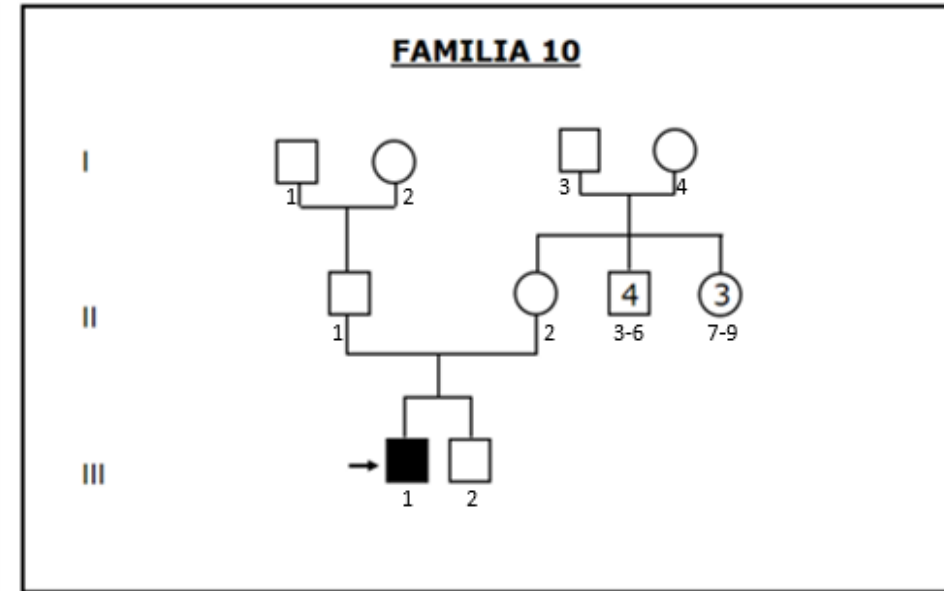
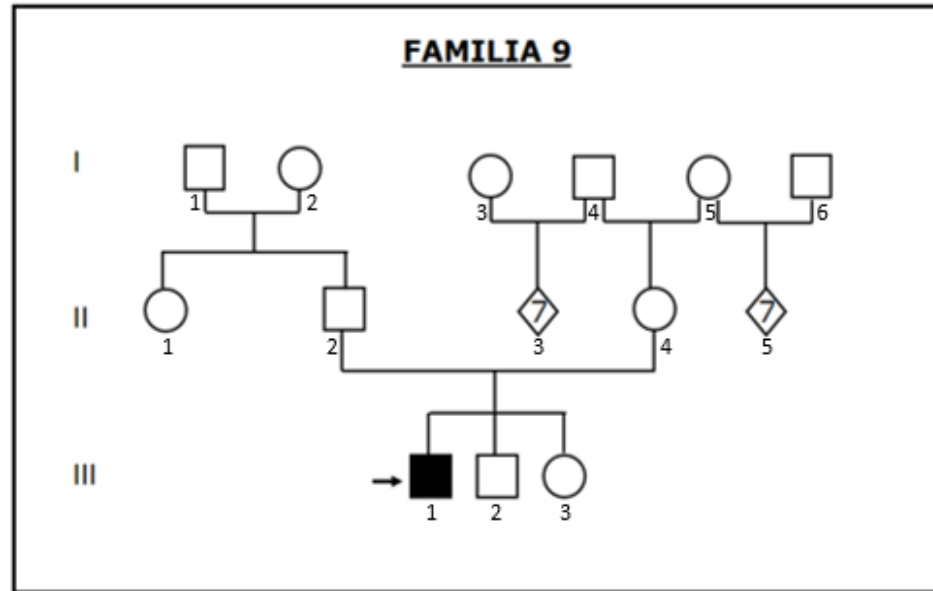
ANÁLISIS DE GENEALOGÍAS



ANÁLISIS DE GENEALOGÍAS



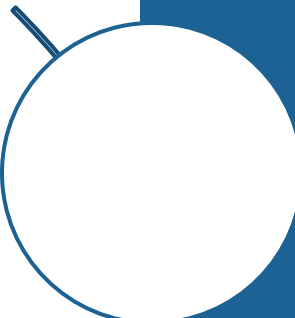
ANÁLISIS DE GENEALOGÍAS



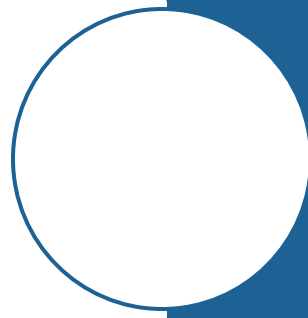
Payan y Saldarriaga (2001)
**GENEALOGIAS – PATRÓN DE
HERENCIA**

CONCLUSIONES

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 permitió la identificación de fragilidades y rupturas en diferentes cromosomas, a partir de la adición de Mitomicina C, demostrando su efecto inductor de aberraciones en el material genético a partir de muestras de la población control.



La elaboración de genealogías de la población de estudio permitió la identificación de familias con características asociadas al síndrome x frágil como posible causa genética de la deficiencia cognitiva.

GRACIAS