

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA QF-PCR PARA EL DIAGNÓSTICO DE  
CROMOSOMOPATÍAS EN COSTA RICA**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología para optar al grado de Magister Scientiae en Biología con énfasis en Genética y Biología Molecular

WENDY KARINA MALESPÍN BENDAÑA

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2008

ii

## **Dedicatoria**

Para Mami, Shirley y Ronny, las personas más importantes de mi vida.

## Agradecimientos

Deseo agradecer a todas las personas que colaboraron y me dieron su apoyo para la realización de este trabajo:

*Dra. Isabel Castro:* Le agradezco profundamente que haya confiado en mi para hacer este proyecto, por permitirme ser su tesiaría y compartir conmigo sus conocimientos y experiencia. Gracias por todo su apoyo y por darme la oportunidad de asistir al Workshop de QF-PCR en Barcelona.

*Dr. Marco Vinicio Alvarado:* Por participar en la revisión de este documento y porque gracias a él llego al final de esta tesis llena de salud.

*Dra. Patricia Cuenca:* Por ser parte de mi comité de tesis y por las facilidades en el uso del laboratorio y el equipo de genética del INISA.

*Fernando Ortiz:* Un reconocimiento muy especial para Fernando por todo el apoyo que le brindó a este proyecto, por haber realizado gran parte del análisis citogenético y guardarme siempre alícuotas bien bonitas de las muestras para la tesis, porque de él aprendí muchísimo sobre los cromosomas, y principalmente por su gran amistad y consejos y por tenerme tanta paciencia.

*Programa de Cáncer del INISA:* Mil gracias a Rafaela Sierra, Clas Une y a Vanessa Ramírez por ver en mí a una profesional y darme la oportunidad de trabajar en el Programa durante estos años, y a Warner Alpízar por confiar en mí y llevarme al laboratorio 9 y haberme enseñado a hacer PCRs. Todo lo que he aprendido de ustedes es invaluable. Un gran agradecimiento a Vanessa por su amable, valiosa y enriquecedora revisión de este documento

*Mi familia:* A mi mamá por su amor apoyo en todo momento, por haberme enseñado a leer hace 25 años y a motivarme siempre a estudiar y dar lo mejor de mi. A mi hermana Shirley por ser mi mejor amiga, por compartir todo conmigo. Y a don Joel por su cariño de papá.

*Ronny:* Por todo su amor y comprensión, por estar siempre pendiente de mi y por hacerme tan feliz.

*A mis compañeros y amigos del INISA:* Gracias a todos los que están o han estado en los laboratorios 5 y 9: Rebeca, Zaida, Adriana, Vicky, Maia, Melissa, Andrey y don William por su amistad tan sincera, por hacer tan agradable el trabajo en el laboratorio, por los cafés, almuerzos y fiestas que compartimos y por estar conmigo durante todo este largo y a veces difícil camino para reír, escucharme, aconsejarme y darme siempre el empujón para seguir adelante.

*Don Fede de Biología y Rebeca Campos del CIBCM:* Por haber corrido mis PCRs en los secuenciadores con tanto cuidado y procurando ponerme de primera en la lista de espera.

*Don Rafa y mis amigos del Coro Universitario y del Ensamble Coral Quod Libet:* Por su amistad, por todos los ratos bonitos que hemos pasado cantando y también no cantando, por su interés en este proceso, por ser el mejor remedio contra el estrés y las preocupaciones, y por dejarme comprobar que la Genética y la Música se llevan muy bien.

*Dr. Vincenzo Cirigliano, de General Lab, Barcelona:* Por haberme recibido en su laboratorio y tratarme con tanta amabilidad, por revisar mis resultados y darles el

visto bueno. Gracias a él y a su equipo de laboratoristas por todo lo que aprendí de ellos, que fue de gran importancia para mejorar ese proyecto. ¡Después de regresar de España mis PCR's salieron como las de las revistas!

*Mis profesores de la Escuela de Biología:* Gracias por todo lo que aprendí en sus cursos, tanto los del Bachillerato como de la Maestría. Fueron la base de mi formación académica y profesional.

*Al personal del INISA:* Por toda su colaboración y las facilidades que me brindaron para realizar este proyecto.

*Al Dr. Kay Sander y la enfermera Paula Obando:* Por su colaboración en la Unidad de Perinatología del Hospital Calderón Guardia.

*Al Ministerio de Ciencia y Tecnología:* Por el importante apoyo económico que le dieron a esta investigación.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de Magister Scientiae en Biología con énfasis en Genética y Biología Molecular”.

---

Dra. Henriette Raventós Vorst  
Representante de la Decana  
Sistema de Estudios de Posgrado

---

Dra. Isabel Castro Volio  
Directora de la Tesis

---

Dr. Marco Vinicio Alvarado Aguilar  
Asesor

---

Dra. Patricia Cuenca Berger  
Asesora

---

Dr. Federico Albertazzi Castro  
Representante del Director  
Programa de Posgrado en Biología

---

Wendy Karina Malespín Bendaña  
Candidata

## Índice

<b>Dedicatoria</b>	<b>ii</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>iii</b>
<b>Hoja de aprobación</b>	<b>vi</b>
<b>Índice</b>	<b>vii</b>
<b>Resumen</b>	<b>viii</b>
<b>Lista de cuadros</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>x</b>
<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>xi</b>
<b>Estado actual del conocimiento</b>	<b>1</b>
<b>Justificación del estudio</b>	<b>33</b>
<b>Objetivos</b>	<b>36</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>37</b>
<b>Resultados</b>	<b>46</b>
<b>Discusión</b>	<b>57</b>
<b>Conclusiones y recomendaciones</b>	<b>71</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>74</b>

## Resumen

**Introducción.** Las cromosopatías autosómicas más frecuentes son las trisomías de los cromosomas 21, 18 y 13. En Costa Rica, el diagnóstico de anomalías cromosómicas fetales y neonatales se realiza solo mediante el análisis citogenético convencional de cromosomas obtenidos de cultivos celulares, tanto de amniocitos como de linfocitos de sangres fetales y neonatales. Además de que la espera por los resultados puede ser larga, con alguna frecuencia fracasa el cultivo por contaminación o mala calidad de la muestra o las figuras mitóticas no se pueden analizar. La QF-PCR permite el diagnóstico fiable y rápido de cromosopatías mediante la amplificación de STRs específicos para cada cromosoma en una PCR fluorescente y su posterior análisis en un secuenciador genético. Esta técnica ha sido validada en varios laboratorios europeos y en los Estados Unidos, y ha demostrado ser un excelente complemento del análisis citogenético convencional, por lo que sería muy valioso contar con la QF-PCR en Costa Rica.

**Objetivo.** Validar la QF-PCR para el diagnóstico prenatal y posnatal de aneuploidías de los cromosomas 21, 18 y 13.

**Metodología.** Se diseñaron tres PCRs multiplex para amplificar cuatro distintos STRs de cada uno de los cromosomas 21, 18 y 13. Se colectaron 129 muestras entre líquidos amnióticos, sangres fetales y neonatales y restos de abortos espontáneos, llegadas al INISA entre el 2006 y el 2008 con solicitud de análisis cromosómico. Los datos de la QF-PCR fueron comparados con los resultados del análisis cromosómico convencional. Se calcularon los parámetros de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos para validar la técnica.

**Resultados.** La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo fueron 96%, 100%, 100% y 98% respectivamente. La QF-PCR identificó correctamente todas las aneuploidías de los cromosomas 21 (n= 20) y 18 (n=6), así como a todos los individuos sin cromosopatía. Sin embargo, no se identificó un mosaico, mos 47,XX +13/46,XX, el cual se diagnosticó como libre de cromosopatía. No se pudo obtener el cariotipo en el 24% de las muestras, por fracaso en el cultivo o ausencia de figuras mitóticas analizables. Se logró realizar el análisis de STRs en el 77% de las muestras en las que no se pudo realizar el cultivo celular, en todos los tipos de muestras colectadas. No hubo falsos positivos. Los marcadores STRs utilizados mostraron diferencias en los porcentajes de heterocigosis con respecto a los utilizados como referencia, pero no hubo muestras no informativas para todos los STRs.

**Conclusión.** La QF-PCR demostró ser una metodología sencilla, fiable y rápida, por lo que podría convertirse en una herramienta complementaria del análisis cromosómico convencional. La obtención de resultados rápidos en casos de diagnóstico prenatal podría disminuir el período de ansiedad parental por la espera de los resultados, así como permitir un mejor abordaje terapéutico de los fetos afectados. Se recomienda hacer análisis con más marcadores para los cromosomas 21, 18 y 13, como e incluir además los cromosomas X y Y, y así permitir el diagnóstico de aneuploidías en los cromosomas sexuales.



## Lista de cuadros

<b>Cuadro 1:</b> Parámetros de un ensayo diagnóstico calculados por comparación con un patrón oro en un estudio de validación	32
<b>Cuadro 2:</b> Tipo de indicación para realizar las amniocentesis y cordocentesis	38
<b>Cuadro 3:</b> Detalles de los primers utilizados en las QF-PCRs multiplex	44
<b>Cuadro 4:</b> Cariotipos anormales según el tipo de muestra biológica	46
<b>Cuadro 5:</b> Cariotipos fetales patológicos e indicaciones para realizar la amniocentesis o cordocentesis	47
<b>Cuadro 6:</b> Total de muestras con QF-PCR exitosa	48
<b>Cuadro 7:</b> Casos sin cariotipo con resultado de la QF-PCR	51
<b>Cuadro 8:</b> Comparación de los resultados de la QF-PCR con el resultado citogenético	52
<b>Cuadro 9:</b> Desempeño de la QF-PCR	54
<b>Cuadro 10:</b> Porcentajes de heterocigosis de los marcadores utilizados en la QF-PCR	55
<b>Cuadro 11:</b> Patrones alélicos de los marcadores utilizados en el diagnóstico de los casos de trisomías 21 y 18	56
<b>Cuadro 12:</b> Comparación de los datos de validación de la QF-PCR en varios países	59
<b>Cuadro 13:</b> Comparación de los porcentajes de heterocigosis encontrados con los de la referencia de la literatura	67

## **Lista de figuras**

<b>Fig. 1.</b> Cromosomas de una mujer normal, 46, XX	16
<b>Fig 2.</b> FISH	18
<b>Fig. 3.</b> Electroforetograma del marcador D21S11 para el diagnóstico de Síndrome de Down	23
<b>Fig.4</b> Localizaciones cromosómicas de los STRs analizados	41
<b>Fig. 5.</b> Diagnóstico prenatal de trisomía 18 por QF-PCR	48
<b>Fig. 6.</b> Diagnóstico prenatal de un feto diploide normal para los cromosomas 21, 18 y 13	49
<b>Fig. 7.</b> QF-PCR del cromosoma 18 para una muestra de líquido amniótico con presencia macroscópica de sangre	56

## **Lista de abreviaturas**

**A:** Adenina

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**C:** Citocina

**CGH:** Hibridación Genómica Comparativa

**EMA:** Edad Materna Avanzada

**FISH:** Hibridación in situ fluorescente

**G:** Guanina

**INISA:** Instituto de Investigaciones en Salud

**Mb:** Mega bases ( $10^6$  bases)

**μl:** microlitro ( $10^{-6}$  L)

**ml:** mililitro ( $10^{-3}$  L)

**MVC:** Muestreo de Velloidades Coriónicas

**pb:** pares de bases

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**pmol:** picomol ( $10^{-9}$  mol)

**QF-PCR:** PCR Cuantitativa Fluorescente

**STR:** Repeticiones cortas en tándem

**T:** Timina

**T13 :** Trisomía 13

**T18 :** Trisomía 18

**T21 :** Trisomía 21

**DESCRIPTORES:** Validación, QF-PCR, cromosomopatías, diagnóstico prenatal y posnatal, Costa Rica

## **ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO**

### **Anomalías cromosómicas**

Los defectos cromosómicos son una causa importante de enfermedad y mortalidad en el feto y el neonato. Se estima que un 50% de los abortos espontáneos y de 5 a 7% de los mortinatos son provocados por cromosomopatías. Además, cerca del 0,3% de todos los nacidos vivos son aneuploides (Crow 2000). De estas anomalías, el grupo más grande es el de variaciones numéricas de los cromosomas 21, 18, 13 y los cromosomas sexuales (X y Y) Juntas representan más de 95% de todas las aneuploidías de los nacidos vivos (Vogel & Motulsky 1997). La mayoría de estas anomalías corresponden a las trisomías, que son causa de abortos recurrentes, muerte neonatal, malformaciones congénitas, así como retardo mental y del desarrollo. Solamente para la trisomía 21 y para algunas aberraciones que involucran a los cromosomas sexuales hay un número significativo de sobrevivientes más allá del año después del nacimiento (Klug & Cummings 1999).

#### **Trisomía 21 (Síndrome de Down)**

Una copia extra del cromosoma 21 es la causa del síndrome de Down, que ocurre en alrededor de 1 en 800 nacidos vivos (Roizen y Patterson 2003). El riesgo de tener un niño con trisomía 21 se incrementa con la edad de la madre, a los 20

años, la probabilidad es de 1 en 1500 nacimientos, mientras que a los 43 años la probabilidad aumenta a 1 en 50 (Cuckle 2005).

Las personas con síndrome de Down poseen características anatómicas y fisiológicas especiales como extremidades cortas, retardo mental (que varía de leve a moderado), defectos cardiacos, malformaciones en el tracto gastrointestinal y problemas oftalmológicos (Roper *et al.* 2006). Además, los afectados por este síndrome poseen un riesgo acrecentado de desarrollar leucemia, sordera y enfermedad de Alzheimer en edades tempranas (Patterson & Costa 2005).

### **Trisomía 18 (Síndrome de Edwards)**

Es el segundo síndrome por trisomía más común después del síndrome de Down, con una incidencia aproximada de 1 en 6000 nacidos vivos (Matthews 1999). La media de supervivencia varía entre los 2, 5 a los 70 días (Rasmussen *et al.* 2003). Se han observado más de 130 anomalías diferentes en los neonatos con trisomía 18; las principales incluyen bajo peso al nacer, orejas de implantación baja, micrognatia, malformaciones cardiacas y en las extremidades, talones prominentes y retardo mental profundo (Vogel & Motulsky 1997).

### **Trisomía 13 (Síndrome de Patau)**

La trisomía del cromosoma 13 es la causa del síndrome de Patau, que ocurre en cerca de 1 en 12 000 nacimientos. La supervivencia varía entre los 2, 5 días y los 4 meses (Rasmussen *et al.* 2003). El neonato presenta múltiples defectos entre ellos holoprosencefalia, microcefalia, polidactilia, malformaciones nasales, labio leporino, paladar hendido, riñones poliquisticos y retardo mental severo.

## **Anomalías de los cromosomas sexuales**

Muchas variaciones en el complemento de cromosomas sexuales son compatibles con la vida; cada condición tiene su propio conjunto de características. La monosomía del cromosoma X o síndrome de Turner se presenta en 1 de cada 5000 niñas nacidas vivas (Vogel & Motulsky 1997). Características de este síndrome son baja estatura, cuello ancho y con pliegues característicos, ovarios rudimentarios, y algunas afectadas pueden presentar defectos cardíacos (Klug & Cummings).

El síndrome de Klinefelter (47, XXY) afecta a 1 en 1000 varones nacidos vivos, pero usualmente se detecta hasta que el paciente alcanza la pubertad, cuando se manifiestan características como extremidades anormalmente largas, genitales pequeños, distribución femenina de tejido adiposo incluyendo ginecomastia y retardo mental leve (Bojesen *et al.* 2003)

## **Etiología de las trisomías cromosómicas**

### **a) No disyunción en meiosis**

La no disyunción meiótica es la separación errónea de los cromosomas homólogos a polos opuestos de la célula, lo cual resulta en la producción de gametos con un número incorrecto de cromosomas. Cuando un gameto normal fertiliza o es fertilizado por un gameto que tiene un cromosoma extra, el resultado es un cigoto trisómico. Las anomalías cromosómicas se originan predominantemente en las meiosis femeninas, principalmente en meiosis I (Kuliv & Verlinsky 2004). Se ha sugerido que el incremento relacionado con la edad en la incidencia de trisomías

comunes está determinado por una reducción de la recombinación meiótica, lo cual resulta en una separación prematura de los bivalentes y en no disyunción (Hassold & Sherman 2000).

### **b) Mosaicismo**

Es el resultado de una no disyunción que ocurre postfertilización en células somáticas; ésta origina la presencia de dos o más líneas celulares cariotípicamente diferentes, de manera que algunas líneas celulares tienen el número normal de cromosomas, mientras que otras son trisómicas o monosómicas. Dependiendo del momento de la no disyunción en la embriogénesis, el número de líneas celulares o tejidos afectados puede variar grandemente (Grati *et al.* 2005). Los mosaicismos con trisomías de los cromosomas 21, 18 y 13 usualmente producen una expresión clínica parcial del fenotipo (Matthews 1999). El mosaicismo con una línea celular normal es uno de los factores que contribuye a la supervivencia de fetos aneuploides (McFadden & Friedman 1997).

### **c) Translocación**

Una translocación es el cambio de un cromosoma o de un segmento cromosómico de su localización normal y su reubicación en otro cromosoma. La translocación es balanceada si la célula contiene dos copias completas y funcionales de todo el material cromosómico. En una translocación desbalanceada, el reordenamiento del material cromosómico resulta en una trisomía o monosomía completa o parcial (Vogel & Motulsky 1997).

Las translocaciones robertsonianas son la fusión céntrica de dos cromosomas acrocéntricos (de los grupos D y G). En la meiosis estos cromosomas forman

trivalentes, por lo que la segregación puede formar gametos nulisómicos o disómicos para uno de los cromosomas involucrados, así que en consecuencia, el cigoto puede ser monosómico o trisómico para uno de los cromosomas implicados (Vogel & Motulsky 1997).

Las translocaciones robertsonianas más comunes son las de los cromosomas 13 y 14, con el potencial de producir un feto con trisomía 13, y de los cromosomas 14 y 21, que podrían producir un feto con trisomía 21 (Scriven 2001).

### **Diagnóstico de cromosopatías**

El diagnóstico precoz de cualquier defecto cromosómico en el feto es de vital importancia, ya que así será posible valorar la posibilidad de tratamiento intrauterino, interrupción del embarazo o preparación del núcleo familiar y del personal de salud, para la atención óptima del neonato afectado y así minimizar el daño y mejorar el tratamiento o rehabilitación (Castro *et al.* 2000).

