

Determinación de aneuploidías por PCR fluorescente

Ivana Primost, Judith Mincman, Paola García Estanga, Irma Coco, Fernando Gismondi, Nicolás Neuspiller, Roberto Coco

Para optar al premio Sociedad Argentina de Medicina Reproductiva. Año 2006

Fecunditas - Instituto de Medicina Reproductiva - Afiliado a la Universidad de Buenos Aires - ivanaprimost@hotmail.com
Reproducción 2007;22:69-86

Resumen

La PCR fluorescente permite enumerar a los cromosomas mediante la utilización de microsatélites (STRs) marcados específicos de los cromosomas de interés, pudiéndose extender a todo el complemento.

Se han utilizado STRs correspondientes a los cromosomas 13, 18, 21, 22, X e Y, los cuales eran de interés de estudio en muestras de vellosidades coriónicas (n=7), líquido amniótico (n=27), productos de abortos espontáneos (n=23) y mortinatos (n=8).

Los resultados de las mencionadas aneuploidías fueron comparados con los obtenidos por citogenética convencional. La gran concordancia hallada entre el estudio por PCR y el citogenético para esos cromosomas legitiman su utilización para la determinación prenatal de aneuploidías, fundamentalmente en aquellas parejas que tienen riesgo aumentado para tales trastornos.

Screening of Chromosome Aneuploidies by Fluorescent PCR

Summary

Fluorescent PCR allows to enumerate specific chromosomes inclusive all chromosomes of the complement, using fluorescent microsatellites (STRs). In the present study we used the STRs corresponding to chromosomes 13, 18, 21, 22, X and Y, which were applied in seven samples of chorionic villi, 27 amniotic fluid, 23 products of spontaneous abortions and 8 fetal blood of stillbirths.

The high correlation found between PCR screening and the cytogenetic technique for the

above mentioned chromosomes legitimizes its use for prenatal screening of aneuploidies by pcr, fundamentally in couples at high risk for such chromosome aneuploidies.

The results of the mentioned screening of chromosome aneuploidies were compared with the obtained by conventional cytogenetic studies. The well correlation between the screening by PCR and the cytogenetic technique for those chromosomes, legitimize us to use the prenatal screening of aneuploidy by PCR, fundamentally, in couples with risk of such chromosome aneuploidies.

Introducción

Aproximadamente el 1% de los recién nacidos tiene una anomalía cromosómica. La anomalía puede involucrar a los cromosomas autosómicos o a los sexuales. Puede ser de número o de estructura (tabla 1).

A la ausencia de un determinado cromosoma, **monosomía**, o a la presencia extra de un determinado cromosoma, **trisomía**, se la denomina **aneuploidía**. En cambio, a la presencia extra de todo un complemento cromosómico se la denomina **poliploidía**. La aneuploidía numérica es la anomalía cromosómica más frecuente en humanos. La misma es homogénea cuando se presenta en línea pura y no homogénea cuando se presenta en mosaico. Las aneuploidías homogéneas son debidas a errores meióticos, mientras que las no homogéneas son post-cigóticas. La aneuploidía ocurre en no menos del 5% de todos los embarazos reconocidos clínicamente.

Tabla 1. Frecuencia de anomalías cromosómicas en RNV. Hook & Hamerton: total 56.592 RNVs (37.779 varones y 19.173 mujeres)

Anomalías C. Sexuales	Nº	%
47,XXY	35	0.093
47,XXY	35	0.093
Otras	28	0.074
45,X	2	0.010
47,XXX	20	0.104
Otras	7	0.037
Trisomías Autosómicas		
+13	3	0.005
+18	7	0.012
+21	71	0.125
Otras	1	0.002
Anomalías Estructurales		
Balanceadas		
T. Robertsonianas	51	0.090
T. Recíprocas e inserciones	51	0.090
Inversiones	8	0.014
Anomalías Estructurales		
Desbalanceadas		
Derivados de T. Robertsonianas	4	0.007
Derivados de T. Recíprocas		
inserciones	7	0.012
Recombinados de inversiones	1	0.002
Deleciones	5	0.009
Marcadores supernumerarios	10	0.018
Otras	7	0.012
Total	353	0.620

El 99% de las anomalías cromosómicas son letales y el 1% que sobrevive es el responsable de las cromosopatías de los recién nacidos (tabla 2).

Tabla II: Frecuencia de anomalías cromosómicas de acuerdo a las etapas

Pre embrionaria	Embrionaria	Fetal	Parto	N. Vivos
> 50	50	15	5	0.6

Aproximadamente el 50% de los abortos espontáneos son aneuploides, siendo la monosomía del X, la trisomía del 16 y la tri-

ploidía las anomalías más frecuentes (tablas 3, 4 y 5).

Tabla 3. Revisión de 5.318 abortos estudiados citogenéticamente. Simpson & Bombard, 1987.

Con anomalías cromosómicas	51%
Numéricas	96%
Estructurales	3%
Otras	1%

Tabla 4. Revisión de 4.696 abortos estudiados citogenéticamente. Goddijn & Leschot, 2000.

Con anomalías cromosómicas	49%
Numéricas	86%
Estructurales	6%
Otras	8%

Tabla 5. Principales hallazgos de anomalías cromosómicas en abortos. Kajii et al, 1985; Carp et al, 2001.

Anomalías numéricas	
Trisomías:	52%, más frecuentes: 16, 13, 18, 21 y 22
Monosomía X:	13%
Monosomía autosómica:	rarisima
Poliploidía:	21%,
Anomalías Estructurales	
Desequilibradas:	6%
La mitad son "de novo" y la mitad transmitidas	
Mosaicos	
Dos o más líneas celulares:	8%

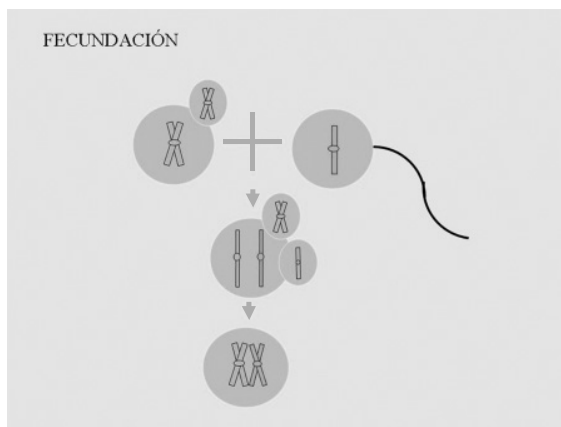
Tabla 6. Anomalías cromosómicas en abortos asociadas con edad materna. Schulman et al, 1985.

Edad	Abortos	Anomalías
20-24	16	59
25-29	19	58
30-34	26	65
35-39	37	74

La mayoría de las trisomías autosómicas son de origen materno, mientras que la mayoría de las aneuploidías sexuales son de origen paterno.

La división meiótica es el proceso que permite la reducción del número de cromosomas y la fecundación (esquema 1), el que permite la restauración del número diploide de la especie.

Esquema 1. Los espermatozoides, a diferencia de los óvulos, se caracterizan por tener cromosomas monocromátidos debido a que las dos divisiones meióticas son sucesivas. En cambio, los óvulos finalizan la segunda división de la meiosis cuando son fecundados por el espermatozoide.



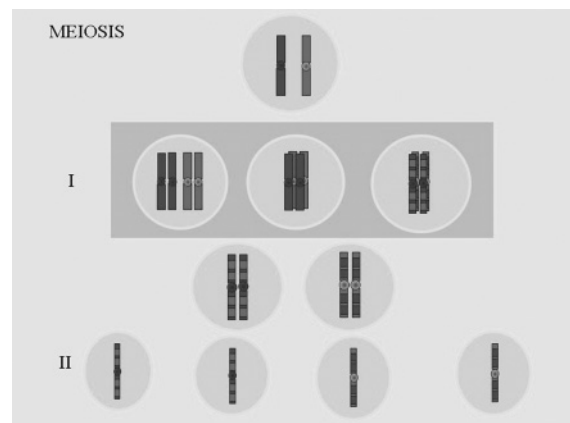
Un requisito indispensable para el normal desarrollo de la meiosis (esquema 2) es el exacto apareamiento de los cromosomas homólogos, el subsiguiente intercambio entre ellos y la posterior separación de ambos.

La eficiencia de la división, si bien la esencia es la misma, difiere en ambos sexos. De hecho es bien conocido que es mayor la tasa de aneuploidía de origen materna que la paterna.

Fallas en la sinapsis de los homólogos, el intercambio y la desinapsis prematura han sido involucradas como causa de trisomías.

