

ESTANDARIZACIÓN DEL CULTIVO DE LINFOCITOS PARA ANÁLISIS CITOGENÉTICO DE CARIOTIPO HUMANO EN UN LABORATORIO PRIVADO DE ENCARNACIÓN

Karina Magdalena Cáceres Fernández¹

Laboratorio Bioquímico de Alta Complejidad RH Positivo - Paraguay

Gastón Andrés Sioli²

Instituto de Genética Humana de Misiones - Argentina

Armando Antonio Gamarra Borja³

Laboratorio Bioquímico de Alta Complejidad RH Positivo - Paraguay

Recepción: 24/07/2023

Aprobación: 14/11/2023

Resumen

El cariotipo es el análisis cromosómico de un individuo. El estudio de cariotipos a partir de cultivos de linfocitos es crucial en genética clínica e investigación y se utiliza en el diagnóstico y seguimiento de enfermedades genéticas asociados a alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales. Es preparado a partir de células vivas, para eso, es necesario realizar cultivo celular a partir de muestras de sangre periférica, médula ósea o líquido amniótico, siendo el método más común el cultivo de linfocitos a partir de sangre periférica. Actualmente, en el departamento de Itapúa, según registros de la base de datos del Centro de Información Científica del CONACYT (CICCO), no se cuenta con laboratorios que hayan implementado la técnica, por lo cual el objetivo fue estandarizar la técnica de cultivos de linfocitos a partir de sangre periférica, para el análisis citogenético de cariotipos humanos en un laboratorio privado de la Ciudad de

¹ Esp. en Docencia Universitaria con Énfasis en Salud. Lic. Genética. Laboratorio Privado de Análisis Clínicos RH Positivo. karinamagdalenacaceres@gmail.com

² Lic. en Genética. Instituto de Genética Humana de Misiones, Fundación Parque de la Salud. gastonsioli@gmail.com

³ Bioquímico. Laboratorio Privado de Análisis Clínicos RH Positivo. armagama@gmail.com

Encarnación. Se realizó un estudio de tipo experimental, de corte transversal y con finalidad aplicada, en el área de Biología Molecular y Citogenética del Laboratorio privado RH Positivo, en Encarnación, Itapúa. El material biológico fue recolectado de 10 personas de forma voluntaria. Las muestras se sometieron por duplicado a dos ensayos; el primero, siguiendo las instrucciones del fabricante y el segundo, con modificaciones. Para el cultivo de linfocitos de sangre periférica se utilizó el medio para cariotipo PB-MAX™. La observación se realizó bajo un microscopio óptico, a 1000X con aceite de inmersión para comparar los resultados de ambos ensayos. En el primer ensayo se obtuvieron pocas células en metafase que se observaban muy cerradas al microscopio óptico, con presencia de un halo de citoplasma que impedía la fácil identificación de los cromosomas. Los cromosomas estaban muy cortos, lo que dificultaba la identificación de las bandas. Sin embargo, en el segundo ensayo se obtuvieron muchas células en metafase, bien abiertas, sin halo de citoplasma, lo que facilitaba la distinción una de otras. Se observaron cromosomas de longitud variada y de fácil identificación de bandas. Para la estandarización del cultivo (segundo ensayo), se obtuvieron metafases de calidad satisfactoria que presentaron cromosomas de buena longitud, bien extendidos y con bandeo nítido, lo que hizo posible observar y analizar el cariotipo de los voluntarios, identificando y agrupando a los cromosomas de acuerdo a su forma, tamaño, posición del centrómero y patrón de bandas. En conclusión, la técnica permite ofrecer la realización del análisis de cariotipo a la población de Itapúa y alrededores que presenten antecedentes de enfermedades genéticas y parejas con problemas de fertilidad, proporcionando información crucial para el asesoramiento genético y ayuda para la toma de decisiones sobre las opciones de tratamiento.

Palabras claves: Citogenética – Cariotipo – Linfocitos - Sangre periférica.

