

ESTUDIO CITOGENETICO DE LIQUIDOS ORGANICOS

- Lic. TM. Héctor Herrera Reynoso
Mg. Genética Humana

Estudio Citogenético de líquidos orgánicos

- Los líquidos orgánicos patológicos se definen como la presencia de fluido en las diferentes cavidades corporales, muchas veces están asociadas a procesos oncológicos. Los carcinomas de ovario, mama, endometrio, colon, estómago, páncreas y bronquios causan ascitis en un 15 a 50% de los pacientes.
- La presencia de alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales (poliploidías, rupturas cromosómicas y otros rearrreglos cromosómicos) en células obtenidas de líquidos orgánicos (líquido pleural, líquido ascítico) aportan información importante con valor diagnóstico y pronóstico para el manejo de pacientes con cáncer.

Estudio Citogenético de líquidos orgánicos

- El exudado pleural (EP) metastásico puede constituir la primera y única evidencia de enfermedad pleuro-pulmonar maligna.
- Su presencia se asocia invariablemente a un pronóstico desfavorable, por lo que se hace necesario el descartar tal naturaleza en todo EP sospechoso de ser neoplásico.

Estudio Citogenético de Líquidos Orgánicos

Obtención de la Muestra

- ❖ *Volúmen de Obtención*
- ❖ *Anticoagulante Heparina*
- ❖ *Conservación de la Muestra*

Características Físicas

- *Color*
- *Aspecto*

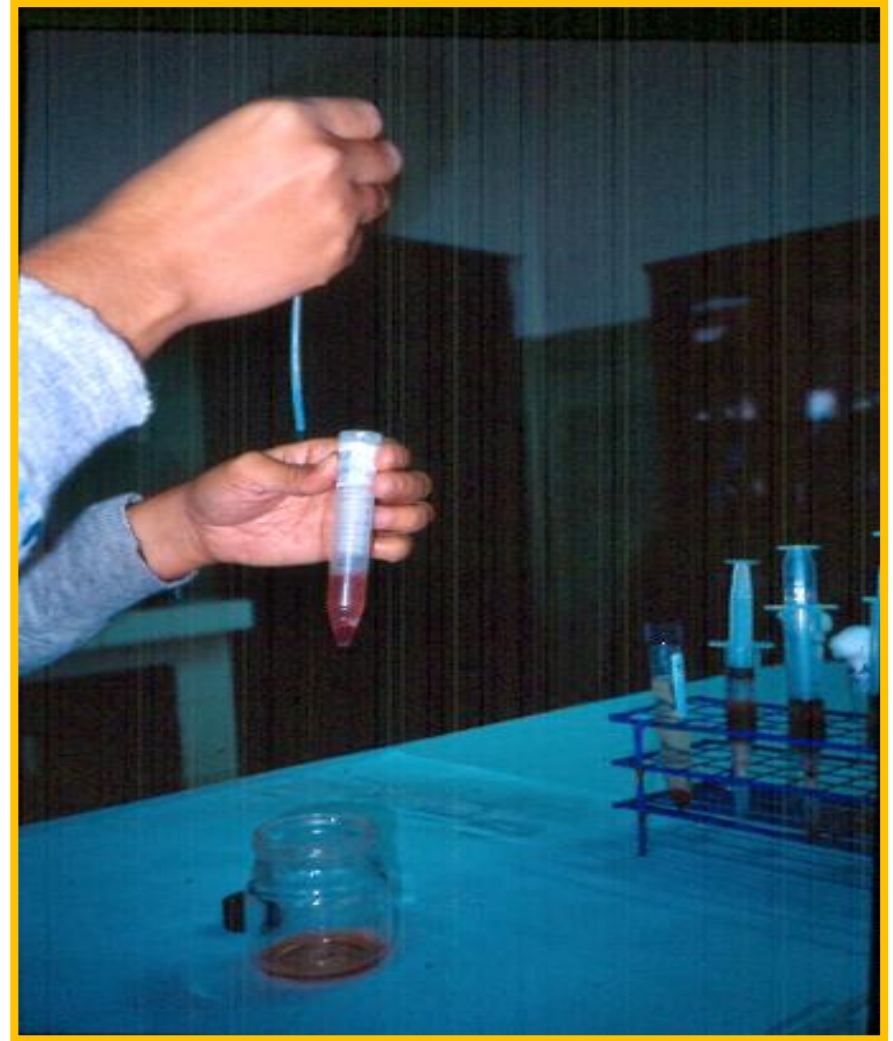


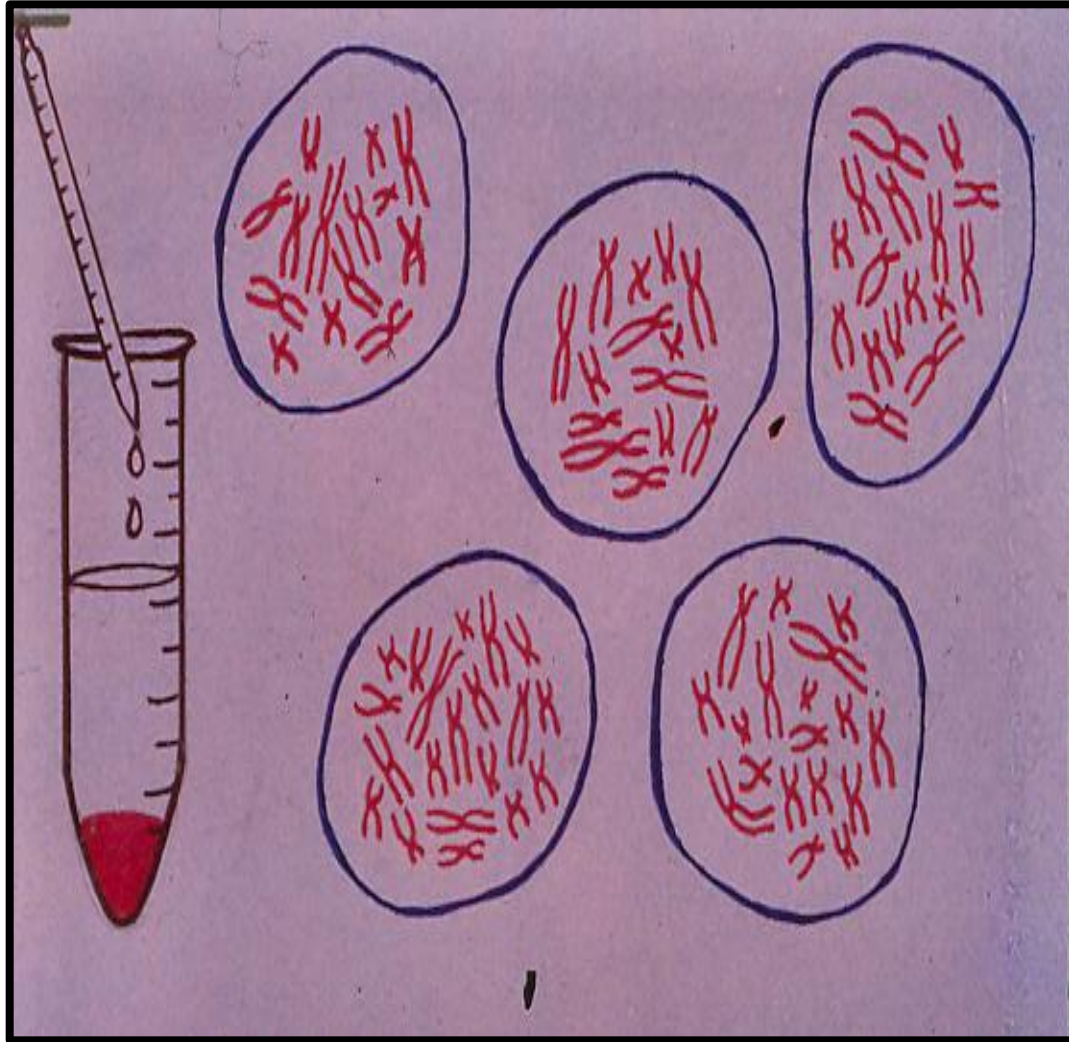
Estudio Citogenético de Líquidos Orgánicos

Procedimiento (“Cultivo Directo” de Líquidos Orgánicos)

- 1.- Centrifugar a 1000 RPM por 10m.***
- 2.- Eliminar sobrenadante y colectar los sedimentos***
- 3.- Adicionar 6 ml. De Solución Hipotónica (CLK 0.075 M) agitar con Pipeta Pasteur***
- 4.- Incubar a 37°C por 30 m.***
- 5.-Centrifugar a 1000 RPM por 10 m. Eliminar el sobrenandante.***

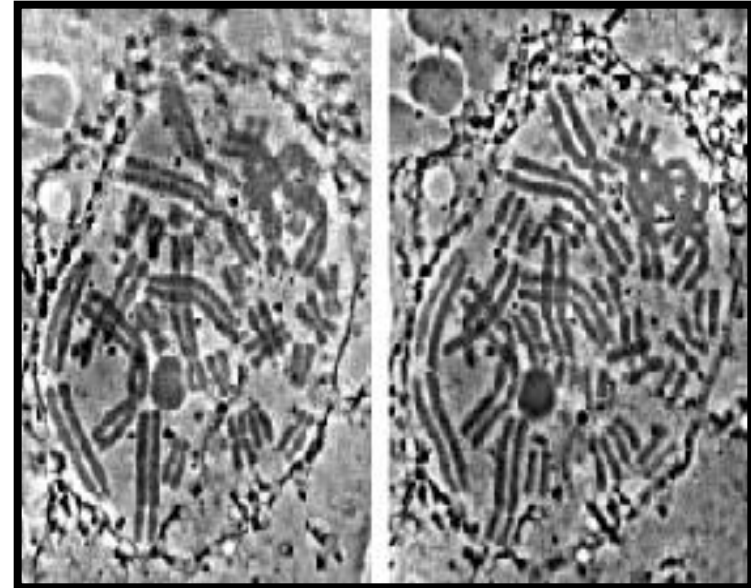






1. Hipotonización

- Adicionar solución hipotónica: Cloruro de Potasio 0.075 M





- Incubar a 37°C por 20 - 30 minutos.



