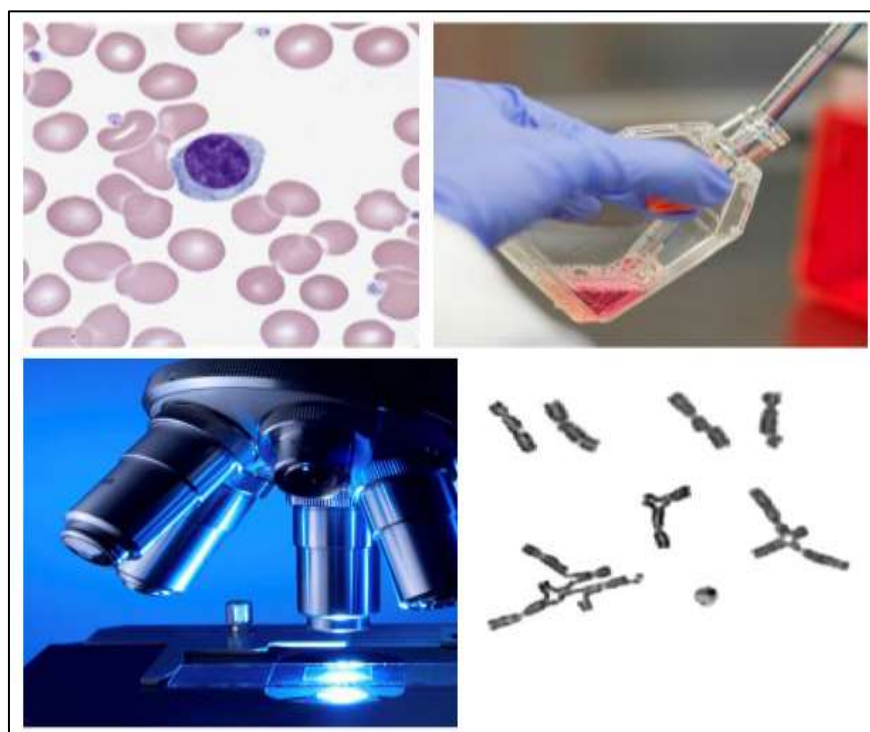


GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS
**GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA
EN FIBROBLASTOS**
UNIDAD DE SOPORTE AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO
SUBUNIDAD DE SOPORTE AL DIAGNÓSTICO
SERVICIO DE GENÉTICA
2019


<p>Elaborado por:</p> <p>Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico</p> <p>Equipo Técnico del Servicio de Genética</p>	<p>Revisado por:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento • Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico • Unidad de Gestión de la Calidad 	<p>Aprobado por:</p> <p>Dr. Antonio Ricardo Zopfi Rubio</p> <p>Director del Instituto Nacional de Salud del Niño - San Borja</p>
<p>Fecha: Abril 2019</p>	<p>Código: GP-005/USDT-SG/INSN-SB/V1.0</p>	<p>Página 1 de 36</p>

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS**GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS**

I.	Título.....	3
II.	Finalidad	3
III.	Objetivos	3
	a. Objetivos Generales.....	3
	b. Objetivos Específicos	3
IV.	Ámbito de aplicación.....	3
V.	Nombre del Proceso o Procedimiento a Estandarizar y Código CPT.....	3
VI.	Consideraciones Generales.....	4
	a. Definiciones Operativas.....	4
	1. Definición del Procedimiento	4
	2. Aspectos Epidemiológicos importantes	5
	3. Consentimiento Informado.....	5
	b. Conceptos Básicos.....	5
	c. Requerimientos Básicos.....	8
VII.	Consideraciones Específicas.....	15
	a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento:.....	15
	b. Indicaciones.....	25
	1. Indicaciones Absolutas	25
	2. Indicaciones Relativas.....	25
	c. Riesgos o Complicaciones Frecuentes:.....	25
	d. Riesgos o Complicaciones poco Frecuentes:	25
	e. Contraindicaciones	26
VIII.	Recomendaciones.....	26
IX.	Autores, Fecha y Lugar.....	26
X.	Anexos.....	27
XI.	Bibliografía	36

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS

I. Título

Guía de Procedimiento: Fragilidad Cromosómica en Fibroblastos.

II. Finalidad

Contribuir como un instrumento de apoyo y de mejora continua en los servicios de salud del INSN-SB garantizando la calidad en el desarrollo del Procedimiento: Fragilidad Cromosómica en Fibroblastos.

III. Objetivos

a. Objetivos Generales

Estandarizar el procedimiento de Fragilidad Cromosómica en Fibroblastos, entre el equipo técnico del Servicio de Genética de la Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento del Instituto Nacional del Niño de San Borja.

b. Objetivos Específicos

- Contribuir a disminuir la incidencia de complicaciones y errores derivados de la atención de pacientes sometidos al Procedimiento de Fragilidad Cromosómica en Fibroblastos

IV. Ámbito de aplicación

La presente Guía de Procedimiento es de aplicación en el Servicio de Genética de la Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento, en los pacientes de edad pediátrica con sospecha de Anemia de Fanconi de tipo mosaico en el Instituto Nacional del Niño de San Borja.

V. Nombre del Proceso o Procedimiento a Estandarizar y Código CPT

Estudio de Fragilidad Cromosómica en Fibroblastos - puntaje 100 células, estimulada por clastógenos (P. ej. diepoxibutano, mitomicina C, radiación ionizante, radiación UV) - FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS.

Código de CPT: 88249.03

Fecha: Abril 2019	Código: GP-005/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 3 de 36
--------------------------	--	-----------------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS

VI. Consideraciones Generales

El estudio de fragilidad cromosómica es una prueba para la evaluación de la inestabilidad cromosómica. El síndrome más común diagnosticado mediante esta prueba, es la Anemia de Fanconi (FA). FA se caracteriza por insuficiencia medular a temprana edad, el aumento del riesgo de cáncer y anormalidades físicas. Los individuos con FA son clínicamente heterogéneos y hasta un 25% de los pacientes con FA conocido presentan pocas o ninguna de las características.

Los individuos con índice de fragilidad cromosómica (IFC) en sangre periférica en el rango de 40-53 serán considerados como mosaicos para Anemia de Fanconi, estos pacientes serán candidatos para descartar esta condición mediante el estudio de fragilidad cromosómica en fibroblastos.

a. Definiciones Operativas

1. Definición del Procedimiento

El procedimiento aplica a todo el personal especializado o capacitado en citogenética en enfermedades genéticas constitucionales y hemato-oncológicas.

La presente guía se aplicará a pacientes de edad pediátrica con sospecha de Anemia de Fanconi de tipo mosaico en el Instituto Nacional del Niño de San Borja.

En población pediátrica se sugiere tomar la biopsia de piel (punch) a la altura del cuadrante superior externo del glúteo, obteniendo un aproximado de 0.2cm³ de muestra. La muestra deberá ser conservada en medio de transporte en un tubo cónico de 15ml con tapa rosca y sellada con parafilm. Deberá ser transportada inmediatamente a temperatura ambiente y entregada el mismo día de su toma

Comprende las etapas de: toma/recepción de la muestra, iniciación del cultivo, cosecha del cultivo, preparación de láminas, coloración de las láminas (Giemsa), análisis citogenético, informe final y validación del informe final.

Se asegurará que los equipos e instrumentos funcionen correctamente, y los reactivos se encuentren estériles y dentro de la fecha de vigencia.

