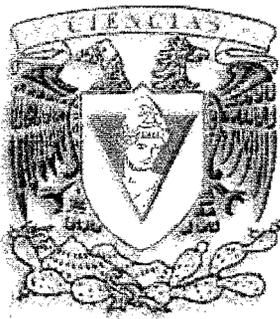


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIAGNÓSTICO PRENATAL DE ANEUPLOIDIAS EN
AMNIOCITOS HUMANOS NO CULTIVADOS POR
MEDIO DE LA TÉCNICA DE FLUORESCENCIA POR
HIBRIDACION *IN SITU* (FISH)

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G A
P R E S E N T A :
K A R E M N I E T O M A R T Í N E Z



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. RICARDO JUAN GARCÍA CAVAZOS



m. 344165



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo, respectivo.

NOMBRE: KAREM NIETO MARTINEZ
FECHA: 17-05-05
FIRMA: KRM

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Diagnóstico prenatal de aneuploidias en amniocitos humanos no cultivados por medio de la técnica de fluorescencia por hibridación *in situ* (FISH)."

realizado por Karem Nieto Martínez

con número de cuenta 09350458-6 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

M. en C. Ricardo Juan García Cavazos

Propietario

Dra. Sara Frías Vázquez

Propietario

M. en C. Bertha Molina Álvarez

Suplente

M. en C. María Guadalupe Ordaz Téllez

Suplente

M. en C. Angélica Graciela Martínez Hernández

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA HUMANA DEL
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA. SSA**

Contenido

| | |
|---|----|
| Resumen | 1 |
| 1. Introducción | 3 |
| 1.1 Definición de Diagnostico Prenatal | 3 |
| 1.2 Aspectos Históricos del Diagnóstico Prenatal | 4 |
| 1.3 Técnicas empleadas para el estudio citogenético prenatal | 4 |
| 1.3.1 Amniocentesis | 4 |
| 2. Líquido Amniótico | 6 |
| 2.1 Función | 6 |
| 2.2 Origen | 6 |
| 2.3 Características Bioquímicas | 6 |
| 2.4 Componentes Celulares | 7 |
| 3. Indicaciones para el estudio Citogenético Prenatal | 8 |
| 3.1 Edad Materna Avanzada | 8 |
| 3.2 Portadores de alteraciones numéricas y estructurales | 9 |
| 3.3 Desordenes ligados al cromosoma X | 9 |
| 3.4 Hijo previo con anomalías cromosómicas | 10 |
| 3.5 Prueba en suero materno positiva para defectos cromosómicos | 10 |
| 3.6 Ultrasonografía Anormal | 10 |
| 4. Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia (FISH) | 12 |
| 4.1 Fundamento de la técnica de FISH | 12 |
| 4.2 Tipos de sondas | 14 |
| 5. FISH y Diagnostico Prenatal | 17 |
| 6. Justificación | 19 |
| 7. Objetivos | 20 |
| 8. Hipótesis | 20 |
| 9. Material y métodos | 21 |
| 10. Resultados | 28 |
| 11. Discusión | 41 |
| 12. Conclusiones | 43 |
| Bibliografía | 44 |

Resumen

En la población general del 2 al 3% de los recién nacidos vivos presentan defectos congénitos, de los cuales el 0.5% aproximadamente están relacionados con cromosomopatías (Luthardt FW y cols, 2001), el 95% de estas últimas son aneuploidias que involucran a los autosomas 13, 18, 21 y los cromosomas sexuales, X e Y (Divane y cols, 1994). Es de gran importancia diagnosticar estas aneuploidias en embarazos que presenten indicadores de alto riesgo para cromosomopatías, a fin de brindar un asesoramiento genético adecuado.

En el Instituto Nacional de Perinatología (INPer) se realiza la técnica de amniocentesis y cultivo celular para obtener el resultado citogenético fetal por bandas G en un tiempo aproximado de 10 a 14 días, esto justifica la aplicación de un estudio de diagnóstico prenatal rápido y confiable para determinar si está presente una cromosomopatía fetal. En la última década, la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) ha sido utilizada como una herramienta de citogenética molecular que permite la detección de aneuploidias en células en metafase e interfase en un tiempo no mayor a 48 horas.

El objetivo del presente trabajo fue estandarizar la técnica de FISH en amniocitos no cultivados y detectar aneuploidias más comunes utilizando sondas para los cromosomas 13 (13q14), 18 (D18Z1), 21 (21q22.13-q22.2), X (DXZ1) e Y (DYZ3) de la casa comercial Vysis. La población de estudio se integró por 39 pacientes que fueron referidas por la consulta de Genética Prenatal del INPer para amniocentesis por embarazo de alto riesgo para cromosomopatías en un periodo de 1 año. Se aplicó la técnica de FISH en las muestras de líquido amniótico para detectar las aneuploidias antes mencionadas y los criterios para el análisis por técnica de FISH se basaron en los propuestos por Hogge y colaboradores (1995). El resultado obtenido por FISH fue comparado con el estudio de citogenética clásica por bandas G. Los resultados obtenidos por FISH concordaron con los de citogenética clásica en 37 muestras, dos fueron no informativas debido a la presencia de citoplasma ló que impidió un análisis confiable.

Es importante mencionar que la eficiencia de hibridación fue mayor a menor edad gestacional de las muestras de líquido amniótico procesadas por FISH. Con esto se concluye que la técnica de FISH en amniocitos no cultivados es una herramienta confiable para la detección de las aneuploidias más frecuentes, además representa una técnica invaluable para la citogenética clínica debido a que proporciona resultados en corto tiempo y requiere poca cantidad de muestra para realizar el estudio.

El establecer de manera inicial la técnica de FISH para el diagnóstico prenatal en embarazos de alto riesgo para las aneuploidias más frecuentes podría optimizar la atención materno-fetal, puesto que el tener un diagnóstico temprano permite proporcionar un asesoramiento genético adecuado.

1. Introducción

En la población general del 2 al 3% de los recién nacidos vivos presentan defectos congénitos, de los cuales el 0.5% aproximadamente están asociados a cromosomopatías (Luthardt FW y cols, 2001), el 95% de estas, se relacionan con aneuploidias que involucran a los cromosomas 13, 18, 21, X e Y (Divane y cols, 1994). Aunque el porcentaje es bajo, representa un número importante de familias con riesgo de tener un hijo enfermo, además del impacto emocional, familiar y económico que esto implica. El saber que tipo y presencia de la alteración permite brindar a la pareja la posibilidad de conocer los alcances de la enfermedad y las opciones de manejo pre y/o postnatales existentes.

1.1 Definición de Diagnóstico Prenatal

El diagnóstico prenatal (DP) permite comunicarse con el feto para conocer su estado de salud, mientras que el diagnóstico citogenético prenatal proporciona información del estado cromosómico del feto.

1.2 Aspectos históricos del Diagnóstico Prenatal

A medida que la nueva tecnología permitía acceso al feto, se avanzaba en el diagnóstico de la condición fetal. En 1952, se practica la amniocentesis –que es el procedimiento para obtener líquido amniótico (LA) por punción transabdominal- con un propósito diagnóstico: el estudio de la eritroblastosis fetal. En 1956 se determinó por primera vez el sexo del feto por análisis de la cromatina sexual del cromosoma X (Análisis del Corpúsculo de Barr) en LA. El desarrollo durante esos años de las técnicas citogenéticas y la determinación del cariotipo humano, inducen a Fuchs y Philips en 1963 a practicar los primeros cultivos con el componente celular del LA, de esta forma se logran, entre 1965 y 1966, los primeros cariotipos fetales a partir de células de líquido amniótico y dos años después se efectúa el primer diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas. A partir de ese momento queda abierto el camino para la investigación cromosómica del feto y durante mucho tiempo, la expresión *diagnóstico prenatal* se hizo sinónima de *diagnóstico cromosómico* (Carrera JM y cols, 1990).

La introducción de la ultrasonografía bidimensional en obstetricia significó por primera vez la posibilidad de estudiar el fenotipo fetal. Los primeros equipos tenían una escasa definición y el diagnóstico de los defectos congénitos quedaba limitado a las anomalías más gruesas como la anencefalia. Hoy en día la alta resolución de los equipos de ultrasonido es un gran apoyo visual para los procedimientos diagnósticos como la amniocentesis, pues permite detectar un gran porcentaje de las dismorfias fetales.

En los años 80's gracias a la fetoscopia no solo fue posible ver directamente el feto, sino también obtener sangre fetal o biopsia directa de piel para cultivo celular o estudios enzimáticos, lo que permite el diagnóstico de genopatías fetales. Cuando parecía que los procedimientos endoscópicos se convertirían en los elementos fundamentales para dar soporte al diagnóstico directo del feto, en 1983, se demostró que es posible la obtención de sangre fetal sin fetoscopia, mediante la punción directa guiada por ultrasonido de los vasos del cordón. El desarrollo de estas técnicas de diagnóstico prenatal, originaron grandes avances para la detección de anomalías cromosómicas en el feto.

1.3 Técnicas empleadas para estudio citogenético prenatal

Las células fetales para realizar estudio citogenético prenatal, se pueden obtener por biopsia de vellosidades coriales (**BVC**), cordocentesis, orina fetal y fluidos de atesoramiento corporal fetal anormal como ascitis, derrame pleural, pericárdico o bien higroma quístico y amniocentesis, que es el procedimiento de diagnóstico prenatal más utilizado en México.

