

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN POR FLUORESCENCIA
IN SITU (FISH) PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA TRANSLOCACIÓN
BCR/ABL**

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

GABRIELA OLEAS DE LA CARRERA

SANGOLQUÍ, 17 de Junio del 2008.

HOJA DE LEGALIZACION DE FIRMAS

ELABORADO POR

Gabriela Oleas de la Carrera

COORDINADORA DE LA CARRERA

Dra. Marbel Torres

SECRETARIO ACADÉMICO

Ab. Vinicio Zabala

Lugar y fecha: Sangolquí, Junio del 2008

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. GABRIELA DE LAS MERCEDES OLEAS DE LA CARRERA como requerimiento parcial a la obtención del título de **INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**.

Fecha

Dr. Ángel Guevara

DIRECTOR

Dr. Edmundo Estévez

CODIRECTOR

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia por todo el apoyo brindado, a todos los que fueron mis profesores en la Carrera de Biotecnología por transmitirme sus conocimientos, a mis amigas por su ayuda incondicional y desinteresada, y a todos los miembros del Laboratorio de Genética Molecular y Citogenética Humana de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por abrirme las puertas para la realización de este trabajo.

Gabriela Oleas De la Carrera

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA.....	I
LEGALIZACIÓN DEL PROYECTO	II
CERTIFICAIÓN DE DIRECTOR Y CODIRECTOR.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
ÍNDICE DE CUADROS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XII
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	15
1.2. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.....	15
1.3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	16
1.3.1. Objetivo General.....	16
1.3.2. Objetivos Específicos.....	16
1.4. MARCO TEÓRICO	16
1.4.1. El Cromosoma Filadelfia y la Translocación BCR/ABL.....	16
1.4.2. Citogenética Convencional.....	18
1.4.2.1. Preparación de Placas de Metafasas para Diagnóstico de Leucemias.....	19
1.4.3. Hibridación por Fluorescencia in situ.....	20
1.4.4. Sondas.....	21
1.4.4.1. Sondas Centroméricas, Teloméricas y Subteloméricas.....	22
1.4.4.2. SONDAS DE PINTADO CROMOSÓMICO.....	23
1.4.4.3. Sondas de Fusión.....	24
1.4.4.4. Sondas de Escisión.....	25
1.4.4.5. Sondas de Secuencia Específica.....	25
1.4.5. Almacenamiento de Sondas.....	25
1.4.5.1. <i>E. coli</i>	26
1.4.5.2. Plásmidos y Resistencia a Antibióticos.....	26
1.4.5.3. Marcadores de Resistencia.....	28

1.4.5.3.1. Coloranfenicol.....	29
1.4.5.3.2. Kanamicina.....	29
1.4.6. Miniprep.....	30
1.4.7. Marcaje 1.4.7.1. Marcaje Indirecto.....	30
1.4.7.2. Marcaje Directo.....	31
1.4.7.3. Fluoroforos.....	31
1.4.7.3.1. Tetrametilrodamida-5-2'-Desoxi-Uridina-5'-Trifosfato.....	32
1.4.7.3.2. Fluoresceína-12-2'-Desoxi-Uridina-5'-Trifosfato.....	32
1.4.7.4. Nick Translation.....	32
1.4.8. Hibridación in situ.....	35
1.1.8.1. Pretratamiento de las Placas	35
1.4.8.2. Lavados Post-Hibridación.....	36
1.4.8.3. Contrateñido.....	36
1.4.9. Aplicaciones de FISH.....	36
1.5. HIPÓTESIS.....	38
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
2.1. PARTICIPANTES.....	39
2.2. ZONA DE ESTUDIO.....	39
2.3. PERÍODO DE TIEMPO DE INVESTIGACIÓN.....	39
2.4. DISEÑO.....	39
2.5. PROCEDIMIENTOS.....	40
2.5.1. Cultivo de Bacterias.....	40
2.5.2. Extracción de Plásmidos.....	40
2.5.3. Medición del ADN plasmídico.....	41
2.5.3.1. Medición Cualitativa.....	41
2.5.3.2. Medición Cuantitativa.....	42
2.5.4. Mezcla de marcaje de fluoroforo 5X.....	42
2.5.5. Nick Translation.....	42
2.5.6. Preparación de placas.....	43
2.5.6.1. Cultivo de linfocitos.....	43
2.5.6.2. Cosecha de linfocitos	44
2.5.6.3. Extensión de Placas.....	44
2.6.4. Teñido con Giemsa y Bando G.....	44
2.5.6.5. Observación en campo claro.....	45

2.5.7. Proceso de Hibridación.....	45
2.5.7.1. Proceso de Pretratamiento de Placas.....	45
2.5.8. Observación por Fluorescencia	46
2.6. ANÁLISIS DE DATOS.....	47
2.6.1. Enumeración de señales.....	47
2.6.2. Cálculos.....	47
CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....	48
3.1 CRECIMIENTO DE COLONIAS.....	48
3.2. CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS.....	48
3.3. CUANTIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO.....	49
3.3.1. Electroforesis.....	49
3.3.2. Espectrofotometría.....	50
3.4. NICK TRANSLATION.....	51
3.5. DETECCIÓN DE LA TRANSLOCACIÓN BCR/ABL	52
3.5.1. Visualización de sondas.....	52
3.5.2. Comparación de resultados.....	52
3.6. CITOGÉNÉTICA VS. PCR.....	53
3.6.1. Procesamiento de los casos de Citogenética Vs. PCR.....	53
3.6.2. Test exacto de Fisher para Citogenética Vs. PCR.....	54
3.6.3. Medidas Simétricas de Citogenética Vs. PCR.....	54
3.6.4. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para Citogenética Vs. PCR.....	54
3.6.5. Prueba de los signos para Citogenética Vs. PCR.....	54
3.6.6. Prueba de McNemar para Citogenética Vs. PCR.....	54
3.7. CITOGÉNÉTICA VS. FISH	54
3.7.1. Procesamiento de casos de Citogenética Vs. FISH.....	54
3.7.2. Test exacto de Fisher para Citogenética Vs. FISH.....	55
3.7.3. Medidas Simétricas para Citogenética Vs. FISH.....	55
3.7.4. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon.....	55
3.7.5. Prueba de los signos para Citogenética Vs. FISH.....	55
3.7.6. Prueba de Prueba de McNemar para Citogenética Vs. FISH.....	55
3.8. FISH Vs. PCR.....	56
3.8.1. Procesamiento de casos para FISH Vs. PCR	56
3.8.2. Test exacto de Fisher para FISH Vs. PCR.....	56
3.8.3. Medidas simétricas para FISH Vs. PCR	56

3.8.4. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para FISH y PCR.....	56
3.8.5. Prueba de los signos para FISH Vs. PCR.....	56
3.8.6. Prueba de McNemar para FISH Vs. PCR.....	57
3.9. CITOGENÉTICA-PCR-FISH.....	57
3.9.1. Prueba de Friedman para Citogenética-PCR-FISH.....	57
3.9.2. Prueba de Cochran para Citogenética-PCR-FISH.....	57
3.9.3. Prueba W de Kendall para Citogenética-PCR-FISH.....	57
3.9.4. Análisis Factorial de correspondencia (AFCM).....	58
3.10. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD.....	58
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN.....	59
4.1. CONCENTRACIÓN BACTERIANA.....	59
4.2. CONCENTRACIÓN DEL PLÁSMIDO.....	60
4.3. TAMAÑO DE FRAGMENTOS.....	61
4.4. FACTORES QUE AFECTAN LA HIBRIDACIÓN.....	61
4.4.1. Estructura del ADN.....	61
4.4.2. Concentración de sal en las soluciones.....	61
4.4.3. Temperatura.....	61
4.4.4. pH.....	62
4.5. COMPARACIÓN DE RESULTADOS.....	62
4.5.1. Comparaciones entre parejas.....	62
4.6. DIFERENCIAS ENTRE FISH Y PCR.....	64
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.....	65
6.1. PRECAUCIONES CON LOS CULTIVOS.....	66
6.2. CONSEJOS MINIPREP.....	66
6.3. PRECAUCIONES EN LA HIBRIDACIÓN.....	67
6.4. PROBLEMAS EN LA VISUALIZACIÓN.....	68
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.....	70
CAPÍTULO 8: ANEXOS.....	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.2. Concentración de bacterias obtenidas a 18 horas de incubación en baño María en caldo LB.....	49
Tabla 3.3.2. Absorbancias a 260 y 280 nm., radios de pureza y concentraciones del ADN Plasmídico extraído.....	50
Tabla 3.5.2. Comparación de resultados obtenidos por FISH con Citogenética y PCR.....	52
Tabla 3.6.1. Resumen del procesamiento de los casos de Citogenética Vs. PCR.....	52
Tabla 3.7.1. Resumen de procesamiento de casos de Citogenética Vs. FISH.....	55
Tabla 3.8.1. Resumen de Procesamiento de casos FISH Vs. PCR	56

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.4.9. Deleciones y microdeleciones detectables por FISH.....	37
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.4.1.a Cariotipo 46,XX Ph +.....	17
Figura 1.4.1.b t(9;22)(q34;q11).....	18
Figura 1.4.4.1. Sonda Centromérica (a), Sondas Teloméricas (b), Sondas Subteloméricas (c).....	22
Figura 1.4.4.2. Sondas de pintado cromosómico.....	23
1.4.4.3. Representación de la distribución de señales de Sondas de Fusión.....	24
1.4.4.4. Representación de la distribución de señales de Sondas de Escisión.....	25
Figura 1.4.5.2.a. Representación de un plásmido dentro de <i>E. coli</i>	27
Figura 1.4.5.2.b. Partes del Plásmido	28
Figura 1.4.7.3.1. Fórmula estructural de la tetrametilrodamida-5-2'-desoxi-uridina-5'-trifosfato.....	32
Figura 1.4.7.3.2. Fórmula estructural de la fluoresceína-12-2'-desoxi-uridina-5'-trifosfato.....	33
Figura 1.4.7.4. Nick Translation.....	34
Figura 3.1. Fotografía de colonias de <i>E. coli</i> BCR/ BA 72 M14/ 22q11.2.11.9	48
Figura 3.2. Cultivo de <i>E. coli</i> ABL/ dJ1132H12/ 19q 34.11.....	49
Figura 3.3.1. Gel de Agarosa en TAE al 1% para confirmar el aislamiento y peso del ADN plasmídico.....	50
Figura 3.4. Fragmentos de sondas de BCR y ABL marcados por la Nick translation...51	
Figura 3.5.1 (100X) (a.) Núcleo observado en DAPI. (b) Señales de las sondas correspondientes a un caso negativo de BCR/ABL. (c.) Señales correspondientes a un caso positivo de BCR/ABL.....	52
Figura 3.12. Análisis Factorial de correspondencia (AFCM) para FISH, PCR y Citogenética,.....	58

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A: Diagnóstico de casos analizados por Citogenética y PCR.....	77
Anexo B: Tablas de contingencia de pruebas no paramétricas.....	78
Anexo C: Guía de patrones para conteo de señales en Interfase.....	79
Anexo D: Estadísticos descriptivos.....	80

RESUMEN

Se realizó el cultivo de las bacterias *E.coli* BCR/ BA 72 M14/ 22q11.2.11.9 y *E.coli* ABL/ dJ1132H12/ 19q 34.11 en caldo LB combinado con Cloranfenicol y Kanamicina, obteniéndose concentraciones de 3×10^8 y 6×10^8 bacterias/ml. respectivamente.

Se extrajeron los plásmidos portadores de las sondas de *BCR/ABL* por Miniprep. Se comprobó el peso y pureza del ADN extraído por electroforesis y espectrofotometría, obteniéndose una concentración promedio de 2.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. de ADN y un ratio de pureza de 2.

Se desarrolló la Nick translation para permitir que la sonda se una al marcador fluorescente, obteniéndose fragmentos marcados de ~800 bp. para la sonda de BCR y de ~100 bp. para la sonda de ABL.

Se extendieron placas con las muestras de médula previamente purificadas y se las sometió a un tratamiento de variación de temperaturas, pH y deshidrataciones para preparar a las células para la hibridación. Dicha hibridación se efectuó colocando la sondas marcadas. Se efectuó una contratinción con DAPI.

La observación al microscopio mostró resultados exitosos para las señales de las sondas fluorescentes. Los resultados de las muestras analizadas fueron cotejados con los datos obtenidos en Citogenética molecular y PCR, encontrándose a las tres pruebas asociadas y concordantes. En relación a la PCR, la FISH se mostró un 17% más sensible y un 98% tan específica que la Citogenética convencional.

ABSTRACT

E.coli BCR/ BA 72 M14/ 22q11.2.11.9 and *E.coli* ABL/ dJ1132H12/ 19q 34.11 were cultivated in LB liquid media with Chloramphenicol and Kanamicyn for each stock. The concentrations obtained were 3×10^8 and 6×10^8 cell/ml.

Plasmids harboring *BCR/ABL* probes were isolated by Miniprep. DNA weight and purity were tested by electrophoresis and Spectroscopy. The average of concentration got was $2.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. and the purity ratio were 2.

Nick translation were developed to bind the probe to de fluorophore. The labeled fragments obtained by this procedure were ~ 800 bp (BCR probe) and ~ 100 bp (ABL probe) long.

Chromosome spreads were prepared from previously purified bone marrow. The slides were treated with different temperatures, pH and dehydrations to prepare the cells for the hybridization. The hybridization was contrasted with DAPI.

The observation with fluorescence microscopy showed succesfull results for the probe signals. The results were campared with Cytogenetics and PCR data. The three analyses are associated and concordant. According to PCR, FISH is 17% more sensitive and 98% much specific than Cytogenetics.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

La translocación BCR/ABL t(9;22)(q34;q11), causante de varios tipos de leucemias (Jameson *et al.*, 1998), es analizada de forma complementaria por Citogenética convencional y PCR. Sin embargo, en casos complejos, el análisis de los resultados puede ser mucho más complejo de lo que se podría esperar. En dichos casos, una tercera prueba con la sensibilidad y especificidad de la Hibridación por Fluorescencia *in situ* (Pfeifer, 2006) podría integrar los análisis de forma dirimente.

1.2. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

En el Ecuador se presentan 3 casos nuevos de leucemias por cada 100000 habitantes (Paz-y-Miño *et al.*, 2001).

El objeto de este proyecto, la translocación t(9;22)(q34;q11), conocida también como cromosoma Filadelfia (Ph), se presenta en cerca del 95% de todos los casos de Leucemia Mieloide Crónica, 25% de los casos de Leucemia Linfocítica Aguda en adultos, entre el 3 y 5% de Leucemias Linfocíticas Agudas pediátricas, y menos del 1% de los casos de Leucemia Mielocítica Aguda. (Jameson *et al.*, 1998)

Las formas clínicas de las leucemias influyen en el tratamiento y los rangos de respuesta y sobrevida difieren entre los subtipos de esta enfermedad. Por lo tanto, es importante contar con métodos de diagnóstico cuyos resultados faciliten el escogimiento de los tratamientos más adecuados para las diferentes formas en las que se presenta esta enfermedad, en especial en casos de diagnóstico complejo. La FISH cumple con dichos requerimientos y complementaría al diagnóstico por Citogenética convencional y PCR.

La técnica de FISH, además, abriría paso para nuevas líneas de investigación en análisis cromosómico ya que, si bien se comienza con leucemias, una vez desarrollada la técnica se la puede implementar en otras investigaciones relacionados a alteraciones de los cromosomas.

1.3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1. Objetivo General

Aplicar la técnica de Hibridación por Fluorescencia in situ (FISH) para el diagnóstico de leucemias.

1.3.2. Objetivos Específicos

1.3.2.1. Cultivar las cepas de *E. coli* modificadas que contienen las sondas a utilizarse en la técnica.

1.3.2.2. Aislar las sondas de las cepas de *E. coli* mediante extracción por Miniprep.

1.3.2.3. Marcar las sondas con nucleótidos de fluorescencia por medio de Nick translation.

1.3.2.4. Comprobar la eficiencia de las sondas obtenidas mediante la técnica de FISH en casos reales por observación al microscopio.

1.4. MARCO TEÓRICO

1.4.1. El Cromosoma Filadelfia y la Translocación *BCR/ABL*

El núcleo de las células normales de humanos contiene 46 cromosomas (23 pares). Un cromosoma de cada par es de origen paterno y el otro de origen materno. Veintidós de los veintitrés pares de cromosomas son iguales en hombres y mujeres y se conocen como *autosomas*. El par veintitrés de cromosomas lo conforman los *cromosomas sexuales* y consisten en dos cromosomas X en el caso de las mujeres y de un cromosoma X y otro Y en el caso de los hombres (Wolstenholme, 1992). El cromosoma Filadelfia (Ph) es el resultado del cromosoma 22 acortado (Figura 1.4.1.a), debido a la translocación recíproca $t(9;22)(q34;q11)$ (Faderl *et al.*, 1999).

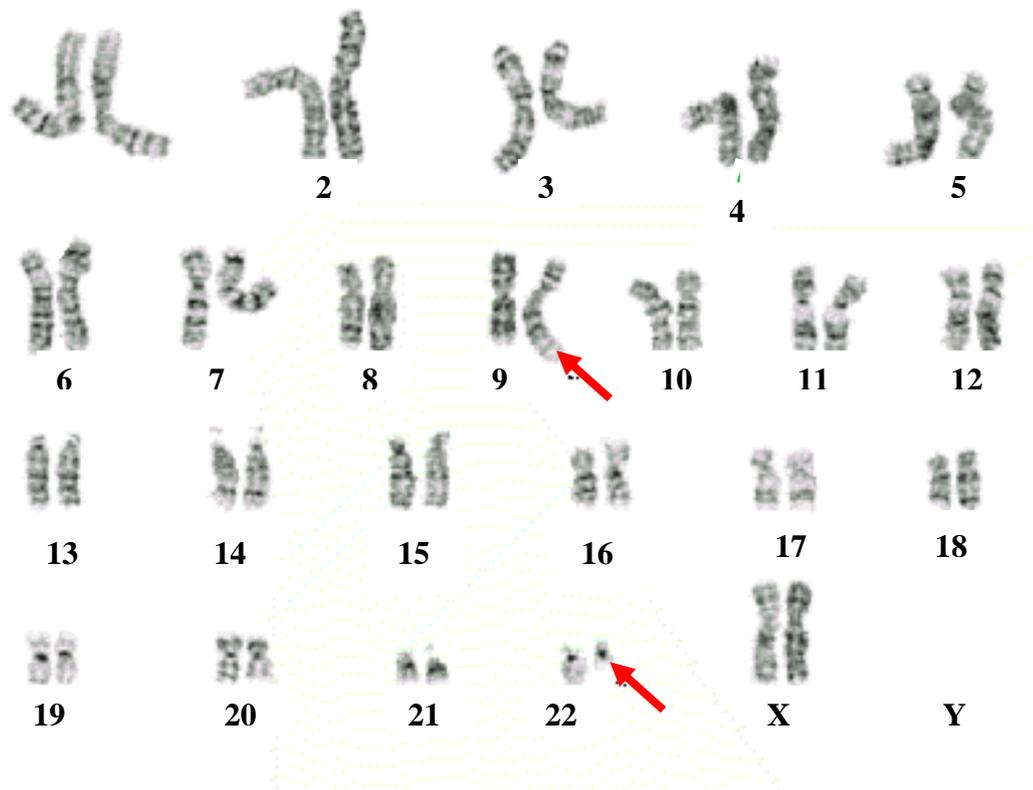


Figura 1.4.1.a Cariotipo 46,XX Ph +. Uno de los cromosomas del par 22, notablemente más pequeño que su pareja (Cromosoma Filadelfia), mientras uno de los cromosomas del par 9 es más largo que su pareja.