El incremento de la edad materna es el factor etiológico más importante asociado

Esquema 2. El proceso gametogénico se caracteriza por dos divisiones celulares. La primera de ellas se llama reduccional y se caracteriza por una larga profase donde los cromosomas duplicados se aparean exactamente e intercambian sus segmentos (esencia de la meiosis). El resultado de la primera división son dos células con la mitad del número de cromosomas, debido a que cada cromosoma duplicado e intercambiado migra hacia cada uno de los polos. Como los cromosomas están duplicados atraviesa una segunda división, dividiéndose cada cromosoma por su centrómero. De esta manera, el resultado de la división meiótica son cuatro células con un número haploide de cromosomas parentales intercambiados o recombinados por el intercambio genético en profase I (crossing over). De esta manera los hijos que devienen de ellas representan grados variables de parentesco de los abuelos.



con aneuploidías (tabla 7), como así también la mala calidad espermática en los varones independiente de la edad.

Tabla 7. Riesgo para S. de Down y otras aneuploidías de acuerdo a la edad.

Edad materna	S. de Down	Todas
20	1/1667	1/526
25	1/1250	1/476
30	1/952	1/385
35	1/378	1/192
40	1/106	1/66
45	1/30	1/21

Reducción en la recombinación meiótica ha sido observada en las trisomías 15, 16, 18, 21 y sexuales en la meiosis I de origen materno, sobre todo en mujeres jóvenes por debajo de los 30 años de edad.

Aumento en la recombinación meiótica ha sido observado en la trisomía 21 inherente a la edad materna avanzada.

La distancia de los puntos de recombinación con respecto al centrómero, más cerca o más lejos del mismo ha sido observada en algunas trisomías, tales como 16 y 21.

El efecto de la edad no está totalmente aclarado: para algunas trisomías, parece ser debido a fallas en la sinapsis y recombinación de los homólogos, mientras que para otras, la desinapsis sería el principal motivo (Lamb et al, 2005; Vialard et al, 2006).

El estudio citogenético en ovocitos humanos con la técnica de Tarkowski (Tarkowski, 1966) y el análisis en cuerpo polar por FISH han permitido establecer que la separación prematura de cromátidas es la principal causa de no disyunción (esquema 3 y 4).

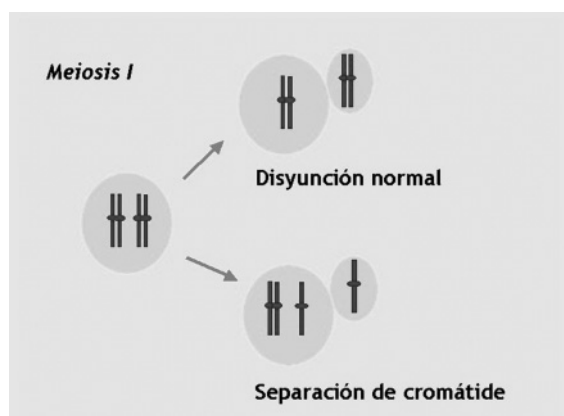
Como la segunda división de la meiosis femenina se completa luego de la fecundación, errores en esta segunda división tam-

bién son responsables de aneuploidías ovocitarias (esquemas 5, 6 y 7).

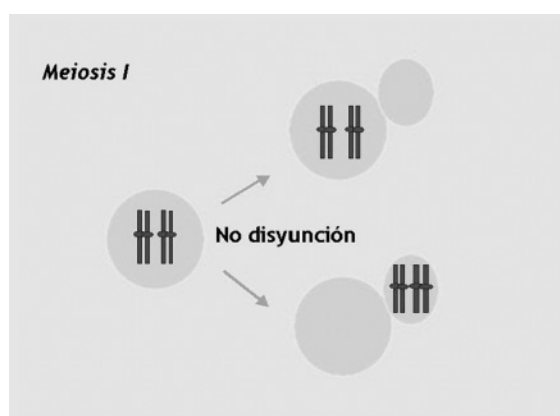
Sobre más de 8.000 ovocitos estudiados por análisis de los cuerpos polares I y II, con sondas de los cromosomas 13, 15, 16, 21 y 22, se ha demostrado que el 50% de los ovocitos provenientes de mujeres de ≥ 35 años tenían aneuploidías cromosómicas, correspondiendo el 42% a errores en meiosis I, 37% a errores en meiosis II y 29% a errores en ambas meiosis. Un hecho sorprendente al estudiar a los embriones derivados de los ovocitos biopsiados mediante el análisis de una o varias blastómeras fue el hallazgo de que 1 de cada 3 errores secuenciales que condujeron al rescate de la pseudo-euploidía, originando embriones anormalmente caóticos (Kuliev & Verlinsky, 2004).

En cambio, la tasa de aneuploidía espermática no es inherente a la edad sino más bien a la calidad espermática, y cuanto más severa, mayor la tasa (Levron et al, 2001; Coco et al, 2000; Coco et al, 2002; Mehdi et al, 2006). Así como se ha mencionado el indudable valor de la edad materna en la generación de aneuploidías, es verdad que la mayoría de los nacidos con trisomías nacen

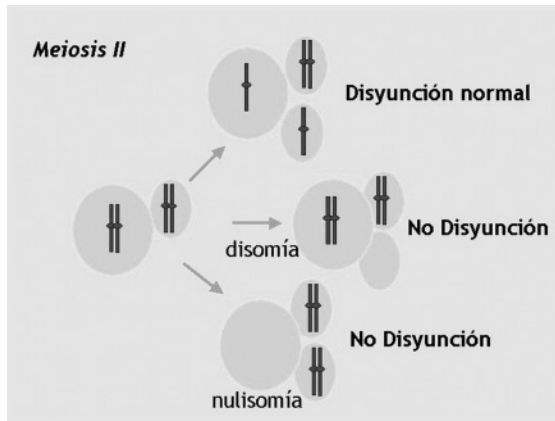
Esquema 3. Representación de la separación prematura de cromátidas: uno de los cromosomas del par separa prematuramente sus cromátidas y una sola migra hacia el primer cuerpo polar, resultando un ovocito, en principio disómico.



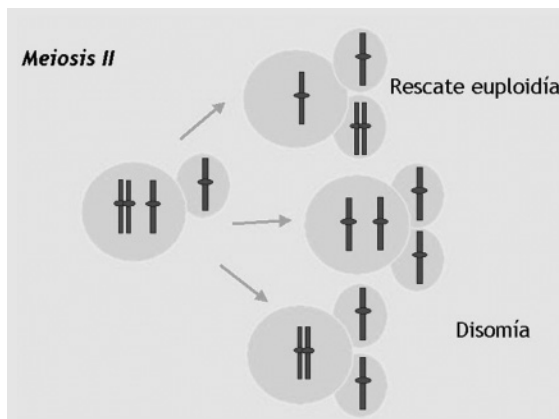
Esquema 4. Representación de la no disyunción clásica: si uno de los cromosomas no migra al primer cuerpo polar resulta un ovocito disómico. Si ambos cromosomas migran al primer cuerpo polar resulta un ovocito nulisómico.



Esquema 5. Errores en la meiosis II a partir de una meiosis I normal. Una no disyunción, y de acuerdo a la migración y/o retención de ambas cromátides, da lugar a ovocitos disómicos o nulisómicos, respectivamente.

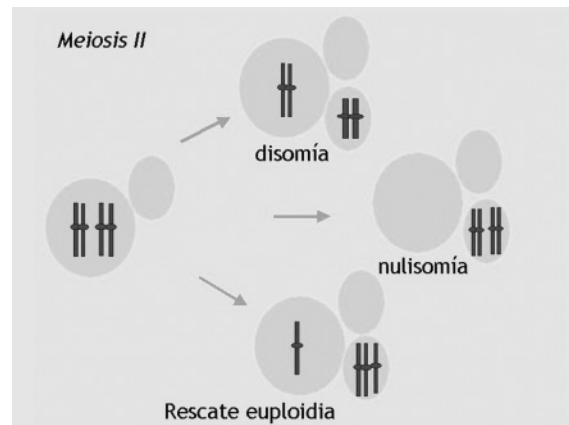


Esquema 6. Errores en la meiosis II a partir de una meiosis I anormal por una separación precoz de cromátides. De acuerdo al tipo de segregación puede dar lugar a un aparente ovocito normal (rescate de la euploidía) o bien dar lugar a ovocitos disómicos o isodisómicos.



de progenitores jóvenes, fundamentalmente porque son los más fértiles. Es por ello que últimamente se está enfocando más la atención en las embarazadas jóvenes con la implementación de los métodos de cribado cromosómico y la realización de los estudios prenatales en los grupos de mayor riesgo.

Esquema 7. Errores en la meiosis II a partir de una meiosis I anormal por una no disyunción. Nótese que una separación normal da lugar a una disomía y que una no disyunción da lugar a un ovocito nulisómico. Además, una separación 3:1 podría rescatar la eu-haploidía.



El *screening* ecográfico y bioquímico no invasivo del primer y segundo trimestre del embarazo es de gran utilidad para tamizar a las mujeres por debajo de 35 años con más posibilidades de embarazos aneuploides.