2.- PREFIJACION: Sacar el tubo de la estufa y agregar 10 gotas de fijador. Solo para parar la acción de la solución hipotónica. Centrifugar a 1000 rpm por 10 minutos



Estudio Citogenético de Líquidos Orgánicos

- 6.- Añadir 5 ml de Fijador. Agitar con Pipeta Pasteur y dejar a TA por 30 m***
- 7.- Centrifugar a 1000 RPM por 10 m, eliminar sobrenadante y añadir 5 ml de Fijador. Repetir este paso 2 o 3 veces***
- 8.- Colocar 3 a 4 gotas sobre una lámina portaobjeto y fijarlo al calor***
- 9.- Coloración convencional (Giemsa)***
- 10.- Bando Cromosómico (Banda GTG)***
- 11.- Observación Microscópica***



3.FIJACIÓN:

- . Adicionar Fijador (5ml)
- . Fijador: Metanol (3Vol) + Acido Acético Glacial (1Vol)

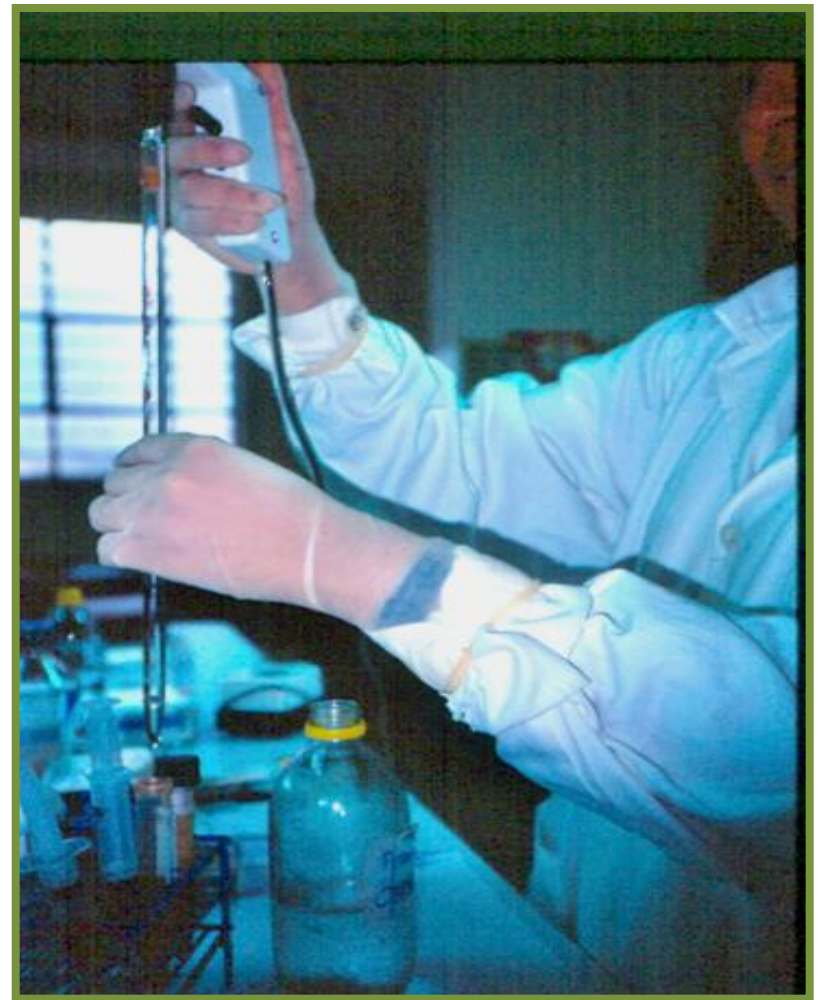


- . Adicionar 5 ml de fijador
- . Mezclar con pipeta pasteur
- . Dejar a TA por 20 minutos

. Se realizan 2 ó 3 lavados



El sedimento se resuspende con 1 a 2 ml de fijador.



RE PERIFERICA (LINFOCITOS)

5. Preparado Cromosómico

- . Adicionar 3 a 4 gotas sobre una lámina portaobjetos helada.
- . Secar al calor de un mechero.
- . Guardar en una gradilla



Cromosomas sin bandeo



Cromosomas con Bandas G





Estudio Citogenético de Líquidos Orgánicos

Criterios de Malignidad

1. Alteraciones Numéricas (ploidía)

Hipodiploidía : $N^{\circ} Cr < 46$

Hiperdiploidía : $69 > N^{\circ} Cr > 46$

Poliploidía : $N^{\circ} Cr > 69$

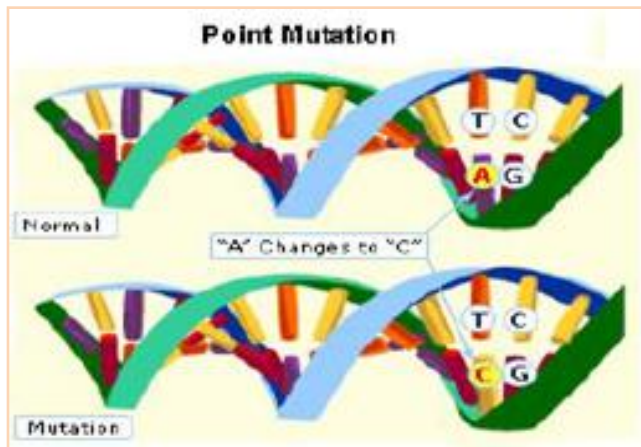
Estudio Citogenetico de Liquidos Orgánicos

2. Alteraciones Estructurales

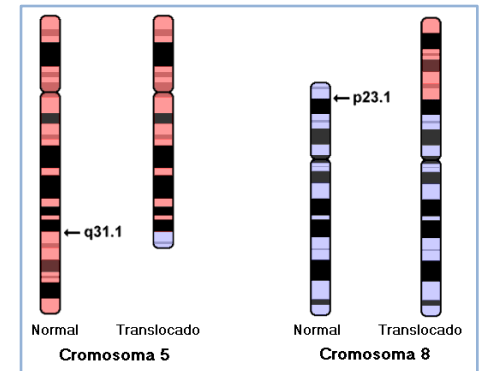
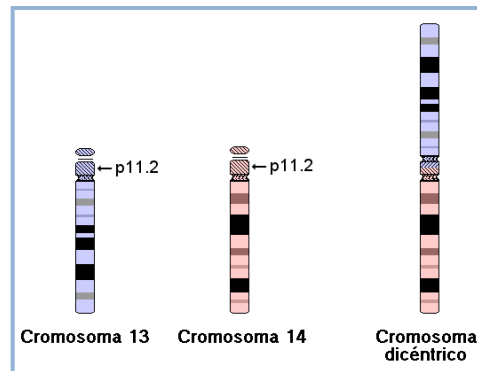
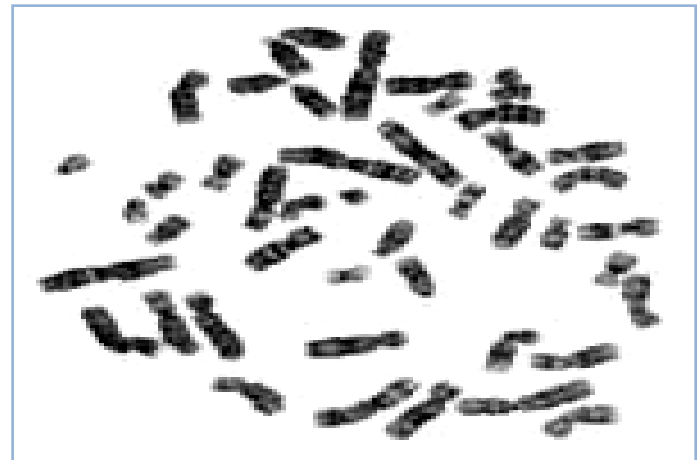
- .- Ring, Translocaciones, deleciones, etc.***
- .- Cromosomas marcadores (mar)***
- .- Dobles minutes (Dm)***
- .- Figuras Trirradiadas, Tetrarradiadas.***
- .- Rupturas Cromosomicas (gap, cap)***

INESTABILIDAD GENETICA

Mutaciones Génicas



Mutaciones Cromosómicas





Roturas de cromátide



Gaps de Cromátide



Roturas Cromosómicas



Gaps Cromosómicos



Dicéntrico



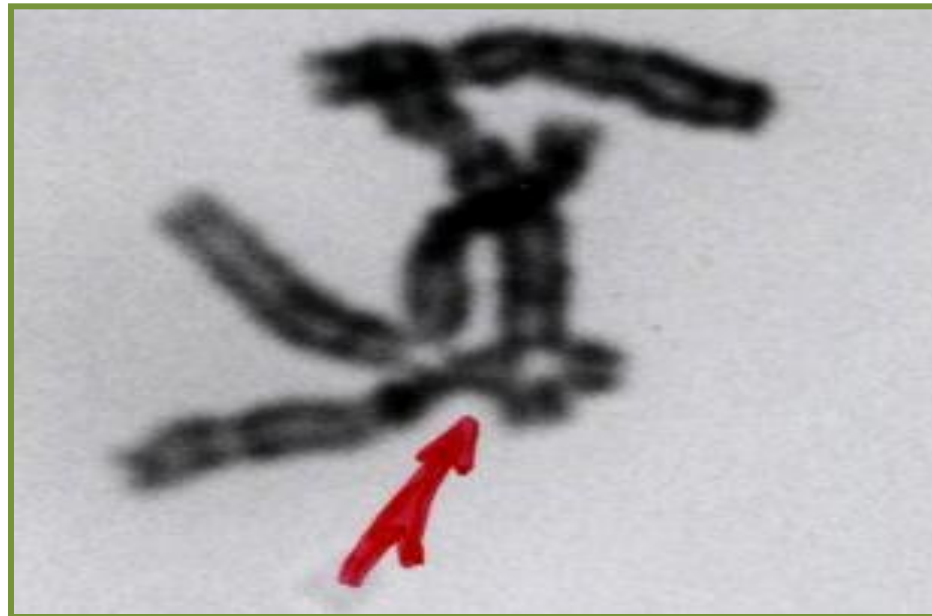
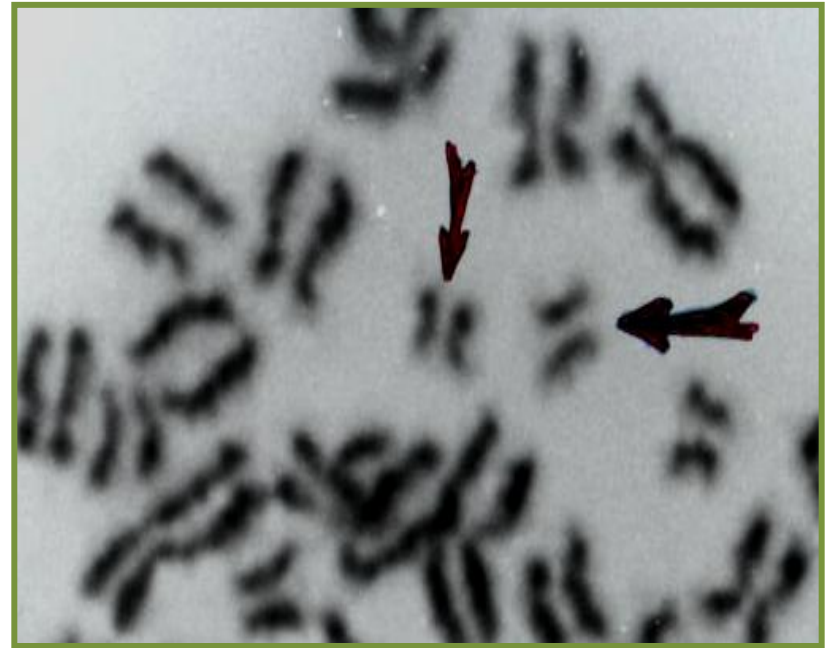
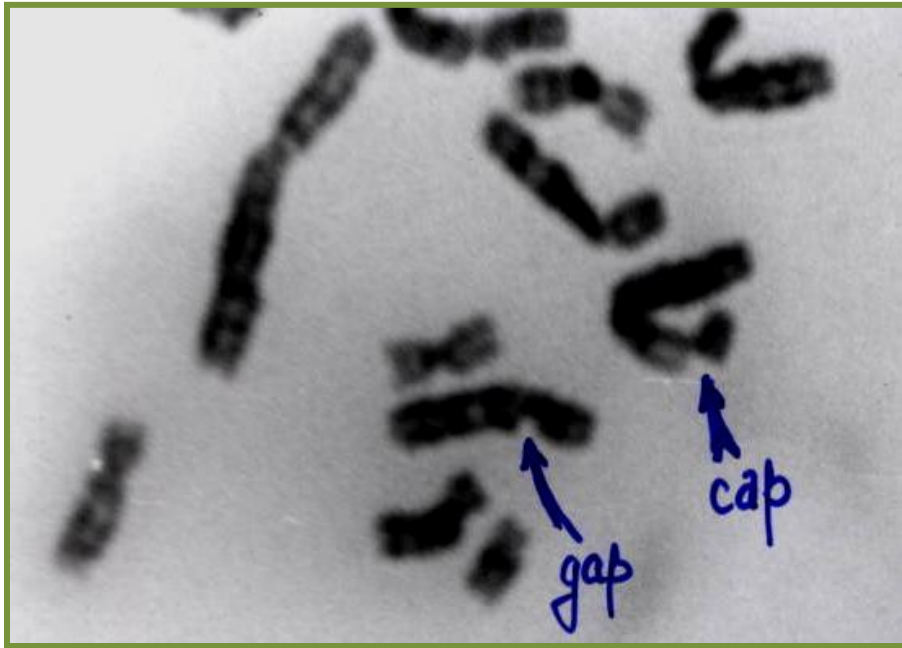
Acéntrico



