

UN METODO SIMPLE PARA ESTUDIOS DE CROMOSOMAS DE LA MEDULA OSEA

Dr. ALFREDO PEREZ

Hospital "Eugenio Espejo", Quito

Desde que Tjio y Levan¹ hicieron la comprobación de que el número de cromosomas humanos era de 46 la citogenética ha tomado gran impulso, habiéndose descrito numerosas alteraciones del normal complemento cromosómico del hombre². Esto ha hecho deseable el disponer de métodos de laboratorio que hagan posible el estudio más frecuente del cariotipo, sobre todo en aquellos casos portadores de anomalías diversas (somáticas o sexuales).

De todas las técnicas descritas para este estudio, las más aplicables, aún en centros con escasos medios técnicos, son las técnicas directas, que utilizan aspirados de sangre de médula ósea como fuente de células en mitosis activa. Se han publicado numerosas variaciones de estos métodos, varios de ellos bastante simples³⁻⁵ y con los que se han podido tener buenos resultados, pero que requieren de alguna experiencia en estos trabajos.

Se presenta aquí un método "directo" simplificado, con el que se han obtenido resultados exitosos y es de fácil aplicación en cualquier pequeño laboratorio.

MATERIALES Y METODO:

Se aspiran 1-2 ml. de sangre medular (por punción esternal o de la cresta ilíaca). Se transfiere la sangre inmediatamente, a un tubo estéril, que contiene 0,1 ml. de heparina ("Liquemin" Roche 5.000 U/ml.) Se mezcla bien y se centrifuga a 500 r. p. m. durante 5 minutos.

El plasma supernadante, rico en elementos de la serie blanca, y la capa de glóbulos blancos que se notan inmediatamente de la masa de hematíes, son retirados cuidadosamente y pasados a un tubo estéril que contiene solución salina al 0,7% con dextrosa al 0.6% y colchicina en una concentración del 1:1.000. Se incuba el tubo durante una hora a 37° C.

Se centrifuga la muestra a 800 r. p. m. durante 5 minutos y se aspira luego la mayor parte del líquido supernadante, dejando en el tubo más o menos 1 ml. que contiene todas las células aglomeradas. Se mueve suavemente el tubo para lograr una suspensión celular uniforme y se añaden 2 ml. de una solución hipotónica de citrato sódico

(al 0,6%), previamente calentada a 37° C. Con este tratamiento hipotónico se hinchan las células. Se mezcla suavemente y se incuba otra vez a 37° C. durante 10 minutos.

Inmediatamente se procede a fijar las células, añadiendo gota a gota una solución de ácido acético al 65% y mezclando, cada vez, suavemente. Se deja en reposo durante 15 minutos y se centrifuga a 500 r. p. m. durante 5 minutos. Se decanta la mayor parte del supernadante, dejando 1 ml. con el sedimento. Se mueve el tubo para uniformar la suspensión y se añaden 2 ml. de una solución de ácido acético al 50%, gota a gota. Se mezcla bien y se deja en refrigeradora a 4° C. durante unas 3 horas o toda la noche a la temperatura ambiente. Si se guarda la preparación en refrigeradora, las células fijadas se conservan durante algunos días, sin inconvenientes.

Se centrifuga el tubo y se descarta la mayor parte del supernadante. Se añade, gota a gota, solución fresca de ácido acético al 50%, en cantidad suficiente para lograr la adecuada concentración celular (o hasta conseguir un líquido moderadamente opaco). Generalmente, bastan 0,5 ml. de la solución acética.

Preparación de los frotis: En una placa caliente (a 56-60° C.) se colocan varios porta-objetos químicamente limpios y desengrasados. Con una pipeta Pasteur de punta bien fina, se mezcla bien la suspensión celular y se la aspira para irla goteando en los porta-objetos calentados formando dos filas de 4 gotas para cada porta-objeto. Las gotas se secan rápidamente y van for-

mando anillos concéntricos, en los cuales se encuentran diseminadas las células.

Coloración: Se utiliza una modificación de la técnica de Greig⁶, que se basa en la reacción de Feulgen para el A. D. N., en la cual se emplea como colorante la solución de Giemsa. El procedimiento es el siguiente: se sumergen los porta-objetos en una solución normal de ácido clorhídrico calentada a 60° C., durante 5 minutos. Se enjuagan luego en agua corriente unos minutos y finalmente se cubren con solución de Giemsa diluída 1:20 en agua ligeramente alcalinizada con una solución amoniacaal débil (solución amoniacaal al 2%). Se deja por un espacio de 30 minutos. Se enjuagan las placas en agua corriente y se secan. Si se desea se pueden montar con cubre-objetos, aunque no es necesario.

Así preparados los porta-objetos, se llevan a la observación microscópica, y se fotografían las mejores figuras mitóticas. (Fig. 1)

Para hacer los mapas cromosómicos (cariotipos), se hacen ampliaciones al tamaño conveniente, se cortan uno por uno los cromosomas y se los ordena de acuerdo a la clasificación de Denver⁷, según el tamaño del cromosoma y la posición de su centrómero. (Ver Fig 1).