Si la normativa en la pareja joven aparentemente sin riesgo es implementar primero el *screening* no invasivo, cuando éste señalara cierto riesgo, la mujer ya tendría 16 semanas de gestación. A esta altura del embarazo la amniocentesis sería el método indicado. El cultivo de los amniocitos para estudio citogenético implicaría una semana y media para tener los resultados confirmatorios. La ansiedad originada en la pareja ha obligado a desarrollar métodos con resultados prácticamente en el mismo día de la amniocentesis. De esta manera, se ha intentado tener resultados de las aneuploidías más comunes mediante el análisis directo de los amniocitos por FISH, pero los amniocitos no son fáciles de hibridar ya que la mayoría tienen núcleo picnótico y además es una técnica muy costosa, por lo menos en nuestro país (Hulten et al, 2003). Otra de las opciones es el estudio por PCR fluorescente, utilizan-

do STRs de los cromosomas que se desean analizar, aunque existiría la posibilidad potencial de estudiarlos a todos ellos con una PCR múltiple (Pertl et al, 1994; Adinolfi et al, 1997; Cirigliano et al, 2000; Cirigliano et al, 2004).

Objetivo

Montar la metodología de estudio que permitiera efectuar el *screening* de las aneuploidías más frecuentes en el humano, con el propósito de implementarlo sobre todo en mujeres jóvenes embarazadas con riesgo aumentado de aneuploidías luego de los *screenings* ecográficos y bioquímicos del primer y segundo trimestre del embarazo destinados a detectar fundamentalmente las aneuploidías de los cromosomas 21, 13 y 18. Además de enumerar a esos cromosomas prenatalmente, su aplicación en el estudio de los abortos espontáneos y mortinatos.

Pacientes y métodos

Se estudiaron muestras provenientes de 27 amniocentesis, 7 vellosidades coriónicas, 23 productos de abortos y 8 sangres fetales provenientes de pacientes que consultaron para diagnóstico genético.

Las muestras fueron procesadas a) para estudios citogenéticos clásicos con los métodos convencionales de cultivo celulares y preparación de las placas metafásicas; y b) para estudio de las aneuploidías de los cromosomas 13, 18, 21, 22, X e Y con técnicas de biología molecular PCR-QF. Para mejor interpretación de las electroforesis capilares se extrajo también sangre a los progenitores.

Extracción del ADN

a) Sangre: de acuerdo con el kit Wizard Genomic DNA purificationtm.

A 300µl de sangre extraída con EDTA se le agrega 900µl de solución de lisis celular, se mezcla por inversión y se incuba 10 minutos. Se centrifuga a 13000 rpm durante 1 minuto. Se descarta el sobrenadante y se mezcla el pellet

obtenido con 300µl de solución de lisis nuclear y se mezcla por inversión. Se adicionan 100µl de solución de precipitado de proteínas y se agita en un vortex durante 20 seg. Se centrifuga a 13000 rpm durante 3 minutos. Se transfiere el sobrenadante a un tubo conteniendo 300µl de alcohol Isopropanol a temperatura ambiente y se centrifuga a 13000 rpm durante 1 min. Se descarta el sobrenadante y se agregan 300µl de etanol al 70% a temperatura ambiente y se centrifuga a 13000 rpm durante 1 minuto. Se aspira el sobrenadante y se deja secar a temperatura ambiente. Una vez seco se re-hidrata en agua libre de nucleasas a 65°C durante 1 hora o a 4°C toda la noche.

b) Líquido amniótico: se usó el mismo kit que para sangre.

Se centrifuga el líquido amniótico a 2000 rpm durante 5 minutos. Se descarta el sobrenadante y al pellet celular se lo lava con PBS. Se adicionan 300µl de solución de lisis nuclear, se mezcla por pipeteo y 1.5µl de solución de AR-Nasa. Se incuba por 15-30 minutos a 37°C y se deja enfriar a temperatura ambiente. Se agregan 100µl de solución de precipitado de proteínas, se agita en vortex 5 segundos, y se enfría en hielo por 5 minutos. Se centrifuga a 13000 rpm durante 4 min. El sobrenadante se transfiere a un tubo con 300µl de Isopropanol a temperatura ambiente, se mezcla por inversión y se centrifuga durante 1 min a 13000 rpm. Se descarta el sobrenadante y se agregan 300 µl de etanol al 70 % a temperatura ambiente. Se aspira el sobrenadante y se deja secar el pellet a temperatura ambiente. Una vez seco se re-hidrata en agua libre de nucleasas 65°C durante 1 hora o toda la noche a 4°C.

c) Abortos espontáneos y vellosidades coriónicas: se usó el mismo kit de extracción de ADN.

Se disgrega el material en PBS con ayuda de una tijera. Se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos. Se descarta el sobrenadante y se lava el pellet celular con PBS varias veces. Se adicionan 600µl de solución de lisis nuclear, se mezcla por pipeteo y se incuba a 65°C duran-

te 15-30 min. Se agregan 3 µl de solución de ARNasa y se incuba a 37°C por 15-30 min. Se deja enfriar a temperatura ambiente. Se adicionan 100 µl de solución de precipitado de proteínas, se agita en vortex 5 segundos y se enfría en hielo por 5 minutos. Se centrifuga a 13000 rpm durante 4 min.

El sobrenadante se transfiere a un tubo con 600 µl de Isopropanol a temperatura ambiente, se mezcla por inversión y se centrifuga a 13000 rpm durante 1 minuto. Se descarta el sobrenadante y se agregan 600 µl de etanol al 70% a temperatura ambiente. Se descarta el sobrenadante y se deja secar el pellet a temperatura ambiente. Una vez seco se re-hidrata en agua libre de nucleasas 1 hora a 65°C o toda la noche a 4°C.

Amplificación de los STRs marcados

Se realizaron dos tipos de PCR: a) una múltiple conformada por los STRs de los cromosomas 13, 18, 21, 22, X e Y; y b) una simple con el STR X22 debido a que no amplificaba en la multiplex.

Para la multiplex el volumen final fue de 15 µl, conteniendo entre 1 y 3 µl del ADN genómico de las muestras, 0.2 mM dNTPs, 0.1 µM de cada uno de los primers D21S1412, D22S280, D13S631, AMXY, y 0.3 µM de los primers D21S11, D18S386; 0.5 mM Mg Cl₂, buffer Taq polymerase 1x conteniendo 1.5 Mm/l Mg Cl₂, y 1.5 U Taq polymerase (de Promegatm).

Desnaturalización a 95°C durante 5 min. Veinticinco ciclos de PCR: primero a 95°C durante 30 seg, segundo a 59°C durante 30 min y tercero a 72°C durante 1 min, con una extensión final de 72°C a 5 min.

La PCR del STR X22 fue realizada en un volumen final de 15 µl conteniendo: entre 1 y 3 µl de ADN genómico, 0.2 mM dNTPs, 0.4 µM del primer, 0.5 mM Mg Cl₂; buffer Taq polymerase 1X conteniendo 1.5 Mm/l Mg Cl₂, y 1.5 IU Taq polymerase. Desnaturalización a 95°C durante 5 min. Veinticinco ciclos de PCR: primero a 95°C durante 30 seg, segundo

a 59°C durante 30 min y tercero a 72°C durante 1 min, con una extensión final de 72°C a 5 min.

Un µl de los productos amplificados fue mezclado con 12 µl de formamida y 0.5 µl del estándar (size Standard - 500 LIZ de Applied Biosystemstm) y desnaturalizado a 95°C durante 5 minutos. La electroforesis capilar fue realizada con un ABI PRISM 310 genetic analyzer de Applied Biosystemstm y analizada con el software GeneScan 3.1 de Applied Biosystems.