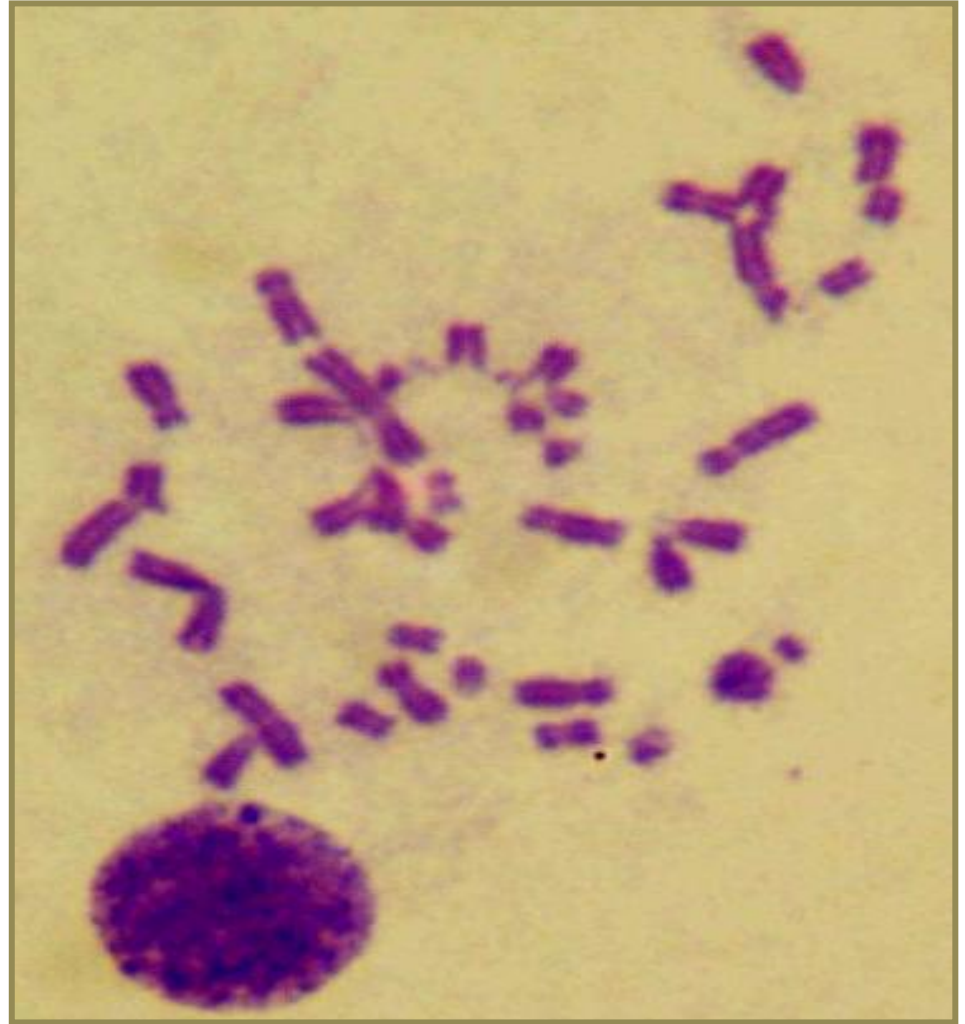
Minute

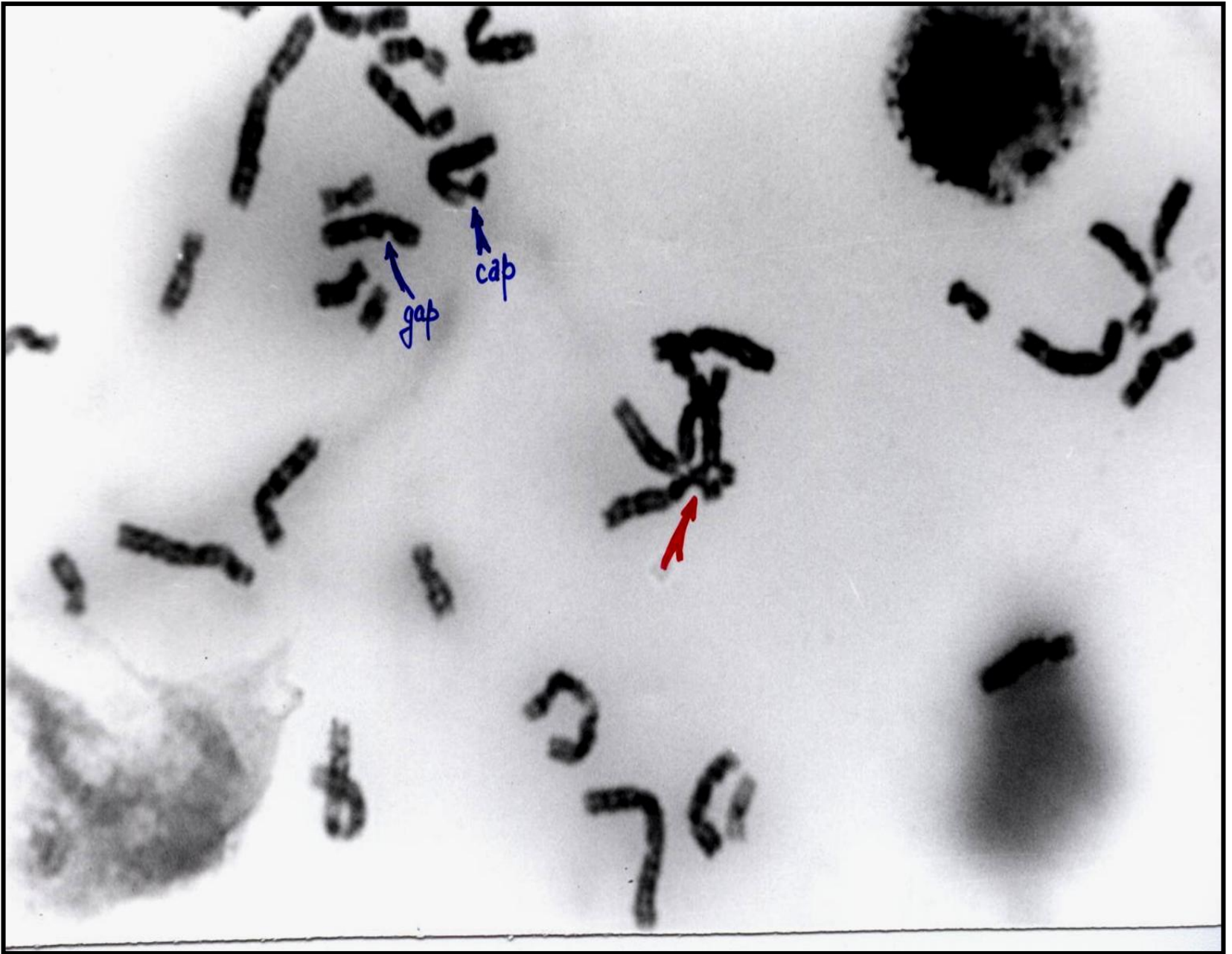


Anillo

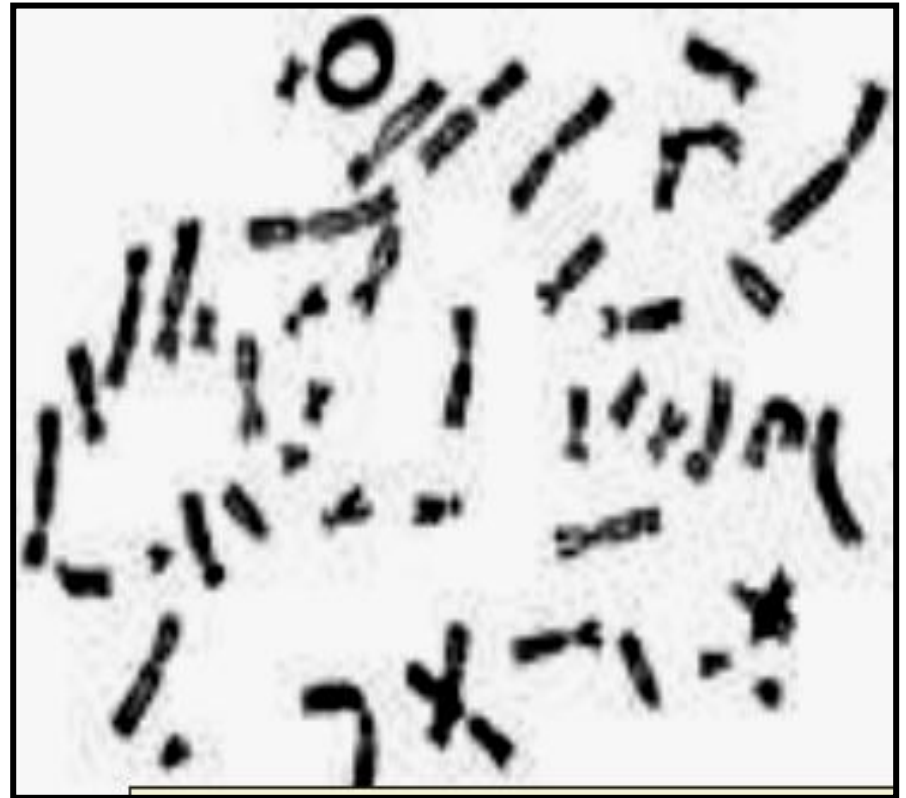


HIPODIPLOIDIAS