1.3.1 Amniocentesis

La amniocentesis se emplea por primera vez en Alemania en 1880 para tratar el polihidramnios y en 1937, se utilizó para introducir solución salina hipertónica para la interrupción del embarazo, pero no fue sino hasta los años cincuenta cuando se utilizó para la detección de enfermedades genéticas; En 1956 se determinó el sexo fetal por análisis del corpúsculo de Barr en LA, en 1966 Steele y Breg realizaron estudio citogenético en LA y en 1967 Jacobson y Barter detectaron la primera anomalía cromosómica: una translocación balanceada entre dos cromosomas del grupo D. En 1968 Valentin y Nadler en forma independiente detectaron un feto con síndrome de Down y confirmaron sus hallazgos después de la interrupción del embarazo, en el mismo año diagnosticaron la primera deficiencia enzimática (galactosemia) y en los siguientes años, múltiples investigadores detectaron diversos padecimientos cromosómicos y metabólicos, pero hasta 1970 se concluyó que la amniocentesis proporcionaba una exactitud diagnóstica aceptable con riesgo relativamente bajo de error, a partir de entonces se estableció este procedimiento como parte integral del cuidado obstétrico moderno (Carrera JM y cols, 1990; Milunsky A y cols, 1975).

La amniocentesis se realiza habitualmente entre la 15 a 18 semanas de gestación por punción transabdominal y bajo guía ultrasonográfica continua, lo que permite corroborar la edad gestacional, detectar anomalías de embarazo, cantidad de LA, malformaciones fetales y gestaciones múltiples. Las células presentes en el LA son cultivadas para estudio citogenético o molecular, mientras que el sobrenadante se utiliza para estudios bioquímicos. El riesgo de pérdida de embarazo por esta técnica es de 0.5%. (Milunsky y cols, 1990).

La obtención del LA durante el primer trimestre entre la 12 a 14 semanas de gestación (**SDG**) se asocia a un mayor riesgo de pérdida del embarazo comparativamente con la amniocentesis del segundo trimestre (15 a 18 SDG). Además entre las 15 y 16 SDG el útero es más accesible y contiene suficiente LA (200-250 ml) lo que permite aspirar un mililitro por SDG hasta 20 ml para el estudio, mientras que en amniocentesis temprana se obtiene 1 ml de LA por SDG. Por otra parte, el LA de edades gestacionales tempranas contiene muy pocas células, de las cuales solo del 20 al 30% son viables y por lo tanto hay poco éxito en el cultivo celular. (Milunsky A y cols, 1990; Carrera JM y cols, 1990). El resultado del cariotipo por medio de esta técnica se obtiene entre los 10 y 14 días, sin embargo los cambios y avances tecnológicos han generado la oportunidad de obtener información citogenética en menor tiempo, hace mas de una década la hibridación *in situ* con fluorescencia (**FISH**) se introdujo como una herramienta importante en el diagnóstico citogenético molecular, apoyando con evidencias a la Genética Clínica, gracias a estos avances, se ha desarrollado el diagnóstico prenatal multidisciplinario para el mejor manejo del binomio materno-fetal.

2. Líquido Amniótico

2.1 Función

El líquido amniótico (LA) proporciona un número importante de funciones para el desarrollo del feto, este proporciona protección al feto del trauma como la compresión del ambiente intrauterino. Además, una cantidad normal de LA origina un ambiente de ingravidez lo que permite el desarrollo del sistema músculo-esquelético por actividad fetal y es también importante para un buen desarrollo del sistema pulmonar y digestivo del feto. La ingestión de LA permite un crecimiento fetal normal y contribuye del 10 al 15% del peso fetal; proporciona estabilidad térmica y reduce infecciones por sus propiedades bacteriostáticas, por lo que es imposible un desarrollo fetal normal en ausencia de LA.

La magnitud del intercambio del LA no es bien conocida. Se han empleado diversas técnicas para calcular su volumen y sus resultados son similares al emplear métodos de dilución, con materiales radioactivos o diferentes químicos, de acuerdo a estos estudios, a las 14 SDG existe un promedio de 111.3 ml y a las 16 SDG un promedio de 207.2 ml (Milunski A y cols, 1990).

2.2 Origen

La formación y circulación del LA aún no se conoce claramente, parece que tiene un origen mixto, (Carrera JM y cols, 1990), pues procede de células del amnios, que forma parte de las membranas y recubre también la placenta y el cordón. El feto que contribuye con su excreción y también a través de su piel (trasudación), de su conducto traqueobronquial (eliminación de secreciones) y por trasudación de la sangre materna (Milunsky A y cols, 1990).

2.3 Características Bioquímicas

En la primera mitad del embarazo, el LA es una extensión de líquido extracelular del feto, la piel de este actúa como membrana semipermeable asemejándose a un ultrafiltrado de plasma fetal probablemente porque en esta fase del desarrollo, la orina constituye prácticamente un filtrado glomerular puro que aún no está alterado con la actividad tubular renal del feto. Esta actividad aumenta más tarde y da lugar a la absorción de sodio y agua, al mismo tiempo que aumentan las concentraciones de urea y creatinina, así como otros compuestos nitrogenados.

En la segunda mitad del embarazo, la composición bioquímica del LA cambia en forma progresiva, según avanza la gestación, la osmolaridad y la concentración de sodio disminuyen de forma regular a medida

que se aproxima el parto, mientras que las concentraciones de urea y creatinina aumentan, siendo estos valores diferentes a los hallados en plasma materno. La explicación más probable es que la piel del feto se queratiniza y se torna impermeable; se pierde la continuidad entre el LA y los fluidos del cuerpo fetal. La formación de orina fetal es la mayor contribución a la composición de LA, a su vez en este se han determinado hormonas, lípidos, fosfolípidos, proteínas, glucosa, fructosa, ácido láctico, pirúvico por mencionar algunos. Ciertas características bioquímicas, como proteínas, pH y glucosa distinguen al LA de la orina, ya que el primero es alcalino y positivo para proteínas y glucosa, mientras que la orina no posee estas características (Carrera JM y cols, 1990; Barch M, y cols. 1997).

2.4 Componentes celulares

Una importante proporción de las células nucleadas obtenidas en una amniocentesis del segundo trimestre son capaces de crecer en cultivo y son reminiscencias de células fetales epidermales de las 16 a las 18 SDG; de acuerdo con sus características estructurales, parte del material obtenido corresponde al exfoliado de células epidérmicas fetales, del epitelio urinario, del cordón umbilical, del propio amnios y algunas del epitelio digestivo y respiratorio. La cantidad y proporción de estas células en el líquido amniótico es variable; desde el cambio de la piel fetal de una estructura de dos capas, a un epitelio estratificado maduro alrededor de las 16 SDG que se lleva a cabo a diferentes grados en diferentes zonas del cuerpo, lo que lleva a un aumento en el número de células corneas y de descamación. (Milunsky A y cols, 1990)

Al obtener la muestra de LA para cultivo celular, algunas células se adhieren al fondo de la caja de cultivo en las primeras 6 a 72 horas, pero la mayoría lo hacen entre el tercer y sexto día de incubación. Aquellas que se adhieren en menos de 24 horas se les llama células rápidamente adherentes; si se presentan en grandes cantidades pueden indicar un defecto de cierre de tubo neural. En los cultivos puede observarse tres tipos celulares principalmente, células fibroblastoides, células epitelioides y células del LA o amniocitos estos últimos caracterizados por la producción de hormonas como estrógeno, progesterona y hormona gonadotropina coriónica lo que indica que estas células podrían provenir de la placenta, en contraste con las fibroblastoides que no muestran producción hormonal debido a su origen mesenquimatoso. Los amniocitos predominan en la mayoría de los cultivos y son las células procesadas para diagnóstico cromosómico. Algunas veces están presentes células maternas combinadas con las fetales como resultado de la ruptura vascular del tejido materno debido al procedimiento invasivo de la punción de amniocentesis (Barch M, y cols 1997; Milunsky y cols, 1990).

3. Indicaciones para estudio citogenético prenatal

Las indicaciones de embarazo de alto riesgo para cromosomopatías son: (Gersen S y cols, 1999)

3.1 Edad Materna Avanzada

La Edad Materna Avanzada (EMA) es la indicación mas frecuente, pues el riesgo de tener un feto con trisomía autosómica o sexual se incrementa claramente con la edad de la madre (Milunsky A y cols 1990). El riesgo específico para trisomía 21 en el segundo trimestre varia de 1 en 274 en mujeres de 35 años, a 1 en 10 en mujeres de 48 años, el riesgo de trisomía 18 y 13 también incrementa con la EMA. Las anormalidades de los cromosomas sexuales se presentan en 1 de cada 750 recién nacidos vivos, la incidencia de 47, XXY (Síndrome de Klinefelter) y 47, XXX (Síndrome de triple X) también se incrementa con la EMA (Níberg D y cols, 2003).