Fuente: <http://www.lhsc.on.ca/lab/cytogen/cml.htm>

Tanto en leucemia mieloide crónica como en leucemia linfocítica aguda, la t(9;22) resulta en la translocación del proto-oncogén *ABL* del brazo largo distal del cromosoma 9 al gen *BCR* al cromosoma 22, formando el gen de fusión *BCR-ABL*. (Jameson *et al.*, 1998).

El descubrimiento del cromosoma Filadelfia renovó el interés en el estudio de la Citogenética de las leucemias y fue el primer paso para determinar por qué mecanismo la t(9;22) se relaciona con el proceso de la leucemia (Heim *et al.*, 1995). Eventualmente se dilucidó que la translocación de cromosoma Ph añade un segmento 3' del gen *ABL* del cromosoma 9q34 a la parte 5' del gen *BCR* del cromosoma 22q11 (Figura 1.4.1.b), generando un gen híbrido *BCR-ABL* que se transcribe a un ARNm quimérico *BCR-ABL*. (Faderl *et al.*, 1999; Nussbaum *et al.*, 2001), el cual contribuye directamente al desarrollo del fenotipo maligno de la LMC, al igual que otras translocaciones características en otros tipos específicos de cáncer (Thomson *et al.*, 1996).

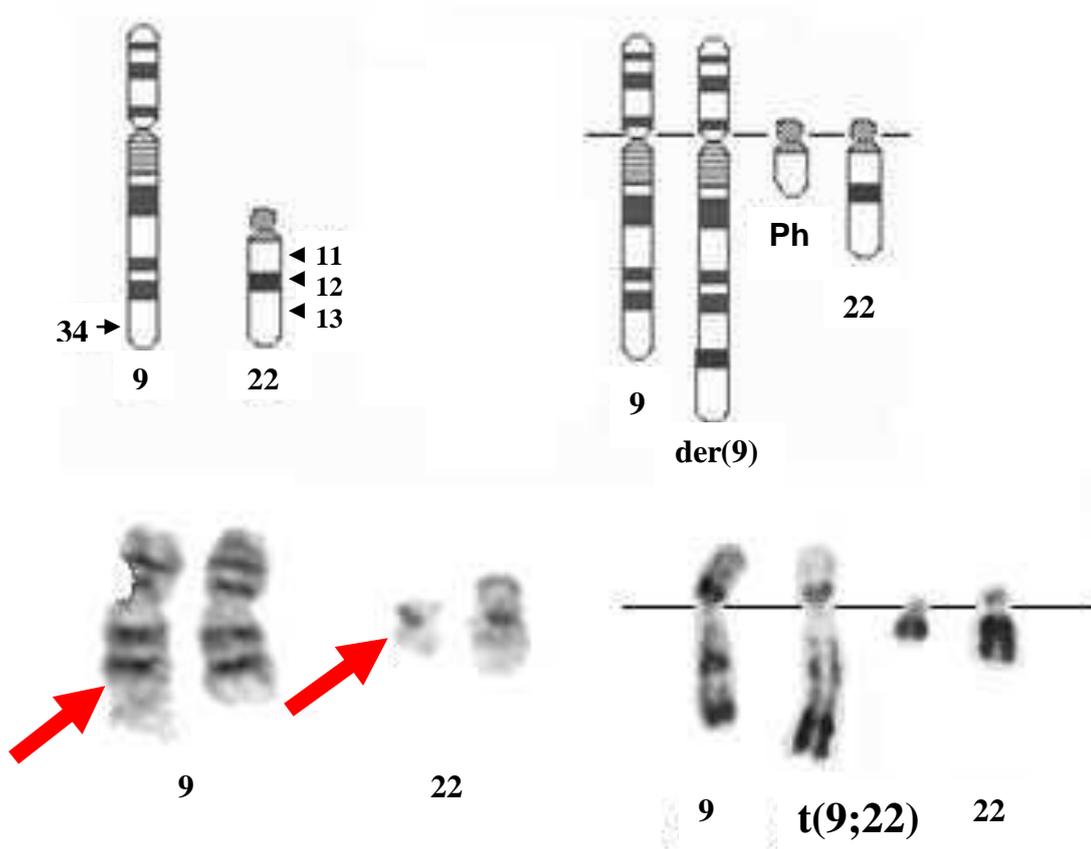


Figura 1.4.1.b $t(9;22)(q34;q11)$ Segmento 9q34 se transloca con el segmento 22q11 formando un cromosoma der(9) y el cromosoma Filadelfia (Ph).

Fuente: <http://www.cmlsupport.com/cmlchromosome.htm>

1.4.2. Citogenética Convencional

La Citogenética estudia el material genético a nivel celular. Los cromosomas pueden ser visualizados individualmente cuando se encuentran en el ciclo activo de replicación. Dichos cromosomas se obtienen de una población de células que se está dividiendo naturalmente o cuya división ha sido inducida *in vitro*. La replicación tarda entre 24 y 48 horas, tiempo en el que la mayoría de los núcleos se encontrarán en interfase (Rooney, 1987; Wolstenholme, 1992).

Durante cada ciclo celular el ADN de los cromosomas se duplica y la célula se divide en dos hijas idénticas a la original. La replicación del ADN se efectúa en la fase S (S=Síntesis) que se lleva a cabo en la mitad de la interfase. Los períodos de interfase antes y después de de la fase S se llaman G_1 y G_2 respectivamente (G=gap) (Wolstenholme, 1992; McArteer *et al.*, 1994). Los cromosomas no pueden ser

diferenciados en interfase sino en el breve período de división celular, conocido como mitosis o fase M, llevado a cabo durante los últimos 30 minutos del ciclo celular (Therman *et al.*, 1986; Wolstenholme, 1992).

De los cuatro pasos de la mitosis, la metafase presenta las características más favorables para la visualización de los cromosomas. En este estado la membrana nuclear se pierde y los cromosomas pueden ser apreciados de forma separada cada uno con sus dos cromátides idénticas (Therman *et al.*, 1986; Wolstenholme, 1992).

1.4.2.1. Preparación de Placas de Metafases para Diagnóstico de Leucemias

Para la observación de metafases en leucemias se parte de una muestra de médula ósea que debe ser incubada en un medio de cultivo que facilite la proliferación de linfocitos (Baserga, 1987; Gosden *et Al.*, 1992; Rooney *et al.*, 1992; Paz y Miño *et al.*, 2000).

Pasadas 24 horas de cultivo, los linfocitos son sometidos a un fijador, generalmente colchicina, por el que las células que se encuentren en metafase se detendrán en ese estado (Baserga, 1987). Para mejorar la visualización de los cromosomas, la preparación de linfocitos es tratada con una solución hipotónica para que el gradiente de concentración hinche la célula de modo que los cromosomas se separen. Finalmente, se utiliza un Fijador Carnoy tanto para lavar a la muestra como para extenderla en una placa (Gosden *et Al.*, 1992; Rooney *et al.*, 1992; Paz y Miño *et al.*, 2000).

Para facilitar el análisis morfológico de los cromosomas, las placas ya extendidas generalmente son “bandeadas”, es decir, teñidas de tal forma que presenten un patrón de bandas que facilite su diferenciación. Uno de los bandeos más populares es el bandedo G o GTG, que utiliza tripsina (T) para tratar a los cromosomas que posteriormente son teñidos con Giemsa (G) (Benn *et al.*, 1992; Paz y Miño *et al.*, 2000). Entonces los cromosomas están listos para ser observados y analizar la presencia o ausencia del cromosoma Philadelphia (Sandberg, 1990; Faderl *et al.*, 1999).

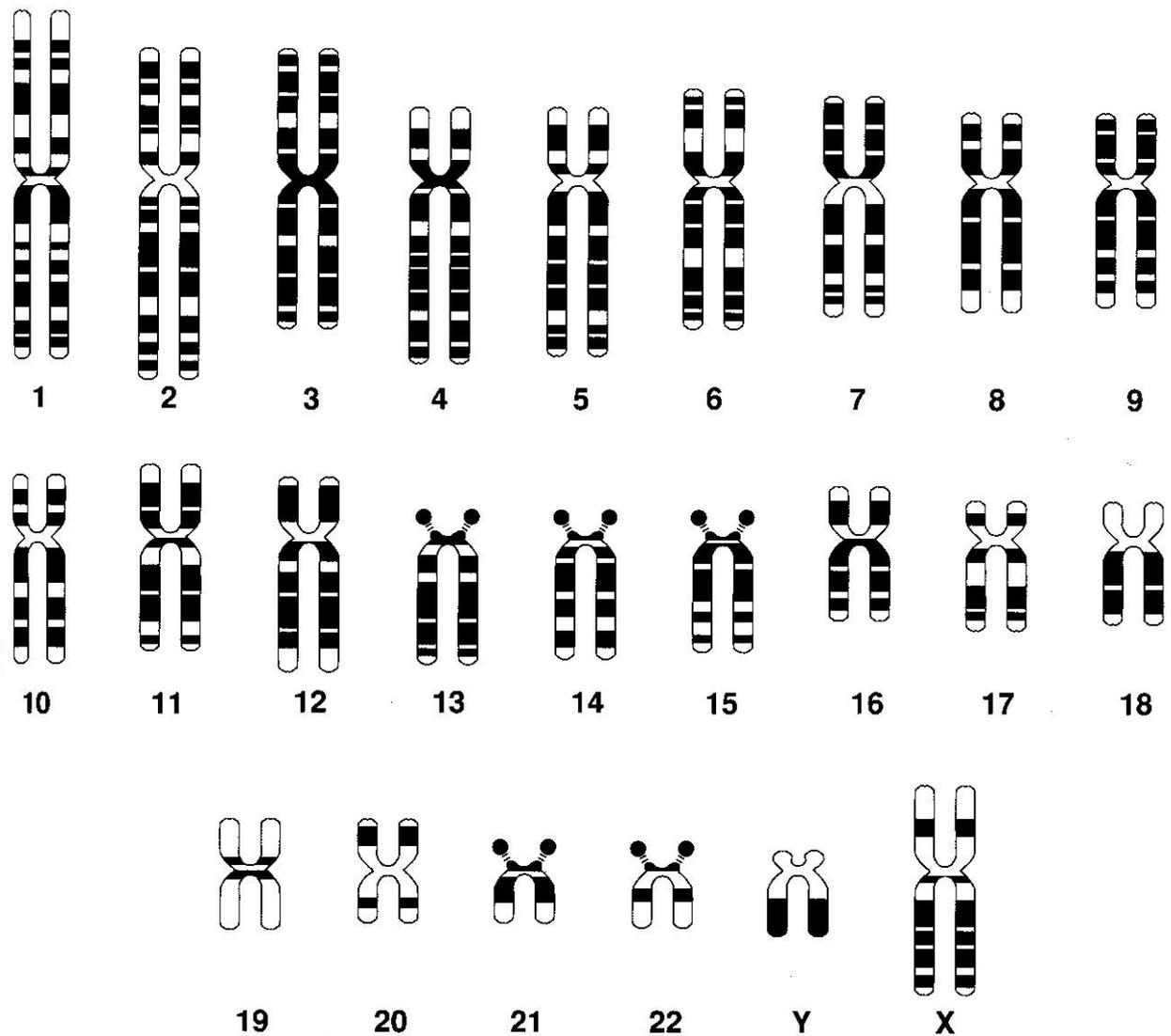


Figura 1.4.2.1 Patrón de bandas para un Cariotipo Humano según Bando G

Fuente: <http://www.ucm.es/info/genetica/AVG/practicas/cariotipo/carioP.htm>

1.4.3. Hibridación por Fluorescencia *in situ*

La hibridación por fluorescencia *in situ* es una técnica de Citogenética Molecular que complementa el análisis estructural de la Citogenética convencional con la especificidad y sensibilidad de las técnicas de Biología molecular.

Aunque la hibridación *in situ* se ha usado desde hace tres décadas (Lay *et al.*, 1993; Pfeifer, 2006), su implementación en el diagnóstico molecular es reciente y su desarrollo se ha extendido rápidamente desde la década de los 90 (González, 2003).

La Hibridación por Fluorescencia *in situ* utiliza una sonda de ADN marcado para ser hibridada con el ADN cromosómico denaturado *in situ*. La denaturación *in situ* se logra a partir de una placa de cromosomas en metafases o interfases preparada a partir de linfocitos de sangre periférica o de líneas celulares linfoblastoides del mismo modo en el que son preparadas las placas para ser observadas al microscopio por Citogenética convencional (Strachan *et al.*, 1999).

En comparación con otras técnicas moleculares, la hibridación por fluorescencia *in situ* es única en sus bases morfológicas pues utiliza la visualización de una sonda específica (Schwarzacher *et al.*, 2000; Pfeifer, 2006). La FISH es usada por su alta sensibilidad y resolución espacial, así como por las facilidades que brinda para combinaciones en pruebas multicolor. En muchos laboratorios de citogenética clínica se usa primordialmente para detección prenatal de alteraciones germinales, tales como microdelecciones. También es útil para la detección de alteraciones somáticas asociadas al cáncer con diagnóstico conocido, pronóstico o implicaciones terapéuticas, particularmente para leucemias, donde los especímenes citológicos celulares son obtenidos de forma relativamente fácil de médula ósea o sangre periférica. En los laboratorios de anatomía patológica, las aplicaciones de la FISH asociadas a la oncología para tumores sólidos son las de mayor interés. Cuatro son las alteraciones que actualmente se detectan de manera común por FISH: aneusomías, deleciones, amplificaciones y translocaciones (Pfeifer, 2006).

1.4.4. Sondas

La sonda es el fragmento de ADN (o ARN) que, una vez marcada con un fluoroforo, se hibridará en la muestra a investigarse para determinar la presencia, ausencia o forma de presentarse de la secuencia de interés. Esta secuencia puede corresponder a un gen, a un fragmento de gen y aún largos fragmentos de ADN, hasta un cromosoma entero, siempre y cuando la hibridación no se dé en secuencias repetidas (Miller *et al.*, 2001).

1.4.4.1. Sondas Centroméricas, Teloméricas y Subteloméricas

De acuerdo a la región a la cual las sondas son complementarias, se pueden clasificar en sondas centroméricas, teloméricas y subteloméricas (González, 2003).

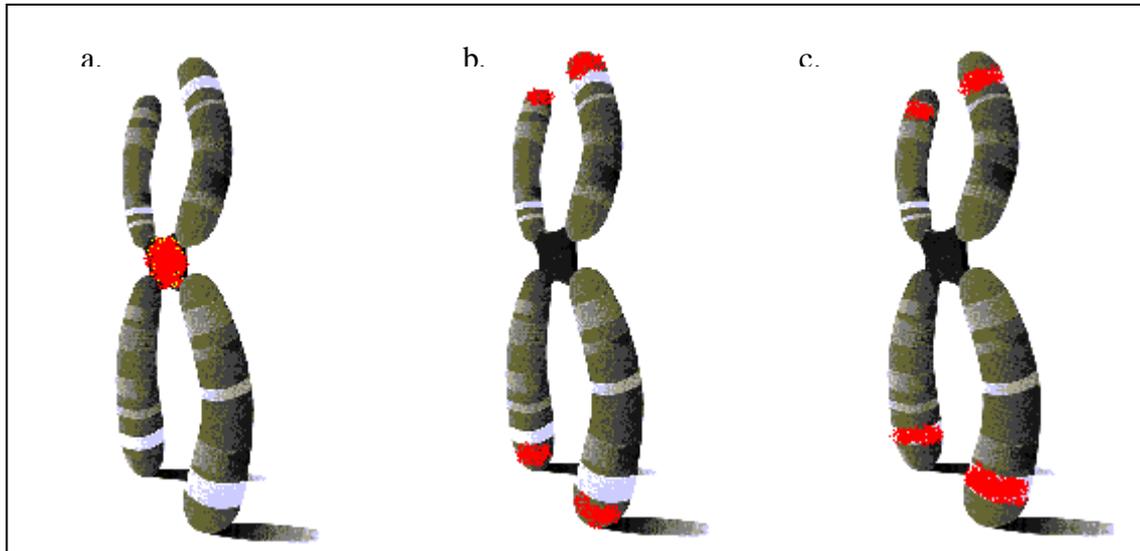


Figura 1.4.4.1. Pintado en rojo la ubicación de: Sonda Centromérica (a), Sondas Teloméricas (b), Sondas Subteloméricas (c)

Fuente: Modificado de: <http://cmcweb.lrk12.nj.us/webquest/sidelsky/chromosome.gif>

Las sondas centroméricas se unen a las secuencias α -satélite, ricas en repeticiones en tándem AT, de los centrómeros de los cromosomas y sirven para cuantificar alteraciones numéricas e identificar cromosomas marcadores. Las sondas teloméricas y subteloméricas también son complementarias a secuencias repetidas en tándem y sirven para detectar translocaciones crípticas y deleciones terminales (Miller *et al.*; 2001; González, 2003).

Las zonas teloméricas son ricas en información muy interesante en tantos sentidos que las sondas teloméricas han sido usadas en investigaciones sumamente diversas: Desde cómo el largo de los telómeros regula el estado epigénico de los telómeros y subtelómeros en mamíferos (Benetti *et al.*, 2007) hasta el origen del Síndrome de Sotos, conocido desde los años 60, en una haploinsuficiencia del gen NSD1 en el 2002 (Kurotaki *et al.*, 2002). También han permitido descubrir la

intervención de varias proteínas de la familia Rb en la regulación del largo de los telómeros (García-Cao *et al.*, 2002).

Las sondas teloméricas han sido usadas además en estudios de alargamiento alternativo de telómeros relacionado a recombinación homóloga en cáncer (Dunham *et al.*, 2000). También, en combinación con sondas centroméricas, las sondas teloméricas han sido usadas para determinar que el acortamiento de telómeros está relacionado a inestabilidad cromosómica en colitis ulcerativa que, eventualmente, puede desencadenar cáncer (O'Sullivan *et al.*, 2002).