RESULTADOS Y COMENTARIOS

Como se puede apreciar en la figura N° 1 con este método se ha obtenido una adecuada diseminación de los cromosomas, que se han hecho factibles el



Fig. Nº 1.—Identificación de cromosomas. Microfotografía de una célula de médula ósea en metafase. Obsérvense los cromosomas nítidamente diferenciados sobre un fondo claro, en el que no se encuentran residuos de citoplasma

estudio cromosómico en un caso de Síndrome de Klinefelter⁸. Se han realizado algunas preparaciones de personas normales, en las que se ha visto numerosas figuras mitóticas aptas para el estudio.

En el curso del desarrollo de este método ha sido posible comprobar que una repetida centrifugación del material celular, hace perder el mayor número de células aptas para el estudio, especialmente después del tratamiento hipotónico. Por esto se han reducido el número de centrifugaciones a un mínimo y se ha procedido a realizar una fijación previa de las células, con ácido acético, luego del período de in-

cubación hipotónica. Con esto se ha podido hacer la centrifugación sin temor de que las células hinchadas se rompan por acción mecánica.

Para la diseminación de los cromosomas, la mayor parte de autores recomiendan la técnica del "aplastamiento", que requiere de gran experiencia y que en nuestras manos nunca trabajó bien. Con el método propuesto por Rothfels y Siminovitch⁹, de secado al aire en placa caliente, las células hinchadas y fijadas en ácido acético, se revientan y hacen diseminar los cromosomas, de manera que el que utiliza este método no necesita de mucho entrenamiento, como en las técnicas de "aplastamiento", en que no es posible calcular la presión adecuada para romper las células y es imprescindible ir haciendo controles al microscopio hasta obtener un buen resultado.

El método de coloración que se presenta, es de fácil manejo, los materiales son de uso rutinario en todo laboratorio y los resultados son bastante reproducibles. Una condición importante es que el lavado de los porta-objetos luego de la hidrólisis ácida, sea intenso a fin de eliminar la mayor parte del ácido. Además, con este método no es necesario deshidratar y aclarar las preparaciones, como sería el caso de usarse sólo la solución de Giemsa, sin hidrólisis.

SUMARIO

Se presenta un método simplificado, directo, para el estudio de cromosomas en células de sangre de médula ósea.

Se usa el tratamiento de las células con colchicina, para detener las mitosis en metafase, se las somete a la acción de una solución hipotónica, que las hincha y se hacen los frotis con el método de secado al aire en placa caliente. La coloración utilizada es una variación del método de la reacción de Feulgen. Se dan algunas indicaciones para obtener los mejores resultados.

SUMMARY

A new simplified method to study chromosomes in blood cells from bone marrow is described. It consisted, essentially, in arresting the mitosis in metaphase by the use of colchicine and then cells were swollen by submitting them to a hypotonic solution.

The preparation was dried using warm slides. To stain it the Feulgerise technique, partially modified, was used.

BIBLIOGRAFIA

1.—TJIO, J. H.; LEVAN, A.: The Chromosome

number of man. *Hereditas* (Lund) **42**: 1, 1956.

- 2.—CARR, D. H.: Chromosomal Abnormalities and their relation to disease. *Canad. Med. Ass. J.* **88**: 456, 1963.
- 3.—SANDBERG, A. A.; ISHIHARA, T.; MIWA, T.; HAUSCHKA, T. S.: The "in vivo" Chromosome constitution of marrow from 34 Human Leukemias and 60 Non Leukemic controls. *Cancer Research* **21**: 678, 1961.
- 4.—FORD, E. H. R.; WOOLLAM, D. H. M.: A colchicine, hypotonic citrate, air drying sequence for foetal mammalian chromosomes. *Stain Techn.* **38**: 271, 1963.
- 5.—KIOSSOGLU, K. A.; MITUS, W. J.; DAMESHEK, N.: A direct method for chromosome studies of human bone marrow. *Am. J. Clin. Path.* **41**: 183, 1964.
- 6.—GREIG, H. B. W.: A substitute for the Feulgen staining technique. *J. Clin. Path.* **12**: 93, 1969.
- 7.—BOOK, J. A. y otros 16 autores: A proposed standard system of Nomenclature of Human Mitotic Chromosomes. *Am. J. Human Genetics.* **12**: 384, 1960.
- 8.—BUSTAMANTE, F.; PEREZ, A.: Síndrome de Klinefelter. *Esta Revista* **3**: 160 1965
- 9.—ROTHFELS, K. H.; SIMINOVITCH, L.: An air drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown "in vitro". *Stain Techn.* **33**: 73, 1958.

FACTORES SOCIALES EN LA OBESIDAD

Se ha efectuado una investigación entre 1.660 adultos representativos de una área residencial de New York, a fin de determinar los factores sociales que pueden haber influido en la obesidad.

Se encontró que la obesidad fue 6 veces más frecuente entre las mujeres de bajo nivel socio-económico que entre las mujeres de un alto nivel socio-económico. Esta relación inversa entre la obesidad y el nivel socio-económico fue ya establecida en una investigación anterior y la presente confirma dichos hallazgos. Se ha encontrado, así mismo que mientras mayor es el tiempo que la familia haya residido en los Estados Unidos, procedentes de otros países, menor es la tendencia a la obesidad. En los hombres los resultados son similares, pero mucho menos marcados que en las mujeres. También se han encontrado algunas relaciones entre factores étnicos y religiosos y la frecuencia de la obesidad en ambos sexos.

(GOLDBLATT, P. B., MOORE, M. E., y STUNKARD, A. J.: Socia factors in obesity, *J. A. M. A.* **192**: 97, 1965).