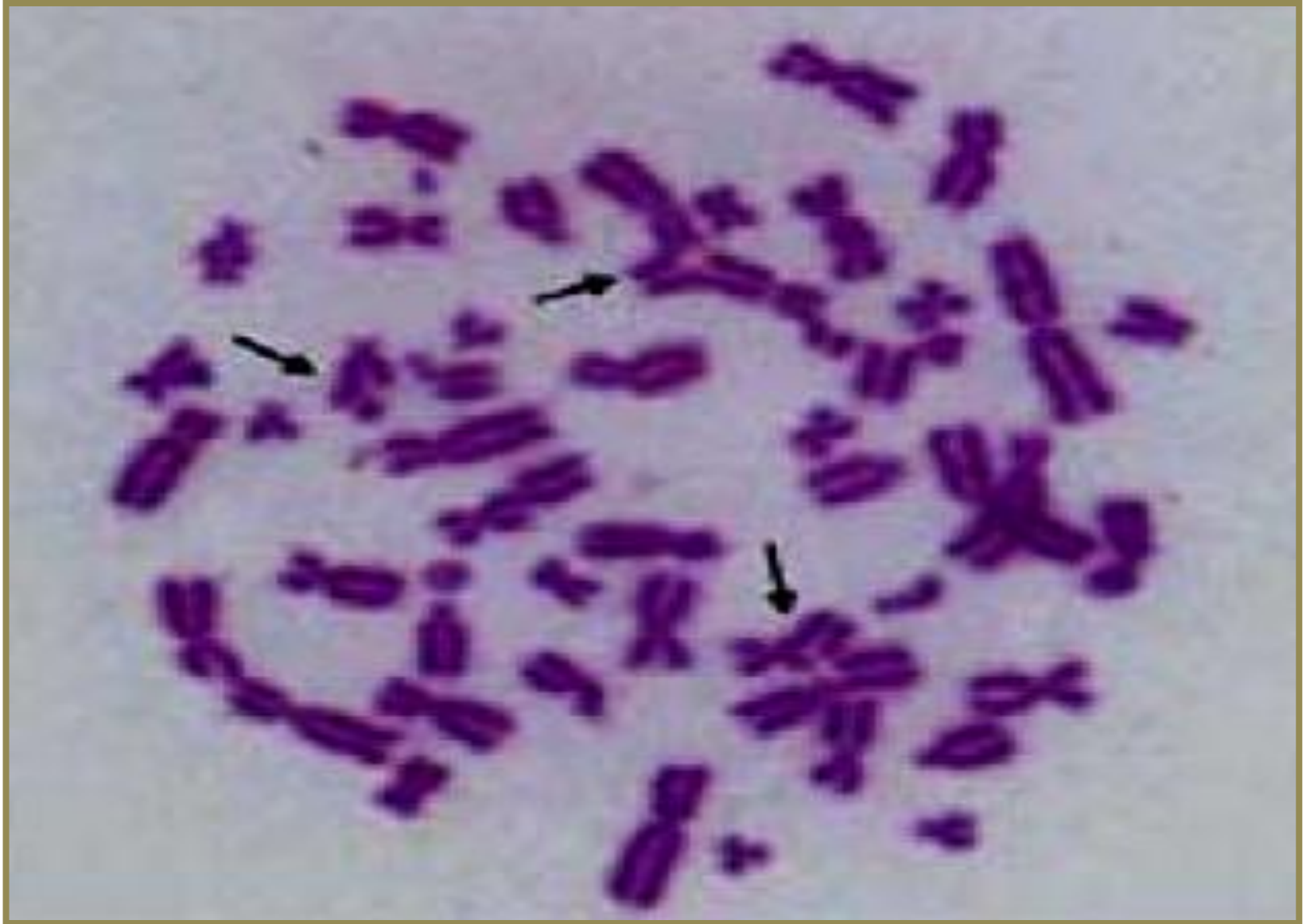






HIPODIPLOIDIA

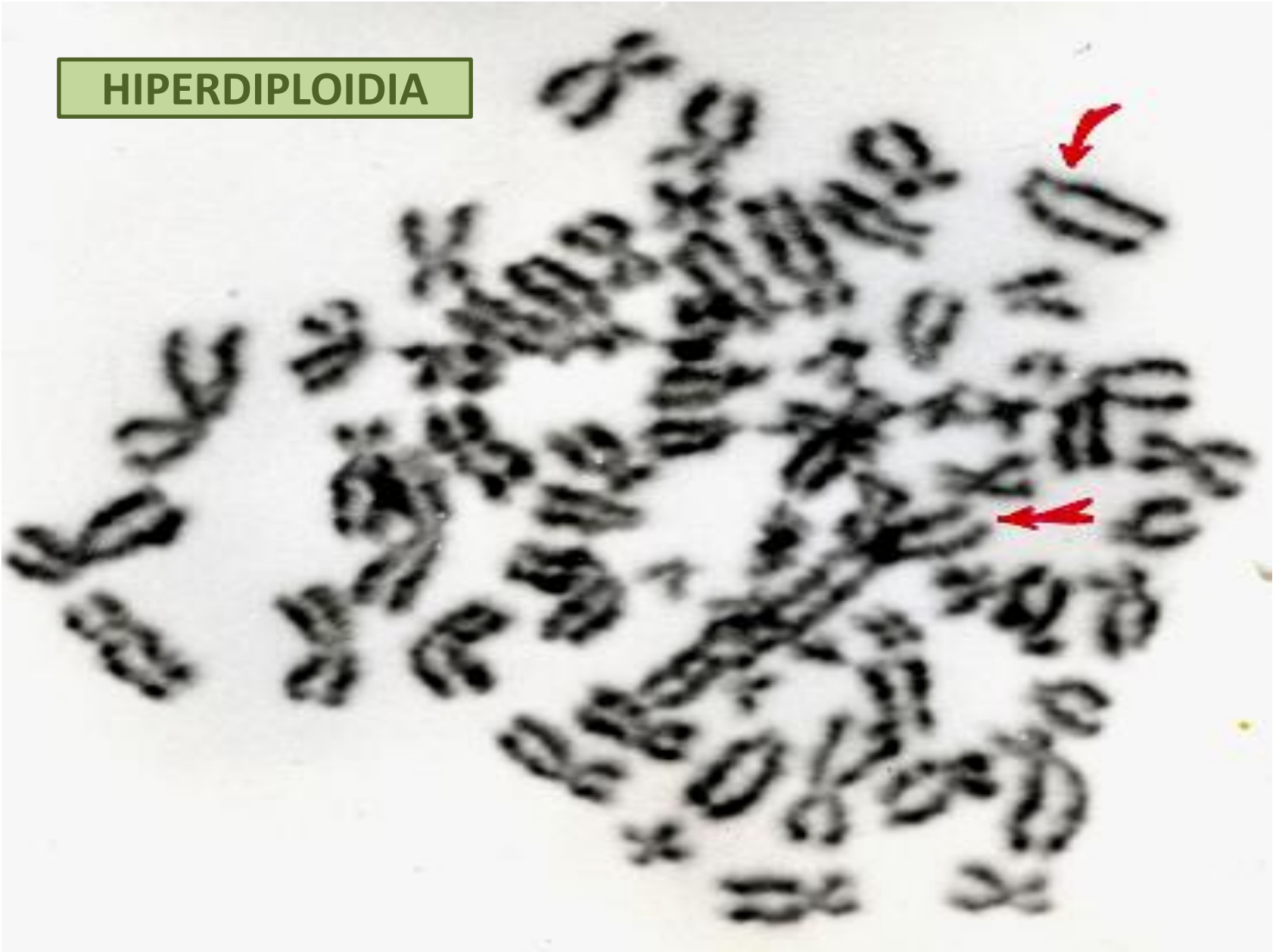
HIPODIPLOIDIA

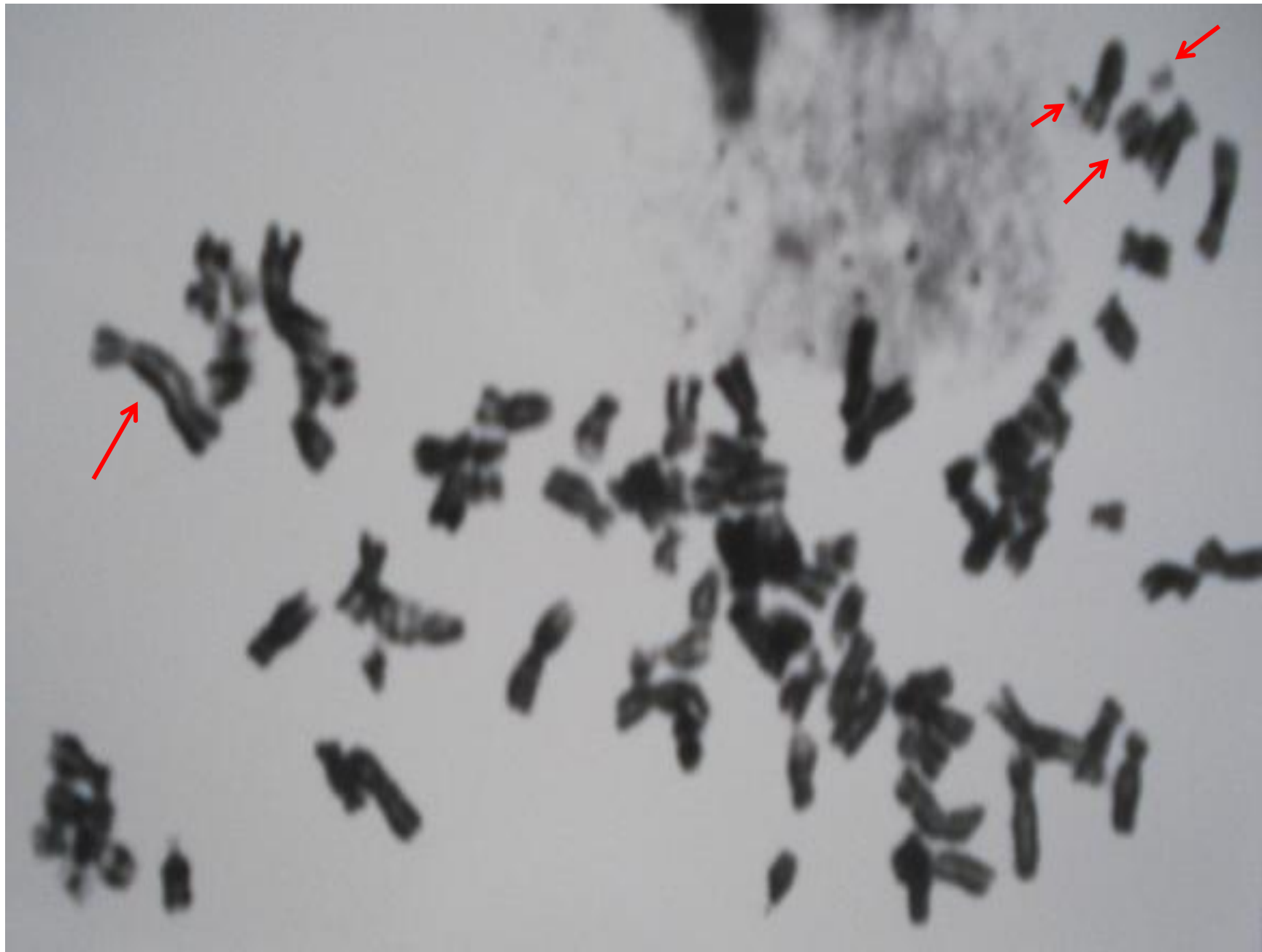


HIPERDIPLOIDIA



HIPERDIPLOIDIA