Las normas de bioseguridad se aplicarán durante todo el proceso.

Fecha: Abril 2019	Código: GP-005/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 4 de 36
--------------------------	--	-----------------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS

2. Aspectos Epidemiológicos importantes

La Anemia de Fanconi (AF) es el grupo más frecuente de anemia aplásica en la infancia. Afecta aproximadamente a 1:360.000 nacidos vivos.

Se considera heterocigota al 0,5% de la población, aunque hay variabilidad étnica. La frecuencia de heterocigotos en EE.UU. y en Europa es 1/300, en Sudáfrica y entre los judíos ashkenazis aumenta a 1/100. Se reporta mosaicismo somático entre el 15-25%.¹

La proporción de varones y mujeres es de 3:1. La edad media al diagnóstico es de 8 años. El 75 % de los casos se diagnostica entre los 4 y 14 años aunque hay casos reportados desde el nacimiento hasta los 48 años.²

Debido al solapamiento fenotípico de la AF con la asociación VACTERL, es necesario considerarlo dentro de los diagnósticos diferenciales. Su prevalencia exacta y los datos de incidencia no están disponibles debido a los criterios de diagnóstico variables, pero se ha informado que la asociación se produce en <1-9/100.000 niños, y la incidencia anual es de 1/10.000 a 1/40.000 nacidos vivos. No se ha encontrado una distribución geográfica específica o un predominio en ciertos grupos étnicos.

3. Consentimiento Informado

Todo paciente que sea sometido al Procedimiento de Fragilidad Cromosómica en Fibroblastos debe tener un consentimiento informado.

El consentimiento informado debe ser firmado por el tutor legal del paciente previo a la realización del procedimiento. El médico tratante, debe informar y explicar en términos sencillos en que consiste la patología del paciente, el procedimiento, los objetivos, así como los riesgos y beneficios de este.

El tutor legal debe registrar su aprobación o negación, cumpliendo las normas vigentes, en el formato de Consentimiento Informado (Ver Anexo 1).

Se exceptúa de este procedimiento en caso de pacientes en situación de emergencia, conforme a Ley.

b. Conceptos Básicos

ABERRACIONES CROMATÍDICAS (cht):³

Son aquellas aberraciones que involucran a una sola cromátide en un cromosoma. Se pueden distinguir los siguientes tipos de aberraciones:

Fecha: Abril 2019	Código: GP-005/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 5 de 36
--------------------------	--	-----------------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS

- Brecha cromatídica o “*chromatid gap*” (**chtg**): es una interrupción en la tinción de una cromátide de 1-2 veces la anchura de que cromátida o mínima desalineación de la cromátide
- Ruptura de cromátidas o “*chromatid break*” (**chtb**): es una interrupción de más de 2 veces el ancho o cuando el fragmento roto está claramente desalineado
- Intercambios de cromátides (**chte**): es el resultado de 2 o más lesiones cromatídicas y su subsecuente rearrreglo de material cromatídico. Los intercambios entre cromátides de diferentes cromosomas (intercambios) y entre cromátides de un mismo cromosoma (“intrachanges”). En el caso de los intercambios, pueden adoptar configuraciones triradiales (**tr**): patrón que involucran 3 brazos, cuatriradiales (**qr**): patrón que involucran 4 brazos, o complejas (**cx**): patrón que involucran más de 4 brazos. Eventos cromatídicos: incluyen duplicaciones, deleciones, inversiones paracéntricos

ABERRACIONES CROMOSÓMICAS (chr):³

Son aquellas aberraciones que envuelven a ambas cromátides en un cromosoma.

Se pueden distinguir los siguientes tipos de aberraciones:

- Brecha cromosómica o “*chromosome gap*” (**chrg**): es una interrupción en la tinción de ambas cromátidas de 1-2 veces la anchura de que cromátida o mínima desalineación de la cromátide
- Ruptura de cromátidas o “*chromatid break*” (**chrb**): es una interrupción de más de 2 veces el ancho o cuando el fragmento roto está claramente desalineado en ambas cromátidas
- Intercambios cromosómicos (**chte**): es el resultado de 2 o más lesiones cromosómicas y su subsecuente rearrreglo de ambas cromátides en un cromosoma a nuevas posiciones dentro u otro cromosoma. Estos pueden ser simétricos, por ejemplo: translocación recíproca; o asimétrica, por ejemplo: cromosoma dicéntrico
- Anillos cromosómicos (**r**)

Fecha: Abril 2019	Código: GP-005/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 6 de 36
-------------------	-------------------------------------	----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS

ANÁLISIS CITOGENÉTICO: 4,5

En el Análisis de fragilidad cromosómica se evalúan las aberraciones cromatídicas y cromosómicas y los puntajes se otorgan como:

- Único evento: a las ruptura cromatídica y cromosómica
- Dos eventos: a las Configuraciones de intercambio de cromátidas: triradiales
- Tres eventos: cuatriradiales, dicéntricos, anillos y translocaciones
- Más de ocho eventos: figuras de intercambio complejas y dependiendo del número de centrómeros y rupturas
- No se considera como eventos a las brechas cromatídicas, cromosómicas y cromosomas pulverizados

Se utilizará la siguiente terminología:

- Células Aberrantes (CA): Células con un único evento
- Células Multiaberrantes (CMA): Células con dos o más eventos
- Número de eventos de Células Multiaberrantes (NCMA): Número total de eventos de células con dos o más eventos
- Frecuencia de aberraciones(FA): Número total de eventos de células analizadas, que es igual a la sumatoria de células aberrantes (CA) y número de eventos de células multiaberrantes (NCMA)
- Índice de Fragilidad Cromosómica o “Chromosome Fragility Index” (IFC): se calcula tomando en cuenta el porcentaje en número de eventos en cultivos con DEB de 1.5ul y de 2.5ul

Los índices calculados más usados y que se utilizan para el análisis son:

- Índice de Fragilidad Cromosómica o “*Chromosome Fragility Index*” (IFC)
- Porcentaje total de células radiales igual o mayor a 10 eventos resultado de la suma de células aberrantes y multiaberrantes en 50 metafases analizadas

Fecha: Abril 2019	Código: GP-005/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 7 de 36
--------------------------	--	-----------------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS**c. Requerimientos Básicos**

El procedimiento de Fragilidad Cromosómica en Fibroblastos, se llevará a cabo en el Área de Citogenética del Servicio de Genética de la Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento del Instituto Nacional del Niño de San Borja.