Es bien conocida la relación entre la frecuencia de trisomía cromosómica y la edad materna, sin embargo, existen otras alteraciones que incluyen anormalidades numéricas, estructurales, marcadores etc. Los fetos con trisomías se incrementan de 0.9% a los 35-36 años a 7.8% a los 43-44 años. La edad materna al momento del parto se ha planeado como un criterio para seleccionar a las mujeres con riesgo elevado para tener neonatos con Síndrome de Down; sin embargo, si se emplea únicamente este criterio, se ha estimado que menos del 20% de todos los fetos con este síndrome serían detectados anualmente. En la siguiente tabla se muestra la frecuencia de las aneuploidias mas frecuentes detectadas prenatalmente por cada 1000 fetos en un rango de edad materna de 35 a 49 años. (Schreinemarchers y cols, 1982)

Tabla 1. Frecuencia de aneuploidias fetales relacionadas con la edad materna

| Edad Materna (años) | No. Total de Fetos | Relación de Aneuploidias/1000 | | | | | |
|------------------------|-----------------------|-------------------------------|----------------|----------------|-----|-----|-----|
| | | Trisomía 21 | Trisomía 18 | Trisomía 13 | XXX | XXY | XYY |
| 35-49 | 19 672 | 9.1 | 2.5 | 0.6 | 1.0 | 1.3 | 0.5 |

Algunos estudios sugieren que la edad paterna avanzada podría tener un efecto menor pues la incidencia de aneuploidias es 3 veces mayor en padres que tienen mas de 39 años a los que tienen menos de 35 años (Gersen S y cols, 1999).

3.2 Portadores de alteraciones numéricas y estructurales

3.2.1 Rearreglos cromosómicos balanceados

Son el resultado de ruptura, intercambio subsecuente de segmentos cromosómicos y unión en cromosomas no homólogos, mientras esta indicación representa únicamente una pequeña proporción (usualmente menos de 5%) de los pacientes de diagnóstico prenatal, el riesgo de los padres de tener descendencia con complementos cromosómicos desbalanceados es significativamente mas alta que el riesgo por edad materna avanzada. El riesgo varia dependiendo de: (a) si la madre o el padre es portador, (b) el tipo de rearreglo, (c) el efecto intercromosómico (d) el tipo de cromosoma involucrado y (e) los puntos de ruptura específicos de cromosomas. (Gersen S y cols, 1999)

3.2.2 Translocaciones Robertsonianas

Estas translocaciones se refieren como translocaciones de "fusión céntrica", es una fusión de los brazos largos de dos cromosomas acrocéntricos (grupo D y G) después de la ruptura de las regiones centroméricas y pericentroméricas, mientras que los brazos cortos de ambos cromosomas se pierden. (Gersen S y cols, 1999).

3.2.3 Inversiones cromosómicas

Es el resultado de una ruptura doble en un cromosoma, inversión del segmento roto y reparación de la secuencia invertida. Si la inversión incluye al centrómero es pericéntrica, si esta confinada en un solo brazo del cromosoma es paracéntrica. El diagnóstico prenatal debe ser propuesto a la pareja cuando uno es portador de una inversión pericéntrica o paracéntrica, excepto con la inversión del cromosoma 9 que involucra la región heterocromática -9qh- que se considera un polimorfismo frecuente. (Gersen S y cols, 1999)

3.2.4 Mosaico cromosómico

El mosaico cromosómico se define como la presencia de dos o mas líneas celulares en un individuo, si en alguno de los miembros de la pareja existe la presencia de un mosaico ya sea en células somáticas o germinales se debe proponer el diagnóstico prenatal. (Gersen S y cols, 1999)

3.3 Desordenes ligados al cromosoma X

Cuando la madre es portadora de una enfermedad ligada al X o tiene alto riesgo de ser portadora, se justifica el diagnóstico prenatal para determinar el sexo del producto. Independientemente de la edad materna, el riesgo de tener un feto afectado con una enfermedad ligada al X es del 50% en caso de ser portadora (Gersen S y cols, 1999).

3.4 Hijo previo con anomalías cromosómicas

El riesgo de las mujeres que han tenido un hijo con trisomía se incrementa en 1 a 2% para el siguiente embarazo. El incremento de riesgo puede ser atribuido a (a) mosaicismo parental, (b) rearrreglo estructural, (c) genes productores de alto riesgo para no disyunción o (d) factores exógenos (Gersen S y cols, 1999)

3.5 Prueba en suero materno positiva para defectos cromosómicos

La aplicación de un examen prenatal genético se apoya por el reconocimiento de marcadores para embarazos de alto riesgo de tener fetos con cromosomopatía como trisomía 18 o 21. El tamiz en suero materno surgió a raíz de una observación hecha por Brock en el Reino Unido de que la α -fetoproteína (AFP), se encontraba elevada en pacientes cuyo feto presentaba anencefalia. Estas pruebas se iniciaron con las determinaciones de AFP en suero materno, pues la proteína fetal difunde al líquido amniótico y circulación materna, en un principio, esta prueba fue introducida para detectar defectos de cierre de tubo neural pues las madres que llevan un feto con este defecto, presentan determinaciones de niveles altos de AFP; además esta prueba detecta un 25 a 30% adicional de defectos con Síndrome de Down en mujeres jóvenes (Milunsky A y cols, 1990).

Posteriormente se observó que las cromosomopatías no solo estaban vinculadas a la AFP, también niveles altos de gonadotropina coriónica humana total (HGC) o de fracción beta de HGC (β -HCG) libre y la disminución de estriol no conjugado (μ E3). La combinación de AFP con μ E3 detecta aproximadamente el 40% de la trisomía 18, y la combinación de AFP, μ E3 y HGC el 70% de esta trisomía. Recientemente se ha utilizado la inhibina A en combinación con HGC y AFP y se detectó el 70% de los casos con síndrome de Down. Este estudio en combinación con edad materna y la ultrasonografía puede ayudar a detectar fetos con trisomías. (Gersen S y cols, 1999; Milunsky A y cols, 1990; Medina P, 2001).

3.6 Ultrasonografía Anormal

Hay una correlación importante en hallazgos ultrasonográficos prenatales y hallazgos patológicos en el feto con alteraciones cromosómicas. Los hallazgos detectados por ultrasonido que se han descrito y están asociados a aneuploidias reciben el nombre de marcadores ultrasonográficos, estos marcadores ayudan a identificar en un 50 a 70% fetos con síndrome de Down, en un 80% fetos con trisomía 18 y en un 90% fetos con trisomía 13. Además de que es útil para determinar la edad gestacional correcta y embarazos múltiples.

La tabla 2 resume los marcadores estructurales asociados a las trisomías más comunes, mientras que los marcadores para Síndrome de Turner son el higroma quístico, disgenesia ovárica, extremidades cortas y defectos cardíacos. (Nyberg D y cols, 2003).

Tabla 2. Marcadores ultrasonográficos para las trisomías 13, 18 y 21

| | Trisomía 21 | Trisomía 18 | Trisomía 13 |
|------------------------------------|---|--|--|
| Hallazgos Ultrasonográficos | <ul style="list-style-type: none"> • Defectos cardíacos • Atresia duodenal • Higroma quístico • Hidrops • Traslucencia nucal • Miembros cortos • Pielectasia • Clinodactilia • Hueso nasal ausente e hipoplásico | <ul style="list-style-type: none"> • Defectos cardíacos • Espina bífida • Disgenesia cerebral • Hernia diafragmática • Onfalocele • Aplasia radial • Higroma quístico • Braquicefalia • Retardo en el crecimiento intrauterino • Arteria umbilical única | <ul style="list-style-type: none"> • Defectos cardíacos • Anormalidades del sistema nervioso central • Anomalías faciales • Labio-paladar hendido • Anormalidades sistema renal • Onfalocele • Polidactilia • Higroma quístico • Pielectasia • Retardo en el crecimiento intrauterino • Arteria umbilical única |

4. Hibridación *In Situ* con Fluorescencia (FISH)

4.1 Fundamento de la técnica de FISH

La técnica de FISH se define como la alineación complementaria precisa de una secuencia de ADN (sonda) marcada con un fluorocromo a la secuencia de ADN blanco, permitiendo la visualización de secuencias específicas dentro de una preparación celular. (Fig.1)

La técnica de FISH es una metodología para examinar la localización de secuencias específicas de ADN en los cromosomas o en la cromatina y puede realizarse en varios tipos celulares. Históricamente la hibridación *in situ* (HIS) fue desarrollada con sondas marcadas radioactivamente, y detectada por autoradiografía, pues inicialmente se emplearon en el marcaje isótopos radioactivos como tritio (^3H) o ^{125}I . (Pinkel D y cols, 2000)

Hasta principios de los 80 los radioisótopos eran los únicos marcajes disponibles para sondas de ADN y para microautoradiografía y por tanto era el único medio para detectar las secuencias hibridadas *in situ*. Las sondas radioactivas proporcionan resolución espacial limitada para la HIS porque la emisión de la partícula radioactiva, deja cometas, no señales discretas y radiación de fondo en la emulsión fotográfica que cubre la preparación (Cremer y cols, 1998). Además de las inconveniencias prácticas por el uso de la radioactividad, el tiempo de vida de los radioisótopos y el largo tiempo de exposición que se requiere para la autoradiografía hicieron de la HIS una técnica complicada y de poco uso.