Abstract

Karyotyping is the chromosomal analysis of an individual. The study of karyotypes from lymphocyte cultures is crucial in clinical genetics and research, and is used in the diagnosis and monitoring of genetic diseases associated with numerical or structural chromosomal abnormalities. Karyotypes are prepared from live cells, which requires performing cell culture from peripheral blood, bone marrow, or amniotic fluid samples,

with the most common method being the culture of lymphocytes from peripheral blood. Currently, in the department of Itapúa, according to records from the CONACYT Scientific Information Center (CICCO) database, there are no laboratories that have implemented the technique, therefore the objective was to standardize the peripheral blood lymphocyte culture technique for the cytogenetic analysis of human karyotypes in a private laboratory in the city of Encarnación. An experimental, cross-sectional, and applied study was conducted in the Molecular Biology and Cytogenetics area of the private laboratory RH Positivo, in Encarnación, Itapúa. Biological material was voluntarily collected from 10 individuals. The samples were subjected, in duplicate, to two assays; the first, following the manufacturer's instructions, and the second, with modifications. The PB-MAX™ karyotyping medium was used for peripheral blood lymphocyte culture. Observation was performed under an optical microscope, at 1000X with immersion oil, to compare the results of both assays. In the first assay, few metaphase cells were obtained; they appeared very condensed under the optical microscope, with a cytoplasm halo that prevented easy identification of the chromosomes. The chromosomes were very short, which made band identification difficult. However, in the second assay, many metaphase cells were obtained; they were well-spread, without a cytoplasm halo, which facilitated their distinction from one another. Chromosomes of varied length and easy band identification were observed. For the culture standardization (second assay), satisfactory quality metaphases were obtained, showing chromosomes of good length, well-extended, and with sharp banding, which made it possible to observe and analyze the karyotype of the volunteers, identifying and grouping the chromosomes according to their shape, size, centromere position, and banding pattern. In conclusion, the technique allows the private laboratory to offer karyotype analysis to the population of Itapúa and surrounding areas who have a history of genetic diseases and couples with fertility problems, providing crucial information for genetic counseling and aiding in decision-making regarding treatment options.

Keywords: Patient safety - Pharmaceutical validation - Health indicators - Patient identification.

1. Introducción

Los defectos cromosómicos se deben a un exceso o ausencia de genes contenidos en cromosomas enteros o en fragmentos cromosómicos. Constituyen, en gran proporción, motivo de pérdidas reproductivas, malformaciones congénitas y retraso mental, y tienen un importante papel en la patogenia del cáncer (1). A veces, en los estudios citogenéticos pueden detectarse algunas variaciones en la morfología de los cromosomas que no tienen consecuencias en el fenotipo del paciente. Algunos de los heteromorfismos que suelen aparecer con más frecuencia, se hallan en las regiones de heterocromatina de algunos cromosomas (2). De forma rutinaria, el diagnóstico de los defectos cromosómicos se realiza mediante el estudio del cariotipo, que consiste en el análisis del número y estructura de los cromosomas al microscopio óptico (1).

El cariotipo se trata del análisis cromosómico de un individuo. Un total de 46 cromosomas pueden ser observados mediante la utilización de un microscopio, 22 pares de cromosomas somáticos y un par de cromosomas sexuales, X e Y (3). 46 XX y 46 XY constituyen la forma de representar el cariotipo de una mujer y un varón, respectivamente (4). El cariotipo es una herramienta importante para el médico genetista, ya que permite el diagnóstico de síndromes asociados a alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales y, de esta manera, proporcionar un manejo clínico y asesoramiento genético adecuado a los pacientes (5). Actualmente, gran parte de las anomalías fenotípicas causadas por alteraciones cromosómicas, tales como, malformaciones congénitas, bajo peso y síndromes hereditarios, tienen como la característica clínica más común, la deficiencia mental y pueden ser diagnosticadas en el periodo prenatal (6).

El estudio de cariotipos a partir de cultivos de linfocitos es crucial en genética clínica e investigación, y se utiliza en el diagnóstico y seguimiento de enfermedades genéticas (7), como el síndrome de Down (trisomía 21), el síndrome de Edwards (trisomía 18) y el síndrome de Patau (trisomía 13) (8) (9), conocidas como alteraciones numéricas, y otras alteraciones cromosómicas denominadas estructurales, como deleciones, duplicaciones e inversiones; y tiene una influencia importante en la necesidad de estudiar o no a los padres para estimar la probabilidad de recurrencia en la familia.