Primers usados

D21S11, LOCALIZADO EN 21Q, RANGO DE PB 172-249, TIPO DE REPETICIÓN TETRANUCLEÓTIDO

(F) 5' 6FAMTATGTGAGTCAATTCCCAAGTGA 3'
(R) 5' GTT GTA TTA GTC AAT GTT CTC CAG 3'

D21S1412, LOCALIZADO EN 21PTER-21QTER, RANGO DE PB 320, TIPO DE REPETICIÓN TETRANUCLEÓTIDO

(F) 5' 6 FAM CGG AGG TTG CAG TGA GTT G 3'
(R) 5' GGG AAG GCT ATG GAG GAG A 3'

D18S386, LOCALIZADO EN 18Q22.1-22.2, RANGO DE PB 358, TIPO DE REPETICIÓN TETRANUCLEÓTIDO

(F) 5' VIC TCA GGA GAA TCA CTT GGA AC 3'
(R) 5' TCC ATG AAG TAG CTA AGC AG 3'

D13S631, LOCALIZADO EN 13Q31-32, RANGO PB 195, TIPO DE REPETICIÓN TETRANUCLEÓTIDO

(F) 5' NED GGC AAC AAG AGC AAA ACT CT 3'
(R) 5' TAG CCC TCA CCA TGA TTG G 3'

X22, LOCALIZADO EN XQ-YQ(PAR2), RANGO PB 189-242, TIPO DE REPETICIÓN PENTANUCLEÓTIDO

(F) 5' PET TAA TGA GAG TTG GAA AGA AA 3'
(R) 5' CCC ATT GTT GCT ACT TGA GA 3'

AMXY, LOCALIZADO EN XP-YP (AMELOGENINA), RANGO 107-113, TIPO DE REPETICIÓN

TETRANUCLEÓTIDO

(F) 5' PET CCC TGG GCT CTG TAA AGA ATA GTG 3'
 (R) 5' ATC AGA GCT TAA ACT GGG AAG CTG 3'

**D2S280, LOCALIZADO EN 22PTER-22QTER,
 RANGO PB 208-220, TIPO DE REPETICIÓN
 DINUCLEÓTIDO**

(F) 5' VICK GCT CCA GCC TAT CAG GAT G 3'
 (R) 5' GAT TCC AGA TCA CAA AAC TGG T 3'

**DYS393, LOCALIZADO EN YPTER-YQTER,
 RANGO PB 123, TIPO DE REPETICIÓN TE-
 TRANUCLEÓTIDO**

(F) 5' GTG GTC TTC TAC TTG TGT CAA TAC 3'
 (R) 5' PET AAC TCA AGT CCA AAA AAT GAG G 3'

**DYS392, LOCALIZADO EN YPTER-YQTER,
 RANGO PB 254, TIPO DE REPETICIÓN TE-
 TRANUCLEÓTIDO**

(F) 5' TCA TTA ATC TAG CTT TTA AAA ACA A 3'
 (R) 5' PET AGA CCC AGT TGA TGC AAT GT 3'

**DXSI5, LOCALIZADO EN XQ28-XQ28, RAN-
 GO PB 152-166, TIPO DE REPETICIÓN DINU-
 CLEÓTIDO**

(F) 5' FAMAGCACATGGTATAATGAACCTCCACG 3'
 (R) 5' CAG TGT GAG TAG CAT GCT AGC ATT TG 3'

**DXSI684, LOCALIZADO EN XQ28-XQ28,
 RANGO PB 128-148, TIPO DE REPETICIÓN
 DINUCLEÓTIDO**

(F) 5' FAM AGC ACC CAG TAA GAG ACT GAA C 3'
 (R) 5' CCT CAG TGG CAA CCA CTC AAG 3'

**DXSIO55, LOCALIZADO EN XP11.4-XP11.3,
 RANGO PB 100-110, TIPO DE REPETICIÓN
 DINUCLEÓTIDO**

(F) 5' CTC TAT GGG ATA CAC TGT TCT GGG 3'
 (R) 5' NED GGA ATG CAT CCC CAT CAT TAA 3'

**DXSIO68, LOCALIZADO EN XP11.4-XP11.3,
 RANGO PB 130-140, TIPO DE REPETICIÓN
 DINUCLEÓTIDO**

(F) 5' VIC ATT ATG ACT AAG GTT CTA GGG AC 3'
 (R) 5' CTG AGA ACA CGC TGT TTT TTA C 3'

**D2ISII,
 D2IS268,**

Análisis de los amplicones fluorescentes

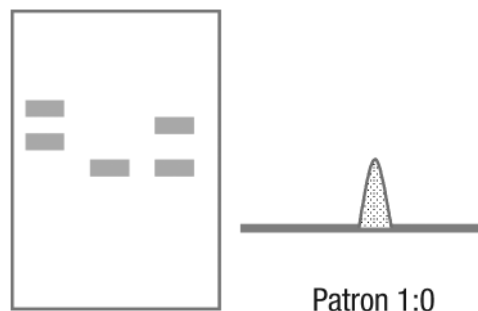
**Criterios de interpretación de los
 electroferogramas para la evaluación
 del número de copias de cada
 cromosoma estudiado.**

Las señales a observar dependerán de acuerdo a la homo/heterocigocidad de los alelos parentales:

Monosomía: una sola señal correspon-
 diente a un alelo parental (esquema 8).

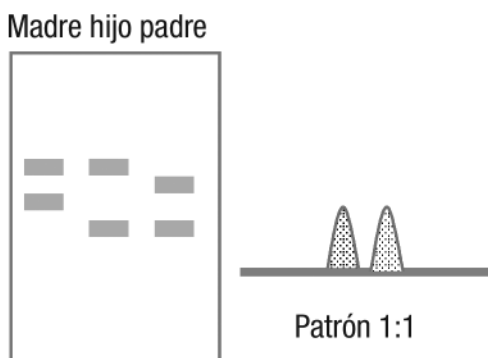
Esquema 8. A la izquierda se ha representa-
 do la corrida electroforética y a la derecha el
 electroferograma correspondiente a la calle del
 medio de la corrida que correspondería al fu-
 turo hijo.

Madre hijo padre



Disomía: dos señales fluorescentes per-
 tenecientes a los dos alelos parentales de los
 STRs usados con una relación de señal 1:1
 cuando los alelos parentales son heterocigo-
 tos (esquema 9).

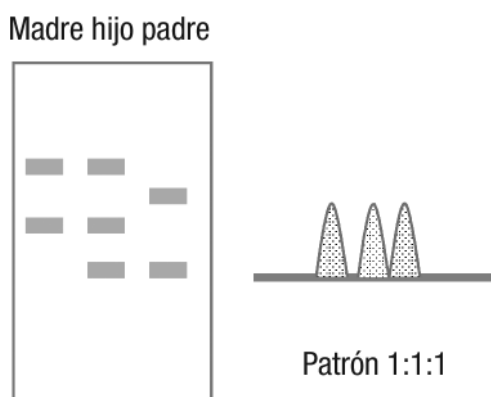
Esquema 9. A la izquierda está esquematizada la corrida electroforética y a la derecha el electroferograma correspondiente a la calle central de la corrida.



Trisomía:

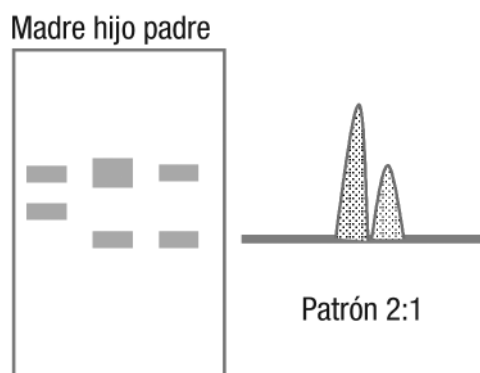
a) Tres señales fluorescentes, dos correspondientes a un progenitor y otro correspondiente al otro cuando los alelos parentales son todos diferentes entre ellos (esquema 10).

Esquema 10. A la izquierda se observa la corrida electroforética y a la derecha el electroferograma correspondiente a la calle central de la corrida.



b) Dos señales fluorescentes, una de doble área respecto a la otra, cuando el cromosoma extra proviene de un progenitor con ese alelo homocigoto (esquema 11).

Esquema 11. A la izquierda la corrida electroforética y a la derecha el electroferograma de la calle central de la corrida.



Doble trisomía: cuando dos de los cromosomas estudiados muestran un patrón 1:1.1 ó 2:1.

Triploidía: los STRs de todos los cromosomas evaluados exhiben un patrón 1:1:1 ó 2:1.

Resultados

a) Muestras de líquido amniótico: el estudio citogenético convencional evidenció 24 muestras normales, 12 de sexo femenino y 12 masculinos. Tres muestras fueron anormales: una tenía un cromosoma X extra (47, XXX) y dos un cromosoma 21 extra (47, XX,+21).

El estudio del *screening* por QF-PCR evidenció 24 muestras normales, una anormal con tres señales para el cromosoma X, otra con tres señales para cada uno de los STRs como si se tratase de una triploidía y otra con tres señales para el cromosoma 21.

El caso 47, XXX fue estudiado además con la serie de STRs extras y evidenciaron señales para los dos cromosomas X de la madre y uno del padre, infiriendo un error en meiosis I materna (figura 1).

El líquido de la presunta triploidía estaba contaminado con sangre materna. De hecho las señales de todos los marcadores

correspondieron a un patrón 1:1:1. Lamentablemente el citogenético evidenció una trisomía 21. Por lo tanto, la misma debe haberse originado por un error en meiosis I materna.