1.4.4.2. SONDAS DE PINTADO CROMOSÓMICO

Las sondas de pintado cromosómico, a diferencia de las citadas anteriormente, son complementarias a secuencias no repetitivas de los fragmentos de todo un cromosoma. En metafase, el resultado es una tinción muy uniforme de todo el cromosoma que sirve para determinar alteraciones estructurales (González, 2003). Este tipo de sondas no sólo son útiles para definir anomalías numéricas en el cariotipo sino que además han sido usadas en combinación con sondas de fusión para analizar mecanismos de imprinting (Cleary *et al.*, 2001).

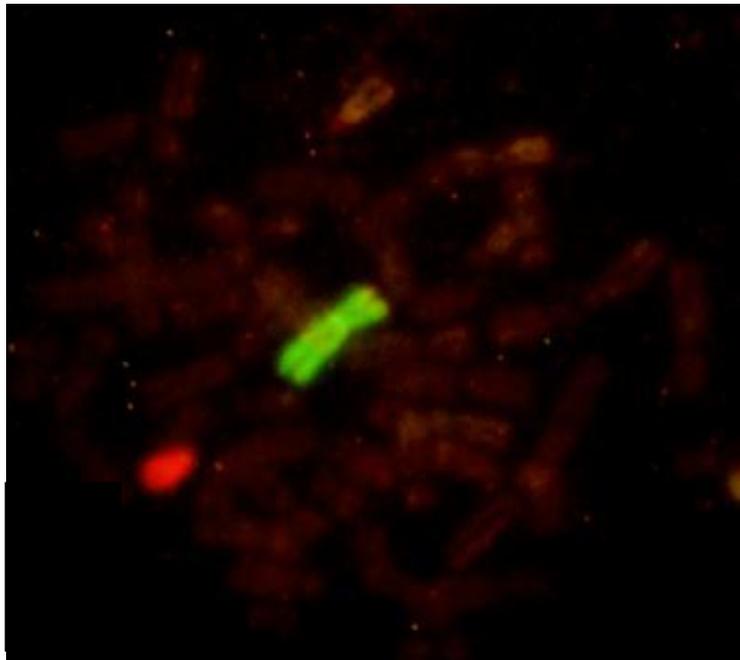


Figura 1.4.4.2. Sondas de pintado cromosómico. En verde: Cromosoma X. En rojo: Cromosoma Y.

Fuente: Curso de Hibridación por Fluorescencia *in situ*. SOLCA Cuenca. Febrero del 2008.

1.4.4.3. Sondas de Fusión

Para el análisis de translocaciones se suelen utilizar las sondas de fusión. Dichas sondas contienen las regiones de interés de los cromosomas implicados en la translocación y cada una es marcada con un fluorocromo diferente. En una célula normal se observan dos señales de cada uno de los colores, mientras que en una célula con translocación se observa una fusión de las señales (González, 2003). Las sondas de fusión han sido usadas para el análisis de translocaciones estudiadas desde hace mucho tiempo como la *BCR/ABL* (Vysis, 1998), permitiendo encontrar anomalías relacionadas a leucemias no descubiertas previamente en base a otras pruebas (Wan *et al.*, 2003), hallar frecuencias de variantes atípicas de *BCR/ABL* (Demerhi *et al.*, 2005), es útil para hallar otro tipo de desórdenes genéticos relacionados con leucemias (Vargas *et al.*, 2002; Hodgson *et al.*, 2007) y, combinadas con otras técnicas, como array-CGH (Array Comparative Genetic Hybridization), han permitido definir translocaciones y fusiones no conocidas previamente en leucemias (Graux *et al.*, 2004).

Este tipo de sondas han sido usadas también para el descubrimiento de nuevos genes en investigaciones no necesariamente relacionadas al cáncer como en las realizadas para dilucidar relaciones entre retardo mental por translocaciones en el cromosoma X (Zemni *et al.*, 2000), así como para investigaciones con translocaciones conocidas de las que se está recopilando nueva información, como en el caso del nuevo producto de fusión que interrumpe la vía del Notch, generado por la $t(11;19)(q21;p13)$, translocación analizada en este estudio a partir de sondas de fusión (Tonon *et al.*, 2003).

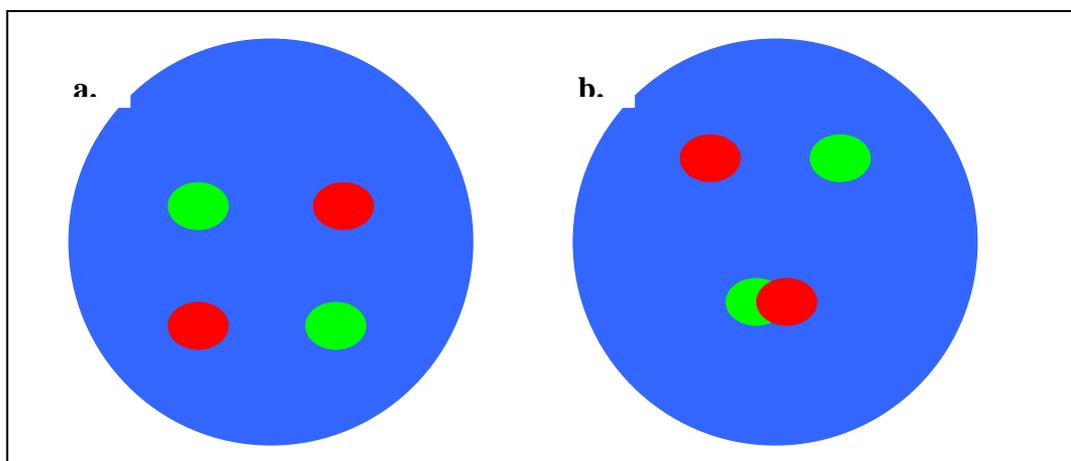
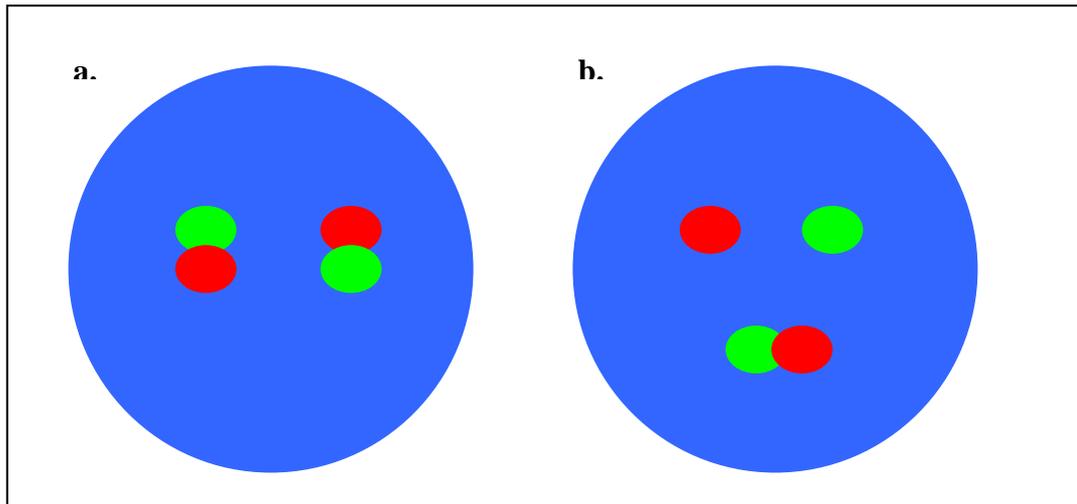


Figura 1.4.4.3. Representación de señales de Sondas de Fusión: Normal (a). Afecto con translocación (b).

Fuente: Gabriela Oleas, 2008.

1.4.4.4. Sondas de Escisión

Las sondas de escisión funcionan de forma inversa a las sondas de fusión ya que las sondas hibridan regiones muy próximas o incluso en distintas partes de un gen y son marcadas también con dos colores diferentes. Pero el resultado de la hibridación de una célula normal será dos señales fusionadas. En el caso de translocación se verá un par de las señales separadas (González, 2003).



1.4.4.4. Representación de la distribución de señales de Sondas de Fusión: Caso normal (a) y Caso afecto con una translocación (b)

Fuente: Gabriela Oleas, 2008.

1.4.4.5. Sondas de Secuencia Específica

Finalmente, las sondas de secuencia específica son las que permiten detectar regiones determinadas en el genoma. Por esta razón su uso se ha destacado en el mapeo del genoma humano (Miller *et al.*; 2001; González, 2003) e investigaciones en genes muy diversos como: *Stab1* (Cai *et al.*, 2003), *Nte* (Winrow *et al.*, 2003).

1.4.5. Almacenamiento de Sondas

Diferentes vectores de clonación como plásmidos, cósmidos, bacteriófagos P1, cromosomas artificiales derivados de P1, cromosomas bacterianos artificiales y cromosomas artificiales de levaduras han sido empleados para almacenar sondas de FISH. Actualmente, se dispone de BACs con su posición confirmada en el genoma

humano, de tal forma que hay al menos un clon para cada Mb de cada uno de los cromosomas humanos (González, 2003).

Con muy pocas excepciones, la mayoría de las cepas bacterianas usadas en el trabajo relacionado a ADN recombinante se derivan de *E. coli* cepa K-12 (Ausubel *et al.*, 1997). Las sondas utilizadas en el presente trabajo no son la excepción y se encuentran almacenadas en plásmidos dentro de bacterias *E. coli*.

1.4.5.1. *E. coli*

E. coli es un modelo de bacterias, ampliamente usada en Biología Molecular por su versatilidad y las facilidades que presenta tanto en su reproducción como mantenimiento. Posee un cromosoma circular de cerca de 3 millones de pares de bases y crece rápidamente mientras su medio contenga una fuente de carbono, como glucosa, que también le sirva como fuente de energía y sales. Sin embargo, *E. coli* crece aún más rápidamente en un medio que le provea de aminoácidos, precursores de nucleótidos, vitaminas y otros metabolitos que, caso contrario, la célula debería sintetizar (Ausubel *et al.*, 1997).

Cuando *E. coli* es colocada o inoculada en medio líquido, entra en el período lag, después del cual la bacteria comienza a dividirse. En un medio rico en nutrientes el cultivo habrá doblado su número en 20 o 30 minutos. Esta fase de crecimiento exponencial se llama fase log. Eventualmente, la densidad de la célula aumenta hasta el punto en el que los nutrientes o el oxígeno se agotan en el medio, o en el cual las concentraciones de los productos de desecho de las células han aumentado tanto que se inhibe el rápido crecimiento (McAteer *et al.*, 1996.; Ausubel *et al.*, 1997; Prescott, 2004). En este punto, bajo las condiciones normales de laboratorio, cuando el cultivo alcanza una densidad de $1-2 \times 10^9$ células/ml, las células dejan de dividirse rápidamente. Esta es la fase de saturación y cuando un cultivo ha alcanzado esta densidad se dice que se ha saturado recientemente (Ausubel *et al.*, 1997).

1.4.5.2. Plásmidos y Resistencia a Antibióticos

Los plásmidos son unidades autónomas que están dentro de la célula como un ADN extracromosomal (Lewin, 2008).

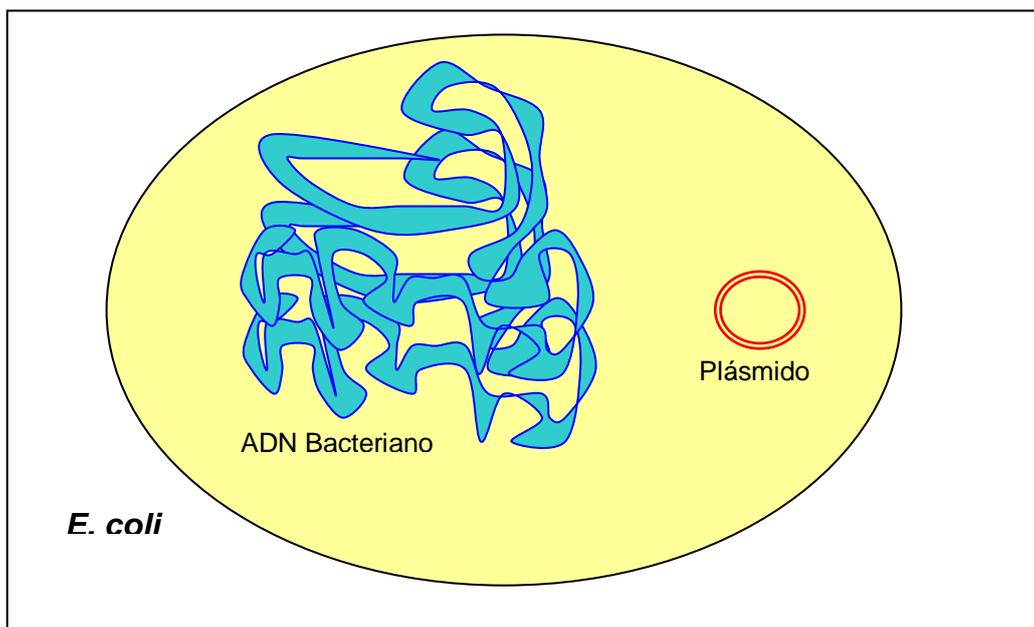


Figura 1.4.5.2.a. Representación de un plásmido dentro de *E. coli*. En rojo: ADN plasmídico de forma circular, doble cadena e independiente del ADN bacteriano.

Fuente: Gabriela Oleas, 2008.

En la década de 1970, las enzimas de restricción dieron lugar a muchos plásmidos elaborados a partir de fragmentos de ADN procedente de plásmidos formados naturalmente uniéndolos con genes de otro organismo (genes heterólogos) (Ausubel *et al.*, 1997; Díaz, 2005).

La replicación de ADN plasmídico se lleva a cabo por subconjuntos de enzimas que duplican el ADN cromosomal. El número de copias es variable, entre 700 y 1 copia de molécula plasmídica por célula y está controlado por una región del plásmido que incluye el origen de replicación del ADN (Sambrook *et al.*, 1989).

Los plásmidos bacterianos son usados frecuentemente en protocolos de clonación. Los plásmidos artificiales, y sus derivados, son los vectores usados más ampliamente como vectores de ADN recombinante. Todos los plásmidos usados como vectores de clonaje contienen tres características comunes: un replicador, un sitio de clonaje (Ausubel *et al.*, 1997) y un marcador selectivo que, generalmente, es un gen de resistencia a determinado antibiótico (Díaz, 2005).

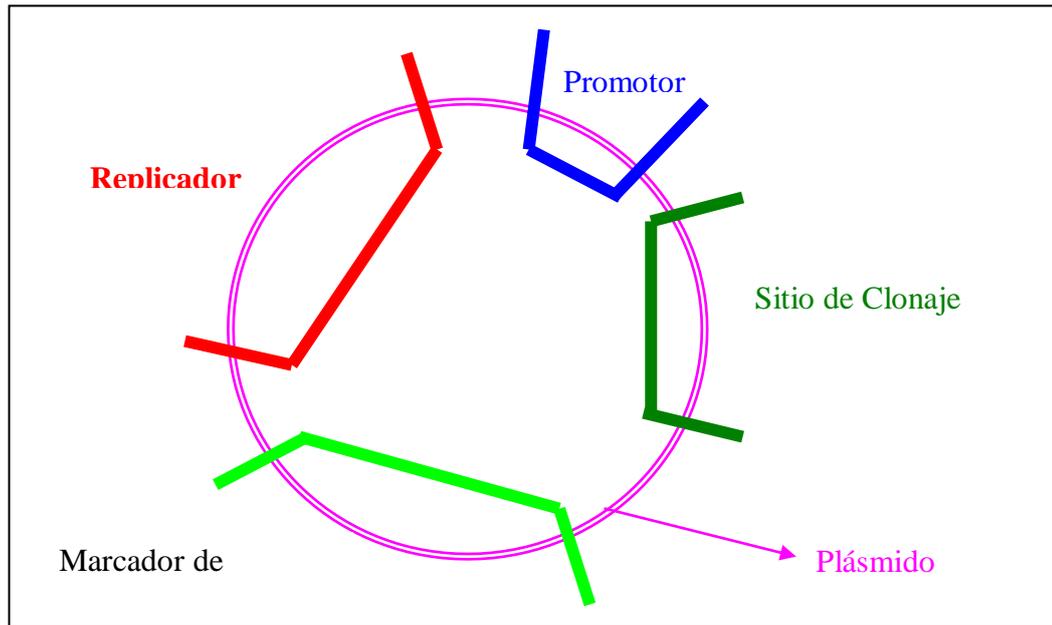


Figura 1.4.5.2.b. Partes del Plásmido.

Fuente: Gabriela Oleas, 2008.

1.4.5.3. Marcadores de Resistencia

Se pueden encontrar plásmidos en cepas naturales aisladas de *E. coli*, desempeñando importantes funciones como resistencia a antibióticos y producción o restricción de enzimas (Ausubel *et al.*, 1997).

Aún bajo las mejores condiciones, los plásmidos se estabilizan sólo en una pequeña minoría de la población bacteriana, por esta razón se utilizan plásmidos con marcadores de selección (Sambrook *et al.*, 1989), como la resistencia a antibióticos que determinan la replicación de colonias de la cepa con resistencia a determinado antibiótico en medio con o sin antibiótico (Ausubel *et al.*, 1997). De este modo se tiene la certeza de estar trabajando con bacterias que poseen el plásmido. Los marcadores de resistencia presentes en los plásmidos utilizados en este trabajo fueron genes de resistencia a cloramfenicol y kanamicina.

1.4.5.3.1. Cloranfenicol

El cloranfenicol actúa como bacteriostático, inhibe la síntesis de proteínas por interacción de la subunidad ribosomal 50S e inhibe la reacción de la peptidil transferasa. El modo de resistencia a este antibiótico depende de la cloranfenicolacetil transferasa, enzima que inactiva el cloranfenicol. Este antibiótico se disuelve en metanol a una concentración stock de 10 mg/ml. de la que se llega a una solución de trabajo de 20µg/ml (Ausubel *et al.*, 1997).

El gen de resistencia al cloranfenicol (Cm^r o *cat*) usado actualmente en vectores plasmídicos fue aislado originalmente de una transducción del bacteriófago P1. El gen *cat* codifica una proteína tetramérica citosólica que, en presencia de la acetilcoenzima A, cataliza la formación de derivados acetoxi hidroxil del cloranfenicol, impidiendo su enlace a los ribosomas. La expresión de la cloranfenicol acetiltransferasa es un catabolito sensible y se incrementa de 5 a 10 veces cuando la bacteria crece en una fuente de carbono –excepto glucosa- (Sambrook *et al.*, 1989).

1.4.5.3.2. Kanamicina

La kanamicina es un desoxiestreptamina aminoglicósido que se enlaza a los componentes ribosomales e inhibe la síntesis de proteínas (Sambrook *et al.*, 1989) y actúa como bactericida. La resistencia a la kanamicina depende de la Aminoglicosido fosfotransferasa, también conocida como neomicina fosfotransferasa, aminoglicosido acetiltransferasa y aminoglicosido nucleotidiltransferasa, que inactiva la kanamicina (Ausubel *et al.*, 1997).