Según el Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social (MSPyBS), la prevalencia estimada de este tipo de enfermedades es de 1 por cada 500 nacimientos (10). En Paraguay, el Registro Nacional de Defectos Congénitos informaron en el 2019, 2 recién nacidos con Síndrome de Patau, 14 recién nacidos con Síndrome de Edwards y 76 recién nacidos con Síndrome de Down (11).

También, puede revelar alteraciones en los cromosomas sexuales, como la presencia de un cromosoma adicional en hombres (síndrome de Klinefelter) o la ausencia de un cromosoma X en mujeres (síndrome de Turner) (9). Estas anomalías pueden ocasionar problemas de fertilidad, por lo tanto, pueden guiar el manejo y tratamiento adecuados. Es por eso que, desempeña un papel importante en la evaluación de la infertilidad, tanto en hombres como en mujeres para investigar posibles causas genéticas subyacentes. Aunque, en la actualidad, se cuentan con herramientas diagnósticas moleculares, el cariotipo en sangre periférica sigue siendo la primera línea de estudio para la detección de problemas cromosómicos en personas con trastornos reproductivos (5), ya que, puede identificar anomalías cromosómicas estructurales o numéricas que podrían estar relacionadas con problemas de fertilidad (12). Por ejemplo, las translocaciones cromosómicas equilibradas, en las que hay un intercambio de material genético entre cromosomas, pueden aumentar el riesgo de abortos espontáneos recurrentes o de tener hijos con trastornos genéticos (13). En hombres, el cariotipo puede revelar anomalías como microdeleciones del cromosoma Y o anomalías en los cromosomas sexuales (por ejemplo, síndrome de Klinefelter o síndrome de Y frágil). En mujeres, el cariotipo puede detectar anomalías cromosómicas que afectan la estructura o el número de cromosomas, como el síndrome de Turner (monosomía X) o las anomalías estructurales de cromosomas sexuales (14). Estas alteraciones cromosómicas pueden estar asociadas con problemas en la ovulación, la calidad de los óvulos, afectar la producción y función de los espermatozoides, y la implantación del embrión. Es por ello que, permite establecer un vínculo entre las alteraciones genéticas, el tratamiento y el pronóstico de la infertilidad de las parejas que optan cada vez más por terapias alternativas de concepción asistida y otras técnicas reproductivas (15).

La citogenética, también, se utiliza para la investigación de varias enfermedades oncológicas. En contraste al carcinoma epitelial, las anomalías genéticas en las enfermedades oncohematológicas, por lo general, están involucradas las translocaciones cromosómicas recíprocas o balanceadas. Por lo tanto, las técnicas utilizadas en la detección de alteraciones cromosómicas son más relevantes en oncohematología que en otras esferas de la oncología. Continúa siendo el estudio estándar de oro de la genética y el más pedido en el campo, comúnmente, para el diagnóstico y seguimiento de varias leucemias, ya que fue la primera prueba genética utilizada en la práctica clínica para el diagnóstico (16).

El cariotipo es preparado a partir de células vivas, generalmente de linfocitos de sangre periférica o médula ósea. Generalmente, el cultivo de linfocitos a partir de sangre periférica se utiliza para diagnósticos de enfermedades genéticas no invasivas. Sin embargo, las células malignas de médula o ósea o sangre periférica son utilizadas para la identificación de alteraciones citogenéticas en enfermedades hematológicas, aunque el rendimiento de estas células puede ser subóptimo (16).

Para la obtención del cariotipo humano es necesario realizar cultivo celular a partir de muestras de sangre periférica, médula ósea o líquido amniótico, siendo el método más común el cultivo de linfocitos a partir de sangre periférica. Las células se cultivan en un medio favorable que utilizan mitógenos (estimulante de la división celular) de linfocitos T, como la phytohemagutina (PHA), para mejorar la división mitótica y obtener abundantes metafases. Se obtiene cromosomas en metafase, estos, son analizados por medio del bandeo G que consiste en el tratamiento de los cromosomas con proteasas, y su coloración con colorante Giensa. Los patrones de bandas son originados de la interacción del ADN y las proteínas presentes en el colorante (tiazina y eosina) (17).