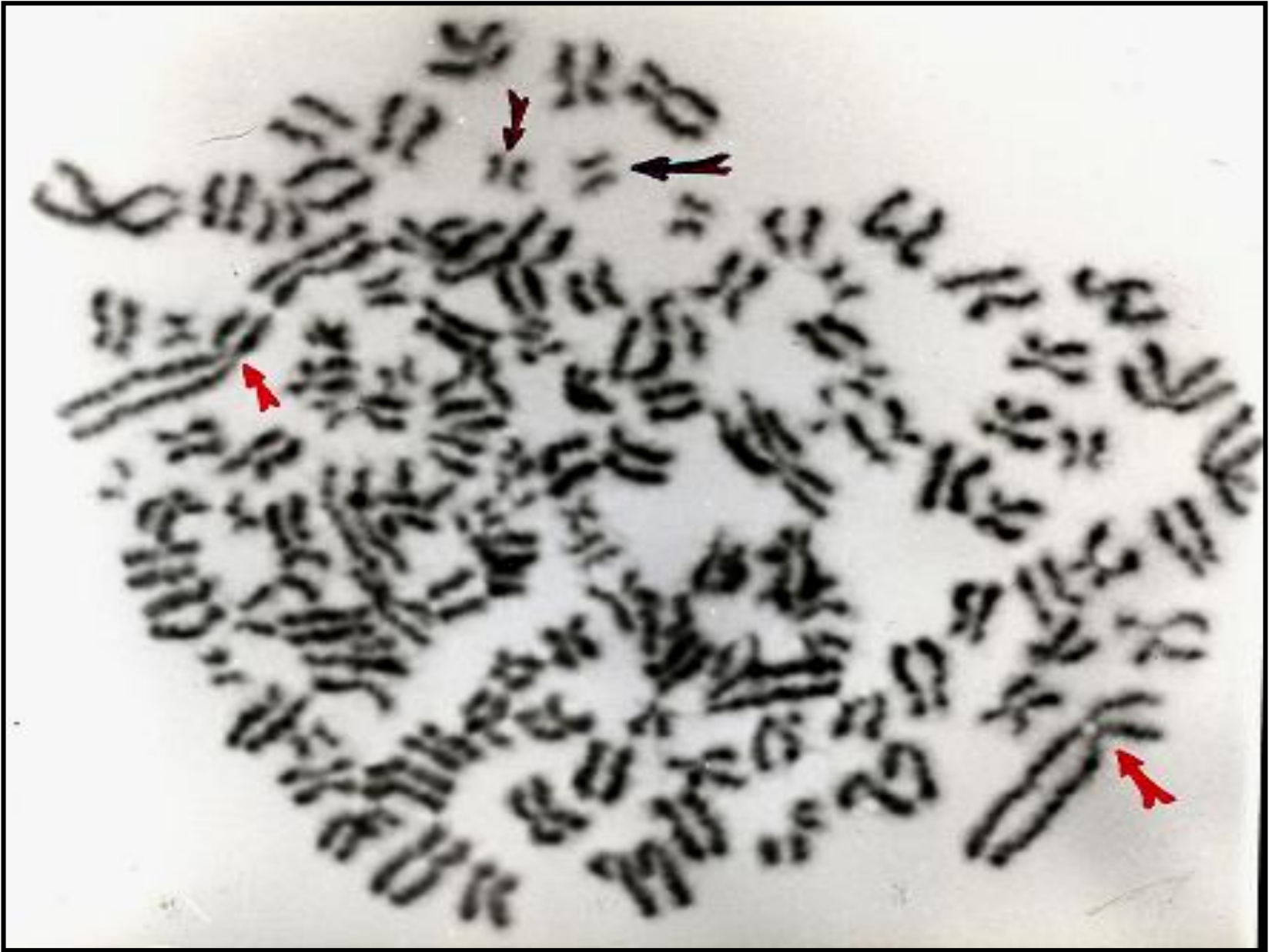


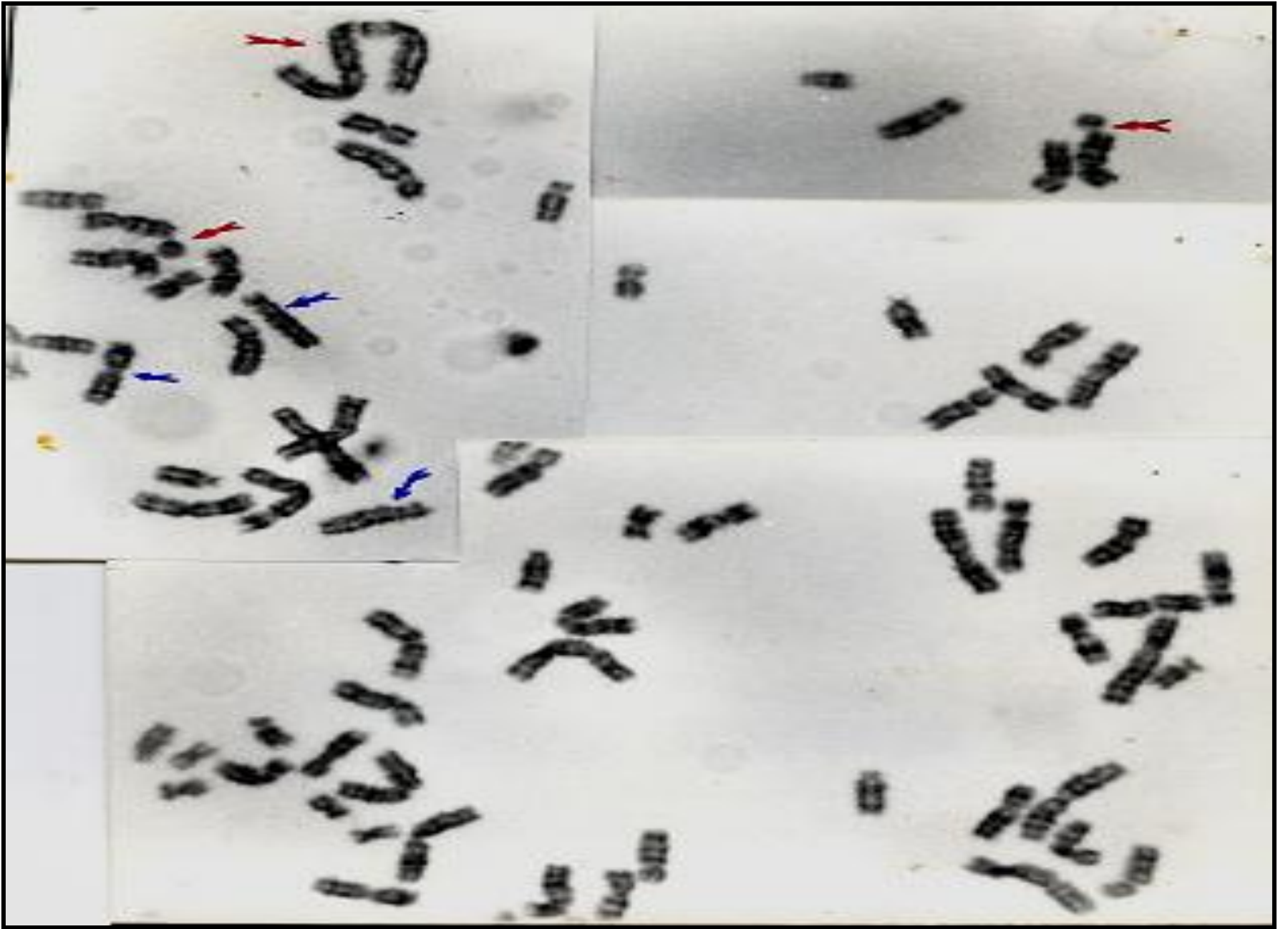
POLIPLOIDIA



POLIPLOIDIA

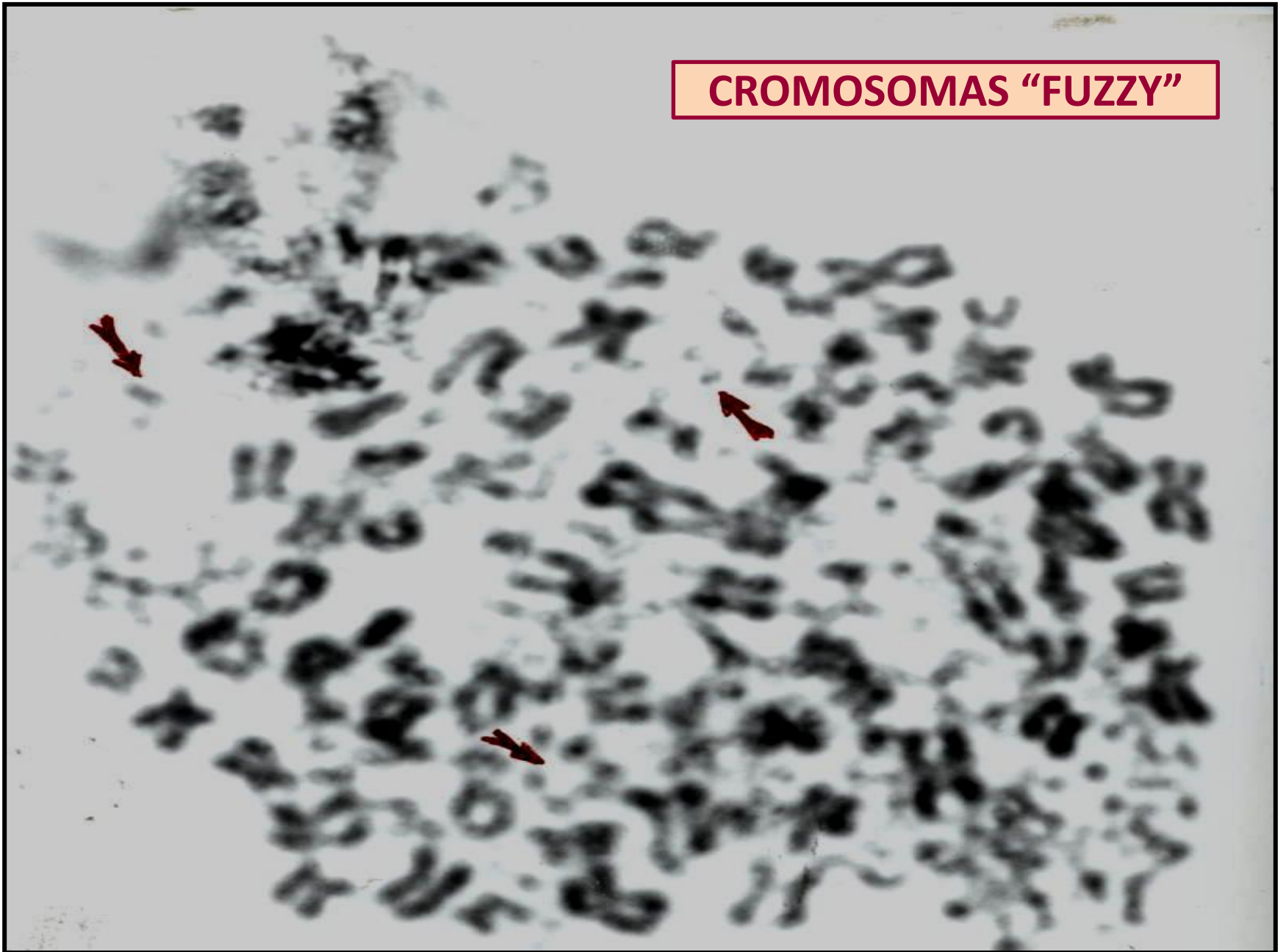








CROMOSOMAS "FUZZY"