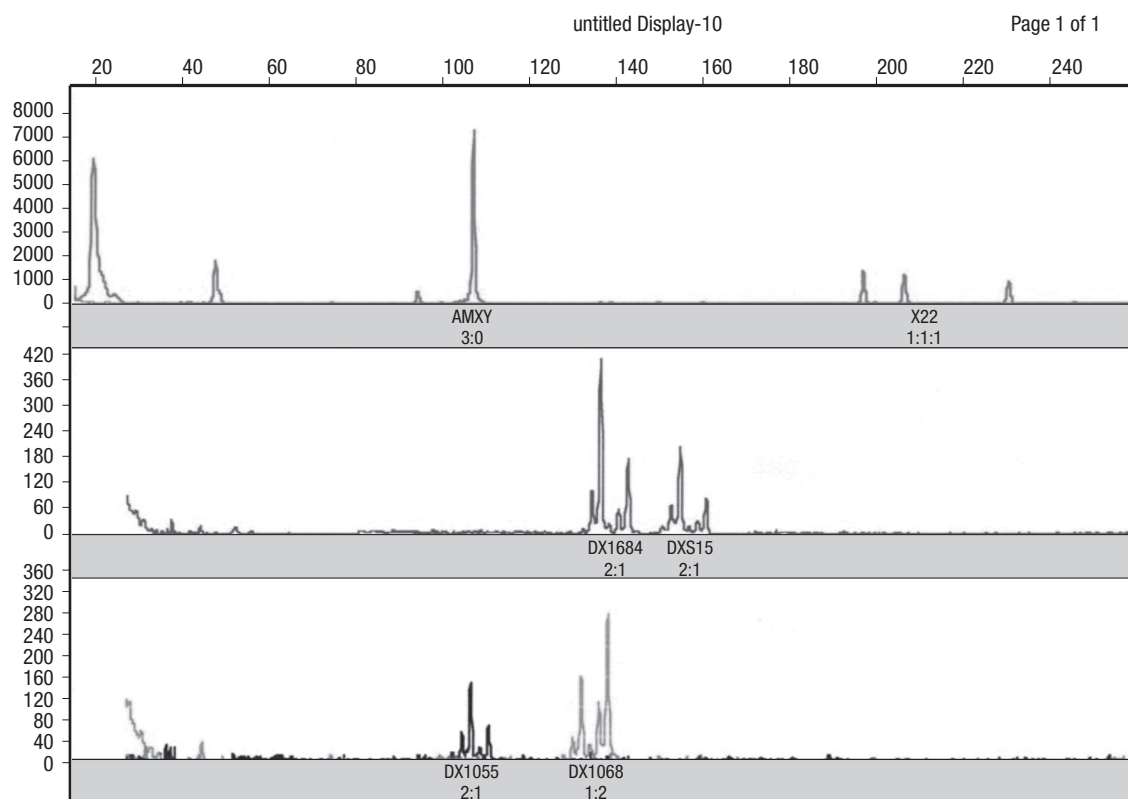
La tercera muestra anormal evidenció un patrón con tres señales para el cromosoma 21, las cuales correspondían a los dos alelos maternos y uno paterno, patrón 1:1:1.

b) Material de vellosidades coriónicas: el estudio convencional evidenció una constitución normal 46,XX en todos. El *screening* de las aneuploidías fue coincidente en 6 de ellas. La restante fue incompleta debido a que no se amplificaron todos los STRs,

salvo los sexuales, los cuales fueron coincidentes con el citogenético.

c) Material de producto de aborto espontáneo: el estudio convencional solo fue posible en 5 de ellos debido al no desarrollo de colonias o a la mala calidad de los cultivos no aptos para estudio cromosómico. Cuatro fueron de sexo femenino y uno masculino. De los 23 estudiados por PCR, 14 evidenciaron patrón femenino normal, 5 patrón masculino normal y cuatro anormales: a) uno con tres señales para todos los cromosomas autosómicos estudiados y tres para el X; b) uno con tres señales para todos los cromosomas autosómicos estudiados, dos señales

Figura 1. Electroferogramas de los productos de una muestra triple X evaluado con distintos STRs para el cromosoma X. Se muestra en el panel superior el patrón 3:0 para el AMXY y un patrón 1:1:1 para el X22; en el del medio un patrón 2:1 para los dos marcadores DX1684 y DXS15; y en el de abajo se repite el mismo patrón anterior para los marcadores DX1055 y DX1068.



para el X y una para el Y, correspondiendo dos señales a los dos alelos maternos y una señal al alelo paterno; c) uno con tres señales para el cromosoma 21 de sexo femenino; y d) uno con tres señales para el cromosoma 18 de sexo masculino (figura 2).

d) Material de sangre fetal: el estudio convencional evidenció dos de ellos

como normales 46,XY y seis anormales. Los anormales fueron: 47,XXY, 47,XY+13, 47,XX,+13, 2-47,XX,+21 y 47,XX,+18. El *screening* de aneuploidías fue coincidente en todos, excepto el caso de la trisomía 18 que además evidenció tres señales para el 21, ambas señales con un patrón 2:1. (figura 2 y 3).

Figura 2: Electroferogramas de los productos de una multiplex QF-PCR mostrando en el panel: A- las señales correspondientes a un varón con trisomía 13 patrón 1:1:1; B- las señales correspondientes a un varón con trisomía 18 con patrón 1:1:1; C- las señales correspondientes a una mujer con doble trisomía 18 y 21 con un patrón 2:1; D- señales correspondientes a una mujer con trisomía 21 con patrón 2:1. En los cuatro paneles los restantes marcadores dieron señales normales.

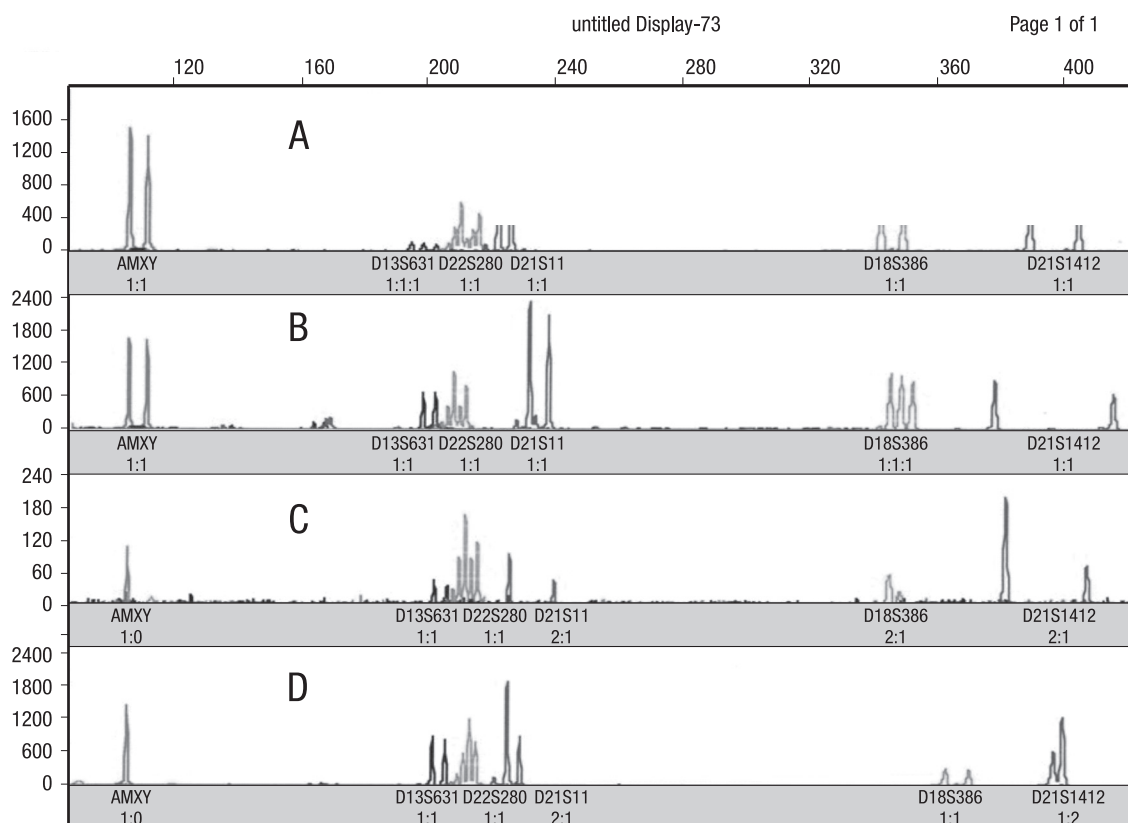
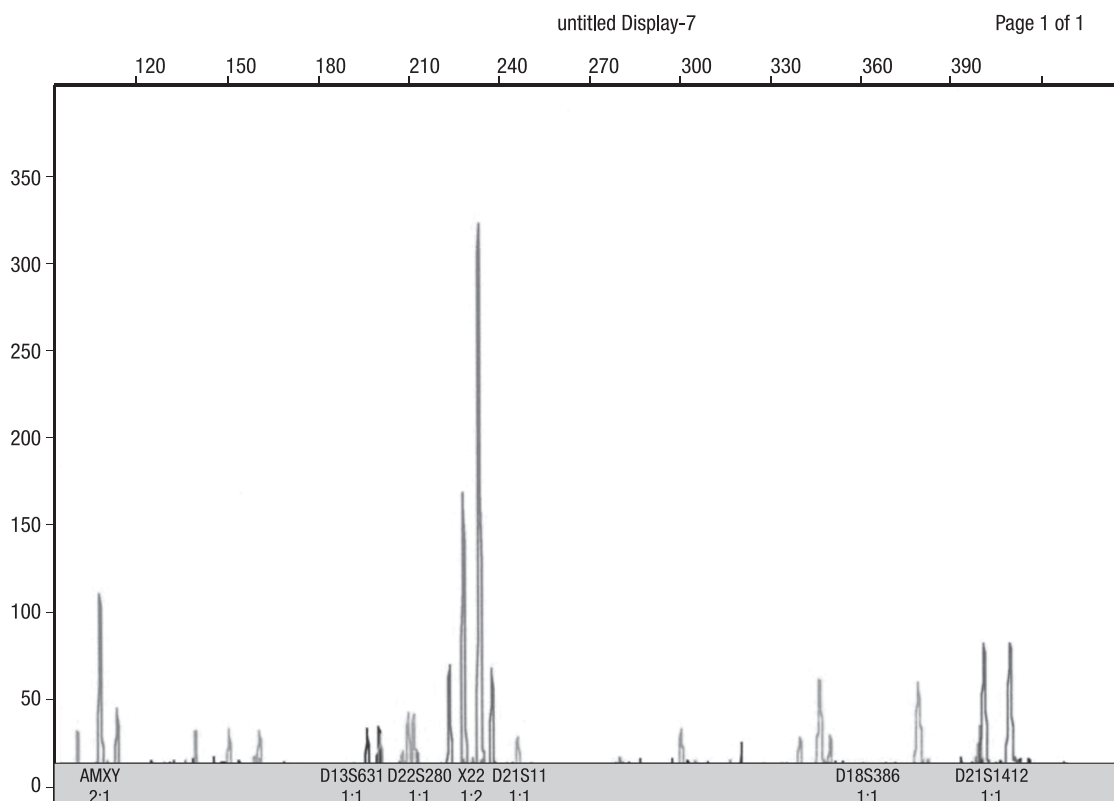