En el país, a nivel público, se cuenta con el Laboratorio de Citogenética del Instituto de Investigación de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional y el Programa Nacional de Defectos Congénitos, del Ministerio de Salud, ubicados en la ciudad de San Lorenzo del Departamento Central, el cual, ofrece estudios de citogenética convencional y citomolecular (18) (19). Sin embargo, en el interior del país, específicamente, en el departamento de Itapúa no se cuenta con laboratorios que hayan implementado la técnica,

es decir, no existen registros de comunicaciones o publicaciones al respecto dentro de la base de datos del Centro de Información Científica del CONACYT (CICCO) (20).

Es por eso, que el objetivo de esta investigación fue estandarizar la técnica de cultivos de linfocitos a partir de sangre periférica, para el análisis citogenético de cariotipos humanos en un laboratorio privado de la Ciudad de Encarnación, de forma que, pueda ser utilizado para ofrecer un diagnóstico citogenético a la población del Departamento de Itapúa.

2. Metodología

Se realizó un estudio de tipo experimental, de corte transversal y con finalidad aplicada, en el área de Biología Molecular y Citogenética del Laboratorio privado RH Positivo, en Encarnación, Itapúa. El material biológico fue recolectado de 10 personas de forma voluntaria. Se realizaron extracciones de 3 – 5 ml de sangre periférica en jeringas heparinizadas tomando todas las medidas de esterilización y bioseguridad.

Cada voluntario firmó un consentimiento informado, donde se explica la participación del estudio, así como, se establece el tratamiento confidencial de los resultados y de sus datos personales. Además de responder a una serie de preguntas que facilitarían la interpretación de los resultados y el diagnóstico citogenético. Las cuales abarcaban, antecedentes familiares, uso de medicamentos y transfusión de sangre o médula ósea.

Para el cultivo de linfocitos de sangre periférica se utilizó el medio para cariotipo PB-MAX™, el cual, se trata de un medio RPMI 1640 optimizado y suplementado, que contiene suero bovino fetal (FBS), L-glutamina y fitohemaglutinina (PHA). Este, se basa en formulaciones a las que se hace referencia en el Manual de laboratorio de la Asociación de tecnólogos citogenéticos para el cultivo de linfocitos de sangre periférica para análisis citogenéticos. Las muestras se sometieron por duplicado a dos ensayos; el primero, siguiendo las instrucciones del fabricante y el segundo, con modificaciones (21).

Para el primer ensayo, se cultivaron 0,5ml de sangre periférica heparinizada en tubos cónicos estériles con tapa a rosca, con 10ml de medio para cariotipo PB-MAX™. Se cultivaron por 72hs en una incubadora, a 37°C.

Transcurrido ese tiempo, se agregaron 500ul de solución KaryoMAX™ Colcemid™ (colchicina) en los tubos de cultivo y se incubaron durante 15 minutos a 37°C. Se centrifugaron los tubos a 1500 rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante de cada

tubo y se agregaron 8ml de solución hipotónica (0,075 M KCl) a pH 7 y temperatura ambiente. El material se homogeneizó con una pipeta Pasteur estéril y se incubó a 37°C por 30 minutos.

Para realizar la fijación del material, se añadió 1ml de solución Carnoy (metanol, ácido acético 3:1) y se dejó reposar a una temperatura de -20°C por 1 hora. Posteriormente, se homogeneizó y centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 4ml de solución Carnoy frío (-20°C) para lavar el material. Nuevamente, se homogeneizó y centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante dejando 1ml en el tubo. Estos lavados se repitieron 3 veces más y al final, se descartó el sobrenadante dejando 1ml aproximadamente en el tubo, el cual, se utilizó para realizar los extendidos.

Para el segundo ensayo, se cultivaron 0,5ml de sangre periférica heparinizada en tubos cónicos estériles con tapa a rosca, con 8ml de medio para cariotipo PB-MAX™. Se cultivaron por 72hs en una incubadora, a 37°C.