De igual manera, la identificación oportuna de cromosopatías en el recién nacido permite una atención más rápida y adecuada, así como la posibilidad de intervenciones quirúrgicas u otros tratamientos necesarios. Por ejemplo, la identificación de trisomía 21 en un recién nacido permite el reconocimiento temprano y tratamiento de alguna posible enfermedad cardíaca congénita. Algunos diagnósticos pueden realizarse de manera sencilla, ya que se reconocen fácilmente, sin embargo, algunas condiciones, pueden ser difíciles de identificar en el neonato (Centeno *et al.* 2001).



## **Tamizaje prenatal**

El tamizaje o cribado es la identificación, entre individuos aparentemente sanos, de aquellos que tienen riesgo suficiente de un trastorno específico, como para justificar una prueba o procedimiento diagnóstico subsecuente, o en algunas circunstancias, acción preventiva directa (Wald *et al.* 1998).

Por el riesgo que implican, su elevado costo y la insuficiencia de centros calificados donde realizarlas, las pruebas de diagnóstico prenatal no pueden ofrecerse a todas las embarazadas, lo cual hace imprescindible una selección o tamizaje de las gestaciones de alto riesgo, basándose en varios criterios, como los que se enumeran a continuación

### **1. Edad materna**

La edad materna avanzada (EMA) es la indicación más frecuente para realizar una prueba de diagnóstico prenatal invasiva. En la mayoría de los países se considera que la EMA es a los 35 años, cuando el riesgo para el síndrome de Down es de 1/400. Este riesgo aumenta a 1/100 a los 40 años y a 1/40 a los 44 años.

La EMA como criterio único detecta solo un 30% de los fetos con trisomía 21. Además, aunque las mujeres con EMA tienen más probabilidades de tener un hijo con síndrome de Down, la mayoría de los niños con esta enfermedad nacen de madres más jóvenes, debido al hecho de que hay más nacimientos antes de los 35 años (Anónimo 2007).

## **2. Hallazgos anormales en el ultrasonido**

La ecografía permite detectar algunas alteraciones estructurales y analizar los llamados marcadores ultrasonográficos de cromosomopatías. Uno de los más importantes es la translucencia nucal, que es un acúmulo fisiológico y transitorio de líquido en la región de la nuca fetal, que procede embriológicamente del sistema linfático paracervical (Chitty *et al.* 2006). Su medida expresada en milímetros (mm), se realiza en el plano sagital entre la parte externa del hueso occipital y la parte interna de la piel en la zona nucal. Se considera que hay un riesgo aumentado cuando entre las semanas gestacionales 10 a 13, la medida se encuentra por encima de 2,5 a 3 mm (Nicolaidis 2004). Existe una correlación positiva entre el valor de la translucencia nucal y la incidencia de cromosomopatía (a mayor medida, mayor riesgo).

Hay otros marcadores que se asocian a alguna aneuploidía en particular. Por ejemplo, el examen por ultrasonido de un feto con trisomía 18 puede mostrar polihidramnios u oligohidramnios, mielomeningocele, quiste del plexo coroideo, hidrocefalia, hernia diafragmática y restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) entre otros hallazgos (Matthews 1999). En un feto con trisomía 13 es posible encontrar RCIU, anomalías renales, craneofaciales y de la pared abdominal, polihidramnios u oligohidramnios y manos y pies malformados (Matthews 1999). En los fetos con trisomía 21, aproximadamente en 75% se observa translucencia nucal aumentada, y en 70% está ausente el hueso nasal, además de húmero corto, higroma quístico y defectos cardiacos (Nicolaidis 2004).

## **3. Marcadores bioquímicos en el suero materno**

El tamizaje bioquímico implica la toma de una muestra de sangre de una mujer embarazada en un período específico de la gestación y la cuantificación de los niveles de determinados marcadores bioquímicos en el suero (Anónimo 2007). Los marcadores en suero que se han utilizado para el tamizaje del síndrome de Down entre las semanas 15 y 22 de gestación son la  $\alpha$ -fetoproteína (AFP), el estriol no conjugado ( $uE_3$ ), la gonadotropina coriónica humana (hCG) y sus subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y la inhibina dimérica A (Wald *et al.* 1998).

La llamada prueba triple consiste en la medición de AFP,  $\beta$ -hCG y  $uE_3$  entre las semanas 15 y 19 del embarazo. En un feto con síndrome de Down, los niveles de  $\beta$ -hCG están elevados, y los de los otros dos marcadores están disminuidos. La prueba triple junto con la edad materna puede detectar entre 57 a 90% de los fetos con trisomía 21 (Natarajan & Klein 2006). En Costa Rica, solamente se está utilizando parcialmente el tamizaje por marcadores bioquímicos en el nivel de atención privado (Castro 2004).

#### **4. Riesgo de patología fetal cromosómica, genética o ambiental**

**a) Aneuploidía previa.** Un niño previo con síndrome de Down u otra trisomía o defecto congénito aumenta ligeramente el riesgo de recurrencia en un embarazo posterior. El riesgo varía en función de si existe o no una alteración cromosómica en uno de los padres. En caso de tratarse de una trisomía libre, como ocurre en la mayoría de los casos, el riesgo de recurrencia no supera el 1%, pero la carga de ansiedad de estas parejas con el antecedente de un hijo afectado puede justificar la realización de una prueba invasiva (Dallaire 2002).

- b) **Rearreglos cromosómicos parentales.** Si uno de los padres es portador de una translocación balanceada o una inversión cromosómica, se incrementa el riesgo de gestar un feto anormal, y esto puede evidenciarse como pérdidas gestacionales recurrentes o como el nacimiento de un neonato afectado.
- c) **Diagnóstico molecular de ADN.** Si los padres padecen o son portadores de alguna enfermedad de herencia mendeliana u otro mal genético como el síndrome del cromosoma X frágil, la corea de Huntington o la distrofia miotónica, es posible realizar un diagnóstico prenatal que permita la detección de dichos defectos (Vogel & Motulsky 1997).
- d) **Exposición a agentes teratogénicos durante el primer trimestre de gestación.** Si la madre tuvo una enfermedad infecciosa (rubéola, toxoplasmosis, varicela) o estuvo expuesta a drogas, medicamentos o radiaciones, se incrementa el riesgo de malformaciones fetales, por lo que se recomienda realizar una prueba invasiva.

### **Técnicas de diagnóstico prenatal de alteraciones cromosómicas**

Los factores de riesgo son lo que determinan que en una embarazada, además de las pruebas de control prenatal rutinario, sea aconsejable efectuar pruebas de diagnóstico o tamizaje específicas. Los procedimientos diagnósticos implican una evaluación directa de células o tejidos fetales, por medio de análisis citogenéticos, moleculares o bioquímicos realizados a células cultivadas o no cultivadas (Agnieszka *et al.* 2007).

#### **A) Pruebas no invasivas**

## **Células fetales en sangre materna**

Durante la gestación se han encontrado varios tipos de células fetales circulando en la sangre materna, como trofoblastos, granulocitos, linfocitos y eritrocitos nucleados; en estos últimos, la identificación de hemoglobina fetal permite la distinción inequívoca de las células maternas de las del feto. Una vez identificadas, estas células pueden utilizarse para el diagnóstico de aneuploidías fetales, por métodos como FISH o PCR (Samura *et al.* 2001). Sin embargo, estas células son poco comunes, ya que existen de una a seis células fetales por mililitro de sangre materna (Bishoff *et al.* 2005), aunque se ha reportado un incremento en su número en la sangre materna en casos de aneuploidía fetal o preeclampsia (Gussin & Elias 2002).

## **B) Pruebas invasivas**

Implican la toma directa de una muestra biológica derivada del cigoto o del medio inmediato en que se desarrolla o líquido amniótico. La obtención del tejido fetal puede hacerse de diversas maneras; cada una conlleva riesgos diferentes, tanto para la madre como para el feto, que pueden ir desde infecciones hasta muerte fetal.

### **1. Amniocentesis**

El método más utilizado de diagnóstico cromosómico fetal es el realizado mediante amniocentesis y cultivo de las células fetales descamadas en el líquido amniótico, que se utiliza para obtener el cariotipo fetal. La amniocentesis consiste en la aspiración de unos 20-30 ml de líquido amniótico por medio de una jeringa que se introduce de forma transabdominal. El ultrasonido es indispensable tanto para

asegurar la viabilidad fetal, como para localizar la placenta y el pozo de líquido, cuya profundidad es medida en relación con la pared abdominal (Boué 1995).

La toma de la muestra puede ser hecha a partir de las semanas 14-16 de gestación, cuando la tasa de células viables contra muertas es mayor, aunque también es posible realizar una amniocentesis temprana entre las semanas gestacionales 10-14, pero es técnicamente más complicada y, sólo se puede extraer 1ml de líquido por cada semana de embarazo, ya que hay mayor riesgo de pérdida fetal (Castro *et al.* 1995, Priest & Rao 1997).

La amniocentesis es un método relativamente simple e indoloro, que puede ser realizado rápidamente y no requiere hospitalización. Es un procedimiento bien establecido, que implica poco riesgo para el embarazo. Sin embargo, por tratarse de un método invasivo, las cifras de riesgo reconocidas internacionalmente, indican que hay pérdida fetal en el 0,5 - 1% de los casos (Collins *et al.* 1998, Muller *et al.* 2000). Además puede haber otras complicaciones como dolor en el hipogastrio, sangrado o salida de líquido transvaginal o contracciones uterinas, las cuales son generalmente transitorias (Boué 1995)

## **2. Muestreo de vellosidades coriónicas (MVC)**

El MVC es la técnica más utilizada para la obtención del cariotipo fetal en el primer trimestre, y se realiza entre las semanas 10 y 13 de la gestación, guiado por ultrasonido. Las muestras pueden obtenerse tanto de manera transabdominal o transcervical (Cunniff 2004). A diferencia de la amniocentesis, en la que se obtiene líquido amniótico, el MVC obtiene tejido coriónico de la placenta en desarrollo, que en teoría brinda la misma información genética que las células fetales por derivarse del cigoto (Wilson 2005).

Las vellosidades coriónicas son una muestra más apta que el cultivo de amniocitos, para las técnicas de ADN o las determinaciones enzimáticas. Debido al rápido crecimiento del corion y el abundante número de mitosis, permite el estudio directo de la constitución cromosómica pudiendo ofrecer resultados en 3 - 4 días. Sin embargo, con el MVC puede haber riesgo de pérdida fetal en el 1-3% de los casos (Wapner 2005).

### **3. Cordocentesis**

El muestreo de sangre fetal, del cordón umbilical, arterias o venas, permite hacer diagnósticos sólo realizables con sangre, como deficiencias inmunes, ciertos casos de hemoglobinopatías, hemofilia, infecciones virales y un cariotipo rápido al final del embarazo (Boué 1995).

La cordocentesis se utiliza principalmente para corroborar un diagnóstico proveniente de amniocentesis o de MCV en caso de mosaicismo o hallazgos inusuales. También cuando se necesita un diagnóstico rápido por llegar tarde al cuidado prenatal, o para terapia fetal, como transfusiones de sangre e inyecciones de plaquetas o medicamentos.

Esta prueba se puede realizar a partir de las 18 semanas de embarazo. El cultivo de los linfocitos fetales demora de dos a tres días, el análisis de uno a dos días, por lo que el resultado final se obtiene en aproximadamente cuatro días.

### **Muestras de sangre posnatales**

Entre las principales razones de solicitud de análisis cromosómico están el nacimiento de un niño con sospecha de una cromosomopatía, género indeterminado al nacer y la confirmación de alguna anomalía encontrada durante el diagnóstico prenatal (Anónimo 2007a).

## **Diagnóstico de aneuploidías fetales y neonatales**

### **Cariotipo fetal**

Desde la década de los setentas, el procedimiento estándar para el diagnóstico de aneuploidías es el cariotipo, que implica el estudio del número y la estructura de los cromosomas. El cariotipo es realizado en células en metafase, cuando los cromosomas están más condensados, y puede estar basado en diferentes técnicas de tinción, como los bandeos G, R, Q y C. El tipo más común es el bandedo G, en el cual las células son levemente proteolisadas y teñidas utilizando un colorante llamado Giemsa. Esta tinción tiene gran afinidad por las regiones del ADN ricas en nucleótidos A y T, lo cual produce bandas oscuras en las regiones de los cromosomas donde el contenido de AT es alto (Gustashaw 1997).

Cada cromosoma difiere con respecto a su estructura, tamaño, posición del centrómero, y patrón de bandas G, lo cual permite su identificación individual y por pares, para la construcción de un cariotipo (Fig. 1), con el que se pueden detectar tanto anomalías numéricas como estructurales (translocaciones, deleciones, inversiones) (Richardson 1997).

Los cromosomas metafásicos deben estudiarse en células en división, o en células que han sido estimuladas para dividirse previo a un cultivo. Las muestras obtenidas por amniocentesis o cordocentesis no contienen células fetales en división, por lo que deben ser cultivadas por un mínimo de cinco a siete días para las primeras y tres días para las sangres fetales. Las muestras de MCV sí contienen células en



división, pero los cromosomas no están suficientemente condensados para realizar un cariotipo de buena calidad y resolución (Mann *et al.* 2004).

Una vez que las células en división se han obtenido, se utiliza un agente que detenga la mitosis (como colchicina o Colcemid<sup>®</sup>) para coleccionar las células en metafase. Después las células son procesadas (cosechadas) mediante la aplicación de una solución hipotónica para incrementar el volumen celular, que expande los cromosomas entre sí, y luego se usa metanol-ácido acético para fijarlos para su estudio en láminas (Jennings & Brown 1997).

A pesar de la gran resolución del bandeado G, muchas veces no se detectan duplicaciones o deleciones de menos de 5 Mb (Wolfe & Herrington 1997). Aunado a esto, el cultivo celular tiene la gran desventaja de que es laborioso y las células demoran entre una y tres semanas en crecer lo suficiente. Este lapso a menudo es angustiante para la madre que ha sido sometida a una amniocentesis por presentar algún factor de riesgo para defectos cromosómicos fetales. Además, para realizar un cariotipo fetal es necesario obtener metafases en suficiente cantidad y de buena calidad, lo cual no siempre se logra con éxito.



**Fig. 1. Metafase de una mujer normal, 46, XX (Imagen facilitada por el Laboratorio de Microscopía, INISA)**

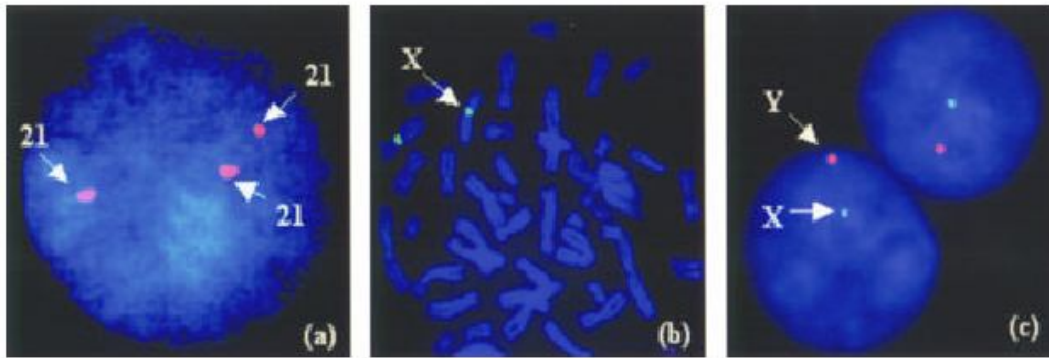
### **Técnicas de biología molecular**

La introducción de técnicas de biología molecular ha proporcionado los medios para estudiar de manera más fina la estructura y segregación de los cromosomas, lo que ha mejorado y facilitado el análisis convencional de los cromosomas. (Pergament 2000). Además, presentan la gran ventaja de que algunas de las técnicas se pueden aplicar en células en interfase, de manera que no es necesario el cultivo celular y el estudio se realiza directamente sobre el material celular, ya sea líquido amniótico u otras muestras. Esto representa un gran ahorro de tiempo y recursos (Wolfe & Herrington 1997).

### **Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)**

La hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), utiliza sondas específicas de ADN marcadas con nucleótidos modificados, que fluorescen directamente o que pueden ser detectados por medio de la unión de una molécula fluorescente reportera. Estas sondas de ADN en hebra sencilla pueden ser hibridizadas no sólo a cromosomas metafásicos, sino también a núcleos en interfase o a células que no se dividen. Las sondas de la FISH pueden detectar regiones tan pequeñas como 0,5 kb en cromosomas metafásicos, en comparación con las técnicas de bandeo, en las cuales la anomalía cromosómica más pequeña que puede ser detectada es de alrededor de 4000-5000 kb (Bui *et al.* 2002). Existen sondas específicas para la identificación individual de los cromosomas, sus brazos, centrómeros, telómeros, bandas o hasta genes (Pergament 2000). Posteriormente y con el filtro apropiado, la señal es detectada en el microscopio (Fig. 2).

La FISH permite la detección de microdeleciones, duplicaciones y translocaciones que involucran regiones teloméricas y subteloméricas. Además, en los últimos años, se han desarrollado varios sistemas de FISH multicolor para una mejor detección de aberraciones cromosómicas. Por ejemplo, el cariotipo espectral (SKY) y multi-FISH (M-FISH) (Shrock *et al.* 1996) están basados en la hibridación simultánea de sondas específicas para los 24 cromosomas humanos, marcadas con diferentes combinaciones de cinco o más fluorocromos.



**Fig 2. Hibridación *in situ* con fluorescencia.** (a) Núcleo en interfase de una muestra de vellosidad coriónica sin cultivar, hibridizada con una sonda específica para el cromosoma 21, que muestra 3 señales que indican trisomía 21. (b) Metafase de una muestra de sangre fetal de un feto femenino, hibridizada con una sonda para los cromosomas X y Y, que muestra dos señales para el X. (c). Núcleo en interfase de una muestra de líquido amniótico hibridizada con una sonda para los cromosomas X y Y que muestra una señal verde y una roja para los cromosomas X y Y respectivamente (Figura tomada de Jobanputra *et al.* 2002)

El M-FISH ha sido utilizado casi exclusivamente en citogenética del cáncer, particularmente en tumores sólidos y líneas celulares derivadas de tejidos neoplásicos. Recientemente, se ha usado para la identificación de cromosomas derivados y cariotipos complejos en amniocitos, sangre periférica y médula ósea (Pergament 2000).