Figura 3. Electroferogramas de un muestra XXY. Nótese que con el marcador AMXY se ven dos señales rojas con un patrón 2:1; con el marcador X22 se ve el mismo patrón que el anterior; y con los restantes marcadores para los cromosomas 13, 18, 21 y 22 las dos señales con patrón 1:1 normales.



Discusión

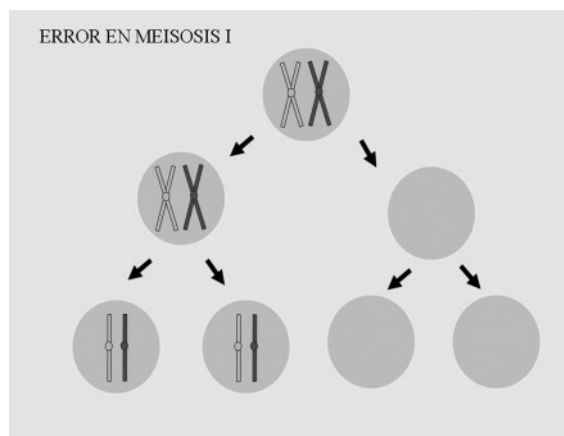
El estudio de las enfermedades cromosómicas en el humano se centraliza fundamentalmente en las aneuploidías y en las causas responsables de las mismas. Las aneuploidías cromosómicas se producen por errores durante la meiosis o luego de la fecundación (esquemas 12, 13, 14 y 15).

Las de origen meiótico por lo general son homogéneas, mientras que las de origen somático son mosaicos (esquema 16 y 17).

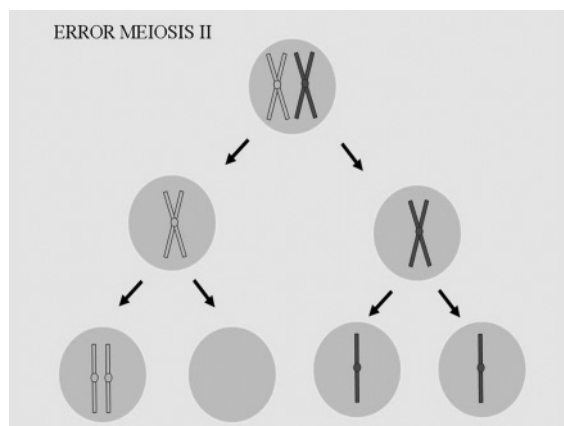
La metodología de QF-PCR permite determinar el número de cada cromosoma, pero no puede informar sobre la morfología del cromosoma ni la existencia de cromosomas en mosaico. El estudio de las aneu-

ploidías comenzó con los estudios cromosómicos convencionales, que generalmente implican cultivos celulares y detención de los mismos con colchicina para su análisis en metafase. Por lo tanto, los resultados de los mismos insumen por lo menos un par de semanas para el cultivo y análisis. Este tiempo cuando se trata de diagnósticos prenatales es muchísimo, ya que prolonga la angustia por la incertidumbre del resultado. Con la finalidad de reducir el tiempo del estudio a pocas horas se han desarrollado varios estudios: el estudio de las vellosidades coriónicas en forma directa, el análisis por FISH de las vellosidades y/o amniocitos, la utilización de la PCR fluorescente y más re-

Esquema 12. Los errores en meiosis I conducen a gametas disómicas y nulisómicas.



Esquema 13. Los errores en meiosis II conducen a gametas isodisómicas, nulisómicas y normales.



Esquema 14. La cigota resultante de un error en meiosis I es trisómica con tres cromosomas diferentes (patrón 1:1:1).



Esquema 15. La cigota resultante de un error en meiosis II es trisómica con dos cromosomas iguales y uno diferente (patrón 2:1).

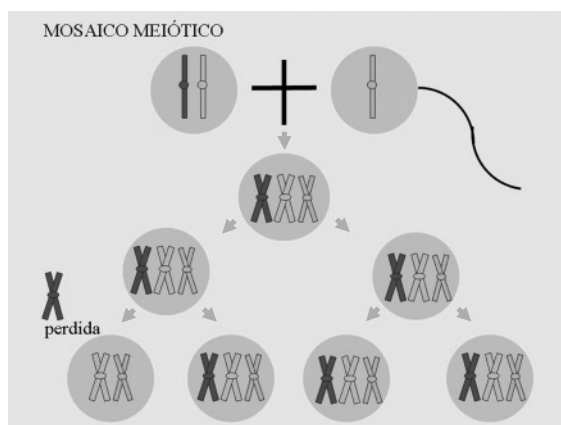


cientemente la PCR en tiempo real. En el presente trabajo se ha preferido el análisis de determinadas aneuploidías por QF-PCR. Es bien conocido, el aumento del riesgo de las aneuploidías inherente a la edad materna en parejas con cariotipos normales, por lo tanto, para esa población el análisis de las aneuploidías adquiere real valor diagnóstico, ya que hasta el presente cualquier tipo de diagnóstico prenatal va dirigido al riesgo en cuestión.

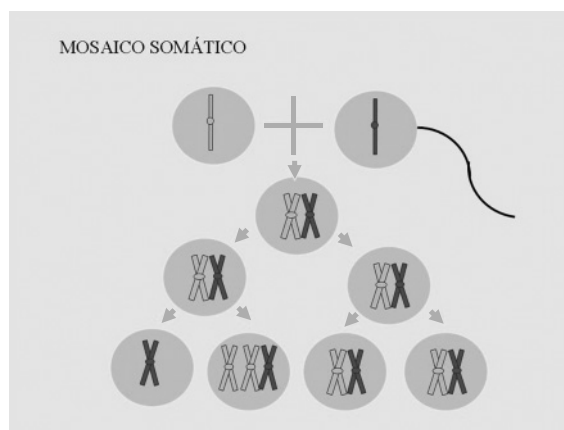
De las 21 muestras de líquido amniótico, 19 resultaron normales y coincidieron con

el estudio cromosómico convencional. De las otras dos, una se trataba de una triple X también coincidente con el cromosómico, y la otra con señales compatibles con una triploidía no coincidió con el cromosómico que evidenció una constitución 47,XX,+21. Esta discrepancia fue muy probablemente debida a la contaminación con sangre materna del líquido amniótico. Las tres señales para cada uno de los alelos con patrón 1:1:1 correspondían a los dos alelos de la sangre materna y a uno del padre para cada uno de

Esquema 16. El mosaico originado a partir de una cigota anormal (error meiótico I) por pérdida en anafase de uno de los cromosomas excedente origina un mosaico de dos líneas, una normal y la otra trisómica.