1. TOMA/RECEPCIÓN DE MUESTRA**1.1 MATERIAL MÉDICO NO FUNGIBLE**

- Bisturí
- Pinzas estéril (2)
- Plumón de Tinta Indeleble Punta Fina
- Gradilla de polipropileno para tubos de 5ml y 15ml

1.2 MATERIAL MÉDICO FUNGIBLE

- Algodón Hidrófilo
- Esparadrapo Antialérgico de Papel
- Tubo cónico para centrifuga de 15 ml.
- Jeringas de 1 ml, 3 ml o 5 ml
- Biopunch (dispositivo descartable para biopsia cutánea)
- Sterilstrip
- Gasa
- Papel parafilm
- Guantes descartables
- Gorras quirúrgicas
- Mascarillas
- Papel Toalla
- Gasa.
- Recipiente de material punzocortante

1.3 REACTIVOS

Fecha: Abril 2019	Código: GP-005/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 8 de 36
--------------------------	--	-----------------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS

- Clorhexidina al 2%
- Alcohol Etilico (Etanol) 70º
- Medio de transporte
- Suero fisiológico
- Antiséptico yodado

2. EQUIPAMIENTO DE LA ETAPA DE INICIACIÓN DEL CULTIVO

2.1 EQUIPOS BIOMÉDICOS

- Refrigerador de 4°C
- Congelador de -20°C
- Baño maría
- Cabina biológica de seguridad de flujo vertical tipo II
- Incubadora de 37° con 5% de CO²
- Pipeteador automático con cargador
- Bomba al vacío para equipo de filtración
- Microscopio compuesto
- Centrifuga para tubos cónicos de 15ml

2.2 MATERIAL MÉDICO NO FUNGIBLE

- Gradilla de polipropileno para para tubos de 2ml y 5ml
- Gradilla de polipropileno para tubos de 15ml
- Bandeja metálica para soporte de cultivo
- Pizeta
- Micropipetas de 10ul-100ul y 0.5-10ul
- Mechero de vidrio(para esterilización)
- Timer
- Mango para bisturí
- Pinza quirúrgica(2)

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS

- Pulmones indelebles.
- Lápiz marcador de cera.
- Lapiceros.
- Ficha de registro para indicación y característica de la muestra.
- Cuaderno de registro de las muestras.

2.3 MATERIAL MÉDICO FUNGIBLE

- Frascos de cultivo celular de poliestireno graduado 25cm² cuello inclinado con tapa con filtro (T25).
- Tips para micropipeta descartables 10ul-100ul y 0.5-10ul
- Filtros estériles para jeringa
- Jeringa de 1ml,3ml,5ml,20ml y 50ml
- Filtros para preparación de medios por bomba al vacío y/o decantación por gravedad
- Crioviales de 2ml y 5ml
- Tubos cónicos de polipropileno para centrifuga de 15ml
- Pipetas descartables de 3ml
- Pipetas descartables de 10ml (para pipeteador automático)
- Placa Petri estéril de 100x20mm
- Placa petri estéril de 35x10mm
- Hojas de bisturí estériles
- Papel parafilm
- Guantes de nitrilo descartables
- Gorras quirúrgicas
- Mascarillas
- Papel Toalla
- Recipiente de material punzocortante
- Masking tape
- Gasa

Fecha: Abril 2019	Código: GP-005/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 10 de 36
--------------------------	--	------------------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS

2.4 REACTIVOS

- Medio de cultivo para fibroblasto o medio completo para cultivos a largo plazo
- Glutamina
- Medio de transporte (RPMI Preparado)
- Hanks solución balanceada o DPBS (libre de Ca y Mg)
- Diepóxido 1-3 Butadieno (DEB) solución stock
- Solución de antibiótico – antimicótico para cultivo.
- Solución de trabajo con colagenasa tipo I
- Tripsina EDTA (Solución 0.25%)
- Suero bobino fetal (activar)
- Solución NaCl 0.9%.

3. EQUIPAMIENTO Y SUPLEMENTOS DE LA ETAPA DE COSECHA

3.1 EQUIPOS BIOMÉDICOS

- Cabina biológica de seguridad de flujo vertical tipo II
- Cabina de extracción de vapores
- Balanza analítica electrónica
- Incubadora de 37°C con %5 de CO²
- Baño de Calentamiento (Baño María)
- Centrífuga
- Pipeta automática con cargador
- Microscopio invertido con objetivo de 10X, 20X
- Refrigerador de 4°C
- Congelador -20°C.

Fecha: Abril 2019	Código: GP-005/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 11 de 36
--------------------------	--	------------------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS**3.2 MATERIAL MÉDICO NO FUNGIBLE**

- Micro pipeta 10-100 μ l
- Rack para tubos cónicos de 15ml
- Frascos de vidrio para laboratorio con tapa de 500ml y 1000ml
- Frascos Coplin de 50ml
- Bandeja de metal para tubos de 15 ml
- Dispensador para solución hipotónica
- Dispensador de metanol
- Dispensador de ácido acético glacial
- Dispensador de Solución Carnoy
- Pinza de metal
- Timer
- Tijera
- Contenedor de bioseguridad de desechos sólidos
- Pizeta
- Mechero de alcohol o mechero bunsen

3.3 MATERIAL MÉDICO FUNGIBLE

- Tips estériles para micro pipeta. 10-300 μ l
- Tubos falcón de 15 ml
- Pipetas descartables de 3 ml
- Jeringas descartables de 1ml, 3ml o 5ml
- Guantes de nitrilo descartables
- Gorras quirúrgicas
- Mascarillas
- Papel Toalla

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS

- Recipiente de material punzocortante
- Contenedor de bioseguridad para líquidos de desecho
- Masking tape
- Plumones indelebles
- Marcador de cera
- Lápiz Marcador punta diamante

3.4 REACTIVOS

- Hanks solución balanceada o DPBS (libre de Ca y Mg)
- Medio completo para cultivo (con suero bovino fetal)
- Solución de Tripsina- EDTA 0.25%
- Solución Hipotónica -KCl
- Ácido acético glacial
- Metanol
- Colcemid: Solución de 10 µg/ml
- Etanol 96%

4. EQUIPAMIENTO DE LA ETAPA DE PREPARACIÓN, COLORACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS LÁMINAS

4.1 EQUIPOS BIOMÉDICOS

- Cabina biológica de seguridad de flujo vertical tipo II
- Cabina de extracción de vapores
- Balanza analítica electrónica
- Estufa
- Secadora eléctrica
- Agitador magnético
- Microscopio compuesto con tubo trinocular

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS

- Cámara trinocular
- Estación de Citogenética/Cariotipador
- Computadora
- Potenciómetro (pH)
- Impresora

4.2 MATERIAL MÉDICO NO FUNGIBLE

- Micro pipetas 10-100 µl
- Coplin de vidrio para tinción
- Rack para tubos de 15 ml
- Canastilla de vidrio para coloración de 25 láminas
- Cubeta de acero inoxidable con asa para coloración de láminas
- Probetas graduadas de 250, 500 y 100 ml
- Pinza de acero inoxidable
- Embudo
- Bagueta
- Frasco para laboratorio con vidrio color ámbar de 250 y 500ml
- Frascos para laboratorio con tapa rosca de 500 y 1000ml
- Beaker de 250 ml y 500ml
- Cajas Porta láminas x100
- Pizeta

4.3 MATERIAL MÉDICO FUNGIBLE

- Tips estériles para micro pipeta 1-300ul
- Papel aluminio
- Láminas portaobjeto
- Pipetas descartables de 3 ml

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS

- Guantes descartables
- Mascarillas
- Papel Toalla
- Plumones indelebles
- Papel filtro
- Masking tape
- Lápiz marcador
- Lápiz punta diamante
- Cuadernos
- Hojas bond
- Lapiceros

4.4 REACTIVOS

- PBS
- Agua Destilada
- Tripsina en polvo 1:250
- Solución NaCl 0.9%
- Colorante Giemsa
- Ácido acético glacial
- Glicerina
- Metanol.
- Etanol.
- Aceite de inmersión

VII. Consideraciones Específicas**a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento:****7.1 TOMA/RECEPCIÓN DE LA MUESTRA****7.1.1 Requisitos para una muestra óptima:⁶**

Fecha: Abril 2019	Código: GP-005/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 15 de 36
-------------------	-------------------------------------	-----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS

- En población pediátrica se sugiere tomar la biopsia de piel (punch) a la altura del cuadrante superior externo del glúteo, obteniendo un aproximado de 0.2cm³ de muestra
- La muestra deberá ser conservada en medio de transporte (medio de cultivo o suero fisiológico, más antibiótico), preferente en un tubo cónico de 15ml con tapa rosca y sellada con parafilm
- Recepción de muestra debidamente rotulada sin señal de contaminación o turbidez
- Deberá ser transportada inmediatamente a temperatura ambiente y entregada el mismo día de su toma

7.1.2 Verificar si la orden de fragilidad cromosómica en fibroblastos registra los siguientes datos:

- Determinar tipo de muestra: Onco- hematológica o Constitucional
- Nombres y apellidos del paciente. (número de contacto)
- Fecha y Hora de recepción
- Número de registro
- Diagnóstico presuntivo
- Tratamiento recibido: antibióticos, corticoides, quimioterápicos, etc.
- Antecedentes
- Nombre del médico tratante/solicitante. (número de contacto)

Nota: No se procesara la muestra y se solicitará una nueva muestra, si la muestra presentara: Signos de contaminación, muestra sin rotular y/o medio de transporte sin identificación.

7.2 ETAPA DE INICIACIÓN DEL CULTIVO O SIEMBRA:^{5,6}

- 7.2.1 Preparación de Diepoxibutano (DEB): (Ver anexo N°2)
- 7.2.2 Antes de iniciar el proceso, encender el UV por 15 minutos en la cabina de extracción
- 7.2.3 Luego encender el ventilador por 3 minutos y desinfectar la cabina con alcohol al 70%

Fecha: Abril 2019	Código: GP-005/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 16 de 36
--------------------------	--	------------------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS

- 7.2.4 El personal deberá colocarse: mandil, gorra quirúrgica, mascarilla y guantes quirúrgicos
- 7.2.5 Rotular tres frascos T25, el código de la muestra e indicar el tiempo y las características del cultivo, se utilizarán las siguientes abreviaturas

Abreviaturas	Tiempo de Cultivo
Cód. del paciente	DEB Fibroblasto CON-A
Cód. del paciente	DEB Fibroblasto CON-B
Cód. del paciente	Control

- 7.2.6 Retirar muestra del tubo de transporte y colocarla en una placa Petri (35x10mm.). Especificar apariencia, color, textura, medio de transporte y espécimen recibido en la hoja formato en registro para cultivo de tejidos
- 7.2.7 Lavar repetidamente con solución Hanks o suero fisiológico utilizando una pipeta de 3ml hasta limpiar bien la muestra
- 7.2.8 Una vez lavada, colocar la muestra en una placa Petri de 100x20mm(Petri A)
- 7.2.9 Usando una pinza quirúrgica y un escalpelo #21 cortar la muestra en tres partes iguales
- 7.2.10 Colocar un tercio con 1ml de medio de cultivo completo (Petri A), otro tercio en una nueva placa Petri de 100x20mm con 1ml de medio de cultivo completo (Petri B) y el último tercio en una nueva placa Petri de 100x20 con 1ml de medio de cultivo completo (Petri C o Control)
- 7.2.11 Muestra en Petri A será tratada con colagenasa , Petri B y C serán procesados como explante

Disociación por colagenasa (Petri A)**Preparación de colagenasa**

Disolver 250mg en 16ml de medio RPMI o MEM

Filtrar la solución usando filtro para jeringa de 0.22um

Alícuotas de solución en crio viales de 2ml y almacenar a -20C

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS

- 7.2.12 Descongelar a temperatura ambiente una alícuota de 2ml de la solución de colagenasa de trabajo
- 7.2.13 Utilizando escalpelos, romper mecánicamente el tejido en la placa Petri A. Usando una pipeta de 3ml añadir 2ml de solución de colagenasa al tejido y homogeneizar con la misma pipeta y llevarlo a la incubadora de CO₂ a 37°C de 1 a 2 horas (dependiendo del tamaño de la muestra)
- 7.2.14 Pasado el tiempo de digestión enzimática. Llevar contenido de Petri A un tubo cónico etiquetado de 15ml (Tubo A). Pipetear hasta hacer una suspensión homogénea
- 7.2.15 Usando una pipeta de 3ml, añadir 2ml del medio de cultivo completo a la placa Petri A para recoger células adheridas y dispensarla en tubo A
- 7.2.16 Cerrar el tubo A de 15ml y llevarlo a la centrifuga a 1100rpm por 10min
- 7.2.17 Remover sobre nadante dejando el pellet intacto
- 7.2.18 Usando una pipeta de 3ml, agregar 2ml de medio de cultivo completo al tubo que contiene el pellet (Tubo A) re suspender
- 7.2.19 Pasar la re suspensión a frasco T25 con filtro, rotulado con los códigos o nombre del paciente, así como con la letra A
- 7.2.20 Llevar los frasco a la incubadora 37°C por 24 o 48 horas para que se puedan adherir células sembradas
- 7.2.21 Hacer una etiqueta con nombre de la muestra, código y fecha. Pegar la etiqueta en la incubadora y registrar en cuaderno de cultivos

Explante (Petri B)

- 7.2.22 Utilizando escalpelos, fragmentar mecánicamente la muestra en la placa Petri B
- 7.2.23 Usando una pipeta de 3ml añadir 1ml de medio de cultivo completo a la muestra fragmentada y homogeneizar
- 7.2.24 Con la misma pipeta de transferencia distribuir de manera uniforme la muestra re suspendida en volúmenes de 0.5ml al frasco T25 con filtro, previamente será rotulado con el código o nombre del paciente, así como con la letra B

Fecha: Abril 2019	Código: GP-005/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 18 de 36
--------------------------	--	------------------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS

- 7.2.25 Hacer una etiqueta con el nombre de la muestra, código y fecha. Pegar la etiqueta en la incubadora y registrar en el cuaderno de cultivos

Explante Control (Petri C)

- 7.2.26 Utilizando escalpelos, fragmentar mecánicamente la muestra en la placa Petri C
- 7.2.27 Usando una pipeta de 3ml añadir 1ml de medio de cultivo completo a la muestra fragmentada y homogeneizar
- 7.2.28 Con la misma pipeta de transferencia distribuir de manera uniforme la muestra re suspendida en volúmenes de 0.5ml al frasco T25 con filtro, previamente rotulado con el código o nombre del paciente, así como con la letra C
- 7.2.29 Hacer una etiqueta con nombre de la muestra, código y fecha. Pegar la etiqueta en la incubadora y registrar en cuaderno de cultivos

Control de crecimiento y mantenimiento de cultivo (Para frascos de cultivo A B y C)

- 7.2.30 Pasadas 24 o 48 horas, evaluar adhesión celular bajo el microscopio invertido
- 7.2.31 Si existe adhesión, continuar. De no ser así, dejar incubar un día más hasta presentar adhesión celular
- 7.2.32 Agregar 3 ml de medio completo para fibroblastos al frasco T25 llegando a un volumen total de 5ml e incubar por 48 horas
- 7.2.33 Evaluar crecimiento celular y hacer recambio de medio de cultivo (5ml por frasco T25). Incubar por 48 horas (x2)
- 7.2.34 48 horas previo a la cosecha, observándose una confluencia de aproximadamente un 50%, se procederá a retirar los cultivos rotulados con DEB de la incubadora y se adicionará la solución DEB de trabajo (solución de trabajo B) en distintas concentraciones a cultivos rotulados con FIBROBLASTO DEB [CONC- A] y el otro cultivo con FIBROBLASTO DEB [CONC- B]. Al cultivo (C) no se le agregara DEB y será utilizado como control de daño espontáneo en el paciente