La FISH es una técnica muy informativa y con mucha aplicabilidad, pero presenta varias limitaciones. La primera de ellas es de orden económico, ya que las sondas, microscopios y software que se necesitan tienen un costo muy elevado, de manera que la técnica es asequible solamente a un sector muy reducido de países industrializados (Wachtel & Tharapel 2002). También existen limitaciones técnicas. Por ejemplo, el tamaño de la sonda puede variar desde 100 hasta 150 kb, por lo que podría contener secuencias de ADN repetitivo que serían capaces de hibridizar en muchas posiciones cromosómicas, no solo en la secuencia específica con la que tiene completa homología. Como resultado de este inconveniente se obtendrían falsos

positivos (Findlay *et al.* 1998). La FISH muestra niveles altos de pruebas no informativas en edades gestacionales tardías, debida a la degradación de la cromatina, ya que las sondas no pueden hibridarse adecuadamente (Pertl *et al.* 1997)

### **Hibridación genómica comparativa (CGH)**

La hibridación genómica comparativa (CGH) es otra innovación de la citogenética molecular que se desarrolló en un principio para el diagnóstico de tumores y otras neoplasias, que son tejidos característicamente resistentes al análisis cromosómico convencional. Sin embargo, la técnica puede ser utilizada para casi cualquier caso donde se desee diagnosticar una aberración y se presume que existen pérdida o ganancia de material genético (Bryndorf *et al.* 1995).

La CGH es una hibridación *in situ* de dos genomas a ser comparados, uno anormal (o prueba) proveniente del individuo que se desea diagnosticar, y otro normal (o referencia), que proviene de un individuo cariotípicamente normal (Montgomery *et al.* 1997). Ambas muestras de ADN son marcadas con fluorocromos de colores diferentes, por ejemplo, verde para el ADN prueba y rojo para el ADN de referencia. Una vez marcadas, las dos muestras se mezclan en proporciones 1:1 y se les deja hibridizar sobre láminas de metafases normales. Si no ha habido pérdida o ganancia de ADN en el espécimen de interés, todos los cromosomas emitirán fluorescencia amarilla (por la combinación del rojo y el verde). Las regiones con duplicaciones se detectarán como un exceso de fluorescencia verde, mientras que las que hayan sufrido deleción, se mostrarán en rojo (Pergament 2000).

La aplicación la CGH en genética obstétrica ha sido muy limitada, solo ha sido utilizada con éxito en el análisis genético de productos de la concepción abortados, ya que con frecuencia los tejidos derivados de abortos no crecen en los cultivos, y las sondas de la FISH solo cubren las aberraciones más críticas, es decir, las de los cromosomas 13, 18, 21, X y Y, por lo que probablemente no se detecten otros estados aneuploides que son incompatibles con una gestación viable (Pergament 2000)

El concepto de la CGH es muy simple, pero el equipo y el software requeridos son relativamente más costosos que los análisis estandarizados del FISH (Daniely *et al.* 1999). De manera que tal y como ocurre con la FISH, las limitaciones económicas más que las metodológicas han impedido que estas técnicas hayan sido introducidas para el diagnóstico prenatal en nuestro país, a pesar del desarrollo tan vertiginoso que ha tenido la investigación genética en los últimos años. La solución parece ser una metodología basada en la PCR, asistida por analizadores computarizados de ADN, llamada QF-PCR, que ofrece resultados más rápidos y confiables y a un costo mucho menor.

### **PCR cuantitativa fluorescente (QF-PCR)**

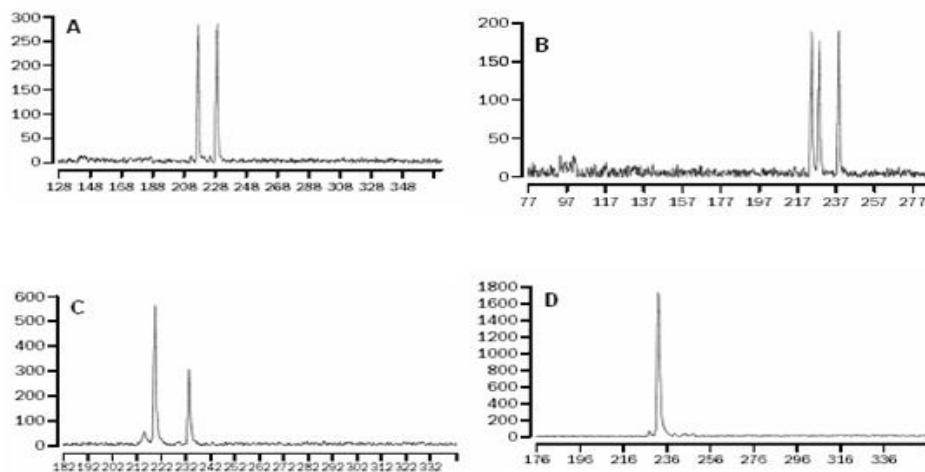
La PCR Cuantitativa Fluorescente (*Quantitative Fluorescent PCR*), conocida también como Amnio-PCR (Verma *et al.* 1998, Levett *et al.* 2001, Leung *et al.* 2003), consiste en la amplificación y cuantificación de regiones específicas de ADN por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando “primers” (iniciadores o cebadores) marcados con fluorescencia, que permiten que un secuenciador de ADN basado en capilares registre los fragmentos de la PCR como

picos de excitación en un gráfico denominado electroforetograma (Nicolini *et al.* 2004). Su uso para la detección de aneuploidías fue reportado por Mansfield en 1993, quien la utilizó para el diagnóstico prenatal del síndrome de Down.

La QF-PCR es un método rápido y eficiente para la detección del número de copias de uno o varios cromosomas por medio de la amplificación de secuencias específicas de ADN altamente polimórficas en longitud entre individuos, denominadas STR (*Short Tandem Repeats*) o microsatélites. Los STRs están presentes en todo el genoma y consisten en secuencias formadas por dos a seis nucleótidos que se repiten varias veces en tándem, formando secuencias de diferentes longitudes. El número de repeticiones de un determinado STR varía de alelo a alelo, lo cual permite la distinción entre ellos (Ochshorn *et al.* 2006). Los STRs, amplificados con esta técnica, brindan información para conocer el número de copias de cada cromosoma. En un individuo normal que tiene diferente número de repeticiones en cada alelo, se observan en el electroforetograma dos picos con una razón de 1:1 por cada región cromosómica analizada, con lo cual el individuo es heterocigoto y se dice que el marcador es informativo. Las trisomías son visualizadas como un pico extra en sujetos triplicados o bien, con una razón de picos 2:1 ó 1:2. Estas razones de picos se calculan con el área y con la altura de los picos (Mann *et al.* 2005).

Para reducir la probabilidad de que alguno de los marcadores no sea informativo, en una QF-PCR siempre deben amplificarse al menos cuatro marcadores diferentes por cada cromosoma; éstos además deben tener índices altos de heterocigosidad para evitar que un solo pico represente homocigosis en lugar de una monosomía (Verma *et al.* 1998, Mann *et al.* 2005).

Una de las características más notables de esta técnica, es la pequeña cantidad de líquido amniótico que se requiere, pues se necesitan de 0,2 a 1 ml para una extracción exitosa de ADN. La extracción se realiza con un método de chelex, que necesita unos 20 minutos por muestra, y es posible extraer ADN de buena calidad a partir de líquido amniótico fresco o congelado, incluso de las células provenientes de los cambios de medio de cultivo de amniocitos. De igual manera y con el mismo protocolo se puede extraer ADN de muestras de vellosidades coriónicas y sangre fetal y neonatal (Mann *et al.* 2005). Este método de extracción de ADN tiene también la ventaja de que se agregan diferentes volúmenes de chelex, dependiendo del tamaño del botón celular, lo cual proporciona concentraciones finales similares de ADN en todas las muestras (Cirigliano *et al.* 2006).



**Fig. 3. Electroforetograma del marcador D21S11 para el diagnóstico de síndrome de Down. A) Individuo normal, que muestra dos alelos de diferente tamaño con picos de igual intensidad. B) Individuo con síndrome de Down, que muestra tres alelos de diferente tamaño. C) Individuo con síndrome de Down que muestra dos picos con una razón de 2:1. D) Marcador no informativo (Imagen tomada de Verma *et al.* 1998).**

Además, contrario a lo que ocurre con la FISH y el cultivo de amniocitos, una edad gestacional tardía no afecta la calidad del análisis. Pertl y colaboradores



(1999) demostraron que la QF-PCR fue informativa en todas las muestras analizadas, a pesar de que algunas superaran las 28 semanas de gestación, de manera que es posible realizar la prueba aunque el cultivo haya fracasado por ausencia de crecimiento celular debido a escasez de células viables o por contaminación con bacterias u hongos, o bien porque no se obtuvieran preparaciones cromosómicas de calidad.

Otra particularidad de la técnica es que al estar automatizada, pueden procesarse varias muestras simultáneamente, lo cual hace posible que el diagnóstico esté listo en 24 horas o menos después de la amniocentesis (Findlay *et al.* 1998, Mann *et al.* 2001). En casos urgentes el resultado puede estar disponible en 5 ó 6 horas (Cirigliano *et al.* 2001).

La QF-PCR presenta varias ventajas con respecto a otras técnicas utilizadas para el diagnóstico prenatal, como la FISH y la CGH. El análisis por STRs de la QF-PCR puede detectar contaminación materna tanto en fetos masculino como femeninos, que se manifiesta como la presencia de dos genotipos (Diego-Álvarez *et al.* 2005). El genotipo fetal se puede distinguir del materno mediante el análisis de una muestra de ADN de la madre (sangre o células bucales) (Cirigliano & Adinolfi 2006). En cambio, la FISH detecta la contaminación materna solo cuando se trata de un feto masculino, y si la prueba diagnóstica una mujer normal, no se puede determinar si la muestra es de origen fetal o materno (Jobanputra *et al.* 2002). Asimismo, el análisis de varios marcadores hace más fiable el resultado que el de la FISH. Adicionalmente, tanto la FISH como la CGH son técnicas más laboriosas, demandan más tiempo y requieren una mayor inversión económica.

La QF-PCR ha sido utilizada con éxito en el diagnóstico prenatal de trisomía 13 (Tufan *et al.* 2005) y de la trisomía 21 tanto completa como parcial (Findlay *et al.* 1998, Verma *et al.* 1998, Blake *et al.* 1999, Valero *et al.* 1999, Lee *et al.* 2004), la evaluación de restos de abortos espontáneos (Diego-Álvarez *et al.* 2005) y la identificación de aneuploidías en células fetales libres circulando en la sangre materna (Pertl & Bianchi 2001, Bischoff *et al.* 2005). Otros autores (Pertl *et al.* 1999b) demostraron que con la QF-PCR se podían detectar, en una sola reacción, las principales aneuploidías en autosomas, es decir, trisomías de los cromosomas 13, 18 y 21. En el año 2000 Schmidt y colaboradores lograron identificar varios STRs en los cromosomas sexuales con altos índices de heterocigosidad, de manera que además de diagnosticar trisomías de los autosomas, se pudo realizar la detección prenatal de los síndromes de Turner y Klinefelter en una única PCR. Posteriormente, otros estudios realizaron análisis con nuevos marcadores para los cromosomas X y Y (Cirigliano *et al.* 2001b, Donaghe *et al.* 2003). En los últimos años se ha utilizado esta prueba múltiple para cinco cromosomas en miles de muestras de líquidos amnióticos, vellosidades coriónicas y sangres fetales (Cirigliano *et al.* 2001a, 2004, 2006 Mann *et al.* 2001).

La Amnio-PCR tiene otras aplicaciones derivadas del diagnóstico de aneuploidías, como la determinación de cigosidad en gemelos en embarazos múltiples (Chen *et al.* 2000, Cirigliano *et al.* 2003). Asimismo, el análisis de STRs en aneuploidías fetales también puede brindar información adicional en las trisomías si se dispone de muestras de los padres, como el origen parental del cromosoma extra y determinar si la no disyunción ocurrió en la meiosis I o II (Valero *et al.* 1999, Diego-Álvarez *et al.* 2005, Machatcova *et al.* 2005).

Por sus resultados más rápidos, confiabilidad, costos inferiores y por ser menos laboriosa que el análisis citogenético convencional, varios autores han propuesto utilizar la QF-PCR como prueba única en casos de embarazos de riesgo alto de síndrome de Down (Leung *et al.* 2003, Ogilvie 2003, Mann *et al.* 2004). Muchos centros europeos y asiáticos realizan abortos selectivos basados solo en los resultados de la amnio-PCR sin esperar la confirmación del cariotipo, por lo que se ha cuestionado la necesidad del análisis citogenético completo en todos los casos.

Ante esta posibilidad, es necesario hacer énfasis en que la mayor limitación de la QF-PCR es que solo detecta las cromosomopatías principales, utilizando deliberadamente un número restringido de STRs seleccionados de los cromosomas que se quieren analizar. Las trisomías 13, 18, 21 y las triploidías representan aproximadamente el 75% de todas las anomalías cromosómicas que pueden diagnosticarse en el cariotipo, por lo que se perderían trisomías poco comunes y la mayoría de duplicaciones y deleciones (Hultén *et al.* 2003). Igualmente, pasarían inadvertidas otras anomalías menos frecuentes o que no involucran cambios de dosis génica, como los reacomodos de material cromosómico (translocaciones, inversiones) que pueden provocar un fenotipo anormal en el niño (Caine *et al.* 2005, Ogilvie *et al.* 2005).

En el caso de las trisomías, a pesar de que se considere suficientemente fiable el resultado de la QF-PCR para tomar la decisión de terminar con el embarazo, es importante la posterior obtención del cariotipo completo para determinar la naturaleza de la trisomía. La información de que se trata de una trisomía libre, o si fue originada por la herencia parental de una translocación robertsoniana, permite

ofrecer asesoría genética para los padres del feto o neonato y estimar el riesgo de recurrencia para futuros embarazos.

Por otra parte, los mosaicismos de trisomías y líneas celulares normales pueden detectarse en una QF-PCR, ya que se evidencian por la presencia de picos extra y razones de alelos distorsionados en un grupo específico de marcadores (Mann *et al.* 2005). Sin embargo, para que pueda diagnosticarse correctamente, la línea anormal debe superar el 30% (Nicolini *et al.* 2004). La detección del mosaicismo también depende del cromosoma involucrado; por ejemplo un mosaicismo con un 50% de células con 45,X y 47,XXX no puede ser detectado por la QF-PCR, ya que parecería ser un feto femenino normal (Cirigliano & Adinolfi 2006). En un estudio de 247 casos, Pertl y col. (1999) encontraron cuatro casos de mosaicismos, tres de los cuales no fueron identificados por QF-PCR.

Así que por lo anterior, es importante la realización paralela de un cariotipo convencional, de manera que en lugar de reemplazar por completo, la QF-PCR sea una herramienta complementaria de la citogenética, ya que ha demostrado ser una técnica confiable para el diagnóstico prenatal y posnatal de cromosopatías. Sus principales ventajas son la rapidez y confiabilidad de la prueba, la independencia de la edad gestacional, su costo económico relativamente bajo y el respaldo de haber sido aplicada con éxito en varios países con muy buenos resultados.

### **Situación del diagnóstico de cromosopatías en Costa Rica**

El Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) cuenta con el único laboratorio del país que realiza cariotipos fetales. Desde el año 1986, se comenzó con el cultivo de amniocitos, y desde 1992 se hacen cariotipos de sangre fetal obtenida mediante cordocentesis (Castro-Volio & Ortiz 2003). Asimismo, se

analizan muestras de sangre de neonatos con fenotipos que sugieren alguna cromosomopatía, principalmente por la presencia de rasgos dismórficos, anomalías congénitas o ambigüedad sexual (Castro-Volio 2004a).

Actualmente, el INISA ofrece el servicio de análisis cromosómico prenatal y posnatal a hospitales públicos y consultorios privados, pero en su mayoría las muestras de líquido amniótico y sangres fetales y neonatales que llegan para ser analizadas provienen de la seguridad social (Castro-Volio *et al.* 1995, 2000, 2001, Castro-Volio & Ortiz 2003). En un estudio de cariotipo de 842 muestras de líquido amniótico obtenidas entre 1986 y 1999, Castro-Volio y colaboradores (2000) mostraron que la amniocentesis para detectar anomalías cromosómicas fue un método seguro y confiable, que puede contribuir a embarazos mejor manejados desde el punto de vista obstétrico y a disminuir la carga de las cromosomopatías desde la perspectiva de la salud pública. De igual manera, señalaron los principales problemas del diagnóstico prenatal en nuestro país: 1) la insuficiencia de recursos del único laboratorio (el INISA) para atender a toda la población de embarazadas con indicación de amniocentesis genética y 2) la prohibición de ofrecer el aborto terapéutico por defecto fetal, ya que está penado por la Ley. Además, se reportó que en el 25% de los líquidos amnióticos recibidos no se pudo obtener el diagnóstico, debido principalmente a la ausencia de crecimiento celular de los cultivos de amniocentesis realizadas en gestaciones tardías (Castro-Volio *et al.* 2001).

Como se comentó anteriormente, hasta la fecha no se cuenta con el apoyo que brindan las técnicas moleculares para el diagnóstico de aneuploidías, por lo que la introducción de una técnica como la QF-PCR, con todas las cualidades descritas, tendría un impacto muy positivo en la detección de cromosomopatías en nuestro país.

## **Validación de ensayos diagnósticos**

La validación es la evaluación de un ensayo diagnóstico con el propósito de determinar qué tan adecuado es el ensayo para un uso particular, así como, predecir con un grado predeterminado de certeza estadística, la probabilidad de que el resultado del ensayo revele la verdadera condición de los pacientes (Anónimo 2008). Así que, la validación de un ensayo proporciona, según Trullols (2006) citando la definición de la ISO, la confirmación por evaluación de evidencias de que los requerimientos para un uso particular han sido cumplidos.