La Aminoglicósido fosfotrasnferasa, con un peso molecular de 25,000, se localiza en el espacio periplasmático y se cree que la fosforilación de la kanamicina intervienen en su transporte hacia la célula (citado por Sambrook *et al.*, 1989, p. 1.6). La kanamicina se mantiene en soluciones stock a una concentración de 10 mg/ml. y se disuelve a 30 µg/ml. para soluciones de trabajo (Ausubel *et al.*, 1997).

1.4.6. Miniprep

La Miniprep es el proceso por el cual se extrae el ADN plasmídico de las bacterias que lo contienen. Se han publicado varios protocolos para la extracción y purificación de ADN plasmídico. Las bases teóricas de la extracción de plásmidos son las mismas que las de la extracción de ADN genómico y los reactivos utilizados en dichos protocolos dependen tanto de la cantidad como de la calidad de ADN que se desee obtener en relación al uso que se le vaya a dar a este ADN después de su extracción (Surzycky, 2000).

La miniprep es un protocolo utilizado para aislar plásmidos en pequeñas cantidades. En general, son modificaciones de los métodos de lisis alcalina de Birnboim y Boly de 1979 (Sambrook *et al.*, 1989; Surzycky, 2000) e Ish-Horowicz y Burke de 1981 (Sambrook *et al.*, 1989) y, debido a que son procedimientos rápidos, permiten obtener el ADN de un gran número de clones para analizarlo rápidamente (Ausubel *et al.* 1997; Surzycky, 2000).

1.4.7. Marcaje

Para la hibridación *in situ* se utilizan nucleótidos que deben ser modificados o “marcados” para que su localización pueda ser detectada después de la hibridación con el blanco de ADN. Para que este proceso sea exitoso, el marcador usado debe tener una estructura que no sea común a la del blanco de ADN que se pretende hibridar eventualmente. Además, el marcador debe ser sensible para detectar sólo los grupos que deben ser marcados (Schwarzacher *et al.*, 2000). En los años 60, los blancos eran marcados con átomos radioactivos y su señal era detectada en emulsiones fotográficas en autoradiografías. En este caso la señal tomaba varias semanas en desarrollarse y aunque es un método muy sensible, la resolución espacial es pobre (Sandberg, 1999; Schwarzacher *et al.*, 2000).

Ahora se utilizan marcadores no radiactivos. Estos marcadores unen a un fluoroforo, un hapteno u otro grupo químico (cuya presencia pueda ser detectada) a la mitad de un nucleótido y se incorporan usando técnicas de marcaje molecular estándar cuya detección se basa en una reacción de fluorescencia. Los sistemas de detección por fluorescencia son los preferidos para la hibridación *in situ* de ADN porque los lugares

para la hibridación están definidos, caracterizados y son fáciles de distinguir del “ruido” o señal de fondo. (Ward *et al.*, 1994; Schwarzacher *et al.*, 2000).

Para el marcaje no radioactivo, muchos investigadores usan uridina y dejan los nucleótidos restantes sin marcar. El uso de U se asume en los protocolos de marcaje, pero sondas con un alto contenido de GC requieren marcaje con G o C para dar suficiente señal en la detección. Aunque los resultados definitivos de la relación entre la incorporación de los marcadores y su detección sea limitada, no es el objetivo del marcaje el llegar a un 100% del remplazo de nucleótidos por los nucleótidos marcados. De hecho, los cambios estéricos en la sonda afectan tanto a los marcadores como a la hibridación, aumentando incorporaciones no deseadas. Por esta razón se usan cadenas de 4 a 20 grupos CH₂ para ligar el grupo marcado, y el nucleótido (U) para limitar estos efectos (Schwarzacher *et al.*, 2000).

Existen dos tipos de marcaje: El marcaje indirecto y el directo.

1.4.7.1. Marcaje Indirecto

El marcaje indirecto se basa en la afinidad de la biotina -con la que se marca la sonda- con la avidina, para detectar los sitios de hibridación. Existen varios marcadores y anticuerpos anti-haptenos u otros métodos de detección para este tipo de marcaje. Junto con la biotina, la dioxigenina y la fluoresceína son ampliamente usadas en el marcaje indirecto para marcadores no radioactivos (Ward, 1994; Schwarzacher *et al.*, 2000, Miller *et al.*, 2001).

1.4.7.2. Marcaje Directo

Los fluoroforos marcados directamente permiten agilizar el trabajo ya que no es necesaria su detección en pasos posteriores a los lavados después de la hibridación, como sucede con el marcaje indirecto. El marcaje directo muestra menos señales inespecíficas de las que se encuentran en el marcaje indirecto. La cantidad de señales obtenidas por este método son apenas el 10 o 15 por ciento de lo obtenido por el método indirecto. Sin embargo, esta deficiencia es solventada por dispositivos sensibles de fotografía digital. Los fluoroforos de marcaje directo están disponibles comercialmente (Ward, 1994; Schwarzacher *et al.*, 2000).

1.4.7.3. Fluoroforos

Los fluoroforos son grupos químicos que fluorescen por una emisión de luz con una longitud de onda más larga después de la excitación con una luz de longitud de onda más pequeña. Gracias a las investigaciones en cuanto a la estructura química de los fluoroforos se ha llegado a entenderlos mejor, permitiéndonos tener a muchos fluoroforos disponibles en varios espectros de luz visible e invisible (Schwarzacher *et al.*, 2000).

Los fluoroforos usados en este trabajos son: tetrametilrodamida-5-2'-desoxi-uridina-5'-trifosfato y Fluoresceína-12-2'-desoxi-uridina-5'-trifosfato.

1.4.7.3.1. Tetrametilrodamida-5-2'-Desoxi-Uridina-5'-Trifosfato

La tetrametilrodamida-5-2'-desoxi-uridina-5'-trifosfato es un fluoroforo marcado directamente cuya señal fluorescente se manifiesta con el color rojo. Tiene un peso molecular de 990.5, una excitación máxima a 551 nm y una emisión máxima de 575 nm. Su fórmula molecular es $C_{37}H_{37}N_6O_{17}P_3SLi_4$ (Roche a, 2007).

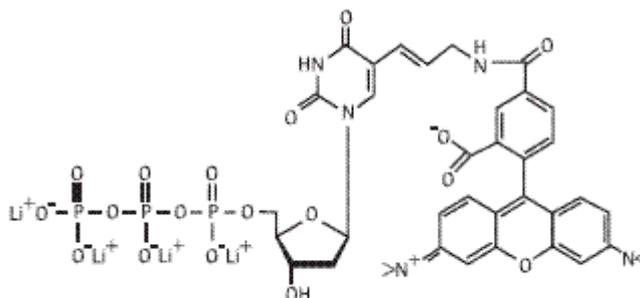


Figura 1.4.7.3.1. Fórmula estructural de la tetrametilrodamida-5-2'-desoxi-uridina-5'-trifosfato

Fuente: Roche a, 2007.

1.4.7.3.2. Fluoresceína-12-2'-Desoxi-Uridina-5'-Trifosfato

La fluoresceína es usada tanto para marcaje directo como para marcaje indirecto (Schwarzacher *et al.*, 2000) y su señal se presenta de color verde. La Fluoresceína-12-2'-desoxi-uridina-5'-trifosfato es un fluoroforo marcado directamente. Su peso

molecular es de 1018.4, su excitación máxima se da a 495 nm y su emisión máxima es de 521 nm.

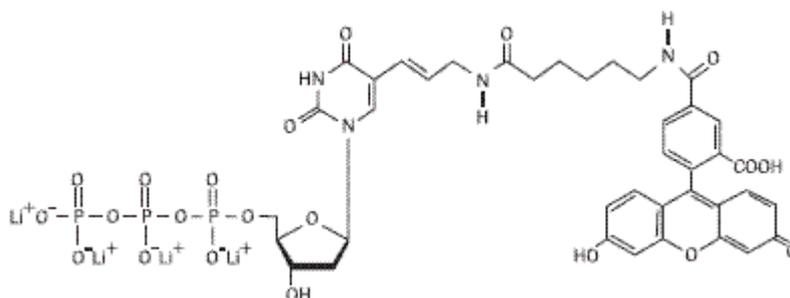


Figura 1.4.7.3.2. Fórmula estructural de la fluoresceína-12-(2'-desoxi-uridina-5'-trifosfato.

Fuente: Roche b, 2007

1.4.7.4. Nick Translation

Nick translation es uno de los métodos por los cuales se hace posible la incorporación de nucleótidos marcados con el fluoroforo a la sonda, es conveniente y generalmente efectivo tanto en ADN genómico total y en grandes insertos clonados (Ward *et al.*, 1994; Schwarzacher *et al.*, 2000).

La reacción de nick translation emplea dos enzimas: la desoxiribonucleasa (ADNasa) I y *E. coli* ADN polimerasa I. La ADNasa I hidroliza “nicks” o muescas aleatoriamente en cada una de las cadenas de la doble cadena de la molécula ADN, a bajas concentraciones de dicha enzima y en presencia de $MgCl_2$ (Schwarzacher *et al.*, 2000; Roche, 2005). Si la hidrolización hace muescas muy pequeñas puede determinar una incorporación ineficiente del marcador en las sondas que son más grandes, y si las muescas resultan muy grandes las sondas quedarán muy pequeñas para dichas muescas (Schwarzacher *et al.*, 2000).

La ADN polimerasa I sintetiza ADN complementariamente a la cadena intacta del templado (sonda) en sentido 5' - 3' usando el terminal 3'-OH de la muesca como primer. Simultáneamente, actúa como exonucleasa en sentido 5' - 3' removiendo nucleótidos en la dirección de síntesis. La actividad de la polimerasa reemplaza los nucleótidos removidos por los nucleótidos marcados con el fluoroforo conjugados al desoxiribonucleósido trifosfato. A una temperatura de 15°C, el ADN no marcado en la

reacción es entonces reemplazado por el ADN marcado nuevamente sintetizado (Roche, 2005).

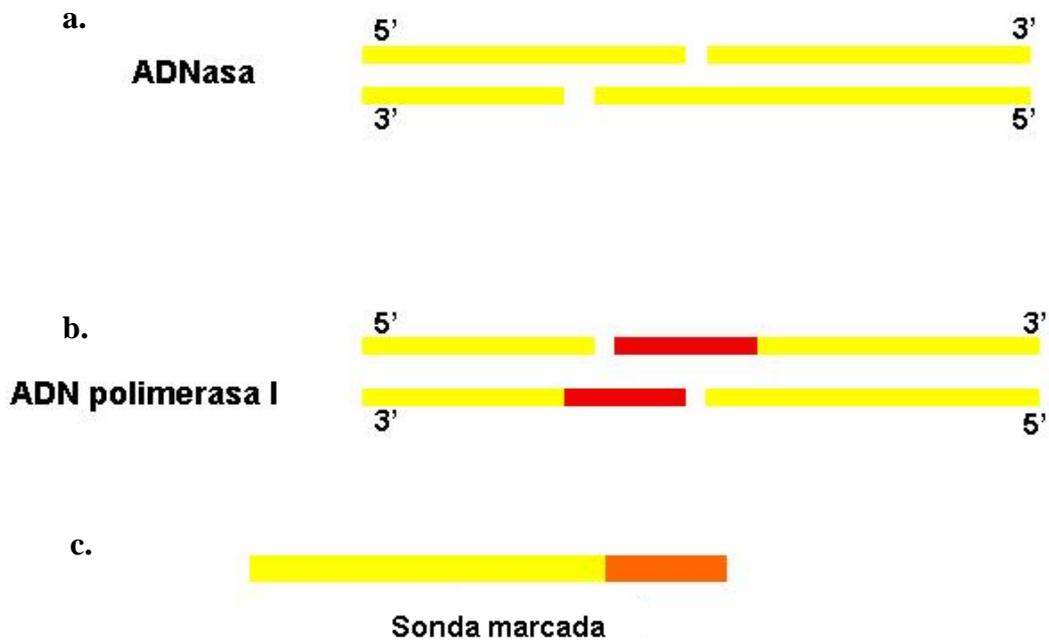


Figura 1.4.7.4. Nick Translation. Muecas o “nicks” elaboradas por la ADNasa (a.). En rojo: ADN sintetizado a partir del ADN marcado (b). Resultado: Sonda marcada (c.)

Fuente: Gabriela Oleas, 2007.

Mezclas optimizadas de enzimas de ADN polimerasa I y ADNasa I están disponibles comercialmente y producen una alta incorporación del marcador en el ADN en 60-90 minutos, produciendo fragmentos de entre 100 y 500 pb (Schwarzacher *et al.*, 2000; Roche, 2005, Invitrogen, 2006 a).

El tamaño de los fragmentos obtenidos en la nick translation influye drásticamente en los resultados de la hibridación debido a que si los fragmentos son muy grandes generalmente determinan un fondo lleno de señales que no han hibridado y que se quedan adheridos a la placa, generalmente porque un tamaño muy grande reduce el grado de accesibilidad de la sonda a ácido nucleico blanco. Por otra parte, si los fragmentos son muy pequeños la hibridación tendrá poca especificidad y sensibilidad (Roche, 2005).

1.4.8. Hibridación *in situ*

La hibridación se basa en dos principios: (1) La capacidad de las moléculas para formar puentes de hidrógeno con sus secuencias complementarias de ADN o ARN dando lugar a una hibridación específica y (2) La formación de ADN dúplex es reversible (Lay *et al.*, 1993).

La hibridación *in situ* consiste en colocar la sonda (en este caso marcada con fluoróforos) en placas extendidas del mismo modo en el que si lo fueran para ser analizadas por Citogenética convencional pero sometidas a un pretratamiento. La mayoría de protocolos de hibridación implican 16 horas de incubación para que las sondas encuentren sus secuencias homólogas. La estabilidad del ADN dúplex depende de factores como la temperatura, la concentración de iones, la composición de las bases, el tamaño del dúplex, la presencia de agentes desestabilizadores y la presencia de pares de bases inespecíficos (Lay *et al.*, 1993; Schwarzacher *et al.*, 2000).

1.1.8.1. Pretratamiento de las Placas

Las placas son elaboradas del mismo modo en el que lo serían para ser analizadas por los procedimientos estándar de citogenética y luego se las somete a un pretratamiento de denaturación (Upadhyaya *et al.*, 2004). El pretratamiento al que son sometidas las placas destinadas a la hibridación se realiza con 3 propósitos: (1) Remover ARN y proteínas que se ligan a la sonda y que incrementen el efecto de fondo indeseado. (2) Permeabilizar el ADN blanco para permitir el acceso de las sondas. (3) Fijar los cromosomas para que los ácidos nucleicos no se pierdan durante el proceso (Schwarzacher *et al.*, 2000).

La exactitud y la limpieza con que se trabaje durante este serán determinantes en la reproducibilidad de los resultados, reducción de la acumulación de suciedad causante de fondos no deseados y reducción de la pérdida o daño del material. Las soluciones usadas en este proceso deben cubrir totalmente a las placas y deben ser manejadas cuidadosamente para evitar turbulencias (Ward *et al.*, 1994; Schwarzacher *et al.*, 2000).

1.4.8.2. Lavados Post-Hibridación

Los lavados post-hibridación remueven las mezclas usadas para la hibridación y los restos de sonda no hibridada. Existen diferentes protocolos de lavado. Unos involucran soluciones hasta un 5% menos concentradas que las usadas en la hibridación, otros recomiendan el uso de soluciones más severas que las empleadas en la hibridación para así eliminar el efecto de fondo no deseado. La temperatura en este proceso debe ser controlada con exactitud ya que el incremento de pocos grados de temperatura en pocos segundos puede determinar la remoción de la sonda (Schwarzacher *et al.*, 2000).

1.4.8.3. Contrateñido

Después de los lavados post-hibridación, el ADN total es teñido de forma independiente de los marcadores. Este proceso se llama contrateñido y sirve para mostrar la morfología de los cromosomas y proveer contraste con el color usado para teñir las sondas de la hibridación. Para este paso, el DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol), que fluoresce bajo la excitación de luz uv, es el más usado debido a que tiñe de manera excelente a los cromosomas y mantiene a menudo sus patrones de bandeo.. El DAPI presenta una excitación y emisión insignificantes a otras longitudes de onda por lo que no interfiere con la excitación y detección de las señales de hibridación de la fluorescencia roja y verde (Schwarzacher *et al.*, 2000).

1.4.9. Aplicaciones de FISH

La técnica de FISH ha sido utilizada en estudios para determinar todo tipo de alteraciones cromosómicas, en especial las que por ser muy pequeñas presentarían dificultad para ser detectadas por medio de bandeo G.

Su especificidad la transforma en una buena herramienta para detectar deleciones y microdeleciones causantes de muchos síndromes difíciles de determinar hace varios años a través de citogenética convencional (Miller, 1974; Feingold *et al.*, 1974; Baraitser *et al.*, 1983 ; Thomsom *et al.*, 1996 ; Potocki *et al.*, 2000).

Cuadro 1.4.9. Deleciones y microdeleciones detectables por FISH

Delección oMicrodelección	Síndrome
4p16	Wolf-Hirschhorn
5p14/5p15	Cri du chat
7q11-23	Williams
8q	Retinoblastoma Langer-Giedion
13q14	Prader Willi
15q11-q13	Angelman
16p13	Rubinstein-Taybi
17p	Smith-Magenis
17p13.3	Miller-Decker
20p	Alagille
22q11	Di George/Shprintzen
11p13	WAGR

Por otra parte, la FISH ha sido instrumento de diversas investigaciones como: desórdenes ocasionados por duplicaciones (Sharp *et al.*, 2006), duplicaciones relacionadas a Alzheimer (Rovelet-Lecrux *et al.*, 2006) y análisis *in situ* de cáncer de mama (Chin *et al.*, 2006). Además, ha permitido estudiar los mecanismos de inactivación del cromosoma X (Boggs *et al.*, 2002; Peters *et al.*, 2002), detectar mutaciones relacionadas al cromosoma Y (Repping *et al.*, 2006), dilucidar el origen de síndromes raros como el polimorfismo relacionado al Síndrome de Williams Beuren (Osborne *et al.*, 2001), investigar mutaciones que determinan síndromes raros como son las del gen *LHX3*, causantes de deficiencias hormonales en la pituitaria (Netchine *et al.*, 2000) y reconocer otro tipo de mutaciones como las del gen *SUFU*, responsables en predisposición a meduloblastoma (Taylor *et al.*, 2002).