El desarrollo en los 80's de marcajes no radioactivos estables de ácidos nucleicos a través de fluorescencia o reacciones enzimáticas dejaron atrás la técnica de HIS radioactiva y esta última fue sustituida por el marcaje con fluorescencia que ha llegado a ser cada vez más útil. Esto se debe a numerosas razones: (1) la obtención de resultados en un menor tiempo, (2) mejoramiento en la resolución de la señal, (3) el desarrollo de protocolos de HIS que permite usar prácticamente cualquier ADN genómico como sonda, intensificando el potencial de esta técnica en muchas aplicaciones como mapeo génico y diagnóstico clínico y (4) utilización de diferentes colores, lo que proporciona recursos para la detección simultánea de múltiples blancos en un solo espécimen, esto es particularmente útil cuando hay alteraciones cromosómicas estructurales que involucran diferentes regiones cromosómicas o para la detección de varias alteraciones numéricas en un solo espécimen ya sea en interfase o metafase (Tkachuck y cols, 1991; Lichter P y cols, 1996; Pinkel D y cols, 2000; Pergament E y cols, 2000).

Principio de FISH

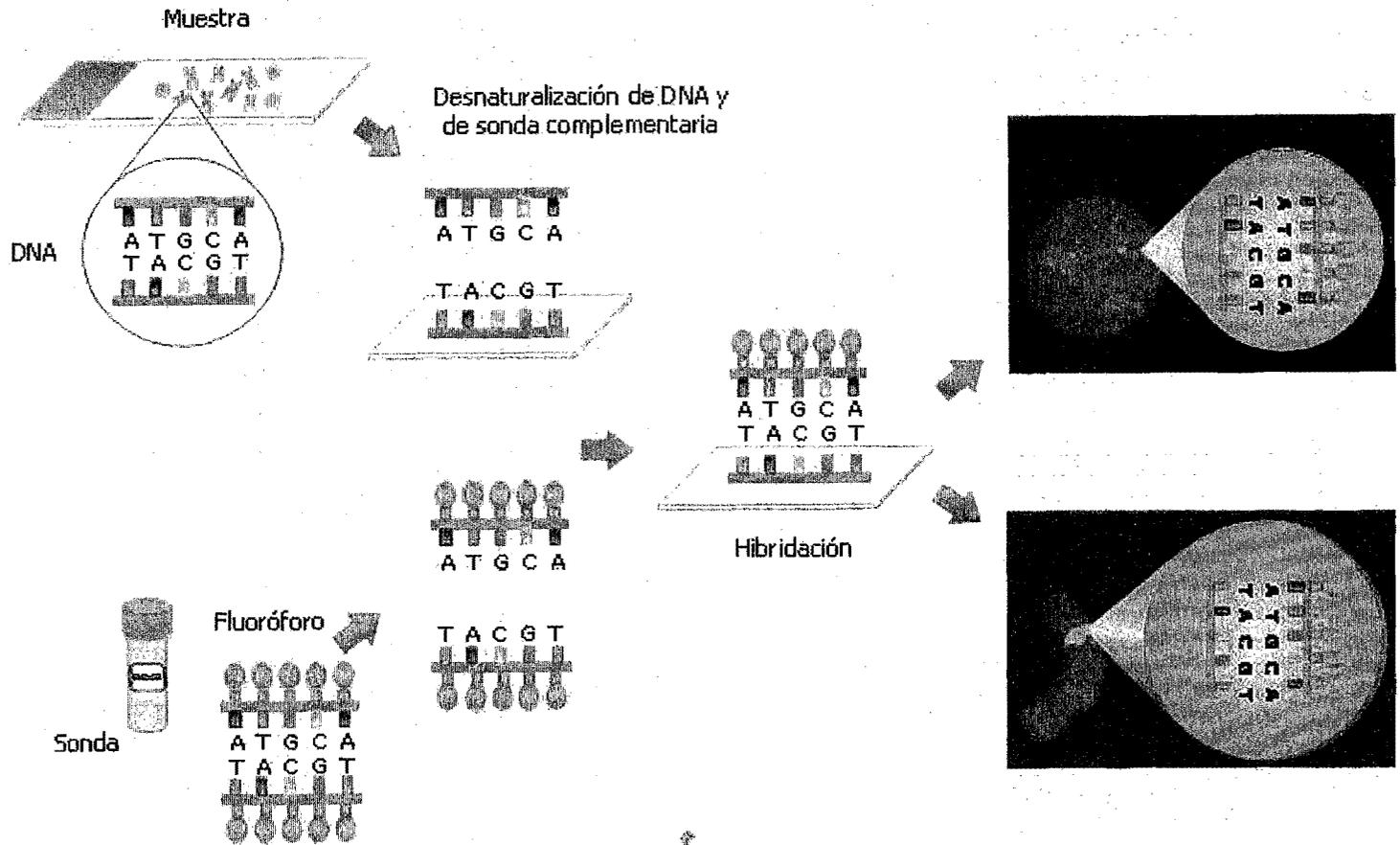


Fig.1. Diagrama que muestra el principio de la técnica de FISH

4.2 Tipos de sonda

Existen diferentes tipos de sondas que son utilizadas en la técnica de FISH y son:

4.2.1 Tinción completa de cromosomas

Para la tinción de un cromosoma completo se utiliza una mezcla de sondas cada una con una secuencia en un sitio específico a lo largo del cromosoma blanco. Estas sondas para secuencias específicas son usadas al mismo tiempo en una sola hibridación y da como resultado que el cromosoma de interés se marque completo. A esta mezcla de sondas se llama de tinción completa (**Fig. 2A**). El desarrollo de sondas multicolores y sistemas sofisticados de detección permiten un análisis simultáneo de todos los cromosomas humanos (Yung JF, 1996).

4.2.2 Sondas Centroméricas

Las sondas centroméricas contienen secuencias repetitivas de ADN α -satélite encontradas en regiones centroméricas de cromosomas humanos (**Fig. 2B**), estas sondas requieren un corto tiempo de hibridación y genera señales intensas, se utilizan en cromosomas en metafase y en núcleos interfásicos. Esta clase de sondas se usa para detectar anomalías cromosómicas numéricas en núcleos en interfase, donde el proceso de cultivo puede representar un problema. Esto hace a las sondas centroméricas apropiadas para casos prenatales y neonatales los cuales requieren un rápido diagnóstico, como detección de aneuploidias. (Yung JF, 1996)

Una desventaja de estas sondas es que los cromosomas 13/21 y 14/22 comparten secuencias centroméricas homólogas no permiten distinguir uno del otro si se aplican en núcleos en interfase, pero esto se solucionó con el uso de sondas de secuencia única (Soloviev y cols, 1995). Otras sondas de secuencias repetitivas son las sondas β -satélite que hibridan en la región pericentromérica el cromosoma 9, 13, 14, 15, 21 y 22, así como sondas de satélite III para la heterocromatina del brazo largo del cromosoma Y.

4.2.3 Sondas de secuencia única

La clase de sondas de secuencia única para FISH contiene fragmentos de ADN para un locus específico (**Fig. 2C**) y es conveniente para hibridar en metafase y en núcleos interfásicos. Cada sonda es específica para un gen y es perfecta para detectar microduplicaciones o microdelecciones de una región específica del cromosoma pueden ser imperceptibles por citogenética clásica. También se usan para identificar translocaciones recurrentes conocidas, encontradas en ciertos pacientes con leucemia o en translocaciones crípticas (Yung JP, 1996).

4.2.4 Sondas teloméricas

El telómero es la región terminal de cada cromosoma y es una región que tiene cientos de repeticiones de nucleótidos (TTAGGG), los telómeros son vitales porque protegen al cromosoma del acortamiento de los extremos en cada división celular y dan estabilidad cromosómica. Varios estudios sugieren que los telómeros pueden estar involucrados en eventos tales como deleciones terminales, amplificación génica y translocaciones crípticas. Existen sondas que detectan todos los telómeros, además de que se ha aislado y caracterizado un set completo de sondas específicas subtelo méricas para FISH que representan cada telómero humano de manera independiente (Yung, JF, 1996) (**Fig. 2D**).

Estas sondas pueden ser especialmente convenientes para la evaluación prenatal rápida de translocaciones crípticas, parejas con demasiados abortos y deleciones en familias con retardo mental idiopático. Estas sondas pueden llegar a ser usadas para detectar anomalías congénitas y alteraciones adquiridas presentadas en pacientes con cáncer y se sabe especialmente que las regiones humanas subtelo méricas contienen la más alta concentración de genes en todo el genoma. (Yung, JF, 1996).

Con el advenimiento de la técnica de FISH para el análisis del número de copias de los cromosomas o la estructura en células en interfase para el diagnóstico y pronóstico en clínica, ha aumentado considerablemente el potencial de esta técnica. La información citogenética obtenida de las células después de la técnica de FISH es el número de áreas de hibridación, el color de estas, la posición espacial y la intensidad. La variación de los patrones de hibridación, permiten identificar células con composición cromosómica aberrante. Las alteraciones cromosómicas estructurales como translocaciones e inversiones específicas pueden ser estudiadas en núcleos en interfase analizando el patrón de las señales (número, color y posición), lo que permite establecer relaciones clínico-citogenéticas y hacer posible la valoración del fenotipo y genotipo en diferentes estadios del ciclo celular (Mukherjee y cols, 1992).