Estudio Citogenetico de liquido orgánicos

Criterios de Interpretación

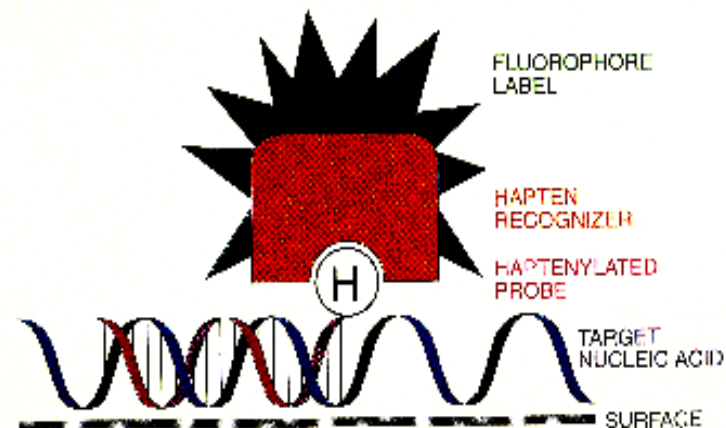
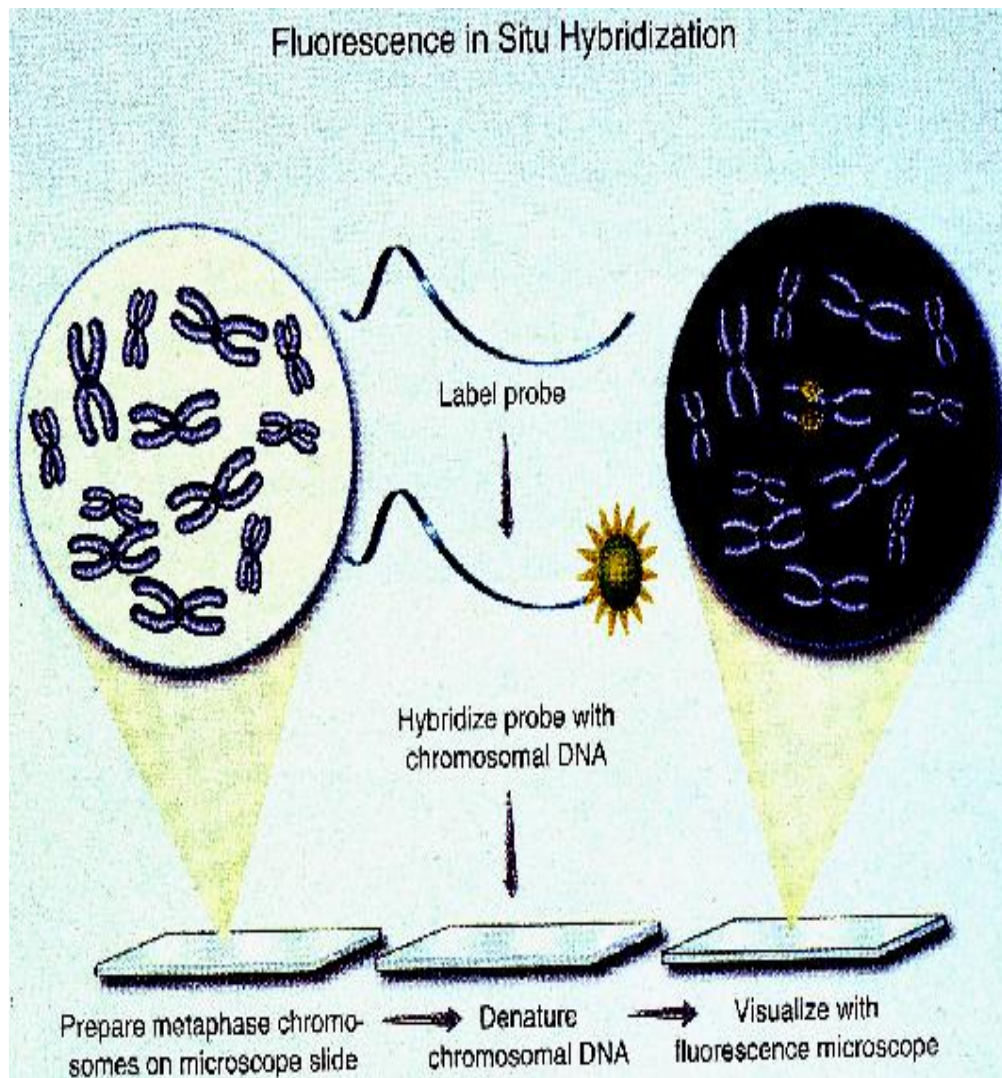
Citogenetica	Morfologia	Conclusión
Hipodiploidia	<i>Positiva</i>	<i>Positivo</i>
	<i>Negativo</i>	<i>Negativo</i>
Hiperdiploidia	<i>Positiva</i>	<i>Positivo</i>
	<i>Reactiva</i>	<i>Positivo</i>
Poliploidías	<i>Positiva</i>	<i>Positivo</i>
	<i>Reactiva</i>	<i>Positivo</i>

EL EXUDADO PLEURAL MALIGNO: VALOR DIAGNOSTICO DEL ANALISIS CITOGENETICO*

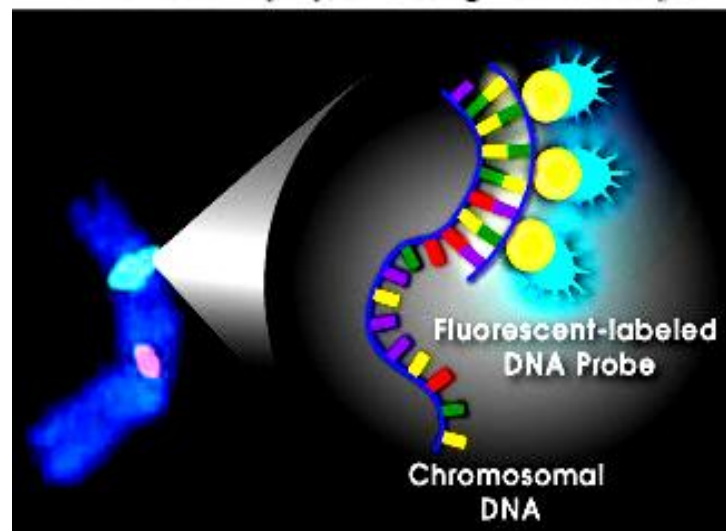
Dres.: José Angulo Márquez; Gustavo Villasmil Prieto; Aída Falcón de Vargas;
José R. Silva; Clarita Roetter de Lucani; Fabio Arias Rojas**

- 20 pacientes portadores de EP asociado bien a patología pleuro-pulmonar maligna conocida (16 de ellos) o a TBC pleuro-pulmonar (4 casos).
- A todos se les realizo estudio citogenético, adicionalmente a la Bx pleural y/o a la citología de LP.
- El estudio muestra un incremento sustancial de la sensibilidad de combinación citología de LP/Bx pleural con la adición del análisis citogenético: de un 65% a un 94%.
- **Conclusión:** es razonable la inclusión de este método en el plan de trabajo diagnóstico ante todo EP sospechoso de ser neoplásico con citología de LP y Bx pleural no-concluyentes.

1990: Citogenética Molecular



Chromosome prepared using FISH technique

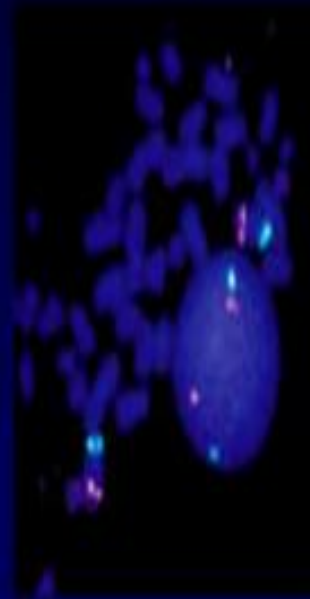
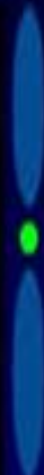
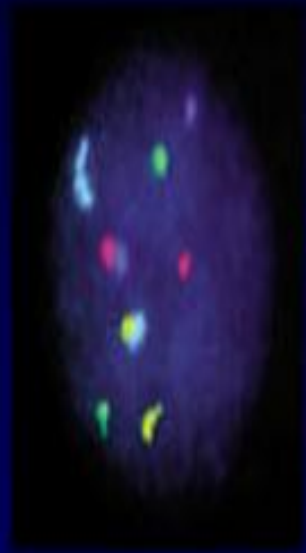


FISH

TIPOS DE SONDAS

Sondas centroméricas (CEP)