Esquema 17. El mosaico originado a partir de una cigota normal por una no disyunción origina tres líneas celulares: una monosómica, una trisómica y otra normal.



los alelos. Por lo tanto, cuando el material está contaminado con sangre materna, el resultado puede ser no informativo como en el presente caso.

De las 7 muestras de vellosidades coriónicas, 6 coincidieron con el estudio convencional y con el restante solo se pudo inferir

el sexo, también coincidente con el estudio convencional. En realidad no hemos encontrado una explicación al hecho, pero evidentemente debe existir una mínima tasa de amplificaciones preferenciales, o bien que la calidad del ADN en esos segmentos hubiese estado alterado (Nagy et al, 2005).

De los 18 productos de abortos espontáneos, 13 dieron señales autosómicas normales con sexo femenino, 4 normales con sexo masculino y uno con 3 señales para el cromosoma 18 con sexo masculino. El estudio convencional fue posible en solo 5 casos, cuatro 46,XX y uno 46,XY. Está reconocido que el material abortado no siempre es cultivable. Si bien no pudimos recabar más información sobre la correlación respecto del estudio convencional, es interesante mencionar que cuando el convencional da femenino normal, la posibilidad de que corresponda al feto es del 50%. Por lo tanto, el estudio molecular desde lo teórico parecería ser más eficiente en detectar todas las líneas celulares.

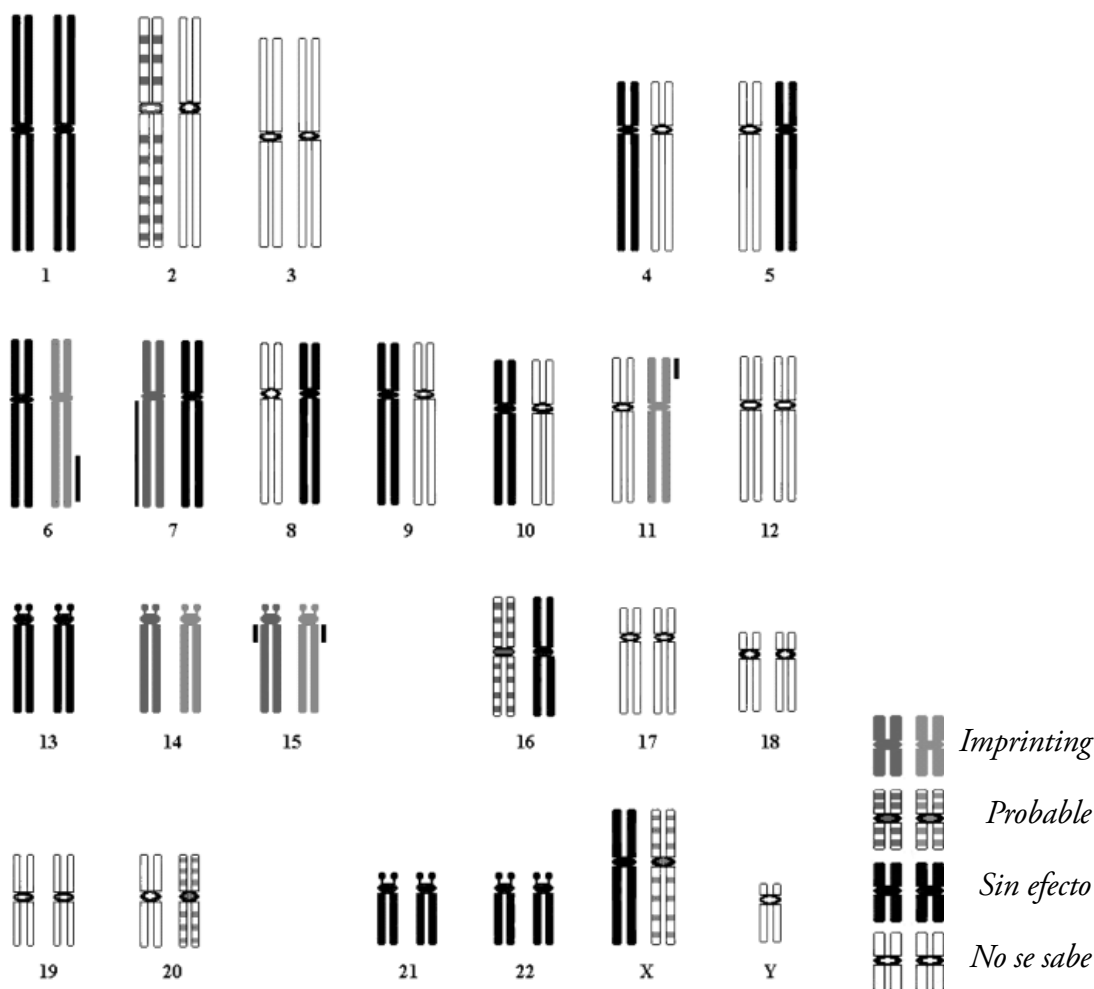
De los 8 estudios efectuados en sangre fetal de los mortinatos, dos dieron señales normales correspondiendo al sexo masculino y 6 anormales. De los anormales, uno tenía 3 señales de cromosomas sexuales XXY, dos 3 señales para cromosoma 13 de diferentes sexo, dos 3 señales para cromosoma 21 y sexo femenino y uno 3 señales para el cromosoma 18 y 21 con un patrón 2:1. Los estudios convencionales fueron coincidentes en todos, excepto el último caso con doble trisomía que solamente evidenció la trisomía 18. Probablemente se haya tratado de un mosaicismo cromosómico 48,XX,+18,+21/47,XX,+18, en el que el estudio convencional solo puso de manifiesto la línea con la trisomía 18. Probablemente una línea se originó durante la meiosis II materna y la otra post-cigótica. De hecho, es bien conocido que una cigota aneuploide tiene más riesgo de división mitótica anormal para el mismo cromosoma u otro.

Teniendo en cuenta los resultados hallados y los de la literatura, cuando la embarazada tiene solamente riesgo aumentado para aneuploidía, el *screening* de las aneuploidías más frecuentes, como las realizadas en el presente trabajo, alcanza a tener un real valor diagnóstico sobre el status de los cromosomas estudiados en el mismo, excepto que la muestra a analizar esté contaminada con células maternas sanguíneas u otras células. Para aumentar la eficiencia diagnóstica es conveniente contar siempre con el ADN genómico de la pareja. Conocer los alelos de los progenitores y su comparación

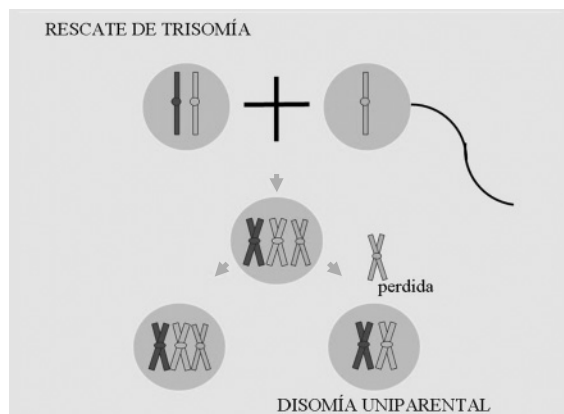
con los de la gesta permite de acuerdo a la muestra estudiada conocer el tipo de error gametogénico o post cigótico que dio lugar a la aneuploidía como así sospechar la existencia de rescates de trisomías (esquemas 19 y 20), adquiriendo vital importancia cuando se trata de cromosomas con *imprinting* (esquema 18).

Este punto es sumamente importante y lo diferencia sustancialmente respecto de los estudios convencionales, que no permiten diagnosticar disomías uniparentales o isodisomías.

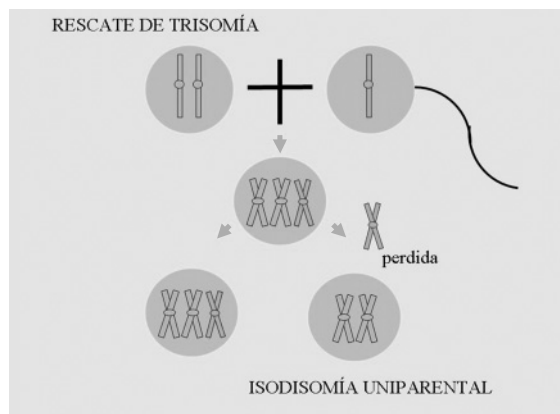
Esquema 18. Mapa cromosómico de *imprinting* de Morison & Reeve, 1998.



Esquema 19. Una cigota trisómica por error meiótico I puede restablecer la eudiploidía cuando uno de los cromosomas extras materno se pierde en la anafase. Nótese que si se pierde el paterno se origina una disomía uniparental.



Esquema 20. Una cigota trisómica por error meiótico II puede restablecer la eudiploidía cuando uno de los cromosomas extras maternos se pierde en la anafase. Nótese que si se pierde el paterno se origina una isodisomía uniparental.