Esto tiene gran significado en casos donde los cromosomas en metafase no pueden ser preparados en suficiente cantidad o calidad por ejemplo en varios tipos de tumores. Las sondas de múltiples colores con una resolución óptica máxima ha permitido la amplia aplicación de esta metodología en la investigación clínica y básica.

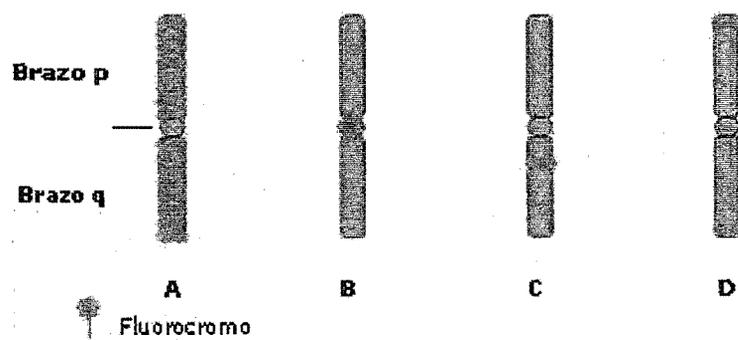


Fig. 2. Tipos de sondas. (2A) Sondas de tinción completa, (2B) Sondas centroméricas, (2C) Sonda para locus específico, (4D) Sondas teloméricas.

5. FISH y Diagnóstico Prenatal

Las técnicas de citogenética clásica son de gran valor en el DP para la identificación, caracterización y diagnóstico de estas alteraciones cromosómicas, los avances en métodos de cultivo y técnicas de bandeado han disminuido el tiempo de entrega para un análisis por cariotipo hasta 7 días, sin embargo, el tiempo común de entrega es de 10 a 14 días. La aplicación de la técnica de FISH en DP es una herramienta que tiene grandes ventajas, una de ellas es la detección rápida de aneuploidías, el requerimiento de poca muestra y el potencial para análisis de un gran número de anomalías cromosómicas.

En los amniocitos no cultivados los cromosomas no pueden ser visualizados, pero la técnica de FISH permite la identificación de secuencias específicas de ADN de los cromosomas de interés lo que reduce el tiempo para obtener el diagnóstico. En un principio se utilizaron sondas centroméricas con marcaje indirecto para determinar la presencia de material del cromosoma Y para detectar alteraciones numéricas en amniocitos no cultivados (Guyot B y cols, 1988), sin embargo, las sondas de secuencias centroméricas para los cromosomas 13 y 21, tienen regiones homólogas que producen hibridación cruzada, lo que impide diferenciar a cual de los dos cromosomas pertenecen las señales (Kuo WL y cols, 1991; Klinger K y cols, 1992; Cacheux V y cols, 1994; Divane A y cols, 1994; además son regiones polimórficas de tamaño variable y algunos autores consideran el uso de esta sonda 13/21 no confiable (Verma RS y cols, 1992), posteriormente se utilizaron sondas de pintado completo para los cromosomas 13, 18, 21 en células en interfase y metafase de amniocitos cultivados pero se observó que estas sondas teñían muy bien en metafase pero en núcleos en interfase los dominios de hibridación eran muy grandes lo que daba como resultado una señal grande, difusa y difícil de interpretar (Kuo WL y cols, 1991). En 1992 se hizo el primer estudio en 526 casos con amniocitos no cultivados donde se utilizaron sondas de secuencia única para los cromosomas 13, 18, 21, y centroméricas para los cromosomas X e Y donde 21 de 21 casos aneuploides fueron identificados (Klinger K y cols, 1992).

En 1993 Ward y colaboradores describieron el primer programa clínico para la detección de aneuploidías de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y en 4500 pacientes con resultados informativos para aneuploidia en 107 de 114 casos anormales, ese mismo año, Christiensen y colaboradores y posteriormente Winsor y colaboradores (1996) y Hockstein y colaboradores (1998) publicaron un estudio de diagnóstico por FISH en LA no cultivado y como influye en el resultado la contaminación con células maternas, por lo que propusieron algunas recomendaciones para optimizar el diagnóstico por esta técnica, como descartar los líquidos amnióticos visiblemente hemáticos o que se observaran células sanguíneas en

el paquete celular obtenido por centrifugación.

En el mismo año esta técnica empezó a utilizarse para complementar la citogenética en el estudio de pseudomosaicismo en amniocitos cultivados (Schwartz S y cols, 1993) y como apoyo para el diagnóstico en fetos con hallazgos ultrasonográficos sugestivos de aneuploidias. (Blakemore KJ y cols, 1993). En 1994 se utilizó mezcla de colores para la detección multicolor simultanea de alteraciones cromosómicas de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y en un estudio retrospectivo en 30 muestras de LA (Divane a y cols, 1994). Posteriormente en 1995 Soloviev y colaboradores, publicaron estudios haciendo énfasis del análisis en interfase en relación a las diferentes fases del ciclo celular.

El desarrollo de sondas de loci específicos para el cromosoma 21 y 13 permiten la detección del síndrome de Down y la trisomía 13 de forma mas específica (Cacheux V y cols, 1994). Con el mejoramiento de las especificidad de las sondas, así como el establecimiento de protocolos para la optimización de la técnica, se publicaron trabajos enfocados al papel que juega el FISH en el diagnóstico prenatal y el manejo de la paciente y el feto, así como estudios multicéntricos para validar los resultados de esta técnica (Bryndorff y cols, 1997 y 2000; D'Alton ME y cols, 1997; Eiben B y cols, 1998 y 1999; Cheong-Leung W y cols, 2001; Feldman B y cols, 2000; Fiddler M y cols, 2001; Lewin P y cols, 2000; Thein ATA y cols, 2000; Tepperberg J y cols, 2001; Weremowicks S y cols, 2001), han permitido aplicarla hoy como una herramienta valiosa en el diagnostico prenatal.

6. Justificación

La incidencia de defectos congénitos en recién nacidos es del 2% al 3%, aunque menos del 1% está relacionado con cromosomopatías, en embarazos de alto riesgo aumenta el 0.75% del riesgo basal, esto justifica el incluir un estudio de diagnóstico prenatal rápido y preciso para determinar si están presentes las aneuploidias más frecuentes.

La amniocentesis es una de las técnicas principales de diagnóstico prenatal que se llevan a cabo en el Instituto Nacional de Perinatología (**INPer**), y se realiza para obtener el cultivo de células de LA y posteriormente análisis citogenético por bandas G, la obtención de resultados con esta técnica se lleva un tiempo de 10 a 14 días. La técnica de FISH puede ser un gran apoyo para el diagnóstico de las aneuploidias más frecuentes en núcleos de interfase, puesto que los resultados se obtienen en un lapso de tiempo no mayor a 48 horas.

Con esto se logrará optimizar aún más la atención materno-fetal, puesto que el tener la certeza del diagnóstico permite tomar las decisiones pertinentes y brindar un adecuado asesoramiento genético a los padres teniendo en cuenta ante todo la salud fetal y materna.

7. Objetivos

Montar y estandarizar la técnica de FISH en amniocitos no cultivados para la detección de las aneuploidias numéricas de mayor incidencia dentro de la clínica de diagnóstico prenatal del INPer.

Validar y fundamentar la aplicación de la técnica de FISH en núcleos en interfase para los cromosomas 13, 18, 21 X e Y, en forma primaria y de rutina para el diagnóstico rápido de las aneuploidias más frecuentes en apoyo al diagnóstico con citogenética clásica.

8. Hipótesis

El Diagnóstico Prenatal por FISH proporciona resultados rápidos y confiables por lo cual es posible establecer el estudio primario en células en interfase de líquido amniótico.

9. Material y métodos

Población de estudio

Pacientes del Instituto Nacional de Perinatología que fueron referidas para el estudio de amniocentesis por embarazo de alto riesgo para cromosomopatía de septiembre de 1998 a agosto de 1999.

Criterios de Inclusión

Pacientes que tuvieran alguno de los siguientes factores de riesgo o la combinación de estos:

- Antecedentes de hijo previo con cromosomopatía de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y.
- Marcadores para cromosomopatía identificadas por ultrasonido.
- Pacientes con triple marcador alterado.
- Edad materna avanzada.
- Miembro de la pareja con un rearrreglo cromosómico que involucrara a los cromosomas antes mencionados.
- Angustia materna.

Criterios de exclusión

- Las muestras de LA hemáticas, color café o aquellas en donde no se observara el líquido amniótico amarillo claro.
- Las muestras de LA que al centrifugar el botón celular apareciera con tintes rojos.

El estudio fue ciego pues la indicación para realizar la técnica de FISH en las muestras de LA de las pacientes no se conocía al momento de procesar la muestra.

9.1 Toma de muestra en amniocentesis

El sitio de punción se eligió por medio de una guía ultrasonográfica; se trató de evitar la punción transplacentaria para evitar contaminación materna. Una vez insertada la aguja, se extrajeron los primeros 3 ml de LA y se desecharon para disminuir el riesgo de contaminación con células maternas. Posteriormente con una jeringa diferente se extrajeron 20 ml o bien un ml por semana de gestación. De la jeringa de 20 ml se proporcionó una cantidad de 2 a 4 ml para procesar el FISH de acuerdo a la cantidad de LA que era tomada.

muestras en donde se aplicaron los dos coctéles, se gotearon dos áreas para la hibridación.