Mediante la FISH se han detectado variaciones a gran escala en el genoma humano (Iafrate *et al.*, 2004). Miles de loci han sido mapeados de forma rápida, confiable y precisa con FISH (Strachan *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 2001), como los exones del *OPAI* –causante de una neuropatía óptica- con su ubicación y orientación correspondientes con COD-FISH (o CO-FISH) por Chromosome Orientation and

Direction FISH (FISH para orientación y dirección de cromosomas) (Delette *et al.*, 2000), técnica por la que pueden ser detectadas hasta inversiones pericéntricas (Miller *et al.*, 2001).

1.6. HIPÓTESIS

Hipótesis Nula: La Técnica de Hibridación por Fluorescencia *in situ* no presenta diferencias estadísticamente significativas en relación a Citogenética convencional y la PCR en el diagnóstico de la translocación BCR/ABL.

Hipótesis Alternativa: La Técnica de Hibridación por Fluorescencia *in situ* presenta diferencias estadísticamente significativas en relación a Citogenética convencional y la PCR en el diagnóstico de la translocación BCR/ABL.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. PARTICIPANTES

El proyecto fue llevado a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Genética Molecular y Citogenética Humana de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, dirigido por el Dr. César Paz y Miño. El área de Citogenética está a cargo de la Lcda. María Eugenia Sánchez y el área de Genética Molecular está bajo la responsabilidad de la Lcda. Melissa Arévalo.

2.2. ZONA DE ESTUDIO

La Hibridación por Fluorescencia *in situ* es una técnica que, por pertenecer al campo de la Citogenética Molecular, requiere de los equipos como de los espacios para desarrollar tanto Citogenética como Biología Molecular. El Laboratorio de Genética Molecular y Citogenética Humana de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador se ajusta a estos requerimientos y está ubicado en la planta baja del Edificio de Química de dicha universidad, en las calles 12 de Octubre y Roca en el centro norte de la ciudad de Quito.

2.3. PERÍODO DE TIEMPO DE INVESTIGACIÓN

La investigación fue llevada a cabo entre junio del 2007 y mayo del 2008.

2.4. DISEÑO

A través de FISH se analizan un total de 20 placas. El resultado final en cada caso es asignado con el valor de 0 si resultara negativo y 1 si resultara positivo.

Una vez obtenidos los resultados se los compara con los resultados previamente obtenidos para las mismas muestras según las técnicas de Citogenética convencional y PCR (Anexo A). Se elaborarán las tablas de contingencia (Anexo B) enfrentando los datos de PCR VS. Citogenética, a FISH vs. Citogenética y a FISH vs. PCR para desarrollar las siguientes pruebas: Test exacto de Fisher, Medida de Acuerdo de Kappa, Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, Prueba de los signos y Prueba de McNemar. (Siegel, 1956).

Entre los resultados de las tres técnicas se realizan las pruebas de Friedman, Cochran, Kendall y un análisis Factorial de correspondencia múltiple. Finalmente se mide la sensibilidad y especificidad de la FISH en relación a las otras dos técnicas según el Teorema de Bayes (Creative Commons®, 2008).

2.5. PROCEDIMIENTOS

2.5.1. Cultivo de Bacterias

El proceso de FISH descrito a continuación se realiza con sondas presentes en forma de plásmidos dentro de bacterias *E. coli*. Para confirmar la viabilidad y pureza de las cepas a utilizarse (Prescott, *et al.*, 2004), se realizan cultivos de las bacterias *E. coli* BCR/ BA 72 M14/ 22q11.2.M.9 (que contiene en sus plásmidos la sonda complementaria al gen BCR) y *E. coli* ABL/ dJ1132H12/ (9q 34.1) M.R (que contiene en sus plásmidos la sonda complementaria al gen ABL) en cajas petri con 15 ml. de agar LB y se incuban a 37°C (Ausubel, *et al.*,1995). Una vez obtenido el cultivo de cada una de las cepas en agar sólido y confirmada la homogeneidad en la forma de las colonias separadas, las bacterias se inoculan en tubos con 5 ml. de caldo LB combinado con 1µl/ml. de Cloranfenicol a una concentración de 20 ug/ml. (Ausubel, *et al.*,1995) para *E. coli* BCR/ BA 72 M14/ 22q11.2.11.9 y 1 µl/ml. de Kanamicina a 20 ug/ml. (Ausubel, *et al.*,1995) para *E. coli* ABL/ dJ1132H12/ 19q 34.11. Los tubos se dejan en incubación hasta el siguiente día (alrededor de 18 horas) en baño maría con agitación (Ausubel, *et al.*,1995). Bajo las mismas condiciones de cultivo de las cepas modificadas se realizan cultivos de una cepa de *E. coli* ATCC como control, en 5 ml. de caldo LB sin antibiótico alguno, con Cloranfenicol y Kanamicina en las mismas cantidades y concentraciones que las usadas con las cepas modificadas.

Al día siguiente se monitorea el crecimiento de las bacterias midiendo la turbidez de los cultivos con un medidor de turbidez.

2.5.2. Extracción de Plásmidos BA 72 M14 y dJ1132H12

La extracción de los plásmidos se realiza a partir de una miniprep de lisis alcalina (Surzycki, 2000). Se trasladan 1.5 ml. del medio en el que creció las *E. coli*

durante la noche anterior a tubos eppendorf y se los centrifuga por un minuto (ResGen™, 2000).

Se desecha el medio y se conserva el pellet. Se toman 100 µl. de GTE (Ausubel *et al.*, 1997) y se resuspende el pellet hasta que desaparezcan todos los grumos. Se colocan los tubos en hielo. Se colocan 200 µl. de solución de lisis recién preparada con NaOH 0.2N y SDS 1% (Donis-Keller Lab, 1990). Se mezcla por inversión entre 7 y 9 veces a los tubos y se los vuelve a colocar en hielo (ResGen™, 2000). Se añaden 150 µl. de Acetato de Potasio 3M pH 4.8 (Donis-Keller Lab, 1990) y se mezcla una vez más por inversión entre 7 y 9 veces.

Se centrifuga la mezcla por 6 minutos a máxima velocidad y a temperatura ambiente. Se transfiere el sobrenadante a nuevos tubos eppendorf (ResGen™, 2000) evitando remover o tomar los desechos de proteínas (Surzycki, 2000) presentes como una masa blanca y granulosa.

Se añade 1ml. de etanol a temperatura ambiente y se mezcla por inversión. Dicha mezcla se centrifuga por 6 minutos a máxima velocidad. Se elimina el sobrenadante y se añaden 500 µl. de etanol al 70% al pellet presente en el fondo del tubo. Se drena el etanol al 70% y se deja secar el pellet sobre una toalla de papel absorbente a temperatura ambiente (ResGen™, 2000).

Una vez secado el pellet, se añaden 20 µl. de TE pH 8 (Ausubel *et al.*, 1997) y 1 µl. de ARNasa (Donis-Keller Lab, 1990). Se dejan los tubos a -4°C entre 24 y 48 horas hasta que se resuspenda el ADN, para proceder a su cuantificación.

2.5.3. Medición del ADN plasmídico

2.5.3.1. Medición Cualitativa

Se mide la calidad del ADN extraído a través de una electroforesis (Surzycky, 2000) realizada en un gel de agarosa al 1% en TAE (Ausubel *et al.*, 1997). En el primer pocillo se cargan 4 µl. de Low Mass Ladder (Invitrogen, 2006 a) mezclados con 3 µl. de buffer de carga (Surzycky, 2000). En los dos pocillos siguientes se colocaron 4 µl. del

ADN plasmídico extraído por la miniprep descrita anteriormente, mezclándolos también con 3 μl . de buffer de carga. En el siguiente pocillo se cargan 5 μl . de 1 Kb ladder (Invitrogen, 2003). Se corre el gel a 80 V. durante media hora. Transcurrido este tiempo se observa el gel en una cámara de luz UV para determinar el tamaño del ADN extraído (Surzycky, 2000).

2.5.3.2. Medición Cuantitativa

Una vez confirmada la presencia de las bandas y determinado su tamaño, se procede a cuantificar el ADN plasmídico por espectrofotometría (Stephenson, 2003). Se usa agua destilada como blanco para encerrar el espectrofotómetro. Luego, se toma 1 μl . del ADN plasmídico extraído y se lo mezcla con 999 μl . de agua destilada. Se realizan mediciones tanto para 260 nm como para 280 nm. y se determina la relación entre ambas absorbancias. Se escogen las muestras en las que la relación A_{260}/A_{280} es igual 2 y con dichas muestras se calcula la concentración del ADN (N), mediante la fórmula :

$$N (\mu\text{l. ml}^{-1}) = 70A_{260} - 40A_{280} \text{ (Surzycky, 2000).}$$

Finalmente, se dividen las concentraciones obtenidas para el factor utilizado (1/1000) para obtener la concentración total de ADN en las muestras (Stephenson, 2003).

2.5.4. Mezcla de marcaje de fluoroforo 5X

Se preparan 50 μl . de mezcla de marcaje de fluoroforo 5X (suficiente para 12 reacciones) para cada uno de los fluoroforos utilizados: Rodamina-6-dUTP y Fluoresceína-12-dUTP. Para esta preparación se mezclan: 5 μl . de dATP 2.5mM, 5 μl . de dCTP 2.5 mM, 5 μl . de dGTP 2.5mM, 3.4 μl . de dTTP 2.5 mM y 4 μl . de fluoroforo 1mM. Se añade agua bidestilada estéril hasta llegar al volumen de 50 μl (Roche, 2005).

2.5.5. Nick Translation

El proceso se realiza paralelamente para cada uno de los plásmidos extraídos, escogiéndose Rodamina-6-dUTP para marcar la sonda de BCR y Fluoresceína-12-dUTP para marcar la sonda de ABL.

En tubos eppendorf de 500 μ l., se mezcla 1 μ g. del DNA plasmídico extraído con agua bidestilada estéril hasta llegar a un volumen de 12 μ l. A esta preparación se añaden 4 μ l. de mezcla de fluoroforo de marcaje 5X y 4 μ l. de Nick Translation Mix. La mezcla se incuba en un termociclador por 90 minutos a 15°C. Una vez transcurrido este tiempo se colocan los tubos eppendorf en hielo mientras se toman 3 μ l. de su contenido para mezclarlos con 3 μ l. de buffer de carga y denaturarlos a 95°C por 3 minutos (Roche, 2005).

Al término de los 3 minutos, se colocan estas alícuotas en hielo por 3 minutos. Pasado este tiempo se las corre en un gel de agarosa al 1% con TBE (Ausubel *et al.*, 1997) a 80 V durante veinte minutos, colocándose en otros tres pocillo: 4 μ l. de Low Mass Ladder (Invitrogen, 2006 a), mezclados con 3 μ l. de buffer de carga, para determinar el tamaño de los fragmentos marcados (Roche, 2005).

Si el tamaño de los fragmentos es aún muy grandes, se repite la incubación a 15°C. Cuando se llega a confirmar un tamaño adecuado de los fragmentos marcados, se añade 1 μ l. de EDTA pH 8 (Ausubel *et al.*, 1997) en los eppendorf que permanecen en hielo. Se mezcla y se somete a calentamiento en un termociclador a 65°C por 10 minutos (Roche, 2005). Una vez transcurridos estos minutos se mantienen estas preparaciones a -4°C hasta su posterior utilización.

2.5.6. Preparación de placas

La preparación de las placas de FISH es la misma utilizada para análisis de Citogenética convencional (Schwarzacher *et al.*, 2000).

2.5.6.1. Cultivo de linfocitos

En un tubo cónico de 15 ml. se colocan 0.5 ml de muestra de médula ósea colectada en heparina sódica (Gosden *et Al.*, 1992) en 4 ml. de medio F10 (Baserga, 1987; Rooney *et al.*, 1992) y se deja en incubación por 24 horas a 37 °C (Paz y Miño *et al.*, 2000).

2.5.6.2. Cosecha de linfocitos

Se añaden 170 µl de colchicina al cultivo, manteniéndolo por una hora más a 37°C. Transcurrido este tiempo, se centrifuga por 5 minutos a 2000 rpm. Se elimina el sobrenadante hasta la línea del tubo cónico y se resuspende el botón formado. Se absorbe toda la muestra con una pipeta Pasteur y se colocan 6 ml. de KCl 0.075M a 37°C en el tubo vacío. Se libera el contenido de la pipeta sosteniendo el tubo cónico en un vortex a velocidad media. Se deja incubar en baño María a 37° C por 35 minutos. Al terminar estos minutos se centrifuga la muestra por 5 minutos a 2000 rpm. Se elimina el sobrenadante hasta la línea de la punta del tubo cónico y se resuspende el botón. Se absorbe toda la muestra en la pipeta y se colocan 3 ml. de fijador Carnoy fresco (1 parte de ácido acético y 3 partes de metanol) en el tubo vacío. Se suelta la muestra rápidamente y se resuspende 2 o 3 veces con la pipeta. Se deja reposar a la muestra 15 minutos a temperatura ambiente. Luego, se centrifuga la muestra por 5min a 2000 rpm. Se elimina el sobrenadante hasta la línea del tubo cónico, se resuspende el botón y se lava con 3 ml. de fijador. Se repite el lavado por 2 o 3 veces hasta que la muestra se haya tornado transparente y se deja reposar durante 1 hora en el refrigerador (Paz y Miño *et al.*, 2000).

2.5.6.3. Extensión de Placas

Con una pipeta Pasteur Se dejan caer 2 o 3 gotas de muestra sobre una placa portaobjetos helada y se flamea 2 o 3 veces. Se deja secar la placa al aire a temperatura ambiente (Paz y Miño *et al.*, 2000).

2.6.4. Teñido con Giemsa y Bando G

Se incuba la placa en solución de Tripsina entre 20 y 40 segundos (Benn *et al.*, 1992). Se lava la placa suavemente con abundante agua y se la empapa en solución de Giemsa por 10 minutos. Transcurrido El tiempo se vuelve a lavar la placa suavemente con abundante agua y se deja secar al aire a temperatura ambiente (Paz y Miño *et al.*, 2000). En este caso el bandedo se realiza antes de la hibridación, pero dependiendo de la técnica particular usada, el bandedo puede ser realizado antes o después de la hibridación (Strachan *et al.*, 1999).

2.5.6.5. Observación en campo claro

Se utiliza un microscopio óptico en campo claro para observar si hubo crecimiento, es decir, si se encuentran metafases y/o núcleos y si los núcleos están dispuestos adecuadamente para evaluar sus señales. Otra opción es extender placas a partir de cultivos cuyo crecimiento haya sido comprobado previamente como favorable.

2.5.7. Proceso de Hibridación

Si se parte de una placa teñida, debe ser desteñida en solución Carnoy (Benn *et al.* 1992) y secarse al aire a temperatura ambiente, caso contrario, una vez extendida y seca la placa se pasa al pretratamiento.

2.5.7.1. Proceso de Pretratamiento de Placas

Se incuba la placa en SSC 2X (Surzycky, 2000) por 2 minutos a 73°C. Mientras tanto se añade 1 ml. de pepsina al 5% a 100 ml. de HCl 10 mM y se traslada la placa a esta solución para su incubación a 37°C por 10 minutos. Se retira la placa de esta solución y se la lava 2 veces por 5 minutos cada una en una solución de PBS 1X a temperatura ambiente. Después de los lavados se incuba la placa en una solución de formaldehído al 1%/ PBS 1X por 5 minutos a temperatura ambiente y al término de estos minutos se repiten los lavados en PBS 1X. Se procede a deshidratar la placa en etanol al 70%, 85% y 100% por 1 minuto en cada una de estas soluciones a temperatura ambiente y se deja secar la placa al aire, también a temperatura ambiente. Cuando la placa esté completamente seca se la incuba en formamida al 70%/ SSC 2X por 2 minutos y luego se la deshidrata en soluciones de etanol al 70%, 80% y 95% a - 20°C por 2 minutos en cada una de dichas soluciones (Invitrogen, 2006).

Mientras la placa se seca se mezclan las sondas de BCR y ABL procesadas con los fluoroforos en la Nick Translation y una vez seca, se colocan 10 µl. de la mezcla de sondas sobre la placa, se la protege con un cubreobjetos de 22 x 22 mm. y se sella el borde con UHU. Se guarda la placa en una cámara húmeda dentro de una incubadora a

37°C y se espera hasta el día siguiente (16 horas aproximadamente) para que se produzca la hibridación (Vysis, 1998).

Al día siguiente se empapa el cubreobjeto de la placa por 5 minutos en SSC 2X/ NP-40 al 0.1% a 37°C sin que dicha solución toque la placa. Se retira cuidadosamente el cubreobjetos y se incuba la placa en 0.4X SSC/NP 40 al 0.3% a 73°C por 2 minutos.

Transcurrida esta incubación se coloca la placa en SSC 2X/ NP-40 al 0.1% a temperatura ambiente por 1 minuto. Al cabo de este tiempo se pasa la placa rápidamente por agua destilada. Se deja secar la placa a temperatura ambiente en la oscuridad.

Cuando la placa está completamente seca se la somete a incubación en DAPI a una concentración de 20 ng/ml. por 5 minutos a temperatura ambiente (Invitrogen, 2006). Se deja secar la placa en la oscuridad a temperatura ambiente y, una vez seca, se coloca 20 µl. de VECTASHIELD® Mounting Medium (Vector Laboratories, 2004). sobre la placa, un cubreobjetos de 22 x 22 mm y se sellan los bordes con UHU. Cuando el pegamento esté seco se procede a la observación.

2.5.8. Observación por Fluorescencia

Se utiliza un microscopio con sistema de fluorescencia con lámpara de Mercurio de 100 W, filtros para luz UV y FITC. Se ubican núcleos en 10X y 40X en el filtro para luz UV y se pasa al filtro FITC para observar la presencia de las señales fluorescentes rojas y verdes.

Se analiza la hibridación de las sondas con la misma observación en núcleos hasta completar 100 análisis por placa. Se determinan como negativos los casos con 2 señales rojas y 2 verdes separadas perfectamente y como positivos aquellos que presenten una unión entre una de las señales rojas con una de las verdes (Hayward Genetics Center, 1998; Vysis, Inc., 1998; Espinet, 2001). Se utiliza el aumento de 100X para discernir señales de difusas (Vysis, 1998).

2.6. Diagnóstico por PCR

El diagnóstico por PCR realizado previa la elaboración de este trabajo se basa en una extracción de ARN con fenol cloroformo. El ARN extraído pasa por una RT PCR y el ADNc obtenido pasa por una PCR llevada a cabo con los primers que amplificarían los fragmentos de las translocaciones que se sospeche que estén presentes.

2.7. ANÁLISIS DE DATOS

2.7.1. Enumeración de señales

Los resultados de la FISH no requieren un análisis estadístico de la distribución de las señales a través de todo el genoma ya que la luz de fondo es tan baja que virtualmente cada señal fluorescente cuenta (Miller *et al.*, 2001).

Se escogen núcleos bien diferenciados que no se solapen con otros núcleos vecinos. Se enumeran las señales fluorescentes de cada núcleo. En caso de señales de difícil diferenciación se toman como guía los patrones del Anexo C (Vysis, 1998).