Conclusión

Principales ventajas:

Diagnóstico rápido, en el día, de las aneuploidías estudiadas. Dicho valor se infiere por la cuantificación de los alelos específicos de cada cromosoma estudiado.

Cuando la pareja tiene solo riesgo inherente a la edad, el *screening* de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y adquiere real valor diagnóstico.

Existe la posibilidad de estudiar mayor número de cromosomas, incluso todo el complemento. Esto se torna muy importante cuando se trata del diagnóstico en una sola célula.

Permite descartar o aseverar presuntos mosaicismos en bajo porcentaje sospechados con los métodos convencionales.

Permite detectar disomías uniparentales.

Menor tiempo de entrenamiento para el operador, respecto de las técnicas de cultivo convencionales.

Menor costo que el *screening* de aneuploidías por FISH.

Desventajas:

Contar con el equipamiento y espacio adecuado de un laboratorio de genética molecular.

No analiza estructura cromosómica.

Es dificultosa la identificación de mosaicos cromosómicos. Los mosaicos de trisomía se pueden diagnosticar cuando los progenitores tienen alelos diferentes. En cambio, los mosaicos de monosomías no pueden ser identificados.

Dificultad de interpretación de los resultados en casos de materiales contaminados con otras células y en casos de los diagnósticos prenatales convencionales la contaminación con sangre, motivos por los cuales se aconseja siempre el análisis conjuntamente con los alelos parentales.

Relativo alto costo de los reactivos, respecto de los estudios tradicionales.

Agradecimientos

- Al Dr. Coco, porque además de ser mi maestro y tenerme mucha paciencia, es una gran persona. ¡Gracias Doc!

- A mis viejos, por confiar en mí y en mis proyectos.
- A mis hermanos: Moni, Este y Je por estar conmigo siempre.
- A Judith Mincman por enseñarme y brindarme todo, incluso su amistad. Gracias ¡Ju!
- Especialmente a Fecunditas por facilitarme el laboratorio de biología y genética molecular.
- Al Dr. Julio Diez y a su equipo de colaboradores Biosystems Argentina por su cooperación en la provisión de *primers* fluorescentes.
- A Irma Coco por darme su buena onda y los mejores extendidos.
- A Paola García Estanga por su tiempo y su buena predisposición en este proyecto.
- A Ali, Vale y Feli por estar siempre al pie del cañón como también a Euge, Fabi, Martín, Viole, Elsi, Nico, Anto y a todos lo que forman parte de esta gran familia que es Fecunditas por aguantarme y darme una mano cada vez que la necesito.
- A mis amigos de siempre, de Urdi, de Chivil, de Posadas, de capital por el enorme aguante de todos estos años. ¡Gracias!
- A mi abuela, mis tíos y mis primos por acompañarme en todo.

Bibliografía

- Adinolfi M, Pertl B, Sherlock J: ***Rapid detection of aneuploidies by microsatellite and the quantitative fluorescent polymerase Chain reaction.*** Prenat Diagn 1997; 17:1299-1311.
- Cirigliano V, Voglino G, Cañadas M. P., Lloveras E., Plaja A., Perez M. M., Fuster C. y Egozcue J.: ***Clinical application of multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the rapid prenatal detection of common chromosome aneuploidies.*** Mol Hum Reprod 2001; Oct 7(10):1001-1006.
- Cirigliano V, Voglino G, Cañadas M. P., Marongiu A, Ejarque M, Ordoñez E, Plaja A, Masobrio M, Todros T, Fuster C, Campogrande M, Egozcue J y Adinolfi A.: ***Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment on 18000 consecutive clinical samples.*** Mol Hum Rep 2004; 10: 839-846.
- Coco R: ***Aneuploidy rate in spermatozoa from men with abnormal semen parameters.*** Abstract 11th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy. Buenos Aires 2002 June 3-5.
- Coco R: ***Estimación del riesgo reproductivo en varones con semen anormal usando FISH para las aneuploidías más frecuentes.*** Medicina 2000; 60(5): 818. Abstract.
- Diego-Alvarez D, Garcia-Hoyos M, Trujillo MJ, Gonzalez-Gonzalez C, Rodriguez de Alba M, Ayuso C, Ramos-Corrales C, Lorda-Sanchez I.: ***Application of quantitative fluorescent PCR with short tandem repeat markers to the study of aneuploidies in spontaneous miscarriages.*** Hum Reprod 2005 May; 20(5):1235-1243.
- Goddjin M, Leschot NJ.: ***Genetic aspects of miscarriage.*** Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2000 Oct; 14(5):855-865.
- Hook EB, Hamerton JL: ***The frequency of chromosome abnormalities detected in consecutive newborn studies, differences between studies, results by sex and by severity of phenotypic involvement.*** In Hook EB and Porter IH (eds) Population Cytogenetics. Academic Press, New York, 1977 pp.66-79.
- Howard Carp, Vladimir Toder, Ayala Aviram, Michal Daniely, Shlomo Mashiach and Gad Barkai.: ***Karyotype of the abortus in recurrent miscarriage.*** Fertil Steril 2001 Apr;75(4):678-682.
- Hulten Ma, Dhanjal S, Pertl B: ***Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR.*** Reproduction 2003; 126:279-297.
- Kajii T, et al: ***Anatomic and chromosomal anomalies in 639 spontaneous abortions.*** Human Genetic 1980; 55: 87.
- Kuliev A, Verlinsky Y. Meiotic and mitotic nondisjunction: ***lessons from preimplantation genetic diagnosis.*** Hum Reprod Update 2004 Sep-Oct; 10(5):401-407.
- Lamb NE, Yu K, Shaffer J, Feingold E, Sherman SL.: ***Association between maternal age and meiotic recombination for trisomy 21.*** Am J Hum Genet 2005 Jan; 76(1):91-99.
- Ledbetter, D.H. and Engel, E: ***Uniparental disomy in humans: development of an im-***

- printing map and its implications for prenatal diagnosis.* Hum Mol Genet 1995; 4: 1757-1764.
- Levron J, Aviram-Goldring A, Madgar I, Raviv G, Barkai G, Dor J.: *Sperm chromosome abnormalities in men with severe male factor infertility who are undergoing in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection.* Fertil Steril 2001 Sep; 76(3):479-484.
 - Mann K, Donaghue C, Fox SP, Docherty Z, Ogilvie CM.: *Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy.* Eur J Hum Genet 2004 Nov; 12(11):907-915.
 - Mehdi M, Smatti B, Saad A, Guerin JF, Benchaib M.: *Analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) of the relationship between gonosomal aneuploidy and the results of assisted reproduction in men with severe oligozoospermia.* Andrologia 2006 Aug; 38(4): 137-141.
 - Morison, I.M. and Reeve, A.E : *A catalogue of imprinted genes and parent-of-origin effects in humans and animals.* Hum Mol Genet 1998; 7: 1599-1609.
 - Nagy B, Ban Z, Papp Z : *The DNA isolation methods has effect on allele drop-out and results of fluorescent PCR and DNA fragment analysis.* Clin Chim Acta 2005 Oct;360(1-2):128-132.
 - Nicolini U, Lalatta F, Natacci F, Curcio C, Bui Hung-The: *The introduction of QF-PCR in prenatal diagnosis of fetal aneuploidies: time for reconsideration.* Hum Reprod Update 2004; 10:541-548.
 - Pellestor F, Anahory T, Hamamah S.: *The chromosomal analysis of human oocytes. An overview of established procedures.* Hum Reprod Update. 2005 Jan-Feb;11(1):15-32.
 - Pertl B, Yau SC, Sherlock J, Davies AF, Mathew CG, Adinolfi M: *Rapid molecular method for prenatal detection of Down's.* Lancet 1994 May 14;343(8907):1197-1198.
 - Sato T, Ikuta K, Sherlock J, Adinolfi M, Suzumori K.: *Comparison between fluorescence in situ hybridization (FISH) and quantitative-fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the detection of aneuploidies in single blastomeres.* Prenat Diagn 2003 Aug;23(8):678-684.
 - Schulman JD, Dorfmann A, Evans MI.: *Genetic aspects of in vitro fertilization.* Ann NY Acad Sci 1985; 442: 466-475.
 - Simpson JL, Bombard A T : *Chromosomal abnormalities in spontaneous abortion frequency, pathology and genetic counselling.* Bennet MJ & Edmonds EK (eds). Spontaneous and recurrent abortion. Blackwell Scientific Publication, London. 1987 pp 78-100.
 - Vialard F, Petit C, Bergere M, Gomes DM, Martel-Petit V, Lombroso R, Ville Y, Gerard H, Selva J.: *Evidence of a high proportion of premature unbalanced separation of sister chromatids in the first polar bodies of women of advanced age.* Hum Reprod 2006 May; 21(5):1172-1178.