Los métodos desarrollados con la intención de utilizarlos de rutina o para su publicación deben haber sido validados para demostrar objetivamente su aplicabilidad para el uso planeado (Peters *et al.* 2007), por lo que todo laboratorio es responsable de la validación propia de cada ensayo diagnóstico nuevo antes de su introducción para uso clínico, ya que hay que determinar si las condiciones mencionadas en la literatura son extrapolables a cualquier entorno, tanto a la población, a la tecnología aplicada, infraestructura y destreza de los investigadores (Bellmunt-Montoya 2007). Esto incluye tanto a los “kits” comerciales, como ensayos desarrollados en el laboratorio de forma interna (Anónimo 2003)

Para que una prueba diagnóstica sea validada, sus resultados deben ser comparados con un estándar de referencia aceptado; éste es el mejor método disponible para determinar la presencia o ausencia de la condición o enfermedad de interés (Rutjes *et al.* 2007). Por ejemplo, el análisis citogenético está considerado como el “estándar o patrón de oro” para el diagnóstico cromosómico (Bui *et al.* 2002, Hultén *et al.* 2003, Nicolini *et al.* 2004). Esta comparación debe ser “ciega”, es decir, que el examinador no conozca los resultados del “patrón oro” mientras efectúa

la prueba que se está evaluando, para evitar sesgos en la interpretación (Greenhalgh 1997). La concordancia entre el valor encontrado por el ensayo en evaluación y el dado por el “patrón oro” es la fiabilidad del ensayo (Rutjes *et al.* 2007).

El objetivo de la validación es definir un ensayo en términos de parámetros estadísticos cuantificables (Cuadro 1). La declaración de “ensayo validado” se alcanza cuando éste ha sido definido en términos de su capacidad de clasificar a las muestras biológicas de los pacientes de acuerdo con la presencia o ausencia de una variable particular. Así que con respecto a una enfermedad, un ensayo es válido si detecta a la mayoría de los afectados (sensibilidad alta), excluye a la mayoría de las personas sin la enfermedad (especificidad alta), si una prueba positiva indica que la enfermedad está presente (valor predictivo positivo alto) y si una prueba negativa indica ausencia de la enfermedad (valor predictivo negativo alto) (Greenhalgh 1997). Adicional a la validación, es deseable que la prueba sea de ejecución rápida, segura, sencilla, inocua para el paciente, confiable y de bajo costo.

Según varios autores, la validación de un ensayo tiene varias etapas o procesos:

- 1. Estudio de factibilidad.** Es necesario verificar la necesidad de un nuevo ensayo, sus ventajas en relación con las pruebas existentes, así como los costos y beneficios de la introducción del nuevo ensayo para los pacientes, tanto a nivel individual como de salud pública (Bellmunt-Montoya 2007).
- 2. Proceso experimental.** Los reactivos y protocolos deben ser optimizados por experimentación y estandarización para detectar el analito de interés con exactitud y precisión. Cuando se trata de la validación de un método de PCR, la recolección de la muestra, su preparación, transporte y los métodos de extracción de ácidos nucleicos son parámetros críticos para la

estandarización del ensayo. De igual manera, todo el equipo utilizado durante el proceso (termocicladores, micropipetas, incubadoras, etc.) debe ser mantenido y calibrado adecuadamente (Anónimo 2008).

- 3. Determinación del rendimiento del ensayo.** Si los estudios de factibilidad y estandarización indican que el ensayo tiene el potencial de ser aplicado, el siguiente paso es el cálculo de los parámetros de su rendimiento (Jacobson 1996). La sensibilidad, especificidad y el valor predictivo (Cuadro 1) son los parámetros primarios que se obtienen durante el proceso de validación de un ensayo. Sin embargo, otros parámetros pueden ser importantes para la evaluación del nuevo ensayo, como la reproducibilidad, la repetibilidad y la robustez.

La reproducibilidad y repetibilidad son estimados de la precisión de un ensayo. La precisión es una medida de la dispersión de los resultados de una muestra evaluada repetidamente; poca dispersión indica un ensayo preciso. La repetibilidad es la coherencia entre los replicados de una muestra evaluados en una misma aplicación del ensayo. La reproducibilidad es la concordancia entre resultados de muestras evaluadas en diferentes laboratorios utilizando un ensayo idéntico (protocolo, reactivos y controles) (Jacobson 1996).

La robustez es una medida de la susceptibilidad de un método a cambios pequeños que pudieran ocurrir durante las condiciones de rutina en las variables, como la temperatura, pH o preparación de las muestras, por lo cual ofrece una estimación de la fiabilidad del ensayo cuando se realiza en condiciones estándar (Anónimo 2003).



**4. Mantenimiento, enriquecimiento y acumulación del proceso de validación.** Un ensayo validado necesita monitoreo y mantenimiento constante para conservar tal nominación. Una vez que la prueba se utilice de rutina, deben realizarse controles periódicos tanto internos como externos, ya que la confianza en la validez de un ensayo se incrementa con el tiempo, cuando su uso confirma que es robusto (Jacobson 1996).

**Cuadro 1. Parámetros de un ensayo diagnóstico calculados por comparación con un patrón oro en un estudio de validación**

<b>Parámetro</b>	<b>Definición</b>	<b>Interpretación</b>
<b>Sensibilidad</b>	Proporción de individuos afectados que son positivos para la prueba	Capacidad de la prueba para diagnosticar correctamente a los individuos enfermos
<b>Especificidad</b>	Proporción de individuos no afectados que son negativos para la prueba	Capacidad de la prueba para diagnosticar correctamente a los individuos sanos
<b>Valor predictivo positivo</b>	Proporción de enfermos entre las personas con resultados positivos para la prueba	Probabilidad de que el individuo esté afectado si la prueba es positiva
<b>Valor predictivo negativo</b>	Proporción de individuos sanos entre las personas con resultados negativos para la prueba	Probabilidad de que el individuo esté sano si la prueba es negativa

### **Justificación**

Aunque existen a nivel mundial varios métodos moleculares para el diagnóstico de cromosomopatías fetales y posnatales, sus elevados costos económicos han impedido que puedan implementarse en nuestro país de manera

habitual. Es necesario contar en Costa Rica con una metodología eficiente, rápida, fiable y de bajo costo que se ajuste tanto a nuestras necesidades como a nuestras posibilidades. Además de todas sus ventajas, la QF-PCR es una técnica más económica en comparación con otras metodologías (FISH, CGH, microarreglos), si se cuenta con un analizador genético, que sería la inversión más alta.

La QF-PCR ha demostrado ser una metodología muy eficiente como complemento del análisis cromosómico tradicional, ya que puede suplir las carencias de este último. Mientras que la citogenética convencional necesita de células vivas para hacer los cultivos, el análisis de ADN puede proveer resultados con gran eficiencia independientemente de la viabilidad y antigüedad de la muestra. Por esto, la QF-PCR es especialmente útil en muestras en las que fracasó el cultivo por escasez de células viables por su edad gestacional, infección por hongos o bacterias o por contaminación con la sangre materna, en casos de amniocentesis, o bien, por problemas de coagulación de las muestras en los casos de cordocentesis o sangres neonatales. Los cultivos de restos de abortos espontáneos son muy propensos al fracaso por contaminaciones o por deterioro de la muestra, pero la extracción de ADN es posible en tejidos frescos, congelados o dañados por la demora en su llegada al laboratorio (Diego –Álvarez *et al.* 2005).

Igualmente, es posible la obtención rápida del diagnóstico en casos urgentes, como en los que se necesita conocer el cariotipo fetal para la realización de una cirugía *in utero*. En estos casos, la cirugía fetal para corregir alguna malformación se realizaría solo si el cariotipo fetal es normal, ya que estaría contraindicada en caso de una cromosomopatía (Castro & Ortiz 2003). Otra ventaja sobre el análisis cromosómico convencional es que se puede detectar si en un cultivo han crecido

células maternas en lugar o junto con las fetales, que indiquen un equivocado resultado femenino normal (46, XX), por medio de la comparación del análisis con el de una muestra materna que puede ser sangre o saliva.

Además de ser una metodología útil para el diagnóstico prenatal y posnatal de cromosopatías, puede utilizarse en otros estudios, tales como el análisis de disomías uniparentales que permitan el diagnóstico de enfermedades como los síndromes de Angelman y Prader-Willy y la detección de genes específicos, como el SRY y genes relacionados con infertilidad masculina como AZF a, b y c. También ha sido utilizada en la determinación de inestabilidad microsatelítica en casos de cáncer colorrectal hereditario (Síndrome de Lynch), en donde se asocia la respuesta a la quimioterapia con la presencia de dicha inestabilidad en los tejidos tumorales (Ribic *et al.* 2003, Hampel *et al.* 2005). Recientemente, Ashton y colaboradores (2008) desarrollaron una QF-PCR para hacer un escrutinio simultáneo en los 79 exones del gen de la distrofina (el gen humano de mayor tamaño conocido hasta el momento), en busca de deleciones, duplicaciones y mutaciones puntuales, que son la causa de las distrofias miotónicas de Duchenne y de Becker; posteriormente se secuenciaron los fragmentos que mostraron alguna alteración morfológica en la QF-PCR, y se lograron diagnosticar las mutaciones con una especificidad y sensibilidad de 100%.

Muchos reportes de los últimos años han demostrado claramente la eficiencia y fiabilidad de la QF-PCR en la detección de aneuploidías, en países europeos (Pertl *et al.* 1999; Schmidt *et al.* 2000; Cirigliano *et al.* 2001, 2004; Mann *et al.* 2001; Nicolini *et al.* 2004; Diego-Álvarez *et al.* 2005), asiáticos (Ghosh & Dey 2003, Lee

*et al.* 2004, Fang *et al.* 2006) y recientemente en los Estados Unidos (Brown *et al.* 2006) y en Argentina (Primost *et al.* 2007). Junho-Pena y colaboradores (2003) reportaron su aplicación en Brasil para el estudio de aneuploidías en abortos espontáneos.

Si con este estudio se logra comprobar que bajo nuestras condiciones la especificidad y sensibilidad de la técnica son buenas (superiores a 90%), la QF-PCR se podría utilizar de rutina con las muestras de amniocentesis, cordocentesis, restos de abortos espontáneos y sangres neonatales que lleguen al INISA para su análisis cromosómico, ya sea porque necesiten un diagnóstico rápido para aliviar la ansiedad materna o para la toma de alguna decisión médica, o bien, en casos en los cuales no se haya podido realizar el análisis citogenético por fracaso en el cultivo u otras razones. Además se espera estandarizar a corto plazo la QF-PCR para la detección de aneuploidías en los cromosomas X y Y. Así que con la introducción de la QF-PCR, el INISA sería el primer laboratorio de Centroamérica en ofrecer el servicio y el primero en Latinoamérica en publicar su validación para la detección de aneuploidías fetales.

### **Objetivo general**

Validar la técnica QF-PCR para el diagnóstico prenatal y postnatal de cromosopatías, para introducirla como una herramienta molecular complementaria del análisis citogenético convencional.

### **Objetivos específicos**

1. Estandarizar la técnica QF-PCR para los cromosomas 13, 18 y 21.

2. Determinar la sensibilidad, especificidad y valor predictivo de la técnica QF-PCR en relación con el cultivo y cariotipo.
3. Evaluar el poder informativo de cada marcador genético utilizado.
4. Valorar la utilidad complementaria de la QF-PCR al análisis citogenético en casos de fracaso en el cultivo celular o necesidad de diagnóstico rápido

## **Materiales y métodos**

**Ubicación geográfica del proyecto.** El estudio se realizó en las instalaciones del Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), en la Ciudad de la Investigación, Mercedes de Montes de Oca, en la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica en la sede Rodrigo Facio y en el Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular (CIBCM) en la Ciudad de la Investigación.

**Población de estudio.** Este fue un estudio prospectivo realizado desde enero del 2006 hasta marzo del 2008, de algunas de las muestras que llegaron al INISA para que se les realizara un análisis cromosómico. Se colectaron 88 muestras de líquido amniótico entre las semanas 15 y 37 de gestación, 5 muestras de sangre fetal por cordocentesis entre las semanas 18 y 35 de gestación, 33 muestras de sangre neonatal y 3 muestras de tejido de abortos espontáneos, para un total de 129 muestras. Estas

muestras provinieron de hospitales estatales (n = 111) o de consulta privada (n =18) con la solicitud de determinar el cariotipo fetal o neonatal por considerarse, en los casos de amniocentesis y cordocentesis, un embarazo de alto riesgo de cromosomopatía, y las muestras de sangre neonatal, fueron referidas por la sospecha de cromosomopatía (n = 25) o por la presencia de otras malformaciones (n = 8). Las indicaciones más comunes para realizar las amniocentesis o cordocentesis se muestran en el Cuadro 2.

Para todas las muestras se realizó la prueba QF-PCR para los cromosomas 13, 18 y 21, así como el cultivo para el análisis citogenético, el cual fue el diagnóstico definitivo. El estudio fue “ciego”, ya que no se supo el diagnóstico citogenético hasta que los datos fueron completados y tabulados.

**Cuadro 2. Tipo de indicación para realizar las amniocentesis y cordocentesis**

<b>Tipo de indicación</b>	<b>Número de casos</b>
<b>Ultrasonografía anormal</b>	56
▪ Malformación fetal	26
▪ Marcadores sonográficos de aneuploidía	20
▪ Hidropesía fetal	6
▪ Cantidad anormal de líquido amniótico	4
<b>Edad materna (más de 35 años)</b>	10
<b>Edad materna + ultrasonografía anormal</b>	21
<b>Embarazo previo con aneuploidía</b>	1
<b>Tamizaje por marcadores bioquímicos (prueba triple)</b>	1
<b>Ansiedad materna</b>	1

Otros	3
<b>Total</b>	<b>93</b>

### **Tratamiento de las muestras.**

**A) Líquidos amnióticos.** Del total de la muestra de líquido amniótico que llegó al laboratorio (20-30 ml), se tomó una alícuota de 0,5 a 1 ml en un tubo plástico de capacidad de 1,5 ml. El resto de la muestra se procesó para su análisis citogenético convencional. En los casos en los que llegaba muy poco líquido amniótico al laboratorio (10 ml o menos), no se tomó alícuota de la muestra para no comprometer el cultivo, sino que se esperaron alrededor de diez días para que crecieran células de una de las botellas para histocultivo y se procedió a realizar la extracción con células obtenidas de la botella. Para cada líquido se registró si se observaba la presencia macroscópica de sangre que indicara posible contaminación materna.

### **Extracción de ADN.**

1. Se centrifugó la muestra del líquido amniótico en tubo de 1,5 ml a 14 000 RPM por cinco minutos.
2. Se removió el sobrenadante y se agregaron 80-400 µl del kit de extracción InstaGene Matrix (Bio-Rad) según el tamaño del botón celular
3. Se agitó en vórtex hasta deshacer el botón celular
4. Se incubó por ocho minutos a 100 °C
5. Se agitó en vórtex y se centrifugó a 12 000 RPM por tres minutos
6. Se utilizó el sobrenadante para realizar la PCR

**B) Sangres fetales y neonatales.** Del total de sangre heparinizada que llegaba al laboratorio, se tomaron al menos 100 µl en un tubo de 1,5 ml. El resto de la muestra se procesó para el análisis cromosómico convencional.

#### **Extracción de ADN**

1. Se tomaron 10 µl de sangre y se diluyeron en 1 ml de agua ultrapura grado biología molecular.
2. Se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos
3. Se centrifugó a 14 000 RPM por cinco minutos.
4. Se removió el sobrenadante y se agregaron 80-400 µl del kit de extracción InstaGene Matrix (Bio-Rad) según el tamaño del botón celular
5. Se incubó por ocho minutos a 100 °C
6. Se agitó en vórtex y se centrifugó a 12 000 RPM por tres minutos
7. Se utilizó el sobrenadante para realizar la PCR

También fue posible la extracción de ADN con Chelex-100 en lugar de InstaGene Matrix, con la diferencia de que se agregaban 200 µl de Chelex a la muestra, y después del paso 4 se incubó por 20 minutos a 56°C y luego se agitó en vórtex hasta deshacer el botón celular. Después se continuó con el paso 5 y se siguió con el resto de los pasos habituales.

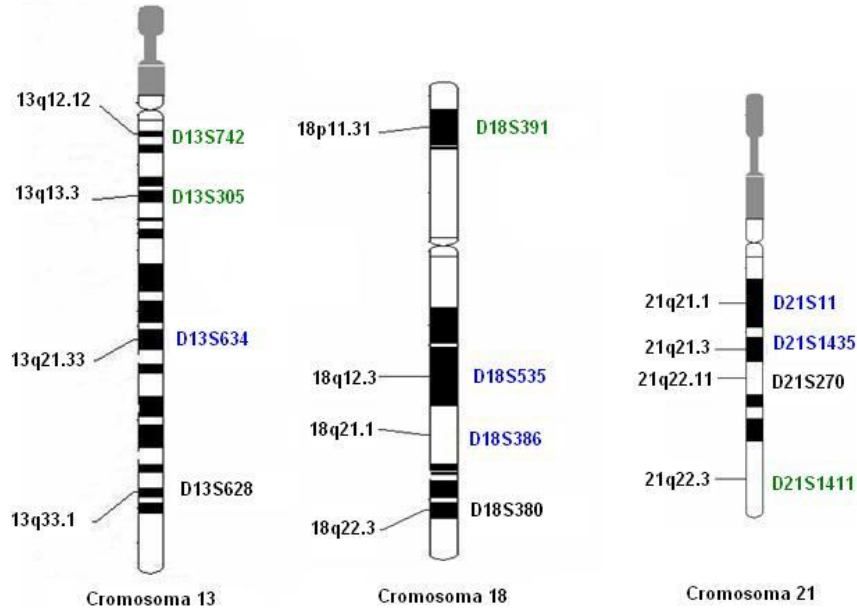
#### **C) Restos de aborto.**

1. Se hizo un macerado de tejido fetal con medio de cultivo en un tubo de 1,5 ml con un pistilo plástico y se pipeteó varias veces para mezclar
2. Se utilizó el sobrenadante y se agitó en vórtex



3. Se centrifugó la muestra en tubo de 1,5 ml a 14 000 RPM por cinco minutos.
4. Se removió el sobrenadante y se agregaron 80-400 µl del kit de extracción InstaGene Matrix (Bio-Rad) según el tamaño del botón celular
5. Se agitó en vórtex hasta deshacer el botón celular
6. Se incubó por ocho minutos a 100 °C
7. Se agitó en vórtex y se centrifuga a 12 000 RPM por tres minutos
8. Se utilizó el sobrenadante para realizar la PCR

**QF-PCR.** Se diseñaron tres diferentes PCRs multiplex, una para cada uno de los cromosomas en estudio (13, 18 y 21) (protocolos modificados de Mann *et al.* 2001, 2004), en las cuales se realizó la amplificación de cuatro diferentes STRs localizados en distintos loci de los cromosomas (Fig 4). Para ello se utilizaron cuatro pares de “primers”, en los cuales uno de cada par está marcado con una molécula fluorescente distinta (6-FAM, NED o HEX) (Applied Biosystems) en el extremo 5’ para permitir la visualización de los productos (Cuadro 3). Los doce pares de “primers” para los tres cromosomas amplifican con las mismas condiciones de termociclaje, de manera que fue posible realizar las tres diferentes PCRs simultáneamente en tubos distintos.