Las sondas definidas por una mezcla del marcador rojo y verde en una relación 1:1 se muestran como una señal de color amarillo (Schwarzacher *et al.*, 2000).

2.7.2. Cálculos

Con los resultados obtenidos se elabora una base de datos, asignándoles a los resultados positivos el valor de 1 y a los negativos el valor de 0. Se asignan los mismo valores a los datos obtenidos previamente en Citogenética convencional y PCR.

Dichos datos son sometidos al programa SPSS para determinar las pruebas especificadas en el diseño del proyecto.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 CRECIMIENTO DE COLONIAS

Se confirmó la viabilidad de las bacterias. De las dos cepas cultivadas se obtuvieron colonias uniformes de color crema, forma redonda regular con un diámetro de entre 1 y 3 mm.

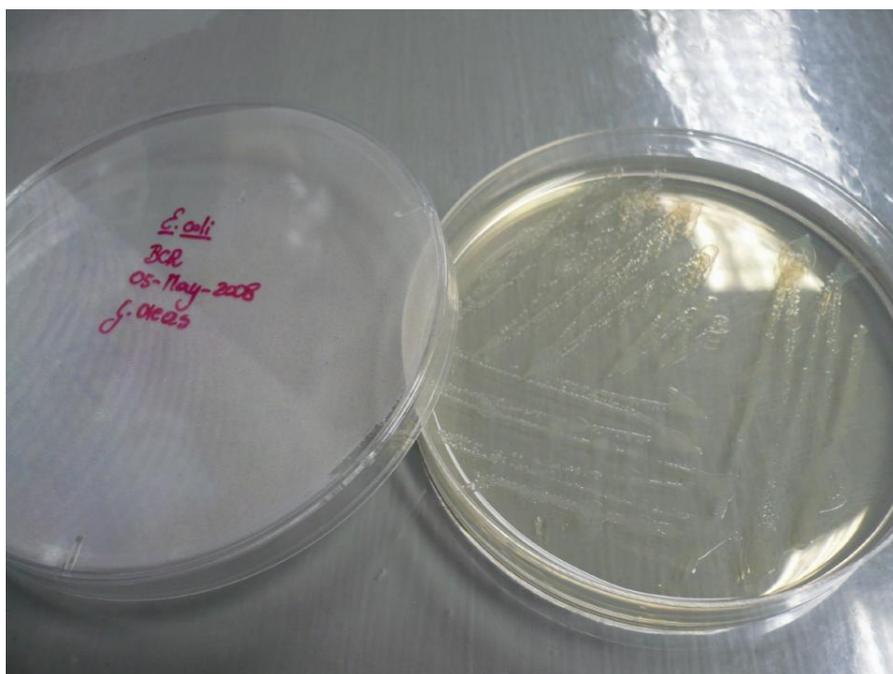


Figura 3.1. Fotografía de colonias de *E. coli* BCR/ BA 72 M14/ 22q11.2.11.9 sembradas en Agar LB a 18 horas de incubación a 37°C.

3.2. CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS

Después de obtener los resultados de la medición de turbidez del caldo y extrapolarlos con los índices de Mc. Farland se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 3.2. Concentración de bacterias obtenidas a 18 horas de incubación en baño María en caldo LB.

Cepa	Bacterias/ml.
<i>E. coli</i> BCR/ BA 72 M14/ 22q11.2.11.9	3×10^8
<i>E. coli</i> ABL/ dJ1132H12/ 19q 34.11.	6×10^8
<i>E. coli</i> ATCC	1×10^9
<i>E. coli</i> ATCC (LB + Cloranfenicol)	-
<i>E. coli</i> ATCC (LB+ Kanamicina)	-

- : No hubo crecimiento bacteriano.



Figura 3.2. Cultivo de *E. coli* ABL/ dJ1132H12/ 19q 34.11 a 18 horas de incubación en baño María a 37°C. El medio se presenta turbio con masa celular precipitada en el fondo del tubo.

3.3. CUANTIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO

3.3.1. Electroforesis

El ADN plasmídico extraído tanto de *E. coli* BCR/ BA 72 M14/ 22q11.2.11.9 como de *E. coli* ABL/ dJ1132H12/ 19q 34.11. tienen un número de pares de bases que sobrepasan por poco a las 12,216 bp, medido con el marcador de 1Kb.

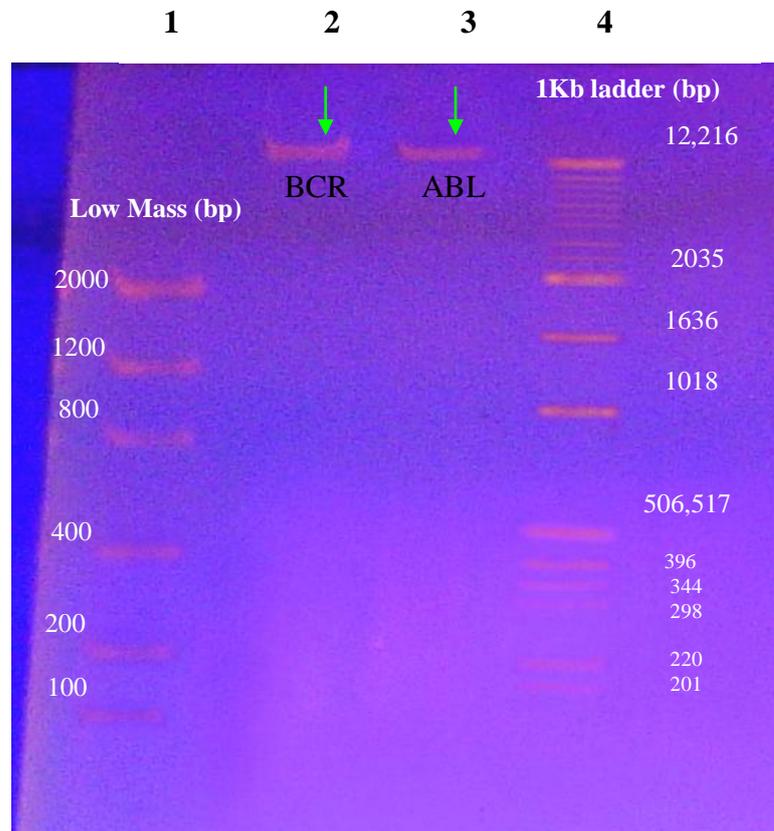


Figura 3.3.1. Gel de Agarosa en TAE al 1% para confirmar el aislamiento y peso del ADN plasmídico. Las flechas verdes señalan las bandas de ADN de los plásmidos que contienen las sondas de BCR y ABL

3.3.2. Espectrofotometría

Tabla 3.3.2. Absorbancias a 260 y 280 nm., ratios de pureza y concentraciones del ADN.

ADN	$A_{260\text{nm.}}$	$A_{280\text{nm.}}$	A_{260}/A_{280}	N
Plásmido BCR ₁	0.270	0.147	1.83	1.30
Plásmido ABL ₁	0.112	0.047	2.38	0.59
Plásmido BCR ₂	0.122	0.057	2.14	6.26
Plásmido ABL ₂	0.113	0.052	2.17	5.83
Plásmido BCR ₃	0.054	0.028	1.92	2.66
Plásmido ABL ₃	0.053	0.027	1.96	2.63
Plásmido BCR ₄	0.070	0.042	1.66	0.32
Plásmido ABL ₄	0.053	0.022	2.40	0.28

N: Concentración de ADN ($\mu\text{g}/\mu\text{l.}$)

$N_{\text{media}} = 2.21 \mu\text{g}/\mu\text{l.}$

3.4. NICK TRANSLATION

La Nick translation se llevó a cabo con los ADNs cuyos radios de pureza se acercaron más a 2.

Los fragmentos marcados obtenidos para la sonda de BCR presentaron aproximadamente 800 bp. y los obtenidos para ABL llegaron a las 100 bp. aproximadamente.

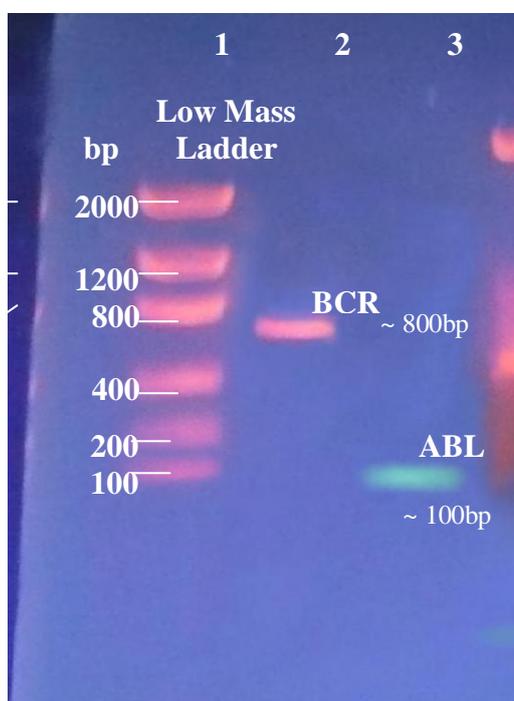


Figura 3.4. Fragmentos de sondas de BCR y ABL marcados por la Nick translation corridos en un gel de Agarosa en TBE al 1%.

3.5. DETECCIÓN DE LA TRANSLOCACIÓN *BCR/ABL*

3.5.1. Visualización de sondas

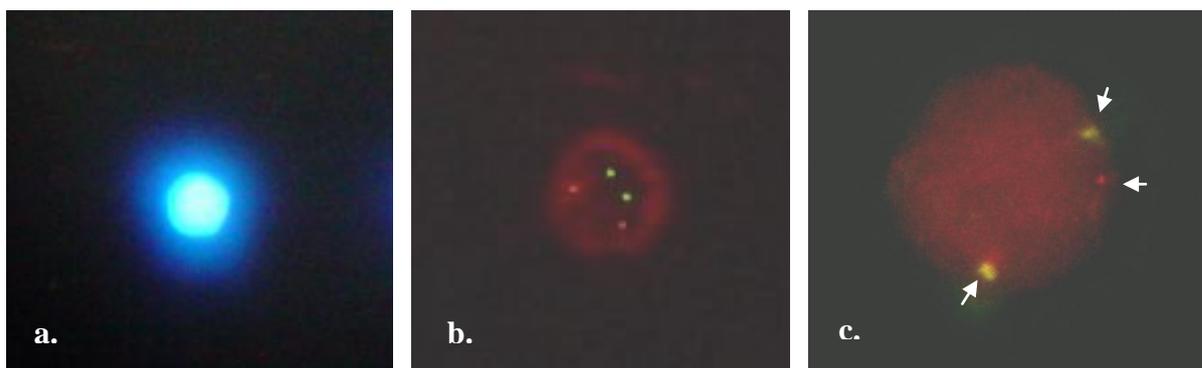


Figura 3.5.1 (100X) (a.) Núcleo observado en DAPI. (b) Señales de las sondas correspondientes a un caso negativo de BCR/ABL, se aprecian dos señales rojas y dos verdes, todas separadas. (c.) Señales correspondientes a un caso positivo de BCR/ABL. Indicadas con las flechas blancas: Una señal roja y otra verde separadas y la fusión de las otras sondas dos debido a la presencia de la translocación.

3.5.2. Comparación de resultados

Tabla 3.5.2. Comparación de resultados obtenidos por FISH con Citogenética y PCR

No. Caso	Citogenética	PCR	FISH
1	0	0	0
2	+	+	+
3	+	0	+
4	0	+	0
5	0	+	+
6	0	0	0
7	+	+	+
8	+	+	+
9	+	+	+
10	NM	+	+
11	0	0	0
12	0	0	0
13	NM	0	0
14	+	+	+
15	NM	0	0
16	0	0	0
17	NM	0	0
18	NM	+	+
19	NM	0	0

20	NM	0	0
----	----	---	---

+: Positivo

0: Negativo

NM: No se encontraron metafases que permitan diagnosticar al caso como

positivo o

negativo.

3.6. CITOGENÉTICA VS. PCR

Se calcularon las estadísticas de Citogenética Vs. PCR como referencia de comparación con los de FISH.

3.6.1. Procesamiento de los casos de Citogenética Vs. PCR

Del total de los 20 casos analizados sólo 13 parejas (65%) son válidas para someterse a las pruebas estadísticas.

Tabla 3.6.1. Resumen del procesamiento de los casos de Citogenética Vs. PCR

I

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Citogenética * PCR	13	65,0%	7	35,0%	20	100,0%

N: Número de casos.

3.6.2. Test exacto de Fisher para Citogenética Vs. PCR

$p = 2.9\%$. Existe asociación entre los resultados de Citogenética convencional y PCR.

3.6.3. Medidas Simétricas de Citogenética Vs. PCR

Medida de acuerdo de Kappa: 0.69. Existe tendencia a 1. Los resultados de Citogenética y PCR tienden a concordar en medida de que 0.69 se acerca a 1.

3.6.4. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para Citogenética Vs. PCR

p=1,000. No existen diferencias significativas entre las proporciones de casos positivos obtenidos por Citogenética con los casos positivos encontrados por PCR.

3.6.5. Prueba de los signos para Citogenética Vs. PCR

p=1,000. No existen diferencias significativas entre las proporciones de casos positivos obtenidos por Citogenética con los casos positivos encontrados por PCR.

3.6.6. Prueba de McNemar para Citogenética Vs. PCR

p=1,000. No existen diferencias significativas entre las proporciones de casos positivos obtenidos por Citogenética con los casos positivos encontrados por PCR.

3.7. CITOGENÉTICA VS. FISH

3.7.1. Procesamiento de casos de Citogenética Vs. FISH.

Del total de los 20 casos analizados sólo 13 parejas (65%) son válidas para someterse a las pruebas estadísticas.

Tabla 3.7.1. Resumen de procesamiento de casos de Citogenética Vs. FISH

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Citogenética * FISH	13	65,0%	7	35,0%	20	100,0%

3.7.2. Test exacto de Fisher para Citogenética Vs. FISH

$p = 2.1\%$. Existe asociación entre los resultados de Citogenética convencional y FISH.

3.7.3. Medidas Simétricas para Citogenética Vs. FISH

Medida de Acuerdo de Kappa: 0,698. Existe tendencia a 1. Los resultados de Citogenética y PCR tienden a concordar en medida de que 0.698 se acerca a 1.

3.7.4. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

$p=0,157$. No existen diferencias significativas entre las proporciones de casos positivos obtenidos por Citogenética con los casos positivos encontrados por FISH.

3.7.5. Prueba de los signos para Citogenética Vs. FISH

$p=0.500$. No existen diferencias significativas entre las proporciones de casos positivos obtenidos por Citogenética con los casos positivos encontrados por FISH.

3.7.6. Prueba de Prueba de McNemar para Citogenética Vs. FISH

$p=0.500$. No existen diferencias significativas entre las proporciones de casos positivos obtenidos por Citogenética con los casos positivos encontrados por FISH.

3.8. FISH Vs. PCR

3.8.1. Procesamiento de casos para FISH Vs. PCR

Del total de los 20 casos analizados, las 20 parejas (100%) son válidas para someterse a las pruebas estadísticas.

Tabla 3.8.1. Resumen de Procesamiento de casos FISH Vs. PCR

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Total					
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
FISH * PCR	20	100,0%	0	,0%	20	100,0%

3.8.2. Test exacto de Fisher para FISH Vs. PCR

$p=0.001$. Existe asociación entre los resultados de FISH y PCR.

3.8.3. Medidas simétricas para FISH Vs. PCR

Medida de acuerdo de Kappa: 0.8. Existe tendencia a 1. Los resultados de Citogenética y PCR tienden a concordar en medida de que 0.8 se acerca a 1.

3.8.4. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para FISH y PCR

$p=0,157$. No existen diferencias significativas entre las proporciones de casos positivos obtenidos por PCR con los casos positivos encontrados por FISH.

3.8.5. Prueba de los signos para FISH Vs. PCR

$p=0.500$. No existen diferencias significativas entre las proporciones de casos positivos obtenidos por PCR con los casos positivos encontrados por FISH.

3.8.6. Prueba de McNemar para FISH Vs. PCR

$p=0.500$. No existen diferencias significativas entre las proporciones de casos positivos obtenidos por PCR con los casos positivos encontrados por FISH.

3.9. CITOGENÉTICA-PCR-FISH

Del total de los 20 casos analizados sólo 13 tríos (65%) son válidos para someterse a las pruebas estadísticas.

3.9.1. Prueba de Friedman para Citogenética-PCR-FISH

$p=26\%$. Se confirma la Hipótesis nula. No existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos por las 3 pruebas.

3.9.2. Prueba de Cochran

$p=26\%$. Se comprueba Hipótesis nula. No existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos por las 3 pruebas.

3.9.3. Prueba W de Kendall

$p=26\%$. Se comprueba Hipótesis nula. No existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos por las 3 pruebas.

3.9.4. Análisis Factorial de correspondencia (AFCM)

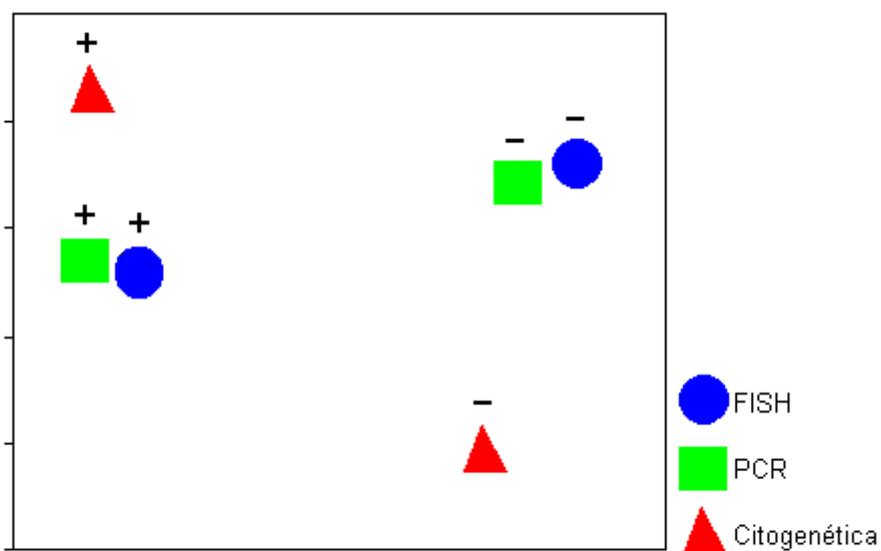


Figura 3.12. Análisis Factorial de correspondencia (AFCM) para FISH, PCR y Citogenética. Excepto por los resultados negativos en Citogenética, todos los demás resultados presentan una cercanía en sus tendencias.