Fecha: Abril 2019	Código: GP-005/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 19 de 36
--------------------------	--	------------------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS

- 7.2.35 Homogeneizar los frascos de cultivo y nuevamente colocarlos en posición horizontal en la incubadora de CO₂ a 37 °C por 48 horas adicionales hasta llegar a un tiempo de cosecha
- 7.2.36 Determinar confluencia de 70%-80%, determinar presencia de células de aspecto refulgente y proceder a cosecha

7.3 ETAPA DE COSECHA^{5,6}

- Preparación del Fijador (Carnoy): mezclando en una proporción de 3 a 1 de metanol y el ácido acético
- Encender el UV por 15 minutos en la cabina de flujo laminar
- Luego encender el ventilador por 5 a 10 minutos
- El personal deberá colocarse: mandil, gorra quirúrgica, mascarilla y guantes quirúrgicos
- Retirar el colcemid (solución en PBS o HBSS) del refrigerador para llevarlo a temperatura ambiente
- Agregar 100ul colcemid (concentración de 0.1ug/ml) por frascos de cultivo T25 y homogeneizar. Llevar el frasco a la incubadora de CO₂ a 37 °C por una hora y media
- Pasado tiempo de exposición a colcemid, descartar el medio
- Añadir 2ml de solución balanceada Hanks o DPBS para lavar el frasco T25. Lavar y descartar. Repetir procedimiento una vez más
- Añadir 1-2 ml de solución de tripsina-EDTA 0.25% al frasco T25 y llevarlo a la incubadora 37°C por un tiempo de 2 hasta 3 minutos.
- Retirar el frasco T25 fuera de la incubadora, revisar desprendimiento bajo microscopio invertido y tapear o golpear el frasco T25 hasta desprender las células y añadir inmediatamente 3 ml de medio de cultivo completo (para inhibir la tripsina por uso de SBF)
- Re suspender y remover todas las células del frasco y transferir a tubo cónico de 15ml etiquetado con el código del paciente. Agregar 3ml más de medio de

Fecha: Abril 2019	Código: GP-005/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 20 de 36
--------------------------	--	------------------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS

cultivo completo al frasco T25 y terminar de remover células adheridas.
Transferir la re suspensión celular al mismo tubo

- Centrifugar a 1100rpm por 10min
- Descartar el sobrenadante usando pipetas descartables de 3ml
- Re suspender el pellet usando la pipeta rotulada y/o golpeando ligeramente el tubo
- Agregar de 8-9 ml de solución hipotónica 0.075M KCl, 0.56%(5.59gr/l) (dispensador a 37°C con tiempo de vida promedio de 4 semanas), luego re suspender unas 30 veces con fuerza utilizando pipeta de transferencia de 3ml
- Incubar los tubos cónicos por 30 minutos a 37°C en baño maría
- Agregar 1.0 ml de fijador Carnoy a cada tubo falcón con solución hipotónica
- Cerrar los tubos y mezclar por inversión o agitar con pipeta descartable
- Centrifugar los tubos a 1100 rpm por 10 min
- Descartar el sobrenadante y re suspender el pellet
- Agregar 6ml de fijador Carnoy
- Re suspender con pipetas respectivas, cerrar y mezclar por inversión
- Centrifugar los tubos a 1100 rpm por 10 minutos
- Aspirar sobrenadante y re suspender el pellet
- Ir a preparación de laminas

Nota: Preparar Carnoy fresco para cada cosecha debido a que a medida que pase el tiempo, la composición de los reactivos cambiara haciendo la solución más acida afectando la muestra fijada.⁶

Almacenar muestras en Carnoy en crio viales de 2ml a -70°C.⁶

7.4 PREPARACIÓN DE LÁMINAS^{6,7}

- El rotulo deberá indicar el tipo de cultivo (FF), el año del proceso(18), el código del paciente(#),horas de cultivo(72) y control o concentración (C o #Concentración)

Fecha: Abril 2019	Código: GP-005/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 21 de 36
--------------------------	--	------------------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS

- Rotular cuatro láminas por cultivo. Una lámina con el código del paciente para control y 3 láminas para análisis. (limpiar y llevarlas al congelador)
- Control: extender lamina control, agregar sol de trabajo giemsa por 2 minutos y evaluar metafases observando la lámina control al microscopio a un aumento de 10X, 20X y 100x, el patrón metafases deben verse uniforme en aproximadamente 80% de las metafases en la lámina. Anotar control de metafases en el registro correspondiente
- Una vez realizado el control, extender las láminas para análisis
- Homogenizar los tubos cónicos que contienen la muestra fijada
- Para preparación de láminas, agregar de 25ul a 30uL de la muestra fijada en la lámina portaobjeto, deslizando la punta del tip de extremo a extremo para lograr un buen extendido
- Dejar secar las láminas a temperatura ambiente y guardarlas en cajas de polipropileno registrando los datos en la caja y en el registro de pacientes

Nota: Parámetros para preparación de láminas 40-60% de humedad relativa y aproximadamente 25°C de temperatura

7.5 COLORACIÓN CROMOSÓMICA CON GIEMSA⁶

7.5.1 Preparación de los reactivos:

- Preparación de buffer fosfato salino pH 7,4
 - Diluir 10 tabletas de PBS en un litro de agua destilada hasta disolver completamente. Medir pH en solución con el potenciómetro y llevar a pH 7.4
- Solución colorante Giemsa madre/stock:
- Disolver 1g de colorante Giemsa en polvo en 84 ml de metanol. Agitar en agitador magnético o manualmente. Una vez disuelto agregar 54 ml de glicerina y continuar con la agitación. Filtrar solución Giemsa y agitar nuevamente. Cubrir envase de solución Giemsa con papel aluminio y dejar a 37 C en baño maría hasta el día siguiente

Fecha: Abril 2019	Código: GP-005/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 22 de 36
--------------------------	--	------------------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS

Solución colorante Giemsa de trabajo:

- Diluir 1 ml de solución Giemsa madre/stock en 9 ml de buffer fosfato salino.
- 7.5.2 Colorear la lámina con la solución colorante Giemsa de trabajo por 3 a 5 minutos
- 7.5.3 Secar la lámina con secadora de mano
- 7.5.4 Evaluar coloración, condensación y morfología observando la lámina al microscopio a un aumento de 10X, 20X y 100x, la tinción debe ser uniforme en aproximadamente 80% de las metafases en la lámina

7.6 ANÁLISIS CITOGENÉTICO:⁵⁻⁹

- El microscopio compuesto permite mediante el uso alternado de objetivos de 10X ,20X y 100X, el análisis cromosómico y selección de metafases de cada paciente
- Para el análisis de fragilidad cromosómica se analizarán un mínimo de 50 metafases completas hasta un máximo de 100 metafases (análisis óptimo)
- Para indicaciones de interpretación y análisis de células aberrantes se utilizarán las siglas detalladas en las normas del ISCN 2016 (Ver anexo N°3)
- En hoja de registro para estudio de fragilidad cromosómica (Ver anexo N°4) se anotaran las coordenadas, número de figuras radiales y de quiebres cromosómicos por cada una de las metafases analizadas
- Los datos obtenidos a partir del recuento en la hoja de registro de fragilidad cromosómica, deberán ser utilizados para llenar la tabla de resultados de fragilidad cromosómica (Ver anexo N°5), en esta se calcularan los rangos o índices de fragilidad que serán posteriormente utilizados como resultados para el informe final
- Se registraran al menos dos metafases que presenten figuras multiaberrantes las cuales serán almacenadas a manera de imagen
- Para detallar las aberraciones, se utilizarán las siglas detalladas en las normas del ISCN 2016
- Se evaluará la correlación clínica- patológica