Para la eliminación del citoplasma las laminillas con la muestra se colocaron en solución de pepsina al 10% en HCl 0.01 N a 37°C por 10 min, se lavaron en solución salina de fosfatos (**PBS**) por 5 min y deshidrataron en alcoholes al 70, 85 y 100% por 2 min en cada uno.

Posteriormente las preparaciones se incubaron a 37°C en SSC 2X por 30 min para su maduración, al término de esta, se deshidrataron en series de etanol al 70%, 85% y 100% por 2 min en cada uno y se dejaron secar.

9.3.2 Desnaturalización de la muestra

La desnaturalización del material celular se realizó con formamida al 70% en SSC 2X (28 ml de formamida, 8 ml de agua destilada y 4 ml de SSC 20X) a pH 7.0 previamente calentada a 72°C por 3 minutos, se realizó un control estricto de la temperatura y tiempo de desnaturalización y se deshidrataron en etanol al 70%, 85% y 100% fríos 2 min en cada uno y se dejaron secar al aire.

9.3.3 Preparación y desnaturalización de la sonda

Las sondas para los cocteles 13/21 y 18/X/Y ya venían desnaturalizadas previamente y solo se colocaron 10 μ l sobre la muestra. La sonda de secuencia única para el cromosoma 21 se mezcló con agua bidestilada y buffer, 1 μ l, 2 μ l y 7 μ l, respectivamente (10 μ l en total) y se desnaturalizó a 73°C por 5 minutos.

9.3.4 Hibridación

La sonda se colocó sobre la muestra con un cubreobjetos limpio de 22 x 22 mm, se selló con cemento de goma y se dejó en cámara húmeda protegida de la luz a 37°C por 16 a 20 horas.

9.3.5 Lavados Post-hibridación

Al día siguiente, se removió con cuidado el sellador y se retiró el cubreobjetos, las laminillas fueron lavadas en 50 ml de SSC 0.4X/NP-40 al 0.3% a 73°C por 2 min y posteriormente en 50 ml SSC 2X/NP-40 al 0.1% a temperatura ambiente no más de 1 min, se dejó secar la laminilla al aire en la oscuridad y se agregó como contratinción 10 μ l de DAPI/Antifade, se colocó un cubreobjetos, se sellaron con cemento de goma para su posterior análisis en un microscopio de epifluorescencia (Olympus™), con los filtros (Chroma™) que se indican en el siguiente cuadro:

Filtros utilizados para el análisis por FISH (Chroma™)

| Filtro | Color | Longitud de Onda (nm) |
|-----------------|-------|-----------------------|
| Banda única | Rojo | 550-570 |
| Banda única | Verde | 491-515 |
| Triple banda | Azul | 350-456 |
| | Verde | 491-515 |
| | Rojo | 550-570 |
| Cuadruple banda | Azul | 350-456 |
| | Verde | 491-515 |
| | Rojo | 550-570 |
| | Aqua | 432-472 |

9.3.6 Controles positivos y negativos para la técnica de FISH

Por cada tres muestras que se corrieron, al mismo tiempo se utilizó un control negativo que fue una laminilla con amniocitos cultivados de un varón normal y el control positivo fue una preparación con células de LA triploides cultivadas de la casa comercial Vysis™, de estos controles se analizaron de cada uno 50 células.

9.3.7 Criterios de Análisis

Los criterios de análisis fueron establecidos de acuerdo a los propuestos por Hogge y cols (1996):

- Mínimo 50 células examinadas
- Núcleos con bordes nítidos
- Núcleos con señales de intensidad y tamaño similar.
- Se descartaron los núcleos que estaban sobrelapados
- Los núcleos con la señal partida en dos con una distancia menor al tamaño de la señal y que estas fueran del mismo tamaño se tomaron como una señal.
- Los núcleos con señal partida que tenían una distancia del tamaño de la misma entre si se tomo como dos señales.
- Resultado normal: 80% de células con un número de señales normales.
- Resultados anormales: 70% de las células con un número señales trisómicas o monosómicas.

La figura 4 resume la metodología de citogenética clásica y FISH en el presente trabajo.

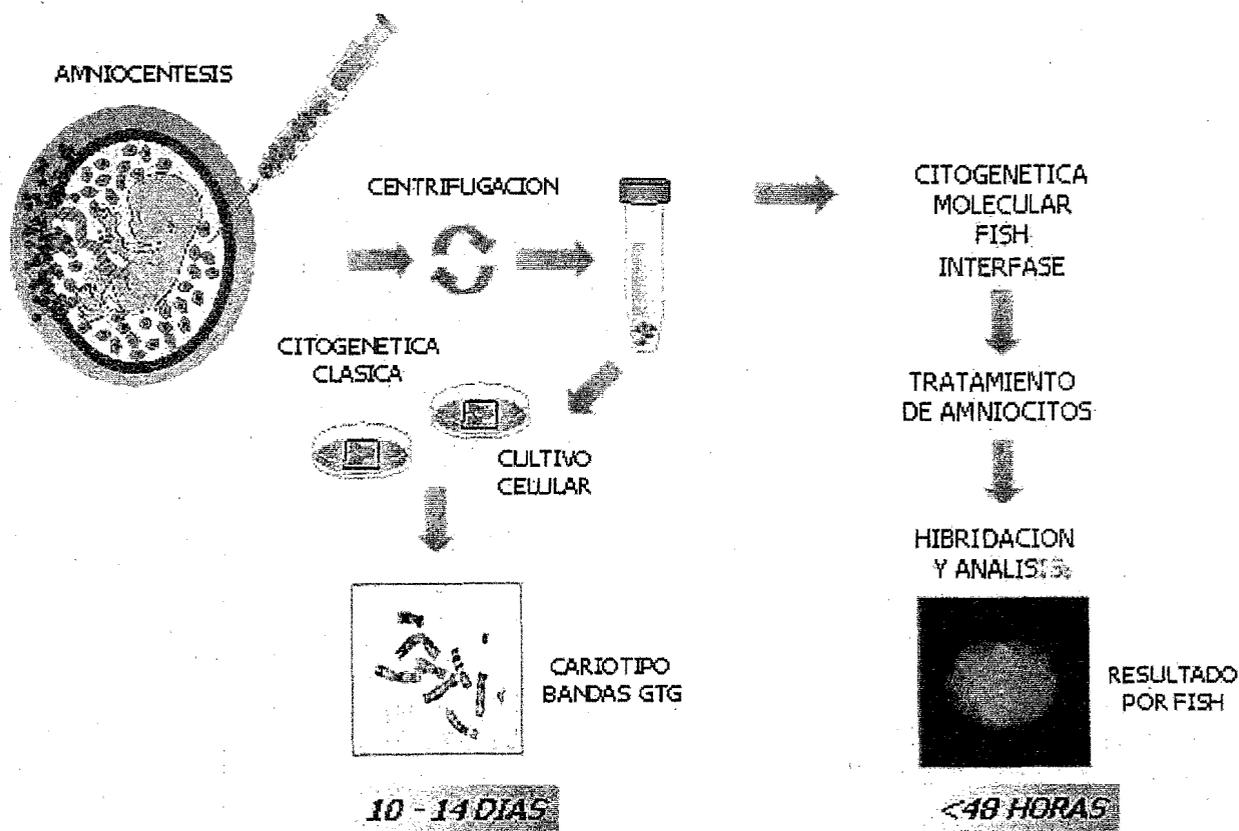


Fig. 4. Diagrama de la metodología de FISH y Citogenética clásica en LA.

10. Resultados

Se procesaron 39 muestras para este trabajo, los resultados de FISH se obtuvieron dentro de las primeras 48 a 72 horas de haber recibido la muestra, mientras que el resultado del cariotipo se obtuvo en un lapso de 10 a 14 días. El número de muestras a las que se aplicaron las diferentes opciones de tipo de sonda se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 3. Número total de muestras y sondas utilizadas

| Número de muestras (n=39) | Sondas Utilizadas |
|---------------------------|---|
| 9 | Sonda de secuencia única para el cromosoma 21 |
| 5 | Coctél de Sondas de secuencia única para los cromosomas 13/21 |
| 7 | Coctél de Sondas centroméricas para los cromosomas 18/X/Y |
| 18 | Coctél de Sondas de secuencia única para los cromosomas 13/21 y Coctél de Sondas centroméricas para los cromosomas 18/X/Y |

Las 39 muestras analizadas fueron obtenidas de pacientes con semanas de gestación diferentes, estas semanas se calcularon por ultrasonido. El análisis por FISH fue extensivo a todos los núcleos presentes en la muestra, por eso se reporta un número variable.

En la tabla 4 muestra la población de estudio, la edad gestacional, la indicación por la que fueron referidas las pacientes, el resultado de FISH, el número de núcleos analizados y el cariotipo.