Sondas de secuencia única

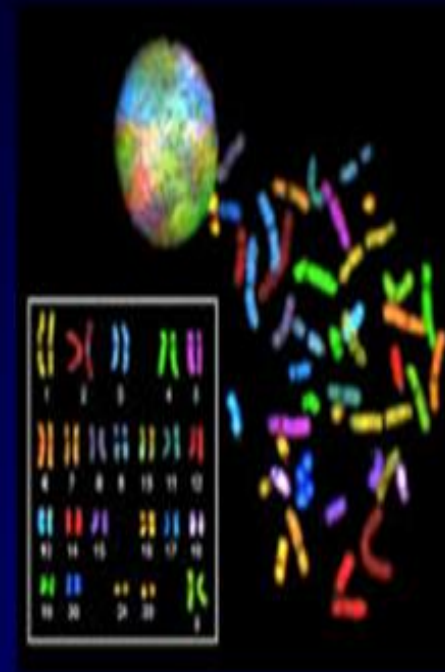


FISH

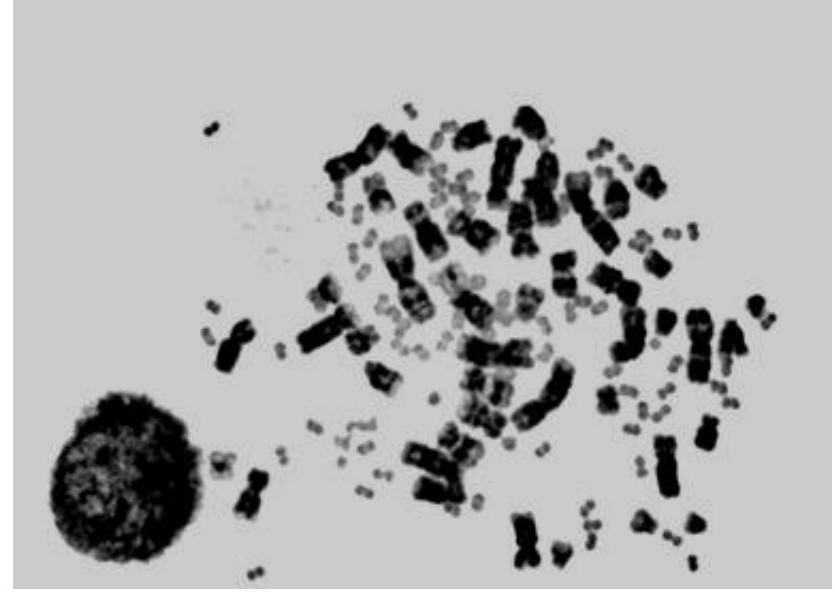
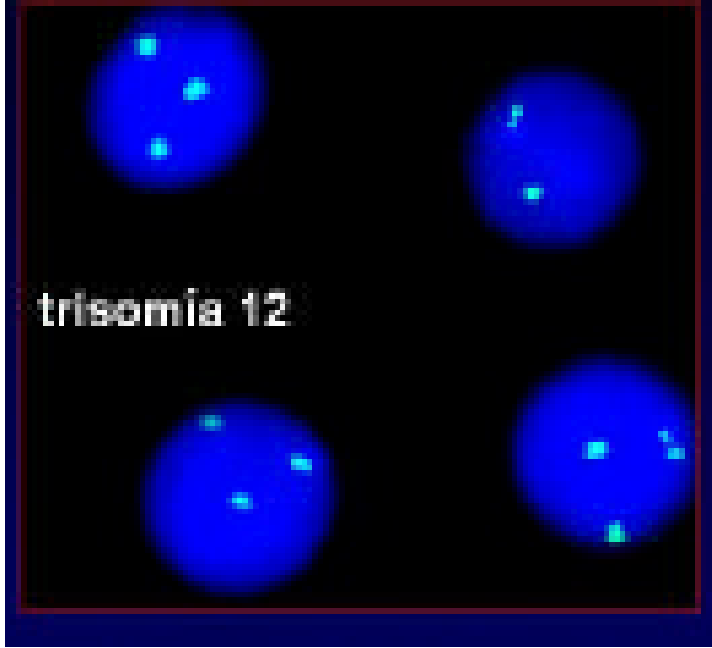
TIPOS DE SONDAS

Sondas de pintado cromosómico

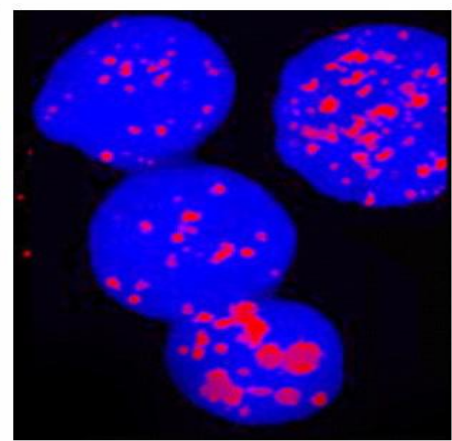
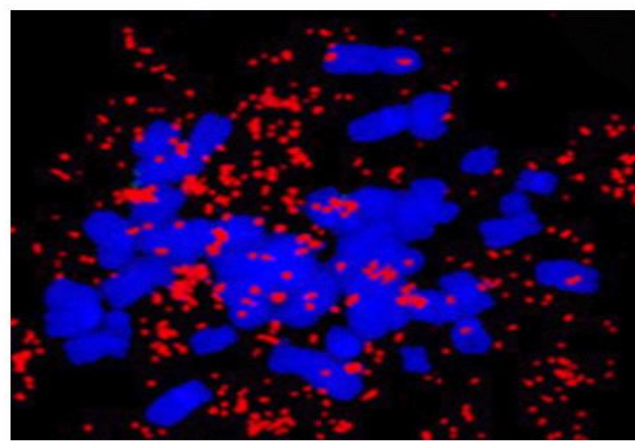
Sondas teloméricas




TIPOS DE ALTERACIONES: NUMERICAS



Amplificación Génica. Doble minutos



Aplicaciones del FISH a la citología no ginecológica

- ✓ Diagnóstico prenatal
- ✓ Determinación del estado del gen HER2-neu en Ca. de mama
- ✓ Diagnóstico de Ca. Urotelio y recidivas (UroVysion FISH test)
- ✓ Otras:
 - Detección de Ca. Pulmón en lavados bronquiales
 -  Detección de malignidad en fluidos corporales
 - Esófago de Barret
 - Sarcomas
 -

PATOLOGÍA MOLECULAR Y CITOLOGÍA. APLICACIONES DEL FISH EN LA CITOLOGIA NO GINECOLOGICA

María Dolores Lozano

Departamento de Anatomía Patológica.

Clínica Universitaria. Universidad de Navarra. Pamplona.

Es importante a la hora de la aplicación de esta técnica a muestras citológicas la calidad del material, puesto que ésta es uno de los factores más importantes que afectan a la eficiencia de la hibridación y la intensidad de la reacción. La densidad celular no debe ser demasiado alta y las células deben estar distribuidas de manera homogénea en todo el porta. De ahí el valor de la citología en medio líquido que permite una fijación adecuada del material y la posibilidad del fondo limpio.

CITOLOGÍA LÍQUIDA

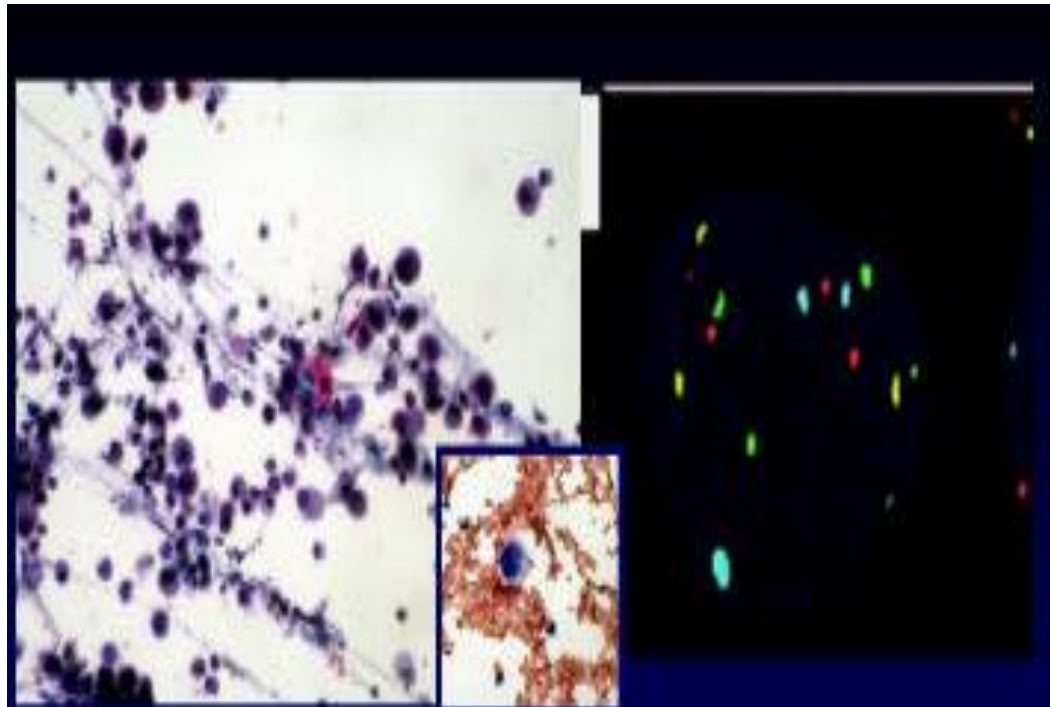
Método automatizado de preparación citológica a través de la conversión de una suspensión líquida de células en una monocapa.

- Mayor nº de células
- Fijación homogénea, reducción de los artefactos
- Aplicación de técnicas complementarias

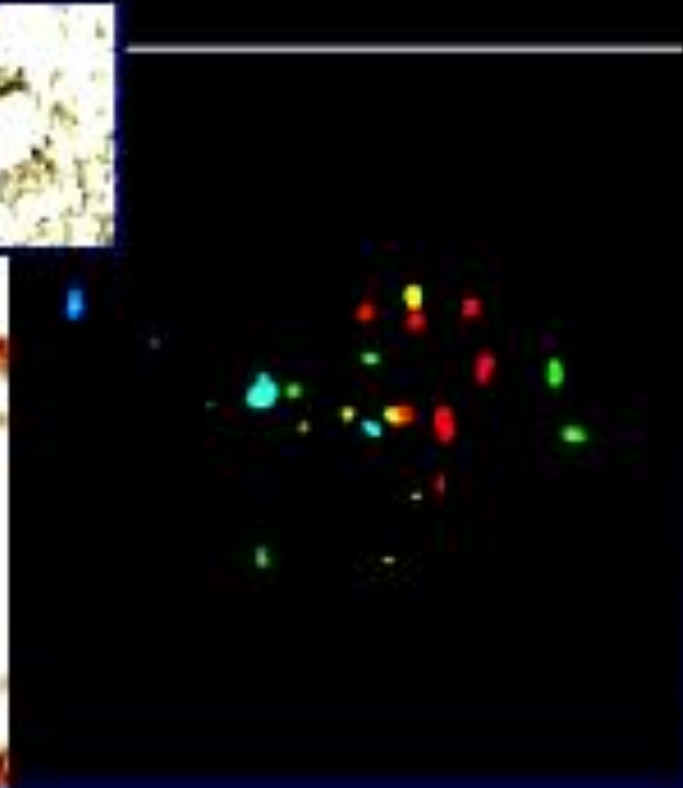
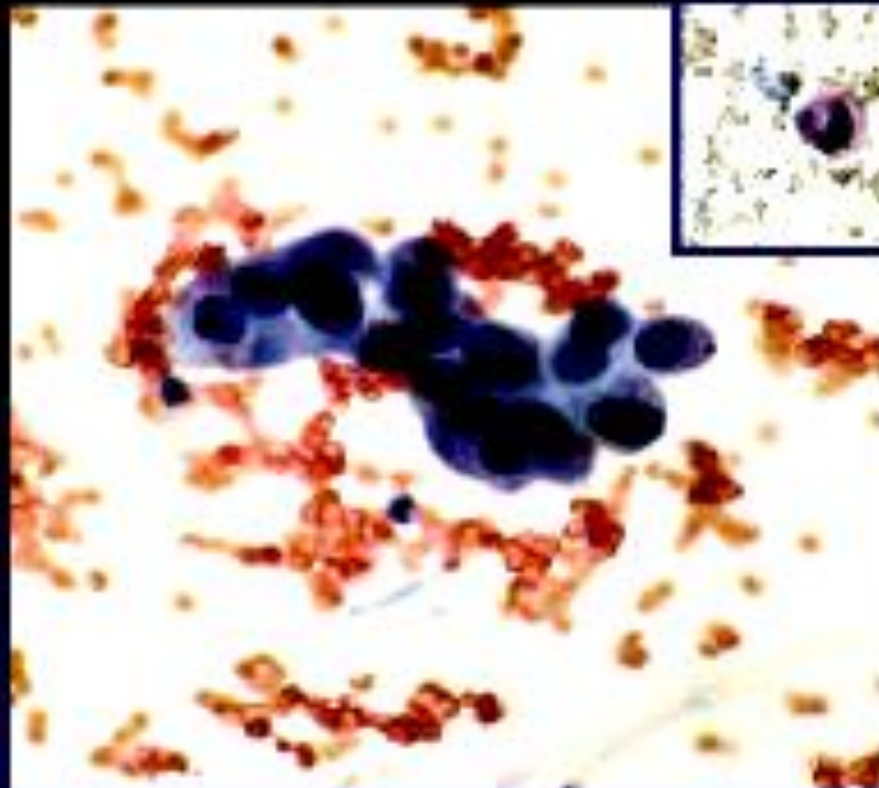


Detección de carcinoma de pulmón en lavados bronquiales

Existen referencias en la literatura de la aplicación de sondas centroméricas para el cromosoma 1 y sondas de secuencia única frente a los locus 5c15, 8q24 (c-myc) y 7p12 (EGFR), aplicadas a células de lavado bronquial. Estos estudios muestran una mayor sensibilidad del FISH a la hora de detectar células tumorales y proponen esta técnica como técnica complementaria al estudio citológico del lavado bronquial.