3.10. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

En los casos analizados, según el Teorema de Bayes, y tomando como referencia los resultados de PCR, la FISH se mostró un 17% más sensible y un 98% tan específica que la Citogenética convencional.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1. CONCENTRACION BACTERIANA

Bajo las condiciones a las cuales fueron sembradas e incubadas las bacterias utilizadas en este proyecto, se esperaría una densidad de entre $1-2 \times 10^9$ bacterias/ml. (Ausubel *et al*, 1997). Pero sólo la cepa de *E. coli* ATCC incubada en caldo LB sin antibiótico alguno cumple esta expectativa, llegando a una concentración de 1×10^9 bacterias/ml.

Las cepas de *E. coli* BCR/ BA 72 M14/ 22q11.2.11.9 y *E. coli* ABL/ dJ1132H12/ 19q 34.11., pese a haberse mantenido exactamente en las mismas condiciones de incubación que la cepa ATCC, presentaron concentraciones mucho más bajas (3×10^8 y 6×10^8 bacterias/ml.). Lo que nos indica que los plásmidos son de baja replicación: Mientras menos plásmidos se repliquen, menos bacterias con resistencia al antibiótico del medio podrán sobrevivir.

Se probó una incubación más prolongada que la recomendada en los protocolos logrando una mayor turbidez. Sin embargo, las extracciones realizadas a partir de los cultivos de más de 18 horas presentaban mayor presencia de proteínas sin que haya un incremento significativo en las concentraciones de plásmido.

4.2. CONCENTRACION DEL PLÁSMIDO

Debido a la cantidad de plásmido requerida para la hibridación (1 µg. en 12 µl. de agua destilada), las concentraciones bacterianas obtenidas en el caldo de cultivo fue suficiente para obtener concentraciones y radios de pureza lo suficientemente buenos para llevar a cabo la FISH.

En cuanto al radio de pureza, las hibridaciones pueden desarrollarse con relaciones A_{260}/A_{280} desde 1.4 (Surzycky, 2000). Sin embargo, el ADN plasmídico extraído se presentó en el gel de forma íntegra, sin smires que denoten ni degradación ni contaminación por proteínas. Dichos resultados coinciden con los obtenidos al medir las muestras por espectrofotometría.

La fórmula utilizada para determinar las concentraciones de los ADNs extraídos se escogió en base a la relación $A_{260}/A_{280}=2$. Si los radios obtenidos se hubieran alejado de esta constante la utilización de dicha fórmula no sería aconsejable (Surzycky, 2000).

4.3. TAMAÑO DE FRAGMENTOS

Se confirma la actividad de las enzimas con las que se realizan las reacciones de la Nick translation debido a que de las bandas de ~12,216 bp. obtenidas por la extracción del plásmido en la Miniprep se llega a una banda de ~800 bp. para la sonda de BCR y ~100 pb. ABL.

La Nick translation incorpora el marcador en el ADN en 90 minutos tal como lo indican Schwarzacher *et al.*, 2000; Roche, 2005 e Invitrogen, 2006 a. Sin embargo, las mismas fuentes bibliográficas indican que los fragmentos obtenidos de la reacción de marcaje deben pesar entre 100 y 500 pb.

El tamaño de los fragmentos influye en los resultados de la hibridación debido a que si los fragmentos son muy grandes, su accesibilidad hacia el ADN blanco puede verse disminuida de tal modo que la sonda no logra hibridizar y se adhiere a la placa generando, en el momento de la visualización, un fondo lleno de señales no específicas. Por otra parte, cuando ocurre lo contrario y los fragmentos son muy pequeños la especificidad y sensibilidad de la FISH pueden verse reducidas (Roche, 2005).

Ya que el fragmento de BCR resultó ser más grande de lo que dice la bibliografía así como el de ABL resultó ser más pequeño se probó con 30 minutos más de reacción para BCR así como con 30 minutos menos para la

sonda de ABL, como lo indican las instrucciones de Roche, 2005. Sin embargo, el cambio de tiempo en la reacción no produjo cambios en el tamaño de los fragmentos obtenidos y después de la hibridación se confirmó que pese al tamaño de los fragmentos la sonda hibridó en los blancos.

4.4. FACTORES QUE AFECTAN LA HIBRIDACIÓN

4.4.1. Estructura del ADN

El ADN presenta varios tipos de enlaces. Su estructura posee tanto Puentes de Hidrógeno como interacciones hidrofóbicas. Por esta razón, la FISH usa tanto soluciones polares como apolares para poder intervenir en los enlaces del ADN blanco y lograr una hibridación exitosa con la sonda.

Por otra parte, se debe tener en cuenta que el principio de esta técnica es la complementariedad de las bases de los ácidos nucleicos, por lo que es indispensable que, en el caso de diagnóstico, en especial, se sepa el grado de complementariedad entre la sonda a usarse con el blanco así como, lo que ya se ha mencionado previamente, el largo de los fragmentos que se pretende hibridar.

4.4.2. Concentración de sal en las soluciones

El PBS utilizado en varias soluciones del pretratamiento contiene Sodio y Magnesio (Na^+ y Mg^{++}) que intervendrán en la estabilidad del híbrido formado ya que se encargan de reducir la repulsión electrostática entre los grupos fosfatos que son negativos y que se repelerían en ausencia de estos iones.

4.4.3. Temperatura

La energía cinética es directamente proporcional a la temperatura. De tal modo que a mayor temperatura, mayor será la energía cinética de las hebras y por lo tanto la estructura del ADN se desestabilizará. Este es uno de los instrumentos que permite la apertura de las hebras para hacer posible la hibridación, pero si no se maneja con cuidado puede arruinar todo el proceso.

4.4.4. pH

El adecuado manejo del pH permite mantener la estabilidad del ADN pese a la denaturación del pretratamiento durante todas las reacciones dentro de este proceso. Pero si no es manejado de forma adecuada puede intervenir en la ionización de los grupos fosfatos de las cadenas de ADN que terminarían favoreciendo la repulsión entre las hebras de la sonda y el blanco.

4.5. COMPARACIÓN DE RESULTADOS

Es necesario tomar en cuenta que debido a que los resultados por Citogenética fueron nulos en 7 de los 20 casos existen análisis hechos sólo entre 13 parejas o 13 tríos, dependiendo de a prueba estadística.

4.5.1. Comparaciones entre parejas

La prueba de Fisher, apropiada en este caso ya que mide el grado de asociación entre dos pruebas dicotómicas para muestras pequeñas, determinó asociación entre los resultados de Citogenética con PCR, FISH con Citogenética y FISH con PCR. Esta asociación entre todos los resultados fue confirmada con la Prueba de Kappa, cuyos valores tendientes a 1 demostraron que los resultados de las tres pruebas, relacionadas en parejas, son concordantes entre sí.

Las pruebas basadas en medidas estadísticas descriptivas: Wilcoxon, Prueba de los Signos y Mc. Nemar demostraron también que no existen diferencias significativas entre las comparaciones por parejas de las tres pruebas. Este resultado es lógico si analizamos las medias de los casos positivos detectado por cada una de las tres pruebas (Anexo 4). Pese a no ser completamente iguales no sólo tienen la misma tendencia sino que además, estadísticamente no se muestran diferentes.

Al hacer la comparación de las tres pruebas a la vez, los resultados coinciden totalmente para las pruebas de Friedman, Cochran y Kendall, confirmándose la Hipótesis nula, es decir que no hay diferencias significativas entre las tres técnicas. Sin embargo, el Análisis Factorial de Correspondencia Múltiple arroja un resultado muy

interesante, demostrando que pese a que los resultados positivos tienen la misma tendencia en las tres técnicas, en el caso de los resultados negativos, los correspondientes al diagnóstico negativo detectado por Citogenética convencional dista mucho de los resultados de FISH y PCR que se mantienen con la misma tendencia.

La aparente incongruencia de las pruebas no paramétricas con el Análisis Factorial de Correspondencia Múltiple es el resultado del número de tríos tomados en cuenta para el AFCM, ya que ha incluido a los casos de Citogenética que no presentaban resultado, es decir que ha conjugado a los 20 casos pese a la ausencia de datos en una de las técnicas. En cambio, los tríos tomados en cuenta en las otras pruebas no paramétricas fueron sólo los 13 que arrojaban datos complejos.

El AFCM, de hecho nos está diciendo mucho de la FISH en el sentido de que, pese a ser una prueba en parte Citogenética no implica necesariamente la presencia de metafases para su evaluación. Esta característica presta muchos beneficios en el diagnóstico de leucemias de cuyas muestras se obtiene crecimiento celular pero no metafases así como en otras líneas de investigación como es el caso del Diagnóstico preimplantación.

Si bien es cierto, las tres técnicas han presentado las mismas tendencias en los resultados y se han mostrado no significativas en cuanto a sus diferencias, pero es muy importante tomar en cuenta que para estudios de casos únicos y para algo tan delicado como el diagnóstico de una leucemia se deben manejar altos estándares de sensibilidad y especificidad pues, aún un único caso, en estas circunstancias es sumamente importante.

El teorema de Bayes confirmó que, en los casos analizados y en relación a la PCR, la FISH es un 17% más sensible y un 98% tan específica que la Citogenética convencional.

La sensibilidad de la FISH se reafirma con el AFCM, ya que demuestra como esta técnica está a la par en la detección de la translocación tanto en casos positivos como negativos tendiente completamente hacia los resultados de PCR.

4.6. DIFERENCIAS ENTRE FISH Y PCR

Ahora, si la FISH presenta una sensibilidad y especificidad muy similares a las de la PCR, por qué optar por FISH en lugar de PCR?

Pues la FISH a diferencia de la PCR no sólo detecta la presencia de determinado gen, fragmento de gen o, como en este caso, una translocación, sino además la célula en la que se encuentra, tal como lo haría la Citogenética convencional solo que optimizada en sensibilidad y especificidad.

Esta característica la transforma en una prueba muy versátil en patologías en las que se requiere ver el estado de las células, como en el caso de mosaicismos, tumores y translocaciones de diversos tipos de cáncer.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

La técnica de Hibridación por Fluorescencia in situ (FISH) es una herramienta útil en el diagnóstico de la translocación *BCR/ABL*. En los 20 casos analizados se confirmó la sensibilidad y especificidad de la FISH en relación a las otras dos técnicas empleadas en el diagnóstico de dicha translocación: Citogenética convencional y PCR.

El crecimiento de las bacterias utilizadas en caldo LB con cloranfenicol y kanamicina demuestra que las cepas de *E.coli* BCR/ BA 72 M14/ 22q11.2.M.9 y *E.coli* ABL/ dJ1132H12/ (9q 34.1) M.R contienen, efectivamente, las sondas complementarias a los genes BCR y ABL dentro de sus respectivos plásmidos.

La Miniprep es un procedimiento rápido, sencillo y efectivo para la extracción de plásmidos. Las concentraciones y los radios de pureza del ADN obtenido a través de la Miniprep son excelentes para el posterior marcaje de las sondas de dicho ADN.

El marcaje directo por medio de la Nick translation, permite tanto unir a las sondas a un fluoroforo para su posterior identificación en el microscopio, como transformar el plásmido extraído (~12,216 bp) en fragmentos más pequeños (~800 y ~100 bp) que puedan hibridarse al ADN que se pretende identificar a través de la FISH.

El éxito del pretratamiento y de los lavados post- hibridación de las placas se demuestra en la limpieza de las mismas durante la visualización. Aún los más mínimos errores en las concentraciones de las soluciones, manejo de los tiempos de lavado e incubación o variaciones en las temperaturas utilizadas durante el tratamiento de las placas se ven reflejados inevitablemente en detrimento de los resultados durante la visualización al microscopio.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

6.1. PRECAUCIONES CON LOS CULTIVOS

Las bacterias utilizadas como contenedoras de las sondas utilizadas en la FISH deben ser manejadas con las precauciones de asepsia propias del trabajo en Microbiología.

Los cultivos realizados en caldo LB, de preferencia, no deben excederse de las 18 horas de incubación pues en los resultados de la Miniprep se presentará una cantidad considerablemente mayor de proteínas que influirá en la pureza del ADN extraído.

Los cultivos realizados en caldo LB deben incubarse a baño María con agitación. Cuando son incubados sin agitación el ADN extraído posteriormente es sumamente pobre tanto en concentración como en pureza.

6.2. CONSEJOS MINIPREP

Las soluciones utilizadas en la Miniperp deben ser elaboradas con agua estéril. Las condiciones en las que se realice la extracción deben evitar contaminación, sin embargo, las soluciones del proceso no deben ser autoclavadas después de su elaboración pues la evaporación del agua durante este proceso de esterilización hace que las concentraciones varíen de tal modo que la extracción tiene poco éxito, obteniéndose ADN degradado.

Al colocar la solución de GTE en la Miniprep es necesario asegurarse que no queden grumos en la mezcla.

Los plásmidos extraídos para ser marcados por la Nick translation pueden conservarse a -20°C durante un mes sin que esto afecte los resultados del marcaje. Después del tiempo mencionado, las sondas se presentan una hibridación menos eficiente.

6.3. PRECAUCIONES EN LA HIBRIDACIÓN

Todas las herramientas y contenedores a utilizarse en la hibridación deben estar limpios y las soluciones sin crecimiento de hongos ni bacterias, por lo tanto deben ser revisadas antes de empezar con los procedimientos.

Las soluciones de pretratamiento y pos-hibridación deben ser manejadas en condiciones de asepsia pero no es necesario que estén estériles. Es muy importante que las concentraciones de cada una de las soluciones sea manejada cuidadosamente para evitar daño errores en la hibridación.

Las placas no se deben tocar entre sí para evitar rasguños en la visualización. Tampoco se debe permitir acumulación de agua en las placas entre los pasos de la incubación. Pese a que se recomienda manejar un promedio de ocho placas a la vez (Schwarzacher *et al.*, 2000), es mejor manejar un máximo de 4 pues a medida que se insertan en los Coplin la temperatura de las soluciones varía de tal modo que los resultados varían drásticamente entre las primeras y las últimas placas en ser ingresadas a los lavados.

Las soluciones de lavado deben cubrir totalmente a las placas y deben ser manejadas con cuidado para evitar turbulencias fuertes para que las placas sean tratadas uniformemente por las soluciones.

De entre todas las variaciones de temperatura a las que se somete a las placas, la más crítica es la de la formamida. Esta solución es la que permite la variación de la temperatura de melting en el ADN para que sea posible la hibridación con las sondas. Errores en el tiempo o temperatura de permanencia de las placas en esta solución intervendrán drásticamente en una pobre hibridación de las sondas.

No se deben exceder los tiempos a altas temperaturas para evitar alteraciones en la estructura de los tejidos y disminuye la calidad de la hibridación.

Existen varios períodos durante el procedimiento de la FISH en el que las placas deben ser secadas al ambiente. Durante estos períodos es recomendable mantener a las placas dentro de un espacio cubierto en el que se evite la contaminación por polvo o pelusas del ambiente.

Se debe tener en cuenta que a mayor tiempo de vejez de la placa se debe usar menor temperatura de denaturación.

Las sondas a utilizarse se deben mezclar bien antes de ser colocadas para que exista un esparcimiento homogéneo en el blanco. Además, al colocar la sonda sobre la placa hay que esparcirla bien con suaves frotos sobre el cubreobjetos antes de sellar la placa.

Se debe evitar exponer los fluoroforos a la luz ya que a mayor exposición será menor su eficacia durante la hibridación.

También en la hibridación, se debe cuidar colocar suficiente cantidad de agua en la cámara húmeda para que el proceso se desarrolle de forma adecuada.

6.4. PROBLEMAS EN LA VISUALIZACIÓN

En el caso de fondo con excesivas señales inespecíficas es necesario revisar el tiempo y la temperatura de las soluciones de pretratamiento pues este tipo de problemas se presenta cuando falla la exactitud en esta parte del proceso. Se debe tomar en cuenta que la temperatura del baño María no es la de la solución que se está calentando en el y que con cada placa que se coloca dentro de los Coplin, la temperatura de dicha baja, así que hay que contar el tiempo a partir de que la temperatura dentro del Coplin sea la adecuada.

Es necesario escoger un antifade adecuado para evitar el desvanecimiento de la sonda, ya que una vez excitados los fluoroforos, sin antifade, la señal se perderá prácticamente de forma inmediata.

El aceite de inmersión utilizado para la visualización a 100X es especial y específico para filtros de fluorescencia, así que el usar otro aceite de inmersión no permitirá ver las sondas de forma eficiente.

Si se observa fluorescencia es excesiva es necesario controlar mejor el tiempo de digestión de la pepsina. Sin embargo, hay que cuidar que ni el tiempo, ni la temperatura ni la concentración de esta solución se excedan porque de ser así se presentarán agujeros dentro de los núcleos. Además la pepsina debe conservarse en refrigeración y oscuridad ya que a temperatura ambiente se digiere, de tal modo que al usarla tendría un efecto escaso en el tejido.

Cuando las señales se muestran débiles se debe controlar mejor la fijación y la calidad del tejido. También existe la posibilidad que los lavados post-hibridación sean excesivos ya sea en tiempo, temperatura o concentración. Si las dos posibilidades

mencionadas están controladas, se debe revisar que la utilización del microscopio sea la adecuada.

Las placas deben ser perfectamente selladas para la hibridación, caso contrario la sonda corre peligro de evaporación y no se podrá visualizar.

Es muy importante usar un microscopio adecuado para fluorescencia. El microscopio de fluorescencia debe tener una lámpara de Mercurio de 100 W para poder visualizar la intensidad característica de las sondas durante la FISH.

Aunque parezca básico, si hay problemas en la visualización, se deben revisar que los objetivos y los filtros con los que se está trabajando sean los adecuados para observar luz fluorescente.

Se debe recordar que una mezcla del marcador rojo y verde en una relación 1:1 se muestran como una señal amarilla que indica la presencia de la translocación *BCR/ABL*.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K.(Eds.) (1997). Short Protocols in Molecular Biology. Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc.

Baraitser, M., Winter, R. (1983). A Colour Atlas of Clinical Genetics. Weert: Royal Smeets Offset..

Benetti, R., García-Cao, M., Blasco, M.A. (2007) Telomere length regulates the epigenetic status of mammalian telomers and subtelomers. Nature Genetics, 39, (2), 243-250.