Tabla 4. Población de Estudio.

| Muestra | SDG | Indicación para el estudio de FISH | Sonda utilizada | Resultados de FISH | Núcleos Analizados | Cariotipo |
|---------|------|--|-----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-------------|
| 1 | 26.5 | • Triple marcador positivo para cromosomopatía | • Coctél 18/X/Y | Disomía 18 XY | 98 | 46, XY |
| 2 | 26.3 | • Antecedentes de hijo previo con cromosomopatía | • Coctél 18/X/Y | Disomía 18 XY | 105 | 46, XY |
| 3 | 15.2 | • EMA | • Coctél 13/21 | Trisomía 21 | 88 | 47, XX, +21 |
| 4 | 19 | • Triple marcador positivo para cromosomopatía | • Coctél 13/21 | Disomía 13 y 21 | 112 | 46, XX |
| 5 | 16.1 | • EMA | • Coctél 13/21 | Disomía 13 y 21 | 99 | 46, XY |
| 6 | 19.2 | • Angustia Materna | • Coctél 13/21 | Disomía 13 y 21 | 124 | 46, XY |
| 7 | 33.5 | • MUS para trisomía 18 | • Coctél 18/X/Y | Trisomía 18 XX | 145 | 46, XX, +18 |
| 8 | 17.2 | • EMA | • Secuencia única para el 21 | Disomía 21 | 108 | 46, XX |
| 9 | 19.1 | • EMA | • Secuencia única para el 21 | Disomía 21 | 106 | 46, XX |
| 10 | 17.5 | • EMA | • Secuencia única para el 21 | Disomía 21 | 98 | 46, XY |
| 11 | 18 | • EMA | • Secuencia única para el 21 | Disomía 21 | 102 | 46, XY |
| 12 | 16.6 | • EMA | • Secuencia única para el 21 | Disomía 21 | 110 | 46, XY |
| 13 | 19.3 | • EMA | • Secuencia única para el 21 | Disomía 21 | 55 | 46, XY |
| 14 | 22.3 | • EMA | • Secuencia única para el 21 | NO INFORMATIVO | 100 | 46, XY |
| 15 | 27.6 | • MUS para cromosomopatía | • Coctél 13/21 • Coctél 18/X/Y | Disomía 13, 18 Trisomía 21 XX | 124 (13/21) 100 (18/X/Y) | 47, XX, +21 |
| 16 | 16.3 | • EMA • MUS para cromosomopatía | • Coctél 13/21 • Coctél 18/X/Y | Disomía 13, 18, 21 XY | 120 | 46, XY |
| 17 | 19.1 | • EMA | • Coctél 18/X/Y | Disomía 18 XX | 116 | 46, XX |
| 18 | 19.2 | • EMA | • Secuencia única para el 21 | Disomía 21 | 120 | 46, XY |
| 19 | 28 | • MUS para cromosomopatía | • Secuencia única para el 21 | NO INFORMATIVO | 120 | 46, XX |
| 20 | 18 | • EMA | • Coctél 13/21 • Coctél 18/X/Y | Disomía 13, 18, 21 XY | 100 | 46, XY |

| Muestra | SDG | Indicación para el estudio de FISH | Sonda utilizada | Resultados de FISH | Núcleos Analizados | Cariotipo |
|---------|------|---|-----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| 21 | 20.4 | • Padre portador de translocación (13;14) | • Coctél 13/21 • Coctél 18/X/Y | Disomía 13, 18, 21 XY | 100 | 46, XY |
| 22 | 17.6 | • EMA | • Coctél 13/21 • Coctél 18/X/Y | Disomía 13, 18, 21 XX | 100 (13/21) 80 (18/X/Y) | 46, XX |
| 23 | 18.6 | • EMA | • Coctél 13/21 • Coctél 18/X/Y | Disomía 13, 18, 21 XX | 110 | 46, XX |
| 24 | 16.6 | • EMA | • Coctél 13/21 • Coctél 18/X/Y | Disomía 13, 18, 21 XY | 100 | 46, XY |
| 25 | 19.4 | • Triple marcador positivo para cromosopatía | • Coctél 18/X/Y | Disomía 18 XY | 100 | 46, XY |
| 26 | 16 | • MUS para cromosopatía | • Coctél 13/21 • Coctél 18/X/Y | Disomía 13, 18, 21 XX | 120 (13/21) 100 (18/X/Y) | 46, XX |
| 27 | 17.3 | • EMA | • Coctél 13/21 • Coctél 18/X/Y | Disomía 13, 18, 21 XY | 100 | 46, XY |
| 28 | 31.6 | • MUS para cromosopatía | • Coctél 13/21 • Coctél 18/X/Y | Disomía 13, 18 Trisomía 21 XX | 150 | 47, XX, +21 |
| 29 | 17.5 | • EMA • Triple marcador positivo para cromosopatía | • Coctél 13/21 • Coctél 18/X/Y | Disomía 13, 18, 21 XY | 100 | 46, XY |
| 30 | 20.5 | • EMA | • Coctél 13/21 • Coctél 18/X/Y | Disomía 13, 18, 21 XY | 100 | 46, XY |
| 31 | 18.4 | • MUS para cromosopatía | • Coctél 18/X/Y | Disomía 18 Monosomía del X | 110 | 45, X |
| 32 | 17 | • EMA | • Coctél 13/21 • Coctél 18/X/Y | Disomía 13, 18, 21 XY | 120 (13/21) 100 (18/X/Y) | 46, XX |
| 33 | 16.2 | • EMA | • Coctél 13/21 • Coctél 18/X/Y | Disomía 13, 18, 21 XX | 100 | 46, XX |
| 34 | 19.6 | • EMA | • Coctél 13/21 | Disomía 13 y 21 | 105 | 46, XY |
| 35 | 17 | • EMA | • Coctél 13/21 • Coctél 18/X/Y | Disomía 13, 18, 21 XX | 120 | 46, XX |
| 36 | 16 | • Padre portador de rearreglo cromosómico | • Coctél 18/X/Y | Disomía 18 XY | 100 | 45, XY, der(14;21)(q10;q10) |
| 37 | 19.4 | • EMA | • Coctél 13/21 • Coctél 18/X/Y | Disomía 13, 18, 21 XY | 100 | 46, XY |
| 38 | 16.4 | • Hijo previo con cromosopatía | • Coctél 13/21 • Coctél 18/X/Y | Disomía 13, 18, 21 XX | 100 | 46, XX |
| 39 | 17.2 | • Triple marcador positivo para cromosopatía | • Coctél 13/21 • Coctél 18/X/Y | Disomía 13, 18, 21 XX | 120 | 46, XX |

EMA – Edad Materna avanzada, MUS- Marcadores Ultrasonográficos, SDG – Semanas de Gestación.

Las indicaciones de las muestras que fueron referidas se resumen en la tabla 5 lo que indica que la mayoría de ellas fueron referidas por EMA:

Tabla 5. Factor de riesgo por el que fue realizado el estudio de FISH

| Factor de riesgo | Número de muestras (n = 39) |
|--|------------------------------------|
| Edad Materna Avanzada | 22 |
| Marcadores ultrasonográficos para cromosopatía | 6 |
| Triple marcador alterado | 4 |
| Hijo previo con cromosopatía | 2 |
| EMA + Triple marcador alterado | 1 |
| EMA + Marcadores ultrasonográficos para cromosopatía | 1 |
| Portador de réarreglo cromosómico | 2 |
| Angustia materna | 1 |
| Total | 39 |

Solo dos muestras del estudio en las que solo se utilizó la sonda de secuencia única para el cromosoma 21 fueron no informativas, una por no haber hibridación (muestra 19), y otra porque presentaba mucho citoplasma lo cual impedía ver la señal con claridad en los núcleos analizados (muestra 14).

Por tanto de los casos analizados por técnica de FISH informativos, 32 casos fueron normales (Fig. 5A, 5B, 5C y 5D) mientras que los 5 restantes fueron positivos para aneuploidia (Fig. 6A, 6B y 6C) lo que representa un 12.8% de la población de estudio, este resultado fue corroborado con el cariotipo como lo indica la tabla 4.

Tabla. 6. Muestras Monosómicas y Trisómicas por FISH y anormales por cariotipo.

| Muestra | SDG | Sonda | Monosomía | Disomía | Trisomía | Cariotipo |
|---------|------|-------|-----------|---------|----------|-------------|
| 3 | 15.2 | 13 | 0 | 87.5 | 0 | 47, XX, +21 |
| | | 21 | 0 | 2.27 | 85.2 | |
| 7 | 33.5 | 18 | 0 | 0 | 48.8 | 46, XX+18 |
| | | X | 0 | 66.8 | 0 | |
| | | Y | 0 | 0 | 0 | |
| 15 | 27.6 | 13 | 3.2 | 92.7 | 0 | 47, XX, +21 |
| | | 21 | 3.2 | 0 | 92.7 | |
| | | 18 | 2 | 90 | 2 | |
| | | X | 0 | 94 | 2 | |
| | | Y | 0 | 0 | 0 | |
| 28 | 31.6 | 13 | 0 | 57.4 | 0 | 47, XX, +21 |
| | | 21 | 0 | 0 | 57.4 | |
| | | 18 | 0 | 54.6 | 0 | |
| | | X | 0 | 68.6 | 0 | |
| | | Y | 0 | 0 | 0 | |
| 31 | 18.4 | 18 | 0 | 92.7 | 0 | 45, X |
| | | X | 100 | 0 | 0 | |
| | | Y | 0 | 0 | 0 | |

En las muestras 7 y 28 a pesar de tener un porcentaje muy bajo de hibridación debido a la presencia de citoplasma, se pudo detectar la aneuploidía.