Fecha: Abril 2019	Código: GP-005/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 23 de 36
--------------------------	--	------------------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS**7.7 ELABORACIÓN DE INFORME FINAL⁵**

- El informe o reporte final de citogenética es elaborado por un profesional especialista en citogenética y deberá contener la siguiente información : código del paciente, nombre, apellido, sexo, número de historia clínica, hospital de referencia, nombre de médico tratante, medio y tiempo de cultivo, concentración de agente alquilante, fechas de recepción y emisión de informe , imagen en metafase de célula normal para casos negativos e imagen multiaberrante para casos positivos, resultado de un exhaustivo análisis en base a las normas del ISCN , el cual será validado mediante la presentación de una tabla de resultados (Ver anexo N°5). La tabla de resultados obtenida a partir de la hoja de registro (Ver anexo N°4) nos permite cumplir con estándares obligatorios a nivel internacional para el análisis y elaboración de Informe final

Los cálculos de tiempos por cada proceso se encuentran contemplados en los cálculos de costeos de la unidad de planeamiento institucional.

7.8 VALIDACIÓN DE INFORME FINAL^{5,6}

- La validación clínica implica la capacidad de la prueba de diagnosticar o predecir la presencia o ausencia de una enfermedad o condición clínica en particular para lo cual el médico especialista en genética podrá establecer o no una relación clínica entre el resultado y el paciente, utilizando la información de la prueba citogenética de fragilidad cromosómica como una herramienta de diagnóstico, pronóstico y/o tratamiento
- El informe final deberá tener una fecha, sello y firma de validación. Todo informe de citogenética solo podrá ser validado por un médico especialista en genética
- El informe final valida el conjunto de procesos y sirve como herramienta de diagnóstico que permite al médico especialista brindar asesoría genética al paciente y a su entorno familiar

Fecha: Abril 2019	Código: GP-005/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 24 de 36
--------------------------	--	------------------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS**b. Indicaciones****1. Indicaciones Absolutas**

Pacientes con: ¹⁰

- Anemia aplásica
- Defectos congénitos característicos de la Anemia de Fanconi, en particular que afecten los radios o pulgares
- Fenotipo del Síndrome de VACTERL
- Rupturas cromosómicas espontáneas
- SMD primario (desde muy joven)
- LMA primario (desde muy joven)
- Sensibilidad inusual a la quimioterapia o radioterapia
- Cáncer típico de Anemia de Fanconi: carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello, cervical, anal/vulvar
- Hermano con Anemia de Fanconi
- Antecedentes familiares consistentes con AF o cáncer (por ejemplo, cáncer de mama)

2. Indicaciones Relativas

No aplica para los estudios de fragilidad cromosómica

c. Riesgos o Complicaciones Frecuentes:

Se solicitará una nueva muestra, si la muestra no es óptima (muestra insuficiente, hemolizada, coagulada, en tubo de heparina con litio o EDTA), insuficiente número de metafases analizables o si no existe correlación clínica-patológica.¹¹⁻¹³

d. Riesgos o Complicaciones poco Frecuentes:

Ninguna

Fecha: Abril 2019	Código: GP-005/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 25 de 36
--------------------------	--	------------------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS

e. **Contraindicaciones**

Ninguna

VIII. Recomendaciones

Es necesario contar con un cariotipador con estación de revisión.

Es necesario cumplir con las indicaciones de cada guía de procedimientos siguiendo protocolos de buenas prácticas de Laboratorio.

Los informes finales deberán contar con una hoja de registro para estudio de fragilidad cromosómica y una tabla de resultados producto de un análisis de metafases realizado por personal especializado en citogenética.

IX. Autores, Fecha y Lugar

Nombre del Ejecutor responsable: MSc. Oscar Dávila Carlín

Fecha, hora y Lugar del procedimiento: Servicio de Genética - Laboratorio de Citogenética.
Instituto Nacional de Salud del Niño, San Borja.

Fecha de elaboración y vigencia del Procedimiento: Enero 2019, con vigencia de 2 (dos) años.

Lista de Autores y correos electrónicos

Dra. Gioconda Manassero Morales
Dra. Kelly Franco Bustamante
Dr. Luis Celis García
Blgo. José Ronceros Del Rio
MSc. Oscar Dávila Carlín

g.manassero@insnsb.gob.pe
kfranco@insnsb.gob.pe
lcelis@insnsb.gob.pe
jronceros@insnsb.gob.pe
odavila@insnsb.gob.pe

Fecha: Abril 2019	Código: GP-005/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 26 de 36
-------------------	-------------------------------------	-----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS**X. Anexos****ANEXO N°1****CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA REALIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE
FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS**

(DS.N°027-2015-SA. Reglamento de la Ley N°29414. Ley que establece los Derechos de las Personas Usuarias de los Servicios de Salud. Ley General de Salud N° 26842. RD N°...../2019/INSNSB)

Nombre del Procedimiento: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS

Servicio: Genética

Diagnóstico

Se realizará la siguiente prueba por la sospecha de Anemia de Fanconi y otros síndromes de inestabilidad cromosómica. La confirmación de estas enfermedades de origen genético se realiza en sangre periférica, pero al ser no concluyente, se procede a realizarla en fibroblastos.

Descripción del Procedimiento

Se tomará biopsia de piel (punch) a la altura del cuadrante superior externo del glúteo, obteniendo un aproximado de 0.2cm³ de muestra, se escogerá otra área según criterio del médico. La muestra de piel se analizará en el Área de Citogenética del INSNSB, para evaluar fragilidad cromosómica.

Objetivos del Procedimiento

Evaluar fragilidad cromosómica en fibroblastos.

Beneficios Esperados

Precisar el diagnóstico de sospecha, y así mejorar la intervención en los posibles problemas relacionados con la enfermedad de fondo.

Riesgos ó Complicaciones Frecuentes

No se refieren complicaciones para el paciente, salvo las relacionadas con biopsia de piel.

Riesgos ó Complicaciones poco Frecuentes

No se reporta.

Consecuencias previsibles de la NO realización del procedimiento y/o intervención quirúrgica

Fecha: Abril 2019	Código: GP-005/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 27 de 36
--------------------------	--	------------------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS

Al no estar definido el diagnóstico, la intervención precoz de los posibles problemas acompañantes no se realizarían en forma óptima.

Describir posibilidad de Tratamiento Alternativo

No se ha descrito tratamiento alternativo, salvo medidas de soporte.

Riesgos en Función de las Particularidades del Paciente:

Solo se describen los relacionados a la biopsia de piel, y los posibles problemas hematológicos de los pacientes. (Ejemplo, plaquetopenia)

Pronóstico: Bueno () Malo () Reservado ()

Recomendaciones/Observaciones:

El asesoramiento posttest debe ser realizado en todo momento por un Médico Genetista en consultorio externo y/o durante la hospitalización.