Transcurrido ese tiempo, se agregaron 250ul de solución KaryoMAX™ Colcemid™ (colchicina) en los tubos de cultivo y se incubaron durante 20 minutos a 37°C. Se centrifugaron los tubos a 1500 rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante de cada tubo y se agregaron 8ml de solución hipotónica (0,075 M KCl) a pH 7 y temperatura ambiente. El material se homogeneizó con una pipeta Pasteur estéril y se incubó a 37°C por 40 minutos.

La etapa de fijación del material, se realizó siguiendo los mismos pasos anteriormente mencionados.

Para los extendidos, se utilizaron portaobjetos limpios y desengrasados. En cada portaobjetos se colocaron de 3 a 4 gotas del material a una altura de aproximadamente 30 cm. Los portaobjetos se secaron por flameado en mechero, luego, se sometieron a calor (100°C) por una hora y se protegieron de la luz durante 10 días antes de realizar en bandeó.

Para el bandeó de los extendidos, se siguió la técnica de Seabright (1971) con modificaciones. Los extendidos se sometieron a un tratamiento enzimático con solución de tripsina al 0,05%, a pH 7 y 37°C en baño termostático durante 30 segundos a 1 minuto.

A continuación, se enjuagaron en solución fisiológica para neutralizar la acción proteolítica de la tripsina y se colorearon con Giemsa al 10% entre 5 a 10 minutos.

La observación se realizó bajo un microscopio óptico, a 1000X con aceite de inmersión. Las metafases se fotografiaron y las imágenes se recortaron y transformaron en escala de grises. El ensamblaje del cariotipo se realizó con Adobe Photoshop.

3. Análisis de los resultados

En el primer ensayo se obtuvieron pocas células en metafase, las cuales, se observaban muy cerradas al microscopio óptico con presencia de un halo de citoplasma que impedía la fácil identificación de los cromosomas. En cuanto a los cromosomas que se podían distinguir, éstos estaban muy cortos, lo que impedía la identificación de las bandas. Sin embargo, en el segundo ensayo se obtuvieron muchas células en metafase, bien abiertas, sin halo de citoplasma, lo que facilitaba la distinción una de otras. Se observaron cromosomas de longitud variada y de fácil identificación de bandas.

Con respecto a la cantidad de células en metafases obtenidas, se pudo notar que el volumen de medio para cariotipo PB-MAX™ (RPMI 1640, FBS, L-glutamina y PHA) no interfería con la cantidad de linfocitos obtenidos en el cultivo, ya que, en el segundo ensayo se utilizó menos volumen. La PHA juega un papel fundamental en la obtención de un cultivo con mayor número de células, ya que es un agente mitógeno, es decir, aumenta la actividad mitótica en las células expuestas. Además, la PHA también provoca la aglutinación de los glóbulos rojos, lo que facilita su eliminación en las etapas posteriores al cultivo (17).

Sin embargo, se pudo notar que la cantidad de solución KaryoMAX™ Colcemid™ (colchicina) interfería tanto en el crecimiento celular, como en el acortamiento de los cromosomas en el primer ensayo. Ya que, se pudieron observar diferencias entre un ensayo y otro, obteniéndose mejores resultados en el segundo ensayo. La colchicina es una sustancia antimitótica que bloquea la división celular durante la metafase, es decir, inhibe la mitosis de las células en división y funciona como un microtubulos o veneno del huso. En caso de sobredosis, afecta preferentemente a las células que se dividen rápidamente. En altas concentraciones es un veneno celular general (22). En otros ensayos se evidenció un proceso eficaz de proliferación y detención del ciclo celular en etapa de

metafase, reflejando un buen desempeño de la colchicina en la cantidad (200 μ l) a la que fueron expuestos los cultivos a las 72 horas de incubación y con mayor tiempo de exposición (23).