**Fig. 4 Localizaciones cromosómicas de los STRs analizados (Imágenes tomadas y modificadas del GeneMap [www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap))**

La amplificación se realizó con 3,5- 25 pmol de cada “primer” (Cuadro 3) (Applied Biosystems), 200 µmol/l de mix con los cuatro dNTPs, (Perkin Elmer) 2U de Taq polimerasa (Fermentas), 10 µl de ADN, 1,5 mmol/l de cloruro de magnesio y buffer de Taq polimerasa 1X con KCl en un volumen final de 25 µl. La desnaturalización inicial se efectuó a 95 °C por 3 minutos y después se programaron 25 ciclos de 94 °C por 30 s, 57 °C por 1 min 30s y 72 °C por 1 min 30 s. Después, una síntesis final de 72 °C por 20 min, en un termociclador iCycler (BioRad). En todas las reacciones se incluyó un control de agua para identificar posibles contaminaciones por ADN o reactivos.

**Análisis de los productos.** Los productos de las PCRs se analizaron en el secuenciador genético basado en capilares ABI 310 (Applied Biosystems), ubicado en la Escuela de Biología de la UCR y en el ABI 3130 (Applied Biosystems) del Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular. Para el análisis de los fragmentos se utilizaron los software Genescan Analysis y Peak Scanner (Applied Biosystems) para los analizadores 310 y 3130 respectivamente.

**Interpretación de los resultados.** Un complemento cromosómico normal fue determinado por la detección, para el STR correspondiente, de dos alelos diferentes con una razón de las áreas de los picos fluorescentes de 1:1 (con un ámbito de [0,9 – 1,3]:1) para individuos heterocigotos, o un solo pico para los homocigotos. Un solo pico se consideró como no informativo.

Las trisomías se detectaron, con el correspondiente STR, como tres picos de actividad fluorescente con una razón de áreas cercana a 1:1:1, para individuos trialélicos, o como dos picos con razón de áreas de 2:1 (con un ámbito de [1,7-2,4]:1) para individuos dialélicos. Para interpretar un resultado como normal o anormal, según el caso, se requirió que al menos tres marcadores informativos fueran consistentes con el patrón disómico o trisómico respectivamente, esto para evitar interpretaciones erróneas debidas a artificios de la amplificación, como mutaciones en los sitios de unión de los “primers” (Mann *et al.* 2004).

### Cultivo celular y análisis citogenético

El cultivo y análisis cromosómico de las muestras fue realizado por el personal de los Laboratorios de Citogenética y Microscopía del INISA, siguiendo los procedimientos normalizados y validados por el Laboratorio de Citogenética.

**Cuadro 3. Detalles de los primers utilizados en las QF-PCRs multiplex**

Marcador	H*	Secuencia (5'-3')	Tamaño de amplicón (pb)	pmol/reacción
<b>Cr 13</b>				
D13S305	0,75	<b>HEX</b> -GCCTGTTTGAGGACCTGTCGTTA(F) TGGTTATAGAGCAGTTAAGGCAC(R)	430-465	15
D13S628	0,688	<b>NED</b> -TAACATTCATTGTCCCTTACAGAT(F) GCAAGGCTATCTAACGATAATTCA(R)	425-470	7,5
D13S634	0,812	<b>6-FAM</b> -GGCAGATTCAATAGGATAAAATAGA(F) GTAACCCCTCAGGTTCTCAAGTCT(R)	385-440	15
D13S742	0,75	<b>HEX</b> -ATAACTGGGCTAGGAATGGAAATA(F) GACTTCCAATTCAGGAGGACT(R)	235-315	15
<b>Cr 18</b>				
D18S380	0,667	<b>NED</b> -GCATTCTGGGCAACAAAGTGAAAC(F) GAGATAACCCAGGCAAGAACAGGA(R)	160-200	5
D18S386	0,875	<b>6-FAM</b> -TGAGTCAGGAGAATCACTTGGAAC(F) CTCTCCATGAAGTAGCTAAGCAG (R)	330-400	15
D18S391	0,75	<b>HEX</b> -GGACTTACCACAGGCAATGTGACT(F) TAGACTTCACTATCCCATCTGAG(R)	140-180	3,5
D18S535	0,92	<b>6-FAM</b> -CAGCAAACCTCATGTGACAAAAGC(F) CAATGGTAACCTACTATTTACGTC(R)	455-500	10
<b>Cr 21</b>				
D21S11	0,9	<b>6-FAM</b> -TTTCTCAGTCTCCATAAATATGTG (F)	225-280	15

D21S1411	0,933	GATGTTGTATTAGTCAATGTTCTC (R) GTAGATACATACATATGATGAATGC(F) <b>HEX</b> -TATTAATGTGTGTCCTTCCAGGC(R)	256–340	25
D21S270	0,86	<b>NED</b> -CTATCCCCTGTATTATTCAGGGC(F) TGAGTCTCCAGGTTGCAGGTGACA (R)	285–340	20
D21S1435	0,75	<b>6-FAM</b> -CCCTCTCAATTGTTTGTCTACC(F) ACAAAAGGAAAGCAAGAGATTCA(R)	160–200	5

\*H: Porcentaje de heterocigosis (Manm et al. 2001)

### Análisis de los resultados

Para evaluar la prueba diagnóstica QF-PCR con respecto al análisis citogenético se calcularon los siguientes parámetros con un intervalo de confianza del 95%:

- **Sensibilidad:** Es la proporción de individuos con la enfermedad (en este caso una trisomía) que presentan un resultado positivo, y es igual a  $PV / (PV + FN)$ , donde PV son los positivos verdaderos según el análisis citogenético y FN los falsos negativos.
- **Especificidad:** Es la proporción de individuos sin la enfermedad que presentan un resultado negativo, y es igual a  $NV / (NV + FP)$ , donde NV son los negativos verdaderos y FP los falsos positivos.
- **Valor predictivo positivo:** Es la proporción de enfermos entre las personas con resultados positivos de la prueba, y es igual a  $PV / (PV+FP)$
- **Valor predictivo negativo:** Es la proporción de individuos sanos (sin cromosomopatía) entre las personas con resultados negativos en la prueba, y es igual a  $NV / (FN+ NV)$

## Información de los marcadores utilizados

Se calcularon los porcentajes de heterocigosis para cada uno de los 12 marcadores utilizados.

## Resultados

### Análisis citogenético

Se obtuvo el cariotipo de 97 de las 129 muestras (75,2%); 33 de ellos fueron femeninos normales (33,6%), 26 masculinos normales (26,7%), 37 fueron diagnosticados con una aneuploidía (37,8%) y 1 (1%) con un mosaico (Cuadro 4). La trisomía 21 fue la cromosopatía con el mayor número de casos; todos fueron trisomías libres. No hubo casos de anomalías estructurales.

El Cuadro 5 muestra las indicaciones para la realización de amniocentesis o cordocentesis en los casos que resultaron con una cromosopatía. Se observa que en los 7 casos de trisomía 21 fetal, la indicación más frecuente fue la EMA y la presencia de un marcador sonográfico de trisomía. Los fetos con trisomía 18 ó 13 mostraron principalmente malformaciones graves múltiples y otros marcadores sonográficos que sugerían una trisomía en estos cromosomas.

**Cuadro 4. Cariotipos anormales según el tipo de muestra biológica**

Cariotipo	Líquidos amnióticos	Sangres neonatales	Sangres fetales	Número de casos
47, XX +21; 47, XY +21	6	16	1	23
47, XX +18; 47, XY +18	6	1	0	7

47, XX +13; 47,XY +13	1	1	0	2
45, X	5	0	0	5
mos 47,XX +13[4]/46, XX[9]	0	1	0	1
<b>Total de cariotipos anormales</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>1</b>	<b>39</b>

**Cuadro 5. Cariotipos fetales patológicos e indicaciones para realizar la amniocentesis o cordocentesis**

<b>Cariotipo informado</b>	<b>Indicación para amniocentesis/cordocentesis</b>	<b>Semana gestacional</b>
47, XY +21	Hidrops fetal	34
47, XY+21	EMA (42 años), higroma quístico	17
47, XX+21	EMA (39 años), higroma quístico	18
47, XY+21	Hidrops fetal, higroma quístico	16
47, XX+21	EMA (42 años). Marcadores bioquímicos y sonográficos de T21	16
47, XX+21	EMA (42 años), translucencia nual aumentada, cardiopatía congénita	27
47, XX+21 <sup>a</sup>	Higroma quístico, hueso nasal corto	23
47, XY+18	EMA (42), disrrafia del tubo neural, poliarnios, otras malformaciones	26
47, XX+18	Poliarnios. Cabeza en forma de trébol. Onfalocele	30
47, XX+18	Riñón multiquístico, onfalocele, cardiopatía	29
47, XY+18	Polimalformado	25
47, XX+18	EMA (41), higroma quístico, derrame pleural	17
47, XX+18	Higroma quístico, quiste del plexo coroideo bilateral	17
47, XY+13	Polimalformado	30
45, X	EMA (39 años), hidrops fetal, higroma quístico	16
45, X	Higroma quístico, hidrops fetal	22
45, X	Higroma quístico, hidrops fetal	16
45, X	Higroma quístico	16
45, X	Higroma quístico	16

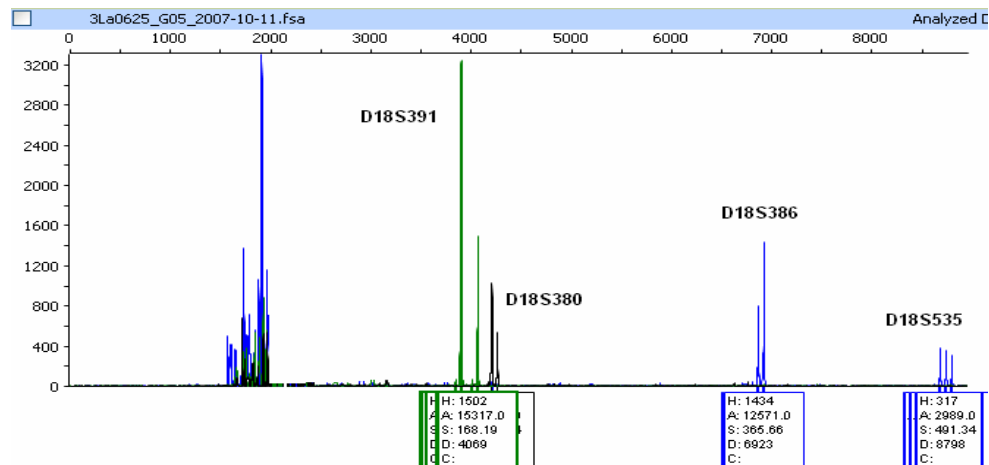
<sup>a</sup> Muestra de cordocentesis

En 32 de las muestras (24,8%) no se pudo obtener el cariotipo debido a que el cultivo celular no creció. La mayor tasa de fracaso en el cultivo ocurrió en los

tejidos de restos de aborto, en los cuales no creció ninguno de los 3 colectados. Tampoco crecieron las células de 2 de las 5 sangres fetales ni 3 de las 33 sangres neonatales por tratarse de muestras de volumen insuficiente o por venir coaguladas en el tubo de recolección. También se malogró el cultivo de 24 de 88 líquidos amnióticos, 19 de ellos provenientes de amniocentesis realizadas en el II trimestre y 5 del III trimestre de la gestación.

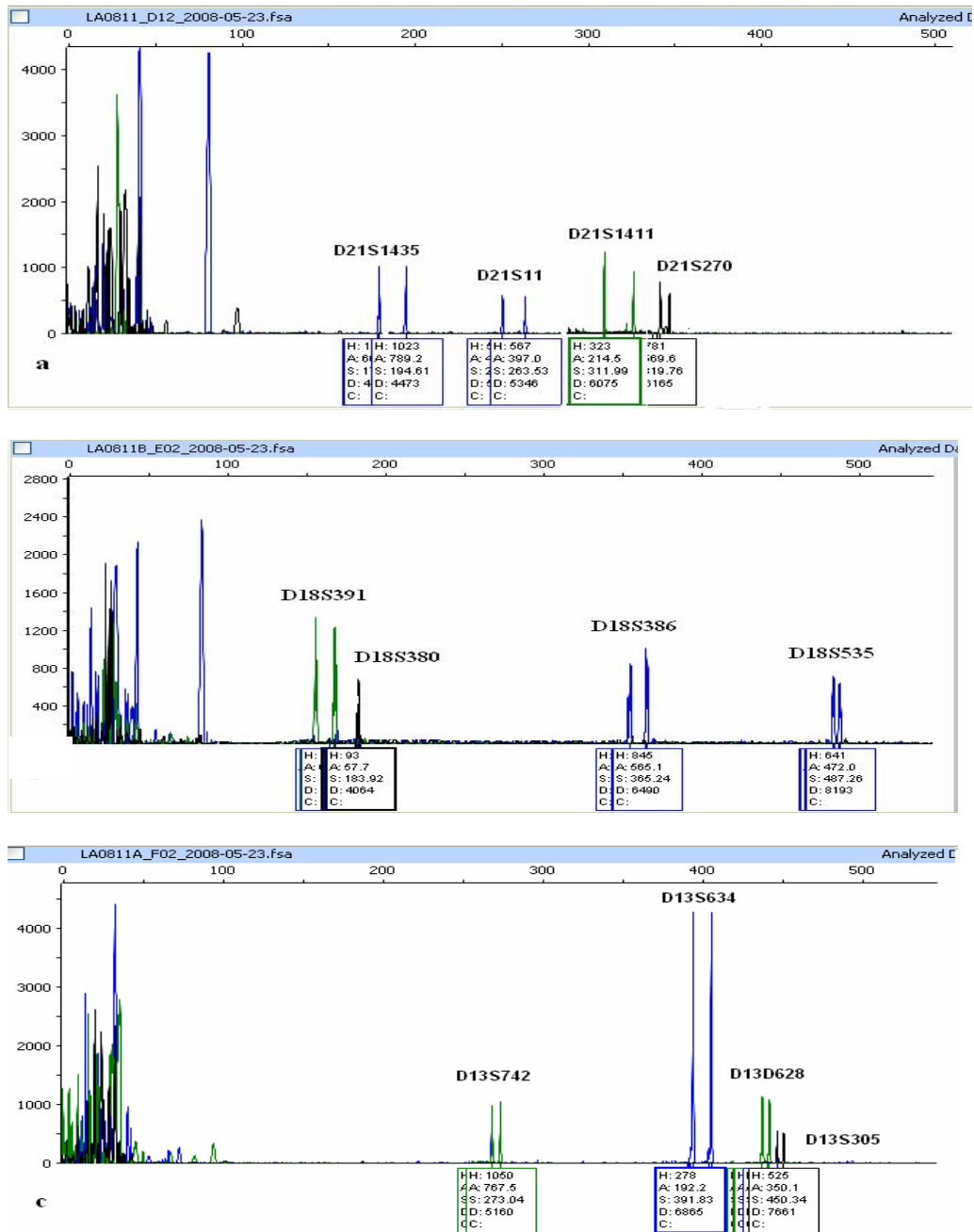
**Cuadro 6. Total de muestras con QF-PCR exitosa**

	Identificado por QF-PCR
Sin trisomía 21, 18 ó 13	81
Trisomía 21	22
Trisomía 18	6
Trisomía 13	0
Mosaicos para los cromosomas 21, 18 ó 13	0
<b>Total</b>	<b>109</b>



**Fig. 5. Diagnóstico prenatal de trisomía 18 por QF-PCR. La trisomía fue detectada como un patrón trisómico dialélico (2:1) para los marcadores D18S396, D18S380 y D18S386. El marcador D18S535 mostró un patrón trisómico trialélico (1:1:1). El análisis citogenético reveló un cariotipo anormal de 47, XX +18.**





**Fig. 6. Diagnóstico prenatal de un feto diploide normal para los cromosomas 21, 18 y 13.**  
 a) La QF-PCR del cromosoma 21 muestra a los 4 marcadores con un patrón diploide de 1:1.  
 b) La QF-PCR del cromosoma 18 muestra 3 marcadores con un patrón 1:1 y 1 no informativo.  
 c) La QF-PCR del cromosoma 13 muestra a todos los marcadores con un patrón 1:1. El análisis citogenético reveló un cariotipo normal 46, XY.

## QF-PCR

Se logró la extracción de ADN y la QF-PCR exitosa en 109 de las 129 muestras disponibles (84, 4%) para los 3 cromosomas en estudio: 72 líquidos amnióticos, 30 sangres neonatales, 4 sangres fetales y las 3 muestras de tejido de restos de aborto. Se obtuvo ADN de líquidos amnióticos congelados a -20° C de años anteriores al inicio del estudio (2006), pues se hizo la QF-PCR en una muestra del año 2004 y en 2 del 2005. Asimismo se pudo realizar la QF-PCR en 10 muestras para las cuales no se contaba con líquido amniótico fresco, sino de células flotantes en el medio de cultivo de botellas de histocultivo que no se cosecharon para el análisis citogenético. El ADN de 20 muestras no amplificó para ninguna de las 3 PCR multiplex. Esto ocurrió probablemente por la presencia de inhibidores residuales de la PCR en los extractos de ADN.

De las 109 muestras amplificadas, se identificaron 81 casos sin evidencia de trisomía para los cromosomas 21, 18 y 13, así como 28 casos que indicaban aneuploidías en alguno de estos 3 cromosomas (Cuadro 6) (Fig. 5)

De los 31 casos con fracaso en el cultivo se logró realizar la QF-PCR en 25 de ellos (80,6%); el 12, 5% de estos casos fueron diagnosticados con trisomía 21 y el resto no mostró evidencia de cromosopatía (Cuadro 7) (Fig. 6). Estos casos no pudieron ser comparados con el patrón, por lo cual no fue posible incluirlos en los cálculos de validación.