Fecha: Abril 2019	Código: GP-005/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 28 de 36
-------------------	-------------------------------------	-----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS**DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO**

Yo _____, identificado (a) con DNI (), C.E. (), Pasaporte () N° _____, en calidad de Madre (), Padre (), Apoderado/Tutor Legal () del (la) paciente _____, con _____ de edad, identificado con DNI N° _____, Historia Clínica _____ N° _____, con el Diagnóstico: _____

Declaro:

Que el Médico _____ con CMP N° _____, y RNE N° _____, me ha explicado que es conveniente/necesario, debido al diagnóstico de mi familiar, la realización del procedimiento de **FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS** sobre el cual he sido informado. Así mismo he comprendido los beneficios, probables riesgos o complicaciones del mismo.

Por lo tanto con la información completa, oportuna y sin presión; yo, voluntaria y libremente:

Doy mi Consentimiento para el Procedimiento: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN SANGRE PERIFÉRICA.



San Borja, dedel 20.....

**Firma del Representante Legal
Responsable**

Huella Digital

Firma del Médico

Nombre _____
DNI N° _____

CMP N° _____
RNE N° _____

REVOCATORIA DEL CONSENTIMIENTO

Yo _____, identificado (a) con DNI (), C.E. (), Pasaporte () N° _____, en calidad de Madre (), Padre (), Apoderado/Tutor Legal () del (la) paciente _____, con _____ de edad, identificado con DNI N° _____, Historia Clínica N° _____, de forma libre y consciente he decidido **Revocar el Consentimiento** firmado en fecha _____ para la realización de _____ y asumo las consecuencias que de ello puedan derivarse para la salud o la vida de mi representado.

San Borja, dedel 20.....



**Firma del Representante Legal
Responsable**

Huella Digital

Firma del Médico

Nombre _____
DNI N° _____

CMP N° _____
RNE N° _____

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS**ANEXO N°2****PRECAUCIONES ESTANDAR Y PREPARACIÓN DE****DIEPOXIBUTANO (DEB) ⁴⁻⁶**

El Diepoxibutano o Diepóxido 1,3-butadieno (DEB) es un carcinógeno potencial y se deben de tomar precauciones al manejar este compuesto.⁴

PREPARACIÓN DEL DIEPOXIDO 1-3 BUTADIENO (DEB):

- El citogenetista debe llevar una bata de laboratorio, mascarilla, gafas de protección, gorra y guantes de nitrilo cuando se trabaja con DEB Sigma-#20,253-3,5g de Diepoxido1,3-Butadieno
- Reactivos :DEB,RPMI
- Instrumentos y Materiales: Micropipeta de 0.5-10ul, tips para micropipeta de 0.5-10,rack para crioviales de 2ml, criovial de 2ml, jeringas descartables de 1ml y 3ml,papel parafilm, envase de desechos especiales, envase para residuos punzocortantes
- Rotular criovial de 2ml indicando contenido y fecha de preparación

Preparación de laboratorio INSNSB de solución de trabajo DEB:

- Diluir 0.95 ul DEB en un 1 ml de agua destilada hasta disolver completamente y guardar en un criovial de 2ml. Solución viable hasta 4 días (Rotular con fecha de vencimiento)
- Preparación (AGT) de solución stock de DEB (SOLUCIÓN A)
- Diluir 1ul de DEB en 1ml de RPMI .Rotular fecha de elaboración
- Preparación de solución de trabajo de DEB (SOLUCIÓN B)
- Diluir 5ul de la solución stock en 1ml de RPMI. Rotular fecha de elaboración

Se agregan volúmenes de 100ul/150ul/200ul de la solución de trabajo B a cultivos de 5ml llegando a una concentración final mínima de 100ng/ml ,150ng/ml hasta 200ng/ml dependiendo de estandarización de cada laboratorio.

- Descartar solución de trabajo pasados los 4 días y preparar nueva solución de trabajo cuando sea necesario

Fecha: Abril 2019	Código: GP-005/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 30 de 36
--------------------------	--	------------------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS

Cuidados adicionales:

- Los cultivos celulares que involucren DEB se deben hacer en una Campana de Extracción Química o en Cabina de Seguridad Biológica II
- Una botella de HCl de 6 M (50 ml) debe mantenerse a mano para usar, para inactivar rápidamente DEB en caso de derrames
- Para desechar las soluciones con DEB, se deberá adicionar HCl al 6M y serán considerados como residuos biológicos peligrosos. Envase de residuos biológicos especiales
- Los frascos de cultivo deberán ser enjuagado con HCl al 6 M, antes de ser desechados
- Los tips de las micro pipetas deben ser colocados en una pequeña botella de HCl al 6 M. para luego ser descartados

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS**ANEXO N°3****TERMINOLOGÍA PARA ESTUDIO DE FRAGILIDAD CROMOSÓMICA³⁻⁵****ABERRACIONES CROMATÍDICAS (cht):³**

Son aquellas aberraciones que envuelven a una sola cromátide en un cromosoma.

Se pueden distinguir los siguientes tipos de aberraciones:

- Brecha cromatídica o “*chromatid gap*” (**chtg**): es una interrupción en la tinción de una cromátide de 1-2 veces la anchura de que cromátida o mínima desalineación de la cromátide.
- Ruptura de cromátidas o “*chromatid break*” (**chtb**): es una interrupción de más de 2 veces el ancho o cuando el fragmento roto está claramente desalineado.
- Intercambios de cromátides (**chte**): es el resultado de 2 o más lesiones cromatídicas y su subsecuente rearrreglo de material cromatídico. Los intercambios entre cromátides de diferentes cromosomas (intercambios) y entre cromátides de un mismo cromosoma (“intrachanges”). En el caso de los intercambios, pueden adoptar configuraciones triradiales (**tr**): patrón que involucran 3 brazos, cuatriradiales (**qr**): patrón que involucran 4 brazos, o complejas (**cx**): patrón que involucran más de 4 brazos. Eventos cromatídicos: incluyen duplicaciones, deleciones, inversiones paracéntricos

ABERRACIONES CROMOSÓMICAS (chr):³

Son aquellas aberraciones que envuelven a ambas cromátides en un cromosoma.

Se pueden distinguir los siguientes tipos de aberraciones:

- Brecha cromosómica o “*chromosome gap*” (**chrg**): es una interrupción en la tinción de ambas cromátidas de 1-2 veces la anchura de que cromátida o mínima desalineación de la cromátide.
- Ruptura de cromátidas o “*chromatid break*” (**chrb**): es una interrupción de más de 2 veces el ancho o cuando el fragmento roto está claramente desalineado en ambas cromátidas.
- Intercambios cromosómicos (**chte**): es el resultado de 2 o más lesiones cromosómicas y su subsecuente rearrreglo de ambas cromátides en un cromosoma a nuevas posiciones dentro u otro cromosoma. Estos pueden ser simétricos, por ejemplo: translocación recíproca; o asimétrica, por ejemplo: cromosoma dicéntrico.
- Anillos cromosómicos (**r**).