La muestra 36, que tuvo un resultado normal por FISH pero el cariotipo reveló una alteración estructural - 45, XY, der(14;21)(q10;q10)- que no involucró a ninguno de los cromosomas que fueron evaluados en esta muestra.

Es importante mencionar que las muestras 1 (Fig. 7A), 2 (Fig. 7C), 16 y 17 que presentaron menos del 70% de hibridación para el cromosoma 18 debido a que se observó la señal muy dispersa de este cromosoma y los dominios de hibridación se traslapaban.

Los resultados de las muestras informativas con la sonda de secuencia única incluyeron a para el 21 (Tabla 7), con el coctél de sondas 13/21 (Fig. 5D, Tabla 8), con el Coctél 18/X/Y (Tabla 9 y Fig 5A, 5B y 5C) y con ambos Coctéles, 13/21 y 18/X/Y (Tabla 10 y 11), no se contraponen con los resultados del cariotipo, por tanto no hubo ningún falso positivo ni falso negativo en el estudio.

Tabla. 7. Porcentaje de hibridación de muestras disómicas para la secuencia única del cromosoma 21

| Muestra | SDG | % de Células con 2 señales para cada sonda | Cariotipo |
|---------|------|--|-----------|
| 8 | 17.2 | 95.3 | 46, XX |
| 9 | 19.1 | 90.5 | 46, XX |
| 10 | 17.5 | 100 | 46, XY |
| 11 | 18 | 100 | 46, XY |
| 13 | 19.3 | 90.9 | 46, XY |
| 12 | 16.6 | 90 | 46, XY |
| 18 | 19.2 | 86.6 | 46, XY |

Tabla. 8. Porcentaje de hibridación de muestras disómicas con el Coctél 13/21

| Muestra | SDG | Sonda | % de Células con 2 señales para cada sonda | Cariotipo |
|---------|------|-------|--|-----------|
| 4 | 19 | 13 | 88.3 | 46, XX |
| | | 21 | 87.5 | |
| 5 | 16.1 | 13 | 97.9 | 46, XY |
| | | 21 | 97.9 | |
| 6 | 19.2 | 13 | 95.9 | 46, XY |
| | | 21 | 97.8 | |
| 34 | 19.6 | 13 | 95.2 | 46, XY |
| | | 21 | 95.2 | |

Tabla. 9. Porcentaje de Señales en Muestras Disómicas para el 18 con complemento XX o XY.

| Muestra | SDG | Sonda | % de Células con 1 señal para cada sonda | % de Células con 2 señales para cada sonda | Cariotipo |
|---------|------|-------|--|--|-----------------------------|
| 1 | 26.5 | 18 | 7 | 67 | 46, XY |
| | | X | 85 | 0 | |
| | | Y | 85 | 0 | |
| 2 | 26.3 | 18 | 4.76 | 78 | 46, XY |
| | | X | 91.4 | 0.95 | |
| | | Y | 92.3 | 0 | |
| 17 | 19.1 | 18 | 1.72 | 64.6 | 46, XX |
| | | X | 0 | 78.1 | |
| | | Y | 0 | 0 | |
| 25 | 19.4 | 18 | 0 | 99 | 46, XY |
| | | X | 100 | 0 | |
| | | Y | 100 | 0 | |
| 36 | 16 | 18 | 0 | 99 | 45, XY, der(14;21)(q10;q10) |
| | | X | 89 | 0 | |
| | | Y | 91 | 0 | |

Tabla. 10. Porcentaje de Señales en Muestras Disómicas 13, 18, 21, XY.

| Muestra | SDG | Sonda | % de Células con 1 señal para cada sonda | % de Células con 2 señales para cada sonda | Cariotipo |
|---------|------|-------|--|--|-----------|
| 16 | 17.3 | 13 | 0.83 | 96.6 | 46, XY |
| | | 21 | 0 | 98.3 | |
| | | 18 | 1.75 | 75 | |
| | | X | 95.8 | 0 | |
| | | Y | 95.8 | 0 | |
| 20 | 18 | 13 | 1 | 99 | 46, XY |
| | | 21 | 1 | 99 | |
| | | 18 | 0 | 94 | |
| | | X | 100 | 0 | |
| | | Y | 100 | 0 | |
| 21 | 20.4 | 13 | 0 | 99 | 46, XY |
| | | 21 | 1 | 98 | |
| | | 18 | 0 | 93 | |
| | | X | 99 | 0 | |
| | | Y | 99 | 0 | |
| 24 | 16.6 | 13 | 0 | 99 | 46, XY |
| | | 21 | 0 | 99 | |
| | | 18 | 0 | 95 | |
| | | X | 100 | 0 | |
| | | Y | 100 | 0 | |

| Muestra | SDG | Sonda | % de Células con 1 señal para cada sonda | % de Células con 2 señales para cada sonda | Cariotipo |
|---------|------|-------|--|--|-----------|
| 27 | 17.3 | 13 | 0 | 100 | 46, XY |
| | | 21 | 0 | 91 | |
| | | 18 | 0 | 89 | |
| | | X | 100 | 0 | |
| | | Y | 100 | 0 | |
| 29 | 17.5 | 13 | 0 | 100 | 46, XY |
| | | 21 | 0 | 100 | |
| | | 18 | 1 | 92 | |
| | | X | 100 | 0 | |
| | | Y | 100 | 0 | |
| 30 | 20.5 | 13 | 0 | 95 | 46, XY |
| | | 21 | 0 | 95 | |
| | | 18 | 0 | 89 | |
| | | X | 97 | 0 | |
| | | Y | 97 | 0 | |
| 37 | 19.4 | 13 | 0 | 100 | 46, XY |
| | | 21 | 0 | 100 | |
| | | 18 | 0 | 100 | |
| | | X | 100 | 0 | |
| | | Y | 100 | 0 | |

Tabla. 11. Porcentaje de Señales en Muestras Disómicas 13, 18, 21, XX.

| Muestra | SDG | Sonda | % de Células con 1 señal para cada sonda | % de Células con 2 señales para cada sonda | Cariotipo |
|---------|------|-------|--|--|-----------|
| 23 | 18.6 | 13 | 0 | 97.2 | 46, XX |
| | | 21 | 0 | 97.2 | |
| | | 18 | 0 | 100 | |
| | | X | 0 | 100 | |
| | | Y | 0 | 0 | |
| 22 | 17.6 | 13 | 0 | 100 | 46, XX |
| | | 21 | 0 | 100 | |
| | | 18 | 0 | 95 | |
| | | X | 0 | 100 | |
| | | Y | 0 | 0 | |
| 26 | 16 | 13 | 0 | 98.3 | 46, XX |
| | | 21 | 0 | 93 | |
| | | 18 | 2 | 97 | |
| | | X | 1 | 98 | |
| | | Y | 0 | 0 | |
| 32 | 17 | 13 | 0 | 100 | 46, XX |
| | | 21 | 0 | 100 | |
| | | 18 | 0 | 100 | |
| | | X | 0 | 100 | |
| | | Y | 0 | 0 | |

| Muestra | SDG | Sonda | % de Células con 1 señal para cada sonda | % de Células con 2 señales para cada sonda | Cariotipo |
|---------|------|-------|--|--|-----------|
| 33 | 16.2 | 13 | 0 | 100 | 46, XX |
| | | 21 | 0 | 100 | |
| | | 18 | 0 | 90 | |
| | | X | 0 | 100 | |
| | | Y | 0 | 0 | |
| 35 | 17 | 13 | 0 | 100 | 46, XX |
| | | 21 | 0 | 100 | |
| | | 18 | 0 | 80.8 | |
| | | X | 0 | 91.6 | |
| | | Y | 0 | 0 | |
| 38 | 16.4 | 13 | 0 | 100 | 46, XX |
| | | 21 | 0 | 100 | |
| | | 18 | 2 | 90 | |
| | | X | 0 | 100 | |
| | | Y | 0 | 0 | |
| 39 | 17.2 | 13 | 0 | 100 | 46, XX |
| | | 21 | 0 | 93 | |
| | | 18 | 0 | 93 | |
| | | X | 0 | 100 | |
| | | Y | 0 | 0 | |

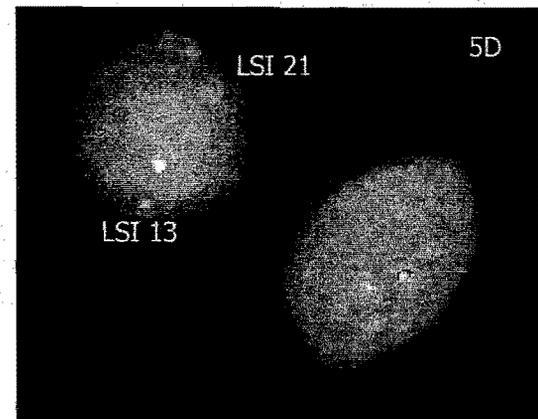
