

SCREENING DE ANEUPLOIDÍAS POR PCR FLUORESCENTE

Por

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

Fecunditas-Instituto de Medicina Reproductiva-
afiliado a la Universidad de Buenos Aires

RESUMEN

Screening de Aneuploidías por PCR Fluorescente

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=23), productos de abortos espontáneos (n=19) y mortinatos (n=8).

Los resultados del mencionado screening de aneuploidías fueron comparados con los obtenidos por citogenética convencional.

La gran concordancia hallada entre el screening y el citogenético para esos cromosomas legitiman su utilización para el screening de aneuploidías, fundamentalmente, en parejas que tienen riesgo de aneuploidías.

ABSTRACT

Screening of Chromosome Aneuploidies by Fluorescent PCR

The fluorescent PCR allows us to enumerate specific chromosomes or inclusive all of the complement using fluorescent microsatellites (STRs) of such chromosomes. 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, 23 amniotic fluid, 19 products of spontaneous abortions and 8 fetal blood of stillbirths.

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

INTRODUCCIÓN

La aneuploidía numérica es la anomalía cromosómica más frecuente en humanos. Ocurre en no menos del 5% de los embarazos reconocidos clínicamente.

El incremento de la edad materna es el factor etiológico más importante asociado con aneuploidías, como así también la mala calidad espermática en los varones, independiente de la edad.

Si bien la edad materna avanzada es la principal causa de aneuploidía, la mayoría de los nacidos con trisomías nacen 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 ecográfico y bioquímico para tamizar a las mujeres con más posibilidades de embarazos aneuploides, ofreciéndoles la posibilidad de los diagnósticos prenatales convencionales a aquellas con mayor riesgo. Pero los resultados de dichos estudios demandan varias semanas. Por este motivo, se están desarrollando metodologías que permitan la obtención de los resultados más rápidamente, con similar certeza diagnóstica que los convencionales. (Hulten et al, 2003; 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 las parejas jóvenes con riesgo aumentado de aneuploidías y además su aplicación en el estudio de los abortos espontáneos y mortinatos.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se estudiaron muestras provenientes de 23 amniocentesis, 7 vellosidades coriónicas, 19 productos de abortos y 8 sangres fetales.

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 por PCR fluorescente. Para interpretar las electroforesis capilares se analizaron los alelos parentales.

Extracción del ADN

La extracción de ADN de las diferentes muestras se realizaron siguiendo las recomendaciones del Kit de Promega Wizard Genomic DNA purificationtm

Amplificación de los STRs marcados

Se realizaron PCRs múltiples con los siguientes STRs:

D13S631, D13S284, D18S386, D18S1145, D18S66, D21S11, D21S1412, D21S268, D21S1411, D22S280, D22S283, D22S423, X22(PAR2), AMXY, , DYS393, DYS392, DXS15, DXS1684, DXS1055, DXS1068.

Los protocolos de las PCRs fueron optimizadas en nuestro laboratorio.

Análisis de los amplicones fluorescentes con el software GeneScan 3.7 en un ABI prism 310 de Applied Biosystems

Criterios de Interpretación de los electroferogramas para alelos parentales heterocigotos y distintos::

Monosomía: una sola señal correspondiente a un solo alelo parental.

Disomía: *dos señales fluorescentes pertenecientes cada una a un alelo parental con una relación de señal 1:1.*

Trisomía: *a) tres señales fluorescentes, dos correspondientes a un progenitor y otro correspondiente al otro con una relación de señal 1:1:1.*

Triploidía: *Todos los STRs muestran tres señales con una relación 1:1:1.*

RESULTADOS

Muestras de Líquido Amniótico: el screening evidenció 21 muestras normales, una anormal con tres X y otra con 3 señales para todos los STRs como si fuese una triploidía. Todos coincidieron con el cariotipo, excepto la supuesta triploidía que se trataba de una trisomía 21.

Material de Vellosidades coriónicas: El screening coincidió con el estudio del cariotipo en todos los casos. Solo en uno el screening fue parcialmente informativo.

Material de producto de aborto espontáneo: De 19 muestras una fue trisómica para el 18 y el resto normales, coincidiendo con los que fueron cariotipables..

Material de sangre fetal de mortinatos: De las ocho muestras, seis fueron anormales. Todas coincidieron con el cariotipo. Un caso de doble trisomía 18 y 21 por screening, el cariotipo solo demostró la trisomía 18.

DISCUSIÓN

La enumeración de cromosomas utilizando varios STRs correspondientes a los cromosomas que interesan analizar depende fundamentalmente de la heterocigocidad de los mismos. La eficiencia diagnóstica dependerá de la cantidad

de STRs por cromosoma, siendo lo aconsejable dos o más. La certeza diagnóstica está estrechamente relacionada con la diferente heterocigocidad de los alelos parentales. En el presente trabajo, por una cuestión de costos, hemos comenzado con dos STRs para el cromosoma 13, 22 e Y, tres para 18, cuatro para el 21 y X.

Todas las muestras de líquido amniótico fueron estudiadas por screening y cariotipo. Todas ellas concordaron, excepto una. 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 madre y a uno del padre. Por lo tanto, cuando el material está contaminado con sangre materna, el resultado puede ser no informativo como el presente caso.

De las 7 muestras de vellosidades coriónicas, 6 coincidieron totalmente y una parcialmente, debido a que no amplificaron todos los STRs. Este hallazgo podría deberse a una amplificación preferencial, o bien que la calidad del ADN en esos segmentos hubiese estado alterado. (Nagy et al, 2005).

De los productos de abortos sorpresivamente todos dieron normales para los cromosomas estudiados, excepto uno que fue un varón con trisomía 18. El bajo porcentaje de aneuploidías pudo deberse a varios motivos: a que el material estudiado no fuese el fetal, por no incluir al cromosoma 16, el más frecuentemente hallado en abortos y además porque que la mayoría de los abortos estudiados provinieron de embarazos obtenidos por fecundación in Vitro, donde las triploidías no son transferidas (Diego-Alvarez et al, 2005). Los seis productos que cultivaron bien para el análisis del cariotipo coincidieron con el screening.

De los 8 estudios efectuados en sangre de los mortinatos, seis resultaron anormales, coincidiendo todos con los cariotipos. Uno de los anormales por

screening evidenció una doble trisomía 18 y 21. El cariotipo mostró solo una de ellas, la trisomía 18. Probablemente haya sido un mosaicismo cromosómico 48,XX,+18,+21/47,XX,+18, y que el estudio convencional solo puso de manifiesto la línea con la trisomía 18.

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 la realizada en el presente trabajo, alcanza a tener un real valor diagnóstico sobre el status de los cromosomas estudiados, excepto que la muestra a analizar esté contaminada con células maternas. Para la mayor certeza diagnóstica es necesario 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 además el tipo de error gametogénico o post cigótico que dió lugar a la aneuploidía como así sospechar la existencia de rescates de trisomías, adquiriendo vital importancia cuando se trata de cromosomas con imprinting (Morison et al, 1998). Este punto es sumamente importante y lo diferencia sustancialmente respecto de los estudios convencionales, que no permiten diagnosticar disomías o isodisomías uniparentales.

BIBLIOGRAFIA:

- Cirigliano V, Voglino G, Cañadas M. P., Marongiu A, Ejarque M, Ordoñez E, Plaja A, Massobrio 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.
- 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):1235-43.
- 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.
- 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):128-32