Fecha: Abril 2019	Código: GP-005/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 32 de 36
-------------------	-------------------------------------	-----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS

PARAMETROS PARA ANÁLISIS CITOGENÉTICO: 4,5

En el Análisis de fragilidad cromosómica se evalúan las aberraciones cromatídicas y cromosómicas y los puntajes se otorgan como:

- Único evento: a las ruptura cromatídica y cromosómica.(b)
- Dos eventos: a las configuraciones de intercambio de cromátidas: triradiales(c)
- Tres eventos: cuatriradiales, dicéntricos, anillos y translocaciones.(d)
- Más de 8 eventos: figuras de intercambio complejas y dependiendo del número de centrómeros y rupturas.(e)
- No se considera como eventos a las brechas cromatídicas, cromosómicas y cromosomas pulverizados.(a)

FIGURA N°1

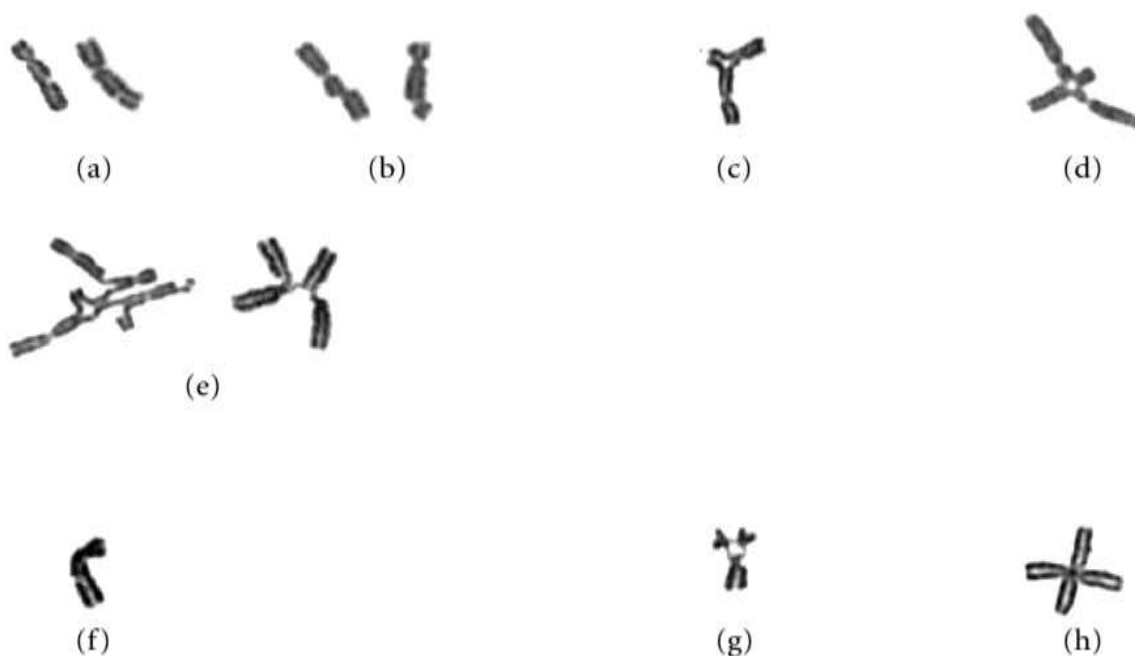


Figura N° 1: Ejemplos de aberraciones cromatídicas típicamente observados en un ensayo de fragilidad cromosómica. (a) Brecha Cromatídica; (b) Ruptura de cromátidas; (c) Figura del intercambio de cromátidas triradial; (d) Figura del intercambio de cromátidas cuatriradial; (e) Otras figuras de intercambio de cromátidas. Ejemplos de imágenes que no deben ser incluidos en el análisis final. (f) Una brecha que no es 100% convincente y debe ser ignorado; (g) Asociación de 3 cromosomas acrocéntricos que muestran "asociación satélite", que no debe confundirse con una triradial y (h) Superposición de cromosomas, que no debe confundirse con un verdadero cuatriradial. (Tomado de Anneke B. Oostra)⁹

Fecha: Abril 2019	Código: GP-005/USDT-SG/INSN-SB/V1.0	Página 33 de 36
--------------------------	--	------------------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS

ANEXO N°4

HOJA DE REGISTRO PARA ESTUDIO DE FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS^{8,9}

ANÁLISIS DE 50 CÉLULAS

[illegible]

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS**ANEXO N°5****RESULTADOS DE FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN****FIBROBLASTOS^{5,6}****INDICE DE FRAGILIDAD CROMOSÓMICA (IFC):³**

Se calcula de la siguiente manera:

$$\text{IFC} = (\% \text{CA}) (\text{FA}/\text{CMA})$$

VALORES REFERENCIALES:

IFC: >54 = Anemia de Fanconi

IFC: <40 = No Anemia de Fanconi

IFC: 40 - 54 = Anemia de Fanconi mosaico

TÉRMINOS UTILIZADOS:

- Células Aberrantes (CA): Células con un único evento
- Células Multiaberrantes (CMA): Células con dos o más eventos
- Número de eventos de Células Multiaberrantes (NCMA): Número total de eventos de células con dos o más eventos
- Frecuencia de aberraciones (FA): Número total de eventos de células analizadas, que es igual a la sumatoria de células aberrantes (CA) y número de eventos de células multiaberrantes (NCMA)

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: FRAGILIDAD CROMOSÓMICA EN FIBROBLASTOS**XI. Bibliografía**

1. Alter BP. Aplastic Anemia, Pediatric Aspects. *Oncologist* 1996; 361-366.
2. Pizzo PA. Pancytopenias constitucionales. En Nelson WE, Berhman RE, Liegman RM, Arvin AM. *Tratado de Pediatría*. 15ª Ed. McGraw Hill Interamericana, España. Madrid, 2000; 1764-1766.
3. Nomenclature ISC on HC. ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013). Karger Medical and Scientific Publishers; 2013. 148 p.
4. Castellà Castellà M, Surrallés i Calonge J, others. Análisis de la variabilidad genética de la anemia de Fanconi en España [Internet]. Universitat Autònoma de Barcelona; 2010 [citado el 10 de noviembre de 2015]. Recuperado a partir de: <http://ddd.uab.cat/record/63185/>
5. Auerbach AD. Diagnosis of Fanconi Anemia by Diepoxybutane Analysis: Diagnosis of Fanconi Anemia by Diepoxybutane Analysis. En: Haines JL, Korf BR, Morton CC, Seidman CE, Seidman JG, Smith DR, editores. *Current Protocols in Human Genetics* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2015 [citado el 10 de noviembre de 2015]. p. 8.7.1–8.7.17. Recuperado a partir de: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142905.hg0807s85>
6. Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Lippincott-Raven Publishers; 1997. 706 p.
7. Association for Clinical Cytogenetics of UK. General Best Practice. 2007. 25 p.
8. Fanconi Anemia Research Fund, Inc. *Fanconi Anemia: Guidelines for Diagnosis and Management*. 4a ed. Oregon; 2014. 431 p.
9. Oostra AB, Nieuwint AWM, Joenje H, de Winter JP. Diagnosis of Fanconi Anemia: Chromosomal Breakage Analysis. *Anemia*. 2012;2012:1–9.
10. Fanconi Anemia Research Fund, Inc. *Anemia de Fanconi: Lineamientos para diagnóstico y manejo*. 3a ed. Oregon; 2008. 440 p.
11. Bloch, EM et al. Transfusion Associated Microchimerism: The Hybrid Within. *Transfus Med Rev*. 2013; 27(1):10–20.
12. Sanchez R. et al. Absence of Transfusion-Associated Microchimerism in Pediatric and Adult Recipients of Leukoreduced and Gamma Irradiated Blood Components. *Transfusion*. 2012;52(5):936–945.
13. Utter GH, Reed WF, Lee TH, Busch MP. Transfusion-associated microchimerism. *Vox Sanguinis*. 2007;93(3):188-195.