De igual manera, en 6 casos donde hubo diagnóstico citogenético de ausencia de trisomía, 3 con trisomía 21, 1 con trisomía 18 y 2 con trisomía 13, no se logró realizar la QF-PCR por fracaso en la extracción de ADN. Estos casos fueron 9 líquidos amnióticos y 3 sangres neonatales y tampoco pudieron incluirse en los cálculos de validación.

**Cuadro 7. Casos sin cariotipo con resultado de la QF-PCR**

	<b>Sin trisomía 21, 18 ó 13</b>	<b>Trisomía 21</b>	<b>Trisomía 18 ó 13</b>
Líquidos amnióticos	16	2	0
Sangres neonatales	2	1	0
Sangres fetales	1	0	0
Restos de aborto	3	0	0
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>3</b>	<b>0</b>

**Desempeño de la QF-PCR con respecto al análisis citogenético**

Para 92 de los 109 casos de los cuales hubo amplificación exitosa de la QF-PCR, hay un correspondiente cariotipo y por tanto un diagnóstico con el patrón oro con el cual hacer una comparación. El cuadro 8 muestra los resultados de la comparación de las 92 parejas de datos (QF-PCR vs. citogenética) utilizados para el cálculo de los parámetros estadísticos necesarios para validar la técnica.

**Cuadro 8. Comparación de los resultados de la QF-PCR con el diagnóstico citogenético**

	<b>Con trisomía según citogenética</b>	<b>Sin trisomía según citogenética</b>	<b>Total</b>
<b>Con trisomía según QF-PCR</b>	26 (PV)	0 (FP)	26

<b>Sin trisomía según QF-PCR</b>	1 (FN)	65 (NV)	66
<b>Total</b>	27	65	92

PV: Positivos verdaderos

FP: Falsos positivos

FN: Falsos negativos

NV: Negativos verdaderos

La QF-PCR identificó como libre de trisomía a todos los casos sin trisomía diagnosticados por la citogenética convencional. Del total de los 65 casos sin trisomía diagnosticados correctamente, 49 fueron muestras prenatales (46 líquidos amnióticos y 3 sangres fetales) y 16 fueron sangres neonatales. Dado que se diagnosticó acertadamente a todos los individuos sanos, la especificidad de la técnica fue de 100%.

La QF-PCR mostró una sensibilidad de 96% (Cuadro 9), ya que se identificaron los 26 casos de trisomías completas de los cromosomas 21 ó 18 (n= 20 y n= 6, respectivamente). Todos estos resultados fueron confirmados por el análisis citogenético y no hubo falsos positivos. Un caso diagnosticado por el análisis citogenético como mosaicismo para el cromosoma 13 (mos 47,XX+13[4]/46,XX[9]) fue determinado como disómico normal por la QF-PCR. Este caso se trató de un mosaico en el que la línea celular anormal no estuvo suficientemente representada para ser detectada (4 células de un total de 13) y fue el único falso negativo del estudio.

Los valores predictivos calculados para la QF-PCR mostraron ser muy altos (Cuadro 9), lo cual confirma la gran validez diagnóstica de la técnica. El VPP indica que con esta prueba existe un 95% de confianza de que entre 84 y 100% de los individuos positivos para una cromosopatía serían confirmados por el análisis citogenético. Por otra parte, según el VPN, de 91% a 99% de los individuos con una

QF-PCR que diagnostique ausencia de trisomía, tendrían una confianza de 95% de resultar con un cariotipo normal, es decir, no presentar la trisomía.

### **Información de los marcadores**

Todas las muestras fueron heterocigotas para al menos uno de los marcadores específicos de los cromosomas 21, 18 y 13. Los porcentajes de heterocigosis para los 12 marcadores utilizados se muestran en el Cuadro 10, donde se observa que los marcadores D21S1435, D21S11 y D21S270 mostraron los porcentajes de heterocigosis más altos para el cromosoma 21, cercanos al 90%. Los marcadores D18S386 y D13S742 mostraron los porcentajes más altos para los cromosomas 18 y 13 respectivamente.

En el cromosoma 21, los marcadores D21S1435, D21S1411 y D21S270 fueron los más consistentes para identificar las trisomías, ya que los tres marcadores detectaron todas las muestras trisómicas sin un solo resultado no informativo (Cuadro 11). Para el cromosoma 18, el marcador más informativo fue el D18S386, el cual también detectó todas las trisomías sin alelos no informativos (Cuadro 11).

**Cuadro 9. Desempeño de la QF-PCR**

<b>Parámetro</b>	<b>Porcentaje (%)</b>	<b>Intervalo de confianza (95%)</b>
Sensibilidad	96	0,79-0,99
Especificidad	100	0,93-1
Valor predictivo positivo (VPP)	100	0,84-1

Valor predictivo negativo (VPN)	98	0,91-0,99
---------------------------------	----	-----------

---

### Otros hallazgos en las QF-PCRs

En un caso se encontró una duplicación submicroscópica en el marcador D21S270, en el que se observó claramente un patrón 2:1, mientras que el resto de los marcadores mostró un patrón normal dialélico, que luego fue confirmado con el cariotipo.

La presencia macroscópica de sangre en las muestras de líquido amniótico no pudo correlacionarse con la evidencia de contaminación con células maternas, ya que en 5 líquidos amnióticos con presencia visible de sangre no se notaron alteraciones que correspondieran a otros genotipos en los electroforetogramas (Fig. 7). Es posible que a pesar de la apariencia hemática de las muestras, éstas tuvieran niveles bajos de células maternas que no alteraron los cocientes de los STRs fetales.

**Cuadro 10. Porcentajes de heterocigosis de los marcadores utilizados en la QF-PCR**

<b>Marcador</b>	<b>Porcentaje de heterocigosis (H)</b>
D21S1435	88
D21S11	88
D21S270	87
D21S1411	83
D18S391	70
D18S380	67
D18S386	90
D18S535	76

D13S742	90
D13S634	83
D13S628	71
D13S305	82

### Tiempo para la obtención de los resultados

Fue posible la obtención de los resultados 2 días después de la llegada de la muestra al laboratorio, y en casos excepcionales podían durar hasta 10 días.

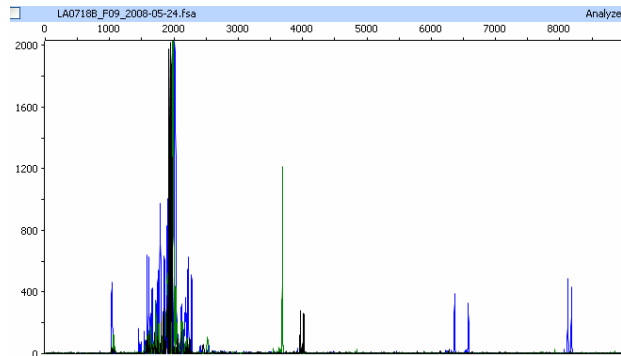
**Cuadro 11. Patrones alélicos de los marcadores utilizados en el diagnóstico de los casos de trisomías 21 y 18**

	D21S1435	D21S11	D21S270	D21S1411
Dialélico <sup>a</sup>	15	8	8	6
Trialélico <sup>b</sup>	5	11	12	14
No informativo <sup>c</sup>	0	1	0	0

	D18S391	D18S380	D18S386	D18S535
Dialélico	4	4	2	4
Trialélico	0	1	4	1
No informativo	2	1	0	1

<sup>a</sup> Patrón 2:1; <sup>b</sup> Patrón 1:1.1; <sup>c</sup> Homocigota



**Fig. 7. QF-PCR del cromosoma 18 para una muestra de líquido amniótico con presencia macroscópica de sangre. Nótese que no se observan picos extra que correspondan a un segundo genotipo.**

## Discusión

El presente estudio de validación permitió evaluar el desempeño de la QF-PCR como una técnica para el diagnóstico de cromosomopatías fetales y neonatales, comparada con el análisis citogenético convencional. Los valores de los parámetros que se calcularon para validar la QF-PCR resultaron ser muy altos (Cuadro 9), de manera que se logró comprobar la validez diagnóstica de la técnica.

Un total de 49 embarazos y 16 neonatos fueron diagnosticados acertadamente por la QF-PCR como libres de trisomía, lo cual fue comprobado con el cariotipo, por lo cual la técnica dio diagnósticos con una especificidad de 100%.

Utilizando tres PCRs multiplex de cuatro marcadores, la QF-PCR identificó correctamente todas las trisomías completas de los cromosomas 21 y 18 presentes en la población de estudio. Con una sensibilidad de 96%, la técnica mostró un alto poder de detección de los individuos con una cromosomopatía y no hubo casos de



falsos positivos. La única alteración que no pudo identificar fue el caso del mosaico en sangre neonatal, ya que fue diagnosticado como libre de trisomía 13. En este caso la línea celular anormal fue menor al 30% necesario para mostrar patrones anormales de picos en la QF-PCR que permitan determinar el mosaicismo (Mann *et al.* 2005). Dado que la QF-PCR no está diseñada para detectar niveles bajos de subpoblaciones celulares aneuploides en la muestra, este resultado no invalida el valor diagnóstico de la prueba.

Los valores altos en la sensibilidad y la especificidad descritos en este estudio, concuerdan con lo encontrado por otros autores (Cuadro 13). La QF-PCR presentó una especificidad de 100% en todos los casos citados. Aunque en la mayoría de los estudios la sensibilidad está por encima de 90%, en ninguno de los casos llegó a ser 100%. Esto se debe a que, tal como ocurrió en el presente estudio, los casos de mosaicos no siempre pueden diagnosticarse correctamente por los factores antes mencionados, tanto para autosomas como mosaicismos que involucren al cromosoma X. Si se trata de un mosaicismo de bajo nivel, es posible que del todo no se muestre en el electroforetograma, o que solamente se observen patrones de picos alterados que hagan sospechar que se trata de un mosaico, pero que éste no pueda confirmarse (Cirigliano *et al.* 2001).

Una sensibilidad y especificidad altas como las reportadas en este estudio, informan qué tan buena es la QF-PCR para distinguir entre los individuos con o sin una cromosopatía. Y, aunque son parámetros de interés para evaluar una prueba diagnóstica, son los valores predictivos los que informan sobre la probabilidad de que un individuo positivo para la prueba, tenga una trisomía (VPP), y qué tan probable es que un individuo negativo para la prueba, no la tenga (VPN). Así que

clínicamente, es importante conocer e interpretar los valores predictivos para tomar decisiones.

En el contexto del diagnóstico prenatal, las estimaciones tan altas de los valores predictivos serían de mucha utilidad para el médico que atiende a una gestante a la que se le realizó una prueba invasiva. En dos casos donde falló el cultivo de amniocitos, la QF-PCR reveló una trisomía 21. Las indicaciones para la amniocentesis fueron para uno de los casos EMA (42 años) y para el otro cardiopatía congénita y otras malformaciones. El conocimiento de la trisomía fetal diagnosticada por la amnio-PCR, con el respaldo de un VPP de 100%, podría evitar la necesidad de una segunda amniocentesis, y con ello evitarle el riesgo de una otra punción tanto a la madre como al feto. De igual manera, con un VPN de 98%, la QF-PCR indicó ausencia de trisomía en 15 líquidos amnióticos y 1 sangre fetal cuyos cultivos no prosperaron. Esta información podría adelantar el diagnóstico a la gestante de que su hijo está libre de trisomía, lo cual podría disminuir la ansiedad en la futura madre, en caso de que el médico recomendara repetir la prueba invasiva. Asimismo, podría brindar la información necesaria para realizar una cirugía fetal.

**Cuadro 12. Comparación de los datos de validación de la QF-PCR en varios países**

<b>Autor y país</b>	<b>Sensibilidad</b>	<b>Especificidad</b>	<b>Tamaño de la muestra</b>
Pertl <i>et al.</i> (1999a), Austria	95,2	100	247
Lee <i>et al.</i> (2004), Corea del Sur	95,4	100	221
Cirigliano <i>et al.</i> (2006), España e Italia	92,3	100	30 000

Según su experiencia con la validación de la QF-PCR en los Estados Unidos, Brown y colaboradores (2006) señalan que cada laboratorio que utilice esta metodología debe realizar una validación propia e independiente; de esta manera no solo se obtenga la experiencia de ejecutar el ensayo e interpretar los resultados, sino que también se demuestre que funciona bien en la población local. Esto quedó demostrado con el presente estudio, ya que se pudo obtener ADN de todos los tipos de muestras por medio de modificaciones locales de los protocolos, así como la estimación de los porcentajes de heterocigosis de los marcadores utilizados, que resultaron diferentes a los de la literatura.

### **Análisis citogenético**

Para este estudio no se pudo obtener el cariotipo por métodos convencionales en el 26% de los líquidos amnióticos. Esta imposibilidad de lograr el cariotipo en cifras superiores al 20% de los cultivos de amniocitos recibidos en aproximadamente 2 años en el INISA (desde el 2006 hasta los primeros tres meses del 2008), ya ha sido reportada con anterioridad (Castro-Volio *et al.* 1995, 2000, 2001, Castro-Volio & Ortiz 2004) y se ha mantenido constante en el tiempo. Uno de los factores que contribuye en gran medida con esta tasa alta de fracaso en el cultivo celular es el hecho de que en el INISA no se rechazan muestras de mala calidad (con contaminación hemática o edad gestacional avanzada) o cantidad insuficiente, a

pesar de que se ha demostrado que tienen pocas posibilidades de crecimiento exitoso (Castro-Volio *et al.* 2001).

En cuanto a las indicaciones para la realización de las amniocentesis y cordocentesis en los casos que resultaron anormales, no se encontró ninguna cromosomopatía en los casos referidos solo por EMA, mientras que se encontraron 6 casos de trisomía y un síndrome de Turner cuando además de la EMA estaba presente un marcador sonográfico de cromosomopatía, siendo el higroma quístico el más observado, en 6 casos de trisomías (4 trisomías 21 y 2 en el cromosoma 18), y en todos los casos de 45, X (Cuadro 5). Esto es similar a lo descrito por Nicolaides (2004), quien encontró que en el 75% de los fetos con higroma quístico hay una anomalía cromosómica.

### **Extracción de ADN y QF-PCR**

La extracción de ADN y la PCR se pudieron realizar en el 80,6% de los líquidos amnióticos que no se lograron cultivar. La edad gestacional avanzada no fue un impedimento, ya que se pudo extraer ADN y realizar la PCR en muestras de hasta 34 ó 37 semanas de gestación.

La mayoría de los 16 líquidos de los que no se pudo aislar ADN corresponde a los primeros que se colectaron para el estudio. En el primer año de la investigación (2006) no se logró la extracción adecuada de 10 muestras, lo cual podría deberse a la falta de experiencia con el método de extracción de chelex que se requiere utilizar; esto pudo haber dejado inhibidores de la PCR en los extractos. Cuando inició en estudio, se agregaba la misma cantidad del kit InstaGene Matrix a todas las muestras. Sin embargo, a partir del año 2007, después de aumentar el tiempo y las revoluciones por minuto de la centrifugación en el primer paso de la extracción, y

agregar el volumen del kit según el tamaño del botón celular, la calidad de las extracciones y PCRs mejoró notablemente y fueron menos los casos que no se pudieron analizar (4 en el 2007 y 2 en el 2008).

La contaminación con bacterias en un líquido amniótico no afecta la extracción de ADN ni los resultados de la QF-PCR (Cirigliano *et al.* 2006), en cambio, es uno de los principales motivos para el fracaso en el cultivo de amniocitos (Castro-Volio *et al.* 1995, 2000, 2001).

También se pudo extraer con éxito ADN a partir de sangres fetales y neonatales, que en ocasiones llegan al laboratorio coaguladas y por tanto inviábiles para ser cultivadas. Este fue el caso de una recién nacida dismórfica, con holoprosencefalia y sospecha de trisomía 18, cuya sangre llegó muy coagulada al laboratorio, lo que hizo imposible su cultivo, pero si se logró realizar la QF-PCR y ésta descartó la trisomía. En los cultivos de sangre fetal la tasa de fracaso es mucho menor a la del cultivo de amniocitos (Castro-Volio & Ortiz 2003), pero en algunas ocasiones, por factores ajenos al laboratorio, la muestra no llega en condiciones óptimas para ser cultivada.

Fue muy notable el hecho de que se lograra la amplificación exitosa de ADN y QF-PCR a partir de tejidos de restos de abortos. En las tres muestras estudiadas no se pudo obtener el cariotipo por fracaso en el cultivo, por deterioro de las muestras o por contaminación bacteriana y de hongos. El aislamiento de ADN se realizó con el kit de extracción InstaGene Matrix, con unas ligeras modificaciones al protocolo utilizado para extraer ADN de líquido amniótico o sangre, de manera que no fue necesario adquirir reactivos especiales para la extracción de ADN de tejidos, como lo

reporta la literatura (Diego-Álvarez *et al.* 2005), lo cual representa un gran ahorro de recursos.

Se estima que alrededor de un 65% de todas las gestaciones tiene como desenlace un aborto espontáneo, y que en el 50% de los casos está involucrada una anomalía cromosómica, por lo que la identificación de la causa de la pérdida fetal permite conocer el origen de la pérdida y así ofrecer una mejor asesoría genética para futuras gestaciones, y predecir la frecuencia de recurrencia para cada paciente (Junho-Pena *et al.* 2003, Diego-Álvarez *et al.* 2005). Además reduce los sentimientos de culpa, ansiedad o depresión de una mujer que sufrió un aborto espontáneo. Para evaluar los restos de aborto sería muy importante amplificar también STRs de los cromosomas 16, 22 y el X, ya que se sabe que la trisomía 16, la trisomía 22 y la monosomía del X son frecuentemente observadas en casos de pérdida fetal (Nagaishi *et al.* 2004)

Para aumentar la eficiencia diagnóstica de la QF-PCR, en los casos de amniocentesis, cordocentesis y restos de abortos, sería muy conveniente contar con el ADN genómico de la madre. La muestra materna puede ser de sangre o de células bucales, y puede utilizarse para confirmar la identidad de las muestras con resultados normales, de manera que se pueda descartar la sospecha de que se está analizando ADN materno en lugar del fetal, para evitar diagnósticos equivocados. La contaminación materna del material fetal puede ocurrir durante cualquiera de los procesos invasivos, y se manifiesta con la presencia de dos genotipos en el perfil de STRs. Los niveles de sangre en la muestra de líquido pueden correlacionarse con el nivel del genotipo materno en la QF-PCR, pero hay que tomar en cuenta que no siempre se detecta con la presencia macroscópica de sangre, ya que se estima que en

alrededor del 20% de las muestras de líquido amniótico hay pequeñas cantidades de sangre materna, indetectables por examinación visual (Verma *et al.* 1998, Mann *et al.* 2004). En este estudio la presencia visible de sangre en los líquidos amnióticos no parece corresponder para estimar la contaminación con células maternas, ya que varias muestras hemáticas pudieron analizarse de manera aceptable, y no se observó la presencia de dos genotipos o cocientes alterados de áreas de STRs y no hubo discrepancias con los resultados del cariotipo. En los casos donde se observen discrepancias entre ambos resultados, Mann *et al.* (2001) recomiendan repetir la QF-PCR utilizando células cultivadas del líquido amniótico.