En cuanto al halo de citoplasma presente alrededor de los cromosomas en metafase en el primer ensayo, se debió al menor tiempo de exposición del cultivo a la solución hipotónica (KCl 0,075) y al tipo de pipeteo para su homogeneización, ya que, se pudieron observar en el segundo ensayo, células sin halo de citoplasma con cromosomas más separados y mejor coloreados. Las células son sometidas a un proceso de shock hipotónico en presencia de una solución KCl 0.075M, generando el movimiento de moléculas al interior de las mismas logrando un aumento en su volumen y facilitando la lisis de las membranas en el proceso de fijación y extendido de los preparados, permitiendo la observación de las metafases (24). En un estudio, se sometieron a las muestras a 3 tiempos diferentes y se observaron que los extendidos con mejor distribución de los cromosomas en el campo microscopio fue conforme se aumentó el tiempo de exposición a la solución hipotónica, debido a la baja cantidad de cruces entre cromosomas y la ausencia de membrana celular, de igual manera se observó para este caso mayor eficacia de lisis celular, con respecto a los demás tiempos de exposición (23).

En cuanto al bandeo y la coloración, se siguió el protocolo descrito, sin embargo se evidenciaron variaciones en el patrón de bandas de los cromosomas. Los extendidos se sometieron a diferentes tiempos, mostrando mejores resultados cuanto a resolución y calidad de bandas los de mayor tiempo de tripsinización, los cuales se pudieron identificar y analizar de forma clara.

De forma general, en la estandarización del cultivo (segundo ensayo), se obtuvieron metafases de calidad satisfactoria que presentaron cromosomas de buena longitud, bien extendidos y con bandeo nítido. Lo que hizo posible observar y analizar el cariotipo de los voluntarios, identificando y agrupando a los cromosomas de acuerdo a su forma, tamaño, posición del centrómero y patrón de bandas.

4. Conclusiones

La implementación y estandarización de la técnica para el cultivo de linfocitos a partir de sangre periférica es de gran importancia, antes de realizar cualquier otro tipo de prueba

de análisis cromosómico, ya que, su obtención puede verse alterada por diferentes factores, siendo necesario realizar ajustes puntuales al procedimiento para garantizar resultados confiables y de calidad. Esto, permite ofrecer una técnica segura para la obtención de las células en metafase y en conjunto con los diversos factores que influyen en la puesta a punto de la técnica, permiten un resultado optimizado, con un mayor número de células y, por lo tanto, mayor frecuencia de células en metafase para la diferenciación de los cromosomas y su clasificación de forma fácil, observándose el tamaño, posición de los centrómeros y el patrón de bandas.

Resumiendo, se puede decir que la técnica permite ofrecer la realización del análisis de cariotipo a la población de Itapúa y alrededores que presenten antecedentes de enfermedades genéticas y parejas con problemas de fertilidad, proporcionando información crucial para el asesoramiento genético y ayudando en la toma de decisiones sobre las opciones de tratamiento.

Es importante destacar que el cariotipo no es la única prueba utilizada en la evaluación de anomalías genéticas, ya que, existen otros estudios genéticos y pruebas adicionales que se realizan en conjunto para obtener un diagnóstico más completo. Sin embargo, sigue siendo la técnica Gold estándar por su bajo costo.

5. Referencias Bibliográficas

- 1) Tizzano Ferrari E, López Expósito I. Técnicas de Diagnóstico Genético en Pediatría. Revista Española de Pediatría. 2009; 65(1): p. 24-31.
- 2) Rivas Álpizar E, Otero Pérez IdC, Rojas Quintana P, Reyes Pérez Á. Polimorfismo del cromosoma 9. Presentación de dos casos. Medisur. 2017; 15(5): p. 106-109.
- 3) Benasayag SJ, Gallino MI. Bases citogenéticas para la práctica hematológica. De lo supuesto a lo expuesto en nomenclatura citogenética. Hematología. 2010; 14(2): p. 58-68.
- 4) McGowan J, Hasting R, Moor S. ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature: Karger; 2020.