- Benn, P.A., Perle, M.A. (1992). Chromosome staining and banding techniques. D.E. Rooney y B.H. Czepulkowski, (Eds.), Human Cytogenetics. A Practical approach. (Vol. I pp. 31-54). New York: Irl Press,
- Boggs, B.A., Cheung P., Heard, E., Spector D., Craig, Chinault A., David Allis C. (2002) Differentially methylated forms of histone H3 show unique association patterns with inactive human X chromosomes. Nature Genetics, 30, (1), 73-76.
- Cai, S., Han, H., Kohwi-Shigematsu. (2003). Tissue-specific nuclear architecture and gene expresión regulated by SATB1. Nature Genetics, 30, (1), 73-76.
- Chin, K., Ortiz, C., Knowles, D., Jones, A., Chou, W., García, E., Kuo, W., Ljung, B., Myambo, K., Miranda, M., Krig S., Garbe, J., Stampfer, M., Yaswen, P., Gray, J. W., Lockett, S.J. (2006) *In situ* analyses of genome instability in breast cancer. Nature Genetics. 36 (9), 984- 988.
- Cleary, M.A., van Raamsdonk, C.D., Levorse, J., Zheng, B., Bradley, A., Tilghman, S. (2001) Disruption of an imprinted gene cluster by a targeted chromosomal translocation in mice. Nature Genetics, 29, (1), 78 – 82.
- Creative Commons®. (2008) Bioestadístico.com. Arequipa, Perú.
www.biostatistico.com
- Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin J., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge., Truc-Carel, C., Perret, E., Astarie-Dequeker, C., Lasquelles, L., Arnaud, B., Ducommun, B., Kaplan, J., Hamel, C.P. (2000) Neclear gene *OPA1*, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. Nature Genetics, 26, (2), 207-210.
- [Demehri, S.](#), [Paschka, P.](#), [Schultheis, B.](#), [Lange, T.](#), [Koizumi, T.](#), [Sugimoto, T.](#), [Branford, S.](#), [Lim, LC.](#), [Kegel, T.](#), [Martinelli, G.](#), [Hochhaus, A.](#), [Druker, BJ.](#), [Deininger, M.W.](#) (2005) e8a2 BCR-ABL: more frequent than other atypical BCR-ABL variants?. Leukemia, 19, (4), 681-684.

- Díaz, A. (2005). Bio... ¿Qué? Biotecnología, el futuro llegó hace rato. Buenos Aires: Siglo Veintiuno Editores.
- Dodgson, S., Foulkes, W., Maher, E. (2007). A Practical Guide to Human Cancer Genetics. Cambridge: Cambridge University Press.
- Donis-Keller Lab. (1990).
http://humgen.wustl.edu/hdk_lab_manual/plasmid/plasmid0.5.html
- Dunham, M., Neumann, A.A., Fahing, C.L., Raddel, R.R. (2000). Telomere maintenance by recombination in human cells. Nature Genetics, 26, (4), 447- 450.
- Espinet, B. (2001). Métodos de Hibridación *in situ* (HIS) aplicados al estudio de Neoplasias Hematológicas. (Libro de Resúmenes Curso Citogenética e Hibridación *in situ* aplicada al diagnóstico hematológico). Barcelona.
- Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R., Kantarjian, H.M. (1999) The Biology of Chronic Myeloid Leukemia. The New England Journal of Medicine. 431, (3), 164-172
- Feingold, M., Bull, M.J., Darling, D.B. (1974) Patient Presentations. D. Bergsma (Ed.), Clinical Cytogenetics and Genetics. (pp.93-106). Miami: Symposia Specialists.
- García-Cao, M., Gonzalo, S., Dean, D. Blasco, M.A. (2002) A role for the Rb family of proteins in controlling telomere length. Nature Genetics, 32 (3), 415-419.
- González, M.B. Aportación de la Citogenética Molecular al Análisis Genómico de las Hemopatías Malignas. Tesis Doctoral de la Universidad de Salamanca.(2003).
- Gosden, C.M; Davidson, C.; Robertson, M. (1992). Lymphocyte culture. D.E. Rooney y B.H. Czepulkowski (Eds.), Human Cytogenetics. A Practical approach, (Vol. I pp. 31-54). New York: Irl Press.

Graux, C., Cools, J., Melotte, C., Quentmeier, H., Ferrando, A., Levine, R., Vermeesch, J.R., Stul, M., Dutta, B., Boeckx, N., Look, A.T., Gillilan, D.G., Michaux, L., Vandenberghe, P., Wlodarska, I., Marynen, P., Hagemeijer, A. (2004) Fusion of *NUP214* to *ABL1* on amplified episomes in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Nature Genetics, 36 (10), 1084-1089.

Hayward Genetics Center. (1998). Human Genetics Program . Tulane University School of Medicine.

http://www.som.tulane.edu/human_genetics/cytogenetics.html

Iafrate, A.J., Feuk L., Rivera, M., Listewnik, M.L., Donahoe, P.K., Qi, Ying., Scherer, S. W., Lee, C. (2004) Detection of large-scale variation in the human genome. Nature Genetics, 36 (9), 949-951.

Invitrogen™. (2003). Trackit™ 1 Kb DNA Ladder.

http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/trackit_1kb_man.pdf

Invitrogen™. (2006 a). Low DNA Mass Ladder.

<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/10068013.pdf>

Invitrogen™. (2006 b). FISH Tag™ DNA Kit.

<http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp32947.pdf>

Jameson, L.J., Ausiello, D., Ballabio, A., Holtzman, M., Wag, E., Kedes, L., Kupper, T.S., Martin, J., McPhaul, M., Nameroff, C.B., Reynolds, J.C., Rosenzweig, A., Lay, S., Williams, Jr., R.C. (Eds.).(1998). Principles of Molecular Medicine. New Jersey: Humana Press.

Kurotaki, N., Imaizumi, K., Harada, N., Masuno, M., Kondo, H T., Nagai, T., Ohashi, H., Naritomi, K., Tsukahara, M., Makita, Y., Sugimoto, T., Sonoda, T., Hasegawa, T., Chinen, Y., Tomita, H., Kinoshita, A., MizuguchiT., Yoshiura, K., Ohta, T., Kishino, T., Fukushima, Y., Niikawa, N., Matsumoto, N. (2002). Haploinsufficiency of *NSD1* causes Sotos syndrome. Nature Genetics, 30,(2), 365-366.

- Lay, S., Ehsani, A., Wallace, B. (1993). The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. K.E. Davies (Ed.), Human Genetic Disease Analysis. A Practical Approach. (pp. 22-33). Nueva York: University Press New York.
- Lewin, B. (2008). Genes IX. Estados Unidos: Jones and Barlett Publishers, Inc.
- McAteer, J., Davis, J. (1996). Basis cell culture technique and the maintenance of cell lines. Davis, J.M. (Ed.). Basic Cell Culture. A Practical Approach. (pp. 93-148.). Estados Unidos: Oxford University Press.
- Miller, O., Therman, E. (2001). Human Chromosomes. Nueva York: Springer-Verlag.
- Miller, O.J. (1974). Updating Advances in Cytogenetics. Bergsma D. (Ed.) Clinical Cytogenetics and Genetics. (pp. 1-25). Miami: Symposia Specialists.
- Netchine, I., Sobrier, M., Krude, H., Schnable, D., Maghnie, M., Marcos, E., Duriez, B., Cacheux, V., Moers, A., Goossens, M., Gruters, A., Amselem, S. (2000). Mutations in LHX3 result in a new syndrome revealed by combined pituitary hormone deficiency. Nature Genetics, *25*, (2), 182-185.
- Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F., W.B. (2001). Genetics in Medicine. China: Saunders Company.
- O'Sullivan, J.N., Bronner, M.P., Brentnall, T.A., Finley, J.C., Shen, W., Emerson, S., Emond, M.J., Gollahon, A., Moskovits, A., Crispin, D.A., Potter, J.D., Rabinovitch, P. (2002). Chromosomal instability in ulcerative colitis is related to telomere shortening. Nature Genetics, *32*, (2), 280-289.
- Osborne, L., Li, M., Pober, B., Chitayat, D., Bodurtha, J., Mendel, A., Costa, T., Grebe, T., Cox, S., Tsui, L., Scherer, S. (2001). A 1.5 million-base pair inversion polymorphism in families with Williams-Beuren syndrome. Nature Genetics, *29*, (3), 321-325.

- Paz-y-Miño, C., Burgos, R., Morillo, S., Santos, J.C., Fiallo, B., Leone P. (2002). BCR-ABL rearrangement frequencies in chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia in Ecuador, South America. Cancer Genetics and Cytogenetics, 132, (1), 65-67.
- Paz-y-Miño, C., Leone, P.E., Sánchez, M. (2000). Manual de Prácticas de Genética Molecular y Citogenética Humana. Quito: Abyayala Producciones Digitales.
- Peters, A., Mermoud, J.E., O'Carroll, D., Pagani, M., Schweizer, D., Brockdorff, N., Jenuwein, T. (2002). Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint or facultative heterochromatine. Nature Genetics, 30, (1), 77-80.
- Pfeifer, J.D. (2006). Molecular Genetic Testing in Surgical Pathology. Filadelfia: Lippincott Williams &Wilkins.
- Potocki, L., Chen, K., Park, S., Osterholm, D.E., Withers, M.A., Kimonis, V., Summers, A., M., Meschino, W. S., Anyane-Yeboah, K., Kashork, C.D., Shaffer, L.G., Lupski, J.R. (2000). Molecular mechanism for duplication 17p11.2- the homologous recombination reciprocal of the Smith-Magenis microdeletion. Nature Genetics, 24, (1), 84-87.
- Prescott, L.M., Harley, P., Klein, D. (2004). Microbiología. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- ResGenTM. Invitrogen Corporaton. (2000). BAC (and fosmid) Miniprep Protocol.
- Repping, S., van Daalen, S.K., Brown, L.G., Korver, C.M., Lange, J., Marszalek, J.D., Pyntikova, T., van der Veen, F., Skalestky, H., Page, D.C., Rozen, S. (2006). High mutation rates have driven extensive structural polymorphism among human Y chromosomes. Nature Genetics, 38, (4), 463-467.

- Roche. (2007 a). Tetramethyl-Rhodamine-5-dUTP Tetramethylrhodamine -5-2'-deoxy-uridine-5'-triphosphate. <http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1534378a.pdf>
- Roche. (2007 b). Fluorescein-12-2'-deoxy-uridine-5'-triphosphate. <http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1373242a.pdf>
- Roche. (2005). Nick Translation Mix.
- Rooney, D.E., Czepulkowski, B.H. (1987). Tissue Culture Methods in Human Cytogenetics. R. Baserga (Ed.). Cell growth and division. A practical approach. (pp. 1-36). Oxford: IRL PRESS Ltda.
- Rooney, D.E., Czepulkowski, B.H. (1992). Lymphocyte culture. D.E. Rooney y B.H. Czepulkowski. (Eds.). Human Cytogenetics. A Practical approach. (Vol. I pp. 31-54) Nueva York: Irl Press.
- Rovelet-Lecrux, A., Hannequin, D., Raux, G., Le Meur, N., Laquerrière, A., Vital, A., Dumanchin, C., Feulliette, S., Brice, A., Varcelletto, M., Dubas, F., Frebourg, T., D., Campion. (2006). APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. Nature Genetics, 38, (1), 24-26.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. A Laboratory Manual. United States: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandberg, A.A. (1990). The Chromosomes in Human Cancer and Leukemia. New York: Elsevier.
- Schwarzacher, T., Heslop-Harrison, P. (2000). Practical *in situ* Hybridization. Norwich: BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Sharp, A.J., Hansen, S., Selzer, R., Cheng, Ze., Regan., Hurst, J.A., Stewart., Price, S.M., Blair, E., Hennekam, R. C., Fitzpatric, C.A., Segraves, R., Richmond,

- T.A., Guiver, C., Albertson, G., Pinkel, D., Eis, P., Schwartz, S., Knight, S., Eichler, E.E. (2006). Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome. Nature Genetics, 38 (9), 1038-1042.
- Siegel, S. (1956). Nonparametric Statistics for behavioral Sciences. Estados Unidos: Mc. Graw Hill Book Company, Inc.
- Strachan, T., Read, A.P. (2001). Human Molecular Genetics. Nueva York: John Wiley & Sons, Inc.
- Strachan, T., Read, A.P. 1999. Human Molecular Genetics 2. Nueva York: BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Sudbery, P. (2004). Genética Molecular Humana. Madrid: Pearson Educación S.A.
- Surzycki, S. (2000). Basic Techniques in Molecular Biology. Indiana: Springer
- Tanon, G., Modi, S., Wu, L., Kubo, A., Coxon, A., Komiya, T., O'Neal, K., Stover, K., El-Naggar, A., Griffin, J.D., Kirsh, I.R., Kaye, F. (2003). t(11;19)(q21;p13) translocation in mucoepidermoid carcinoma creates a novel fusion product that disrupts a Notch signaling pathway. Nature Genetics, 33, (2), pp. 208-214.
- Taylor, M., Liu, L., Raffel, C., Hui, C., Mainprize, T., Zhang, X., Agatep, R., Chiappa, S., Gao, L., Lowrance, A., Hao, A., Goldstain, A., Stavrou, T., Scherer, S.W., Dura, W.T., Wainwright, Squire J., Rutka, J., How, D.(2002). Mutation in SUFU predispose to medulloblastoma. Nature Genetics, 31,(3), 306-310.
- Therman, E., Millard, S. (1986). Human Chromosomes. Madison: Springer- Verlag New York Inc.
- Thompson, M.W., McInnes, R.R., Willard, H.F. (1996). Genética en Medicina. Barcelona: Masson S.A.

- Tanon, G., Modi, S., Wu, L., Kubo, A., Coxon, A., Komiya, T., O'Neil, Stover, K., El-Naggar, A., Griffin, J.D., Kirsch, I.R., Frederic, J.K. (2003). t(11;19)(q21;p13) Translocation in mucoepidermoid carcinoma creates a novel fusion product that disrupts a Notch signaling pathway. Nature Genetics, 33, (2), 208-214.
- Upadhyaya, M., Thompson, P., Han S., Cooper, D.N. (2003). Neurofibromatosis Type 1. A Common Familial Cancer Syndrome. Elles R., Mountford R. (Eds.). Molecular Diagnosis of Genetic Diseases. (pp. 285-310). Nueva Jersey: Human Press.
- Vargas, M., Fernández-Novoa, M., García-Creus, M., González, J. (2002). Trisomía 8 en dos casos de leucemia mieloide crónica ABL/BCR negativo. Rev. méd. Chile, [Version Electrónica], 130, (4).
- Vector Laboratories, Inc., (2004). California. www.vectorlabs.com
- Visis, Inc. 1998. LSI[®] BCR/ABL ES Dual Color Translocation Probe. www.vysis.com/LSIBCRABLESDualColorTranslocationProbe_4957.asp
- Wan, T., Ma, S., Au, W., Chan, L. (2003). Derivative chromosome 9 deletions in chronic myeloid leukemia: interpretation of atypical D-FISH pattern. Journal of Clinical Pathology, 56 (6), pp. 471- -474.
- Ward, D., Boyle A., Haaf, T. (1994). Metaphase Chromosomes, interfase nuclei, and extended chromatine fibers. R.S. Verma y A. Babu. Human Chromosomes. Principles and Techniques. (pp. 184-212). Nueva York: McGraw-Hill. Inc.
- Winrow, C.J., Hemming, M.L., Allen, D.M., Quistad, G.B., Casida, J.E., Barlow, S.C. (2003). Loss of neuropathy target esterasa in mice links organophosphate exposure to hyperactivity. Nature Genetics, 33, (4), 477-485.
- Wolstenholme, J. (1992). An introduction to human chromosomes and their analysis. D.E. Rooney y B.H. Czepulkowski. (Eds.). Human Cytogenetics. A Practical approach. (Vol. I- pp. 31-54) New York: Irl Press.

Zemni, R., Thierry, B., Vinet, M.C., Aziz, S., Carrié, A., Billuart, P., McDonell, N., Couvert, P., Francis, F., Chafey, P., Fauchereau, F., Friocourt, G., des Portes, V., Cardona, A., Frintz, S., Meindl, A., Brandau, O., Ronce, N., Moraine, C., van Bokhoven, H., Ropers, H.H., Sudbrak, R., Kahn, A., Fryns, J.P., Beldjord, C., Chelly, J. (2000). A new gene involved in X-linked mental retardation identified by analysis of an X;2 balanced translocation. Nature Genetics, 24, (2), pp. 167-170.

CAPÍTULO 8: ANEXOS

ANEXO A

Diagnóstico de casos analizados por Citogenética y PCR.

No. Caso	Citogenética	PCR
1	46,XY Ph-	P190 -, P210-
2	46,XX Ph+	P210+
3	46,XY Ph-	P190+

4	46,XY Ph-	P210-
5	46,XY Ph-	P210+
6	46,XY Ph-	P210-
7	46,XY Ph- 55%/46,XYPh+ 45%	P210-
8	46,XY Ph+	P210+
9	46,XY Ph+	P210+
10	NM	P210+
11	46,XY Ph-	P210-
12	46,XY Ph-	P210-
13	NM	P210-
14	46,XX Ph+	P210+
15	NM	P210-
16	46,XX Ph-	P190-, P210-
17	NM	P210-
18	NM	P210+
19	NM	P210-
20	NM	P210-

ANEXO B

Tablas de contingencia de pruebas no paramétricas

Tabla de contingencia Citogenética * PCR

Recuento		PCR		Total
		0	+	
Citogenética	0	6	1	7
	+	1	5	6
Total		7	6	13

0: Negativos

+: Positivos

Tabla de contingencia Citogenética * FISH

Recuento

	FISH		Total
	0	+	
Citogenética 0	5	2	7
+	0	6	6
Total	5	8	13

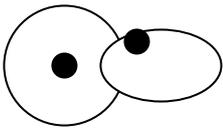
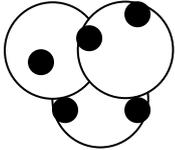
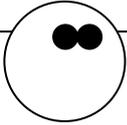
Tabla de contingencia FISH * PCR

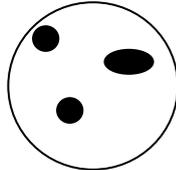
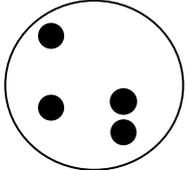
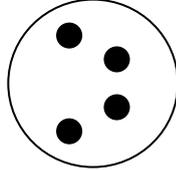
Recuento

	PCR		Total
	0	+	
FISH 0	10	0	10
+	2	8	10
Total	12	8	20

ANEXO C

Guía para diferenciación de señales en Interfase.

No.	Procedimiento	Patrón
1	No contar. Descartar. Puede tratarse de dos núcleos con una señal cada uno o un núcleo torcido.	
2	Contar como dos señales. Una es muy compacta, la otra es difusa.	
3	No contar. Descartar. No se puede determinar cuál núcleo contiene las señales.	
		

4	Contar como dos señales. Una está fracturada.	
5	Contar como tres señales.	
6	Contar como tres señales. Una está fracturada.	
7	Contar como cuatro señales.	

Fuente: Vysis, 1998.

ANEXO D

Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
Citogenética	13	,46	,519	0	1
PCR	20	,40	,503	0	1

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
Citogenética	13	,46	,519	0	1
FISH	20	,50	,513	0	1

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
PCR	20	,40	,503	0	1
FISH	20	,50	,513	0	1

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
Citogenética	13	,46	,519	0	1
PCR	13	,46	,519	0	1
FISH	13	,62	,506	0	1