También puede ser valioso contar con el ADN del padre. Si se tienen los alelos de ambos progenitores para compararlos con los de un hijo con una cromosomopatía, se podría inferir el tipo de error gametogénico o postcigótico que dio lugar a la aneuploidía, es decir, el origen parental y meiótico de la no disyunción (Diego-Álvarez 2005). En otros casos es posible determinar si ocurrió una disomía uniparental, lo cual es de vital importancia cuando se trata de cromosomas susceptibles al fenómeno de impronta genómica, como el caso del cromosomas 14 y 15, el segundo relacionado con los síndromes de Angelman y Prader Willi (Jiang *et al.* 2004). Esta es una ventaja muy significativa con respecto al cariotipo, que no permite diagnosticar disomías uniparentales o isodisomías.

### **Evaluación de los marcadores utilizados**

Un factor muy importante para la introducción de la QF-PCR en el diagnóstico prenatal y posnatal es la determinación de los STRs que deben utilizarse para la amplificación. El ensayo ideal debería incluir pocos STRs que detecten el

mayor número de anomalías cromosómicas (Choueiri *et al.* 2006). Para disminuir los resultados no informativos, la QF-PCR debe incluir al menos cuatro marcadores por cromosoma (Mann *et al.* 2005). A pesar de que individualmente algunos de los marcadores utilizados en este estudio rondaban el 70% de heterocigosis (Cuadro 10), la combinación de los cuatro STRs utilizados en las tres multiplex diseñadas demostró ser eficiente para el diagnóstico tanto de los individuos normales como de los trisómicos.

El Cuadro 13 es una comparación de las frecuencias de heterocigosis encontradas en este estudio y las reportadas por Mann *et al.* (2001) para el Reino Unido. En esta comparación se observan varias diferencias. Para el cromosoma 21, los marcadores D21S11 y D21S270 muestran heterocigosis prácticamente idénticas a la referencia, en cambio, D21S1435 y D21S1411 resultaron con heterocigosis mayor y menor respectivamente que la referencia. El porcentaje de heterocigosis encontrado en esta investigación para D21S11 es un poco mayor al estudio de Rodríguez y colaboradores (2006), en el cual se analizaron las frecuencias alélicas de 18 STRs en la población costarricense y reportaron una heterocigosis de 83, 2% para dicho marcador.

En el cromosoma 18 ocurrió algo similar, pues dos de los marcadores (D18S380 y D18S386) presentaron heterocigosis muy similares a la referencia, mientras que las de D18S391 y D18S535 fueron menores. Para la población estadounidense, Brown *et al.* (2006) también encontraron que el marcador D18S391 presentaba una heterocigosis menor al 75% reportado por la literatura.



Las frecuencias de los marcadores del cromosoma 13 fueron las que presentaron las mayores diferencias con respecto a la referencia, pues dos de ellas fueron bastante mayores y dos bastante menores.

Los microsatélites difieren de la mayoría de otras secuencias de ADN en sus altos grados de polimorfismo, con heterocigosis que comúnmente superan el 70%. Al ser considerados “neutrales” y por tanto libres de presiones selectivas (Webster *et al.* 2002), es evidente que su alta variabilidad genética requiere una tasa de mutación alta. Varios autores concuerdan con que las mutaciones en los STRs se originan principalmente por un fenómeno conocido como “replication slippage” o “tambaleo de la polimerasa”, es decir una disociación temporal de las cadenas del ADN en replicación, seguida de una reasociación alineada incorrectamente (Ellegren 2004), que resulta en la ganancia o pérdida de una o más repeticiones. Algunos de estos errores son corregidos por el sistema de reparación de emparejamientos erróneos (“mismatch repair system”), pero otros logran escapar a esta corrección (Li *et al.* 2002). También se ha propuesto que un intercambio desigual durante la meiosis puede provocar la aparición de nuevos alelos (Valdes *et al.* 1993).

Lo anterior aclara la naturaleza tan polimórfica de los STRs, pero la deriva génica podría explicar las diferencias en los porcentajes de heterocigosis encontradas en la muestra estudiada en nuestro país con respecto a las europeas. En una población relativamente pequeña y reciente como la costarricense, las fluctuaciones al azar (incrementos o disminuciones) en las frecuencias alélicas, y por ende, en porcentajes de heterocigosis de los microsatélites, pueden ocurrir de manera más rápida que en una de mayor tamaño. (Vogel & Motulsky 1997). Aunado a esto, la composición genética de la población costarricense es el resultado de una mezcla de

diferentes grupos de Europa, África y América (Morera *et al.* 2003), lo cual hace que sea de esperar haya diferencias en la diversidad genética con respecto a la población europea.

**Cuadro 13. Comparación de los porcentajes de heterocigosis encontrados con los del Reino Unido \***

<b>Marcador</b>	<b>% de heterocigosis en el presente estudio</b>	<b>% de heterocigosis de referencia</b>
D21S1435	88	75
D21S11	88	90
D21S270	87	86
D21S1411	83	93
D18S391	70	75
D18S380	67	66
D18S386	90	87,5
D18S535	76	92
D13S742	90	75
D13S634	83	68,8
D13S628	71	81,2
D13S305	82	75

\* Mann et al. (2001)

También es posible otra explicación para entender las diferencias en los porcentajes de heterocigosis. Cabe la posibilidad de que la población analizada (n= 129) no fuera lo suficientemente grande ni representativa para captar la verdadera diversidad alélica de los marcadores evaluados en nuestro país. La gran mayoría de las muestras analizadas fueron tomadas en hospitales del Valle Central (Hospital Calderón Guardia, H. México, H. Max Peralta), por lo que es probable, con excepción de algunas pocas referencias de hospitales regionales, que muchos de los pacientes sean pobladores de las provincias más céntricas, por lo que no se estaría

evaluando el aporte de otras provincias a la variabilidad alélica de los microsatélites utilizados.

La microduplicación observada en el marcador D21S270 en un caso, se ha reportado en la literatura para otros marcadores (Cirigliano *et al.* 2004), lo cual hace hincapié en la necesidad de utilizar al menos cuatro diferentes marcadores específicos, y también recalca la importancia de no reportar una trisomía basándose solo en un único STR informativo.

### **Tiempo para la obtención de los resultados**

Es muy importante destacar el hecho de que en varios casos fue posible obtener el diagnóstico rápido de la QF-PCR, incluso hasta dos días después de la llegada de la muestra al laboratorio. Esto es un tiempo mucho menor comparado con los 16 días que se necesitan en promedio para el resultado del cultivo de amniocitos (Castro-Volio & Ortiz 2004). En muchos casos este lapso de espera es de mucha ansiedad para la madre, principalmente si hay sospechas de síndrome de Down. Experimentar niveles altos de ansiedad durante el embarazo puede llegar a tener efectos adversos, como incrementar los niveles de hormonas de estrés, lo cual podría disminuir el flujo de la sangre uterina, así como la inducción de un parto prematuro (Littleton *et al.* 2006). Johnson & Slade (2003) proponen que una gestante que sufre de mucha ansiedad podría estar más propensa a cometer comportamientos no saludables como fumar, ingerir alcohol o no asistir a la consulta prenatal. Así que por todo lo anterior, sería muy beneficioso contar con métodos más rápidos para obtener los resultados.

El diagnóstico rápido y fiable que brinda la QF-PCR es muy valioso en casos urgentes de los que dependan intervenciones médicas importantes, tales como cirugías fetales, prescripción de medicamentos o la decisión de terminar el embarazo por cromosomopatía. En países donde el aborto selectivo es permitido, el diagnóstico rápido de la QF-PCR que indique trisomía fetal, es considerado como razón suficiente para realizar el aborto, sin necesidad de esperar el resultado del análisis cromosómico. Esto es particularmente útil en los casos que están por cumplir el límite de edad gestacional permitido para abortar (usualmente 20 semanas) (Pert *et al.* 1999a). Lo anterior no implica que no sea necesario realizar el análisis citogenético completo aunque se haya optado por terminar el embarazo, ya que la información del cariotipo puede ser de utilidad para ofrecer asesoría genética a los padres. Cabe resaltar que por motivos legales, el aborto selectivo no es una opción para las costarricenses.

Además, es necesaria la obtención del cariotipo para confirmar el diagnóstico de fetos y neonatos normales, así como descartar otras anomalías que no estén contempladas en la QF-PCR, como aneuploidías en otros cromosomas, translocaciones, duplicaciones, deleciones o inversiones, que podrían o no, tener consecuencias negativas en el fenotipo.

En conclusión, los resultados del presente estudio confirman que la QF-PCR es una metodología fiable, rápida, fácil de realizar y analizar, y que puede convertirse en un excelente complemento del análisis citogenético, por lo que su introducción al servicio de diagnóstico cromosómico de nuestro país, podría ser una realidad en poco tiempo.

## **Conclusiones y recomendaciones**

- a) Los datos presentados en este estudio confirman que la QF-PCR es una metodología fiable, muy exacta, sensible y rápida para la detección de aneuploidías. La QF-PCR puede cambiar la manera de hacer el diagnóstico citogenético en nuestro país, ya que al ser un complemento tan eficaz del

análisis cromosómico, lo vuelve más ágil y versátil, con alcances más allá del cariotipo y con la capacidad de suplir sus carencias.

- b) La QF-PCR pudo utilizarse con éxito en varios tipos de muestras biológicas, con el mismo protocolo de extracción de ADN y sin necesidad de reactivos especiales para cada uno. Se obtuvo ADN de buena calidad a partir de líquido amniótico sin importar la edad gestacional o contaminación bacteriana, así como de muestras de sangre coaguladas y tejidos de restos de abortos macerados.
  
- c) Fue posible realizar el ensayo en casi todas las muestras para las cuales no se había obtenido el cariotipo. Esto fue uno de los puntos más fuertes de la técnica, ya que la tasa de fracaso en los cultivos celulares superó el 25%.
  
- d) Con la QF-PCR se pudieron detectar todas las trisomías 21 y 18 presentes en la población estudiada, así como diagnosticar ausencia de cromosomopatía en las muestras sin trisomía. Aunque sí es posible detectar la presencia de muestras con mosaicismo, en este estudio no se pudo diagnosticar un caso de mosaico, debido a la baja representatividad de la línea celular anormal.
  
- e) En varios casos el diagnóstico pudo obtenerse en dos días después de la llegada de la muestra al laboratorio, lo cual demuestra que es posible realizar un diagnóstico preciso y rápido. Sin embargo, esto no siempre fue posible, ya que solo se logró cuando los secuenciadores con los que cuenta la

Universidad funcionaron adecuadamente. De lo anterior se deriva la necesidad de que el INISA cuente con un secuenciador propio para utilizarlo en la QF-PCR y otras muchas aplicaciones. Así, el diagnóstico podría ser aun más rápido, inclusive en el mismo día.

- f) Ya que se demostró que para esos autosomas la QF-PCR fue muy eficiente, sensible y específica, sería recomendable incluir una multiplex para el estudio de los cromosomas sexuales, y poder así no solo indicar el sexo del feto, sino también diagnosticar aneuploidías de estos cromosomas.
  
- g) La combinación de los 12 marcadores utilizados demostró ser muy eficiente para el análisis de las muestras, ya que no hubo ningún espécimen que fuera no informativo para alguno de los tres cromosomas. Sin embargo, dado que los porcentajes de heterocigosis encontrados en ese estudio fueron para algunos de ellos muy disímiles con respecto a la literatura, y mostraron heterocigosis relativamente bajas, sería recomendable estudiar otros STRs en la población costarricense, en una muestra más grande para buscar los que pudieran ser más adecuados para incluirlos como parte de las multiplex, ya sea para reemplazar a alguno de los marcadores o para aumentar los STRs que se amplifican simultáneamente, y así mejorar al poder de detección de la técnica.
  
- h) Sería muy interesante realizar otras investigaciones basadas en la metodología de la QF-PCR, como la determinación del origen parental y

meiótico de las trisomías y el estudio de inestabilidad microsatelítica relacionada con el cáncer. Adicionalmente, como también es posible el estudio de genes específicos con esta técnica, podría realizarse un escrutinio simultáneo de aneuploidías y otras enfermedades genéticas.

- i) Para poder implementar la QF-PCR como parte de los servicios de análisis cromosómico que brinda el INISA, después de su validación sería recomendable someterla al proceso de acreditación del ensayo, y así cumplir con la norma ISO correspondiente.

### **Bibliografía**

Agnieszka, S., K. Pesz & J. Gil. 2007. Prenatal diagnosis - principles of diagnostic procedures and genetic counseling. *Fol. Histochem. Cytobiol.*45(1): 11-16

Anónimo. 2003. Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases. *Terrestrial Manual*. Francia. 33 p.

Anónimo. 2007. Antenatal Down Syndrome Screening in New Zealand. A Report of the Antenatal Down Syndrome Screening Advisory Group to the National Screening Unit. Nueva Zelanda. 93 p.

Anónimo. 2007a. Professional Guidelines for Clinical Cytogenetics Association for Clinical Cytogenetics. General Best Practice Guidelines. British Society for Human Genetics. Reino Unido. 25p.



- Anónimo. 2008. Validation and quality control of polymerase chain reaction methods used for the diagnosis of infectious diseases. OIE Terrestrial Manual. Francia. 10 p
- Ashton, E., S.Yau, Z. Deans & S. Abbs. 2008. Simultaneous mutation scanning for gross deletions, duplications and point mutations in the DMD gene. *Eur. J. Hum. Genet.* 16: 53–61
- Bellmunt-Montoya, S. 2007. Validación de pruebas diagnósticas. *Angiol.* 59 (6): 433-438
- Bischoff, F., D. Lewis & J. Simpson. 2005. Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure. *Human Reproduction Update* 11(1): 59–67
- Blake, D., S. Tan & A. Ao. 1999. Assesment of multiplex fluorescent PCR for screening single cells for trisomy 21 and single gene defects.1999. *Mol. Hum. Reprod.* 5(12): 1166-75
- Bojesen, A. S. Juul, & C. Højbjerg. 2003. Prenatal and Postnatal Prevalence of Klinefelter Syndrome: A National Registry Study. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88(2):622–626
- Boué, A. 1995. *Fetal Medicine. Prenatal diagnosis and management.* Oxford University Press. Estados Unidos. 283p.
- Brown, L., M. Abigania, D. Warburton & S Brown. 2006. Validation of QF-PCR for prenatal aneuploidy screening in the United States. *Prenat. Diagn.* 26(11): 1068-74
- Bryndorf T., M. Kirchhoff, H. Rose & J. Maahr. 1995. Comparative Genomic Hibridation in Clinical Citogenetics. *Am J. Hum Genet.* 57: 1211-1220
- Bui, T., E. Blennow & M. Nordenskjold. 2002. Prenatal diagnosis: molecular genetics and cytogenetics. *Clin. Obstr. Gyn.* 16(5): 629-642
- Caine, A., E. Maltby, C. Parkin, J. Waters & J. Crolla. 2005. Prenatal detection of Down's syndrome by rapid aneuploidy testing for chromosomes 13, 18, and 21 by FISH or PCR without a full karyotype: a cytogenetic risk assessment. *Lancet* 366: 123–28
- Castro-Volio, I. 2004a. Pasado, presente y futuro de la citogenética en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 52 (3): 537-44
- Castro-Volio, I. 2004b. El diagnóstico prenatal de defectos cromosómicos en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 52 (3): 545-549
- Castro-Volio, I. & F. Ortiz. 2003. Cordocentesis para diagnóstico fetal citogenético en Costa Rica. *Progr. Diagn. Trat. Prenat.* 15(3): 116-119

- Castro-Volio, I. & F. Ortiz. 2004. Cariotipos fetales mediante amniocentesis y cordocentesis en Costa Rica. *Perinatol. Reprod. Hum.* 18(3):187-198
- Castro-Volio, I., G. Escalante, H. Mora, D. Guerra, L. Sánchez & C. Peña. 1995. Cariotipo de células fetales en el diagnóstico prenatal en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 43(1-3): 31-37
- Castro-Volio, I., K. Sander, M. Vargas, L. Sánchez & G. Escalante. 2000. Cariotipos fetales en embarazos de alto riesgo genético provenientes de hospitales de la seguridad social y de la consulta privada, de 1993 a 1998. *Acta Médica Costarricense.* 2(1): 25-30.
- Castro-Volio, I., K. Sander, M. Vargas, L. Sánchez & G. Escalante. 2001. Diagnóstico prenatal citogenético mediante amniocentesis durante los trimestres II y III de gestación en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 49(3-4): 1227-1236
- Centeno, C., A. Beltrán, C. Ruiz, T. Centeno, J. Macías & M. Martín. 2001. Cromosopatías en recién nacidos malformados. *An Esp Pediatr.* 54: 582-587
- Chen, C., S. Chern & W. Wang. 2000. Rapid determination of zygosity and common aneuploidies from amniotic fluid cells using quantitative fluorescent polymerase chain reaction following genetic amniocentesis in multiple pregnancies. *Hum Reprod.* 15(4): 929-934
- Chitty, L., K. Kagan, F. Molina, J. Waters & K. Nicolaides. 2006. Fetal nuchal translucency scan and early prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities by rapid aneuploidy screening: observational study. *BMJ* 332: 452-455
- Cirigliano, V. & M. Adinolfi 2006. Rapid Prenatal Diagnosis of Common Chromosome Aneuploidies by Quantitative Fluorescent PCR, pp 115-136. In: D. Wells (Ed). *Cytogenetics in Reproductive Medicine.* Landes Bioscience. Estados Unidos.
- Cirigliano, V., M. Ejarque, M. Cañadas, E. Lloveras, A. Plaja, M. Pérez, C. Fuster & J. Egozcue. 2001a. Clinical application of multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the rapid prenatal detection of common chromosome aneuploidías. *Mol. Hum. Reprod.* 7(10): 1001-6
- Cirigliano, V., P. Lewin, S. Szpiro-Tapies, C. Fuster & M. Adinolfi. 2001b. Assessment of new markers for the rapid detection of aneuploidies by quantitative fluorescent PCR (QF-PCR). *Ann. Hum. Genet.* 65: 421-427
- Cirigliano, V., G. Voglino, M. Cañadas, A. Marongiu, E. Ejarque, E. Ordóñez, A. Plaja, M. Massobrio, T. Todros, M. Campogrande & M. Adinolfi. 2004. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assesment on 18 000 consecutive clinical samples. *Mol. Hum. Reprod.* 10(11): 839-446

Cirigliano, V., P. Cañadas, A. Plaja, E. Ordóñez, C. Mediano, A. Sánchez e I. Farrán. 2003. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidías and zigosity in multiple pregnancies by amniocetesis with single insertion of the needle and Quantitative Fluorescent PCR. *Prenat. Diagn* 23: 629-633

Cirigliano, V. G. Voglino, P. Cañadas, E. Ordonez, E. Lloveras, A. Marongiu, A. Plaja, C. Fuster & M. Adinolfi. 2006. Rapid Prenatal Diagnosis by QF-PCR: Evaluation of 30 000 Consecutive Clinical Samples and Future Applications. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1075: 288 - 298

Collins, V., C. Webley, J. Sheffield & L. Halliday. 1998. Fetal outcome and maternal morbidity after early amniocentesis. *Prenat. Diagn.* 18: 767-772

Crow, J. 2000. The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation. *Nat. Rev. Genet.* 1: 40-47.