- 5) González - Caballero A, Fernández - Martínez S, Torres - Fernández E. Evaluación citogenética en parejas con esterilidad e infertilidad que concurren al Departamento de Genética del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Asunción en el periodo septiembre 2021- febrero 2022. Memorias del Instituto de Invesgiaciones en Ciencias de la Salud. 2022; 20(3): p. 27-35.
- 6) Fin LG, Pereira RA, Montenegro RA, Fernandes RL, Ferreira AIC, Nakashima F, et al. Diagnóstico citogenético e malformações congênitas: uma analise em Roraima. Health and Dversity. 2020; 4: p. 38-44.
- 7) Gaurav P, Pankaj M, Prashant S, Vikas S, Neelam V, Subhash V. Current Role of Genetics in Hematologic Malignancies. Indian J Hematol Blood Transfus. 2016; 32(1): p. 18-31.
- 8) Contreras CDT, Barrón BL, Taboada LG, Tarifa AR, Lafuente AE. Frecuencia de aberraciones cromosómicas en pacientes del Instituto de Genética-UMSA periodo 2011-2015. Cuadernos. 2017; 58(2).
- 9) Genotipia. El Cariotipo: ¿Qué es y para qué sirve? [Genotipia].; 2020. Acceso 29 de mayo de 2023. Disponible en: <https://genotipia.com/cariotipo/>.
- 10) MSPyBS. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. [Online]; 2022. Acceso 5 de juniode 2023. Disponible en: <https://www.mspbs.gov.py/portal/25037/marzo-mes-de-las-aneuploidias.html>.
RENAC-PY. [Registro Nacional de Anomalías Congénitas].; 2019. Acceso 6 de junio de 2023. Disponible en: <https://www.mspbs.gov.py/dependencias/pndc/adjunto/394b2cmanualoperativovigilanciadefectos.pdf>.
Lozano P. Foro Blog. [Online] Acceso 19 de mayode 2023. Disponible en: <https://www.institutobernabeu.com/es/foro/anomalias-cromosomicas-estructurales-como-afectan-al-embrion-y-al-paciente-portador/>.
Taucher SC, Fuentes Soto AM, Paulos Millanao A, Rebasa EdIR. Estudios cromosómicos en abortos espontáneos. Revista de obstetricia y ginecología. 2014;

- 79(1): p. 40-46. Audí L. Anomalías de la diferenciación sexual. Anales de Pedritría continuada. 2011; 9(1): p. 15-30.
- 11) Rumbold AR, Moore VM, Whitrow MJ, Oswald TK, Moran LJ, Fernández RC. The impact of specific fertility treatments on cognitive development in childhood and adolescence: a systematic review. Human Rep. 2017; 32(1): p. 489-507.
 - 12) Prakash G, Kaur A, Malhotra P, Khadwal A, Sharma P, Suri V, et al. Current Role of Genetics in Hematologic Malignancies. Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion. 2016; 32(1): p. 18-31.
 - 13) Araújo MC, Avelar ACM, Valente AD, Scorsim B, de Souza GAF, dos Reis MF, et al. Padronizacao de montagem de cariótipo humano por medio de cultivo de linfócitos e bandeamiento G. Brazilian Journal of Health Review. 2022; 5(6): p. 24863-24871.
 - 14) Torres E. Ventajas y limitaciones de la Citogenética en la medicina actual. Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. 2018; 16(2): p. 107-112.
 - 15) Citogenética humana. BAG, J. basic appl. genet. 2019; 30(1).
 - 16) CICCOC. Centro de Información Científica de CONACYT. [Online] Acceso 2 de juniode 2023. Disponible en: <https://cicco.conacyt.gov.py/>.
 - 17) Thermo fisher. PB-MAX™ Karyotyping Medium Instructions for Use [PB-MAX™ Karyotyping Medium Instructions for Use].; 2023. Disponible en: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0018538_PB_MAX_KaryotypingMedia_IFU.pdf.
 - 18) RACIM. [Red Argentina de Centros de Información de Medicamentos].; 2020. Disponible en: <http://cime.fcq.unc.edu.ar/wp-content/uploads/sites/15/2020/07/RACIM-Colchicina-versi%C3%B3n113.07.2020.pdf>
 - 19) Acosga Galeano L, Bejarano Velandia DS, Benavides Hernández J. Optimización del cultivo de linfocitos para obtención de cromosomas y análisis de fragilidad:

Inportancia en X frágil y déficit congntivo. Trabajo de Grado. Bogotá: Universidad Colegio mayor de Cundinamarca. Facultad de Ciencias de la Salud, Programa de Bacteriología y laboratorio clínico.

20) Solari AJ. Genética humana: fundamentos y aplicaciones en medicina. 4th ed. Bogotá: Médica Panamericana; 2004.