Papanicolaou de un BAL en un paciente con Ca. Escamoso de pulmón. FISH en el BAL con las siguientes sondas: CEP1 (centromérica de secuencias repetitivas del Crom 1), y tres sondas de secuencia única: 5p15, 8q24 (C-Myc), 7p12 (EGFR)



.Ejemplo de FISH en un BAL de un paciente con AC. El FISH muestra numerosas alteraciones.

CEP1 (sonda centromérica de secuencias repetitivas del Crom 1), y tres sondas de secuencia única: 5p15, 8q24 (C-Myc), 7p12 (EGFR)

Estudio Citogenético de líquidos orgánicos

Las principales ventajas del FISH son las siguientes:

- **Puede ser realizado en metafases con núcleos en interfase.**
- **Permite el uso de material congelado, material incluido en parafina y material citológico.**
- **Es una técnica rápida.**
- **Tiene gran sensibilidad y especificidad**

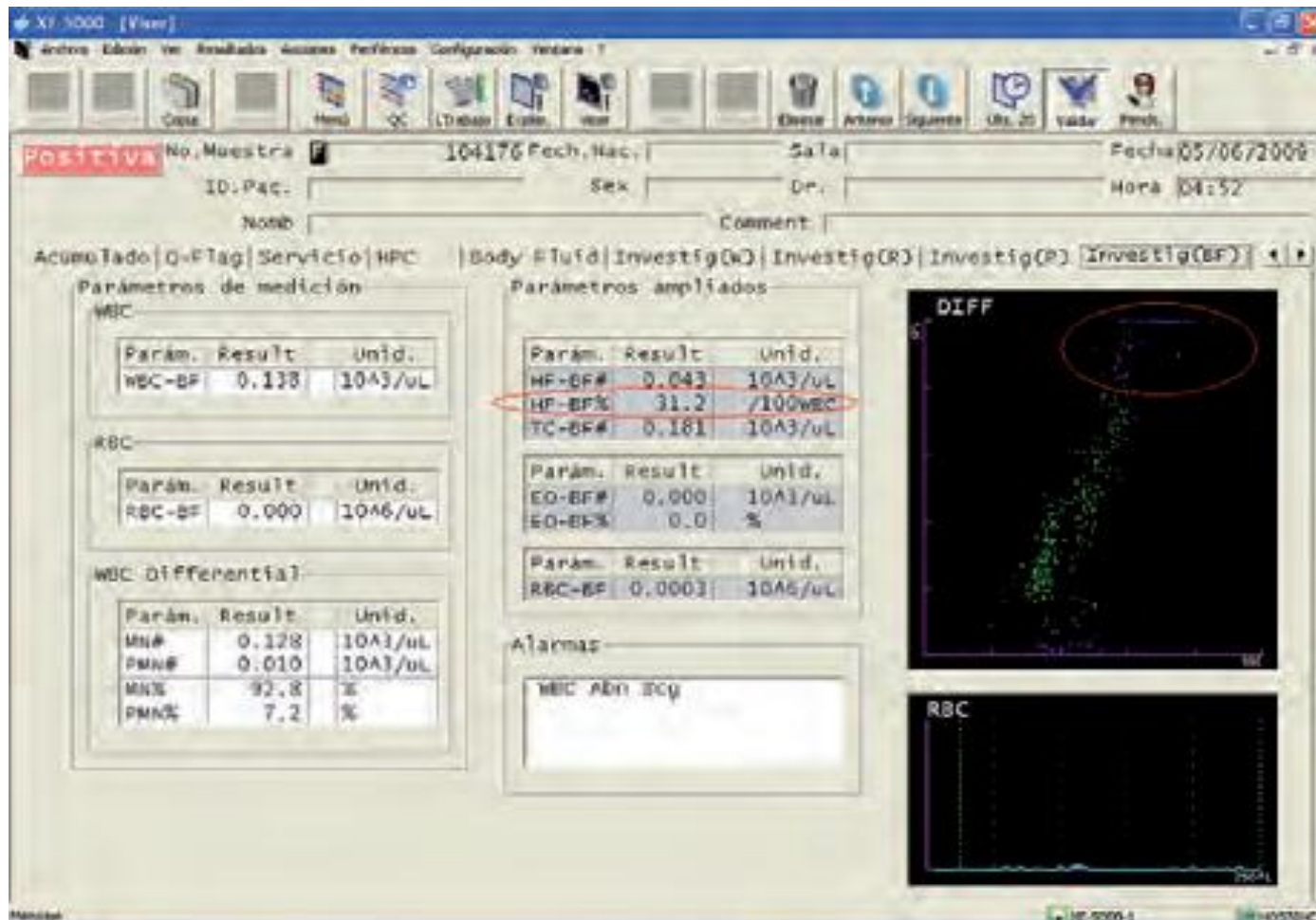
CREACION DE UN AREA DE AUTOMATIZACION PARA EL ESTUDIO CITOLOGICO DE LIQUIDOS BIOLÓGICOS. PROPUESTA DE UN FLUJO DE TRABAJO

Miriam Martinez Villanueva, Amparo Sarabia Meseguer, Jose A. Noguera Velasco, Pedro Martinez Hernandez. *Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Servicio Murciano de Salud. Murcia*

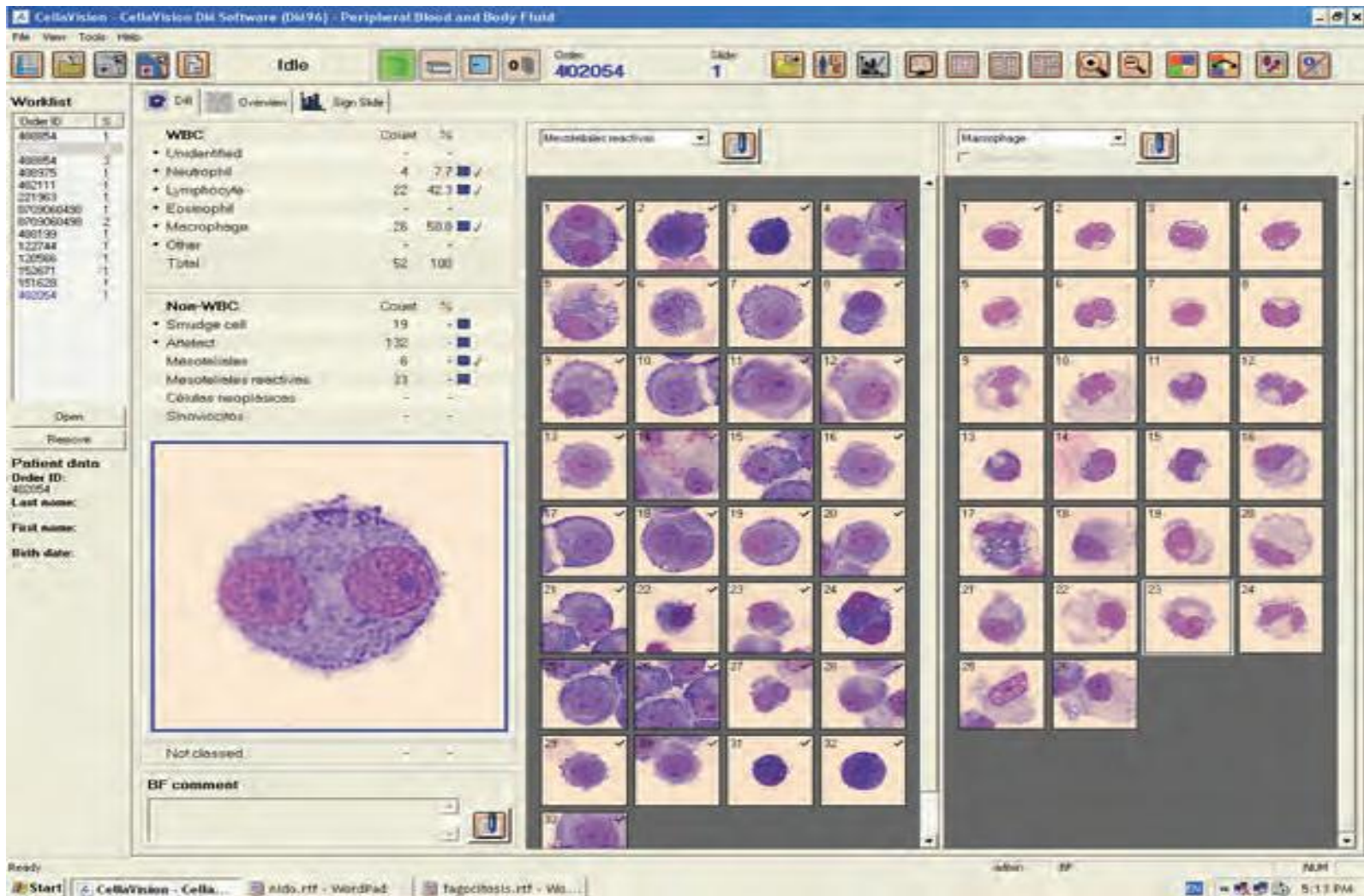
El analizador hematológico XE-5000 (Sysmex Co, Kobe, Japan) dispone de un modo específico de trabajo para el análisis de líquidos biológicos (BF Mode). La tecnología aplicada se basa en la citometría de flujo de fluorescencia. El volumen de muestra que aspira es de 130 μL y no es necesario pretratamiento alguno.

Por otra parte, Cellavision DM96 v 2.0 es un sistema de microscopía digital entrenado mediante una red neural artificial y con un software específico para el análisis de líquidos biológicos (BF). Este sistema escanea, fotografía y almacena el botón celular obtenido por citocentrifugación y teñido con May Grunwald-Giemsa, permite obtener una visión general de dicho botón a un aumento de 10x y 50x y preclasifica las células en 7 categorías que posteriormente han de ser revisadas y/o corregidas por el citólogo:

- neutrofilos
- linfocitos
- eosinofilos
- macrófagos (incluyendo monocitos)
- células rotas (smudge)
- artefactos
- otras (en las que se incluyen, entre otros, blastos, linfoblastos y células tumorales)



Pantalla de investigación de fluidos pero con un elevado porcentaje de células de alta fluorescencia (HF-BF%=31.2%). biológicos del Sysmex XE-5000 que muestra un líquido ascítico con escasa celularidad



Pantalla del Cellavision DM96 que muestra que el elevado porcentaje de células de alta fluorescencia del líquido ascítico (HF-BF=21%) corresponde en su mayoría a células mesoteliales reactivas y macrófagos en un paciente con cirrosis e hipertensión portal.

MUCHAS GRACIAS