Cuckle, H. 2005. Primary prevention of Down's syndrome. *Int. J. Med. Sci* 2(3): 93-99

Cunniff, C. 2004. Prenatal Screening and Diagnosis for Pediatricians. *Pediatrics.* 114(3): 889-894

Daniely M., G. Barkai , B. Goldman & A. Aviram-Goldring . 1999. Detection of numerical chromosome aberrations by comparative genomic hybridization. *Prenat. Diagn.*19: 100-104

Day, T. & P. Taylor. 1998. Chromosomal drive and the evolution of meiotic nondisjunction and trisomy in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 2361-65

Diego-Álvarez, D., M. García-Hoyos, M. Trujillo, C. González-González, M. Rodríguez de Alba, C. Ayuso, C. Ramos-Corrales e I. Lorda-Sánchez. 2005. Application of quantitative fluorescent PCR with short tandem repeat markers to the study of aneuploidies in spontaneous miscarriages. *Hum. Reprod.* 20(5):1235-1243

Donaghue, C., A. Roberts, K. Mann & C. Ogilvie. 2003. Development and targeted application of a rapid QF-PCR test for sex chromosome imbalance. *Prenat. Diagn.* 23: 201-210

Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat. Rev. Genet.* 5 :435- 443

Fang, Z.,X. Xin, Z. Yuan-zhen, S. Xiao-bo, P. Jian-hong, W. Chun-Hong, X. Chen-ling, L. Xia. 2006. Rapid prenatal diagnosis of trisomy 21 by fluorescent quantitative multiplex polymerase chain reaction. *Chinese Medical Journal* .119 (6): 514-517

Findlay, I., P. Matthews, T. Toth & P. Quirke. 1998. Same day diagnosis of Down's syndrome and sex in single cells using multiplex fluorescent PCR. *J. Clin. Pathol.: Mol Pathol* 51:164-167

Ghosh, S. & S. Dey. 2003. DNA Diagnosis of Down Syndrome Using Polymerase Chain Reaction and Polymorphic Microsatellite Markers. *Int J Hum Genet*, 3(1): 17-20

Grati, M., B. Cassanib, F. Rossellaa, P. Antonazzoc, B. Gentilina, Sirchiaa, L. Moria, S. Riganod, G. Bulfamanteb, I. Cetinc & G. Simonia. 2005. Fetal and Placental Chromosomal Mosaicism Revealed by QF-PCR in Severe IUGR Pregnancies. *Placenta* 26: 10-18

Gussin, H. & S. Elias. 2002. Culture of fetal cells from maternal blood for prenatal diagnosis. *Hum. Repr. Update*. 8(6)523-527

Guatashaw, K. 1997. Chromosome stains, pp 259-285. In M. Barch, T. Knutsen & J. Spurbeck (eds.). *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Lippincot-Raven Publishers. Filadelfia

Hampel, H., W. Frankel, E. Martin, M. Arnold, K. Khanduja, P. Kuebler, H. Nakagawa, K. Sotamaa, T. Prior., J. Westman, J. Panescu., D. Fix, J. Lockman, I. Comeras & A. de la Chapelle. 2005. Screening for the Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer). *N Engl J Med*. 352:1851-60.

Hassold, T. & S. Sherman. 2000. Down Syndrome: Genetic recombination and the origin of the extra chromosome 21. *Clin Genet* 57(2): 95-100

Hewison, J., J Nixon, J. Fountain, K Cocks, C. Jones, G. Mason, S. Morley & J. Thornton. 2006. Amniocentesis results: investigation of anxiety. *The ARIA trial. Health Technology Assessment*. 10(50): 1-93

Jennings, H y M. Brown. 1997. Cytogenetics. An overview, pp19-50. In M. Barch, T. Knutsen & J. Spurbeck (eds.). *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Lippincot-Raven Publishers. Filadelfia.

Jobanputra, V., K Kumar & K. Kucheria. 2002. Prenatal detection of aneuploidies using fluorescence *in situ* hybridization: A preliminary experience in an Indian set up. *J. Biosci.* 27 (2):155-163

Johnson R. & P. Slade. 2003. Obstetric complications and anxiety during pregnancy: is there a relationship? *J Psychosom Obstet Gynecol*. 24:1-14

Junho, S. H. Belo, E. Fontoura & R. Sturzeneker 2003. Investigação genética dos abortamentos espontâneos pelo DNA. *Rev Med Minas Gerais*. 13(3):164-73

Klug, W. & M. Cummings. 1999. *Conceptos de Genética*. Prentice Hall. España. 814p.

- Kuliev, A. & Y. Verlinsky. 2004. Meiotic and mitotic nondisjunction: lessons from preimplantation genetic diagnosis. *Hum. Reprod. Update* 10(5): 401–407
- Lee, M., H. Ryu, D. Kim, B. Lee, E. Cho, J. Yang, M. Kim, J. Han & S. Park. 2004. Rapid Prenatal Diagnosis of Down Syndrome Using Quantitative Fluorescent PCR in Uncultured Amniocytes. *J Korean Med Sci* 19: 341-4
- Leung, W., E. Lau, T. Lao & M. Tang. 2003. Can Amnio–polymerase chain reaction alone replace conventional cytogenetic study for women with positive biochemical screening for fetal Down Syndrome?. *Obstet. Gynecol.* 101(5): 856-861.
- Leung, W., Y. Lam, Y. Wong, E. Lau & M. Tang. 2002. The effect of fast reporting by amnio-PCR on anxiety levels in women with positive biochemical screening for Down syndrome — a randomized controlled trial. *Prenat Diagn.* 22: 256–259.
- Levett L., S. Liddle & R. Meredith. 2001. A large-scale evaluation of amnio-PCR for the rapid prenatal diagnosis of fetal trisomy. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 17:115–8.
- Li, Y., A. Korol, T. Fahima, A. Beiles & E. Nevo. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.* 11: 2453–2465
- Littleton, H., C. Radecki & A. Berenson. 2006. Correlates of anxiety symptoms during pregnancy and association with perinatal outcomes: A meta-analysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 62: 123-133
- Machatkova, M., M. Brouckova, M. Matejkova, A. Krebsova, K. Sperling, S. Vorsanova, S. Kutsev, T. Zerova, S. Arbuzova, R. Krejci, M. Petersen & M. Macek. 2005. QF-PCR Examination of Parental and Meiotic Origin of Trisomy 21 in Central and Eastern Europe. *J. Histochem. & Cytochem.* 53(3): 371–373
- Mann, K., S. Fox, S. Abbs, S. Yau, P. Scriven, Z. Docherty, C. Ogilvie. 2001. Development and implementation of a new rapid aneuploidy diagnostic service within the UK National Health Service and implications for the future of prenatal diagnosis. *Lancet* 358: 1057-61
- Mann, K., C. Donaghue, S. Fox, Z. Docherty & C. Ogilvie. 2004. Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy. *Eur. J. Hum. Genet.* 12: 907–915
- Mansfield, E. 1993 Diagnosis of Down Syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. *Hum. Mol. Genet.* 2: 43-50
- Matthews, A. 1999. Chromosomal Abnormalities: Trisomy 18, Trisomy 13, Deletions, and Microdeletions. *J Perinat. Neonat. Nurs.* 13(2):59–75

Mc Fadden , D. & J. Friedman. 1997. Chromosome abnormalities in human beings. *Mutat Res* 396: 129-140

Misri, S., T. Oberlander, N. Fairbrother, D. Carter, D. Ryan, A. Kuan & P. Reebye. 2004. Relation Between Prenatal Maternal Mood and Anxiety and Neonatal Health. *Can J. Psychiatry*. 49:684-689

Montgomery, K., E. Keitges & J. Meyne. 1997. Molecular Cytogenetics: Definitions, Clinical aspects and protocols, pp 413-489. In M. Barch, T. Knutsen & J. Spurbeck (eds.). *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Lippincot-Raven Publishers. Filadelfia.

Morera, B., R. Marín-Rojas & R. Barrantes. 2003. Gene Admixture in the Costa Rican Population. *Ann. Hum. Genet.* 67: 71-80

Muller F., D. Thibaud, F. Poloce, M. Gelineau & M. Bernard. 2002. Risk of amniocentesis in women screened positive for Down syndrome with second trimester maternal serum markers. *Prenat Diagn.* 22(11): 1036-9

Nagaishi M. T. Yamamoto, K. Inuma, K. Shimomura, S. Berend & J. Knops. 2004. Chromosome abnormalities identified in 347 spontaneous abortions collected in Japan. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 30 (3):237-241

Nicolaidis, K. 2004. Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. *Am. J. Obst. Gynecol.* 191:45-67

Nicolini, U., F. Lalatta, F. Natacci, C. Curcio & T. Bui. 2004. The introduction of QF-PCR in prenatal diagnosis of fetal aneuploidies: time for reconsideration. *Hum. Reprod. Update.* 10(6): 541-548

Ogilvie, C. 2003. Prenatal diagnosis for chromosome abnormalities: past, present and future. *Path Biol* 51:156–160

Ogilvie, C., A. Lashwood, L. Chitty, J. Waters, P. Scriven & F. Flintera. 2005. The future of prenatal diagnosis: rapid testing or full karyotype? An audit of chromosome abnormalities and pregnancy outcomes for women referred for Down's Syndrome testing. *BJOG* 112: 1369–1375

Ochshorn, Y., A. Bar-Shira, A. Jonish & Y. Yaron. 2006. Rapid Prenatal Diagnosis of Aneuploidy for Chromosomes 21, 18, 13, and X by Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction. *Fetal Diagn Ther* 21:326–331

Patterson, D. & A. Costa. 2005. Down syndrome and genetics a case of linked histories. *Nat. Rev. Genet.* 6 (137): 137-147

Pergament, E. 2000. New molecular techniques for chromosome analysis. *Clinical Obstetrics and Gynaecology.* 14(4): 677-690.

- Pertl, B. & D. Bianchi. 2001. Fetal DNA in Maternal Plasma: Emerging Clinical Applications. *Obstetrics & Gynecology* 98:483-490
- Pertl, B., S. Kopp, P. Kroisel, L. Tului B. Brambati & M. Adinolfi. 1999a. Rapid detection of chromosome aneuploidies by quantitative fluorescence PCR: first application on 247 chorionic villus samples. *J Med Genet.* 36:300-303
- Pertl, B., D. Pieber, A. Lercher, I. Orescovic, M. Haeusler, R. Winter, P. Kroisei & M. Adinolfi. 1999b. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy by quantitative fluorescent PCR on fetal samples from mothers at high risk for chromosome disorders. *Mol. Hum. Reprod.* 5(12): 1176-79.
- Peters, F., O. Drummer & F. Musshoff. 2007. Validation of new methods. *Forens. Sci. Int.* 165: 216-224
- Priest, J. & K. Rao. 1997. Prenatal chromosome diagnosis, pp199-215. In M. Barch, T. Knutsen & J. Spurbeck (eds.). *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Lippincot-Raven Publishers. Philadelphia.
- Primost, I., J. Mincman, P. García, I. Coco, F. Gismondi, N. Neuspiller & R. Coco. 2007. Determinación de aneuploidías por PCR fluorescente. *Reproducción.* 22: 69-86
- Rasmussen, S., L. Wong, Q. Yang, K. May & J. Friedman. 2003. Population-Based Analyses of Mortality in Trisomy 13 and Trisomy 18. *Pediatrics* .4: 28-35
- Ribic, C., D. Sargent, M. Moore, S. Thibodeau, A. French, R. Goldberg, S. Hamilton, P. Laurent-Puig, R. Gryfe, L. Shepherd, D. Tu, M. Redston & S. Gallinger. 2003. Tumor Microsatellite-Instability Status as a Predictor of Benefit from Fluorouracil-Based Adjuvant Chemotherapy for Colon Cancer. *N. Engl. J. Med.* 349:247-57.
- Rodríguez, A. G. Arrieta, M. Vargas, O. García, I. Yurrebaso, J. Pérez, M. Villalta & M. Espinoza. 2007. Population genetic data for 18 STR loci in Costa Rica. *Forens. Sci. Int.* 168: 85-88
- Roizen, N. & D. Patterson. 2003. Down's syndrome *Lancet* 361: 1281-89
- Roper, A. & R. Reeves. 2006. Understanding the Basis for Down Syndrome Phenotypes. *PLoS Genetics* 2 (3): 168-177
- Rutjes, A., J. Reitsma, A. Coomarasamy, K. Khan & P. Bossuyt. 2007. Evaluation of diagnostic tests when there is no gold standard. A review of methods. *Health Technol. Assess.* 11: (50): 1-92

- Samura, O., S. Sohda, K. Johnson, B. Pertl, S. Ralston, L. Delli-Bovi & D. Bianchi. 2001. Diagnosis of Trisomy 21 in Fetal Nucleated Erythrocytes from Maternal Blood by Use of Short Tandem Repeat Sequences. *Clin. Chem.* 47(9): 1622–1626
- Scriven, P., F. Flinter, P. Braude & C. Ogilvie. 2001. Robertsonian translocations-reproductive risk and indications for preimplantation genetic diagnosis. *Hum. Reprod.* 16(11): 2267-2273
- Schmidt, W., J. Jenderny, K. Hecher, B. Hackeloer, S. Kerber, L. Kochan & K. Held. 2000. Detection of aneuploidy in chromosomes X, Y, 13, 18 and 21 by QF-PCR in 662 selected pregnancies at risk. *Mol. Hum. Reprod* 6(9): 855-860
- Schrock, E., S. Du Manoir & T. Veldman. 1996. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science.* 273: 494-497
- Trullols, E. 2006. Validation of Qualitative Analytical Methods. Tesis para optar por el grado de Doctor en Química. 284 p.
- Tufan, S., A. Tufan, B. Yildirimi & B. Kaleku .2005. Prenatal Diagnosis of a Trisomy 13 Case Associated with Holoprosencephaly by Ultrasonography and Quantitative Fluorescent PCR. *Turk. J. Med. Sci* 35: 179-83.
- Valdes, A., M. Slatkin & N. Freimert. 1993. Allele Frequencies at Microsatellite Loci: The Stepwise Mutation Model Revisited. *Genetics* 133: 737-749
- Valero, R., G. Marfany, R. Gil-Benso, M. Ibáñez, I. López-Pajares, F. Prieto, G. Rullan, E. Sarret & R. González-Duarte. 1999. Molecular characterisation of partial chromosome 21 aneuploidies by fluorescent PCR. *J. Med. Genet.* 36: 694-697
- Verma, L., F. McDonald, P. Leedham, M. McConachie, S. Dhanjal & M. Hulten. 1998. Rapid and simple prenatal DNA diagnosis of Down's syndrome. *Lancet* 352:9–12.
- Vogel, F. & A. Motulsky. 1997. Human genetics. Problems and approaches. Springer. Berlín. 851 p.
- Wachtel, S. & A. Tharapel. 2002. FISH and PRINS: competing or complementary technologies? *Am J Med Genet* 107: 97–98
- Wald, N., A. Kennard, A. Hackshaw & A. McGuire. 1998. Antenatal screening for Down's syndrome. *Health Technol. Assess.* 2(1): 1-111
- Wapner, R. 2005. Invasive Prenatal Diagnostic Techniques. *Semin Perinatol* 29:401-404
- Webster, M., N. Smith & H. Ellegren. 2002. Microsatellite evolution inferred from human– chimpanzee genomic sequence alignments. *PNAS* 99(13): 8748–8753



Wolfe K. & C. Herrington C. 1997. Interphase cytogenetics and pathology: a tool for diagnosis and research. *J. Pathol.* 181:359–61.

### **Referencias de internet**

Dallaire, L. 2002. Prenatal Diagnosis. Atlas of Genetics, Cytogenetics in Oncology and Haematology. University Hospital, Poitiers, Francia. (Consultada 24/3/2008, <http://AtlasGeneticsOncology.org/Educ/PrenatID30055ES.html>)

Mann, K., C. Ogilvie, C. Donaghue, T. Mountford, C. Mcanulty, J. Warner, N. Dunlop, L. Levett, C. Hardy, C. McConnel, J. Diack & F. McKay. 2005. QF-PCR for the diagnosis of aneuploidy. ACC Best practice Guidelines. Association for Clinical Cytogenetics. General Best Practice Guidelines. British Society for Human Genetics. Reino Unido (Consultado 10/11/2006, [www.cytogenetics.org.uk/info/ACC\\_QF-PCR](http://www.cytogenetics.org.uk/info/ACC_QF-PCR))

Natarajan, G. & M. Klein. 2006. The Fetus as a Patient: Prenatal Diagnosis and Fetal Therapy. Health on the Net Foundation, (Consultada 24/3/2008, <http://www.emedicine.com/ped/topic2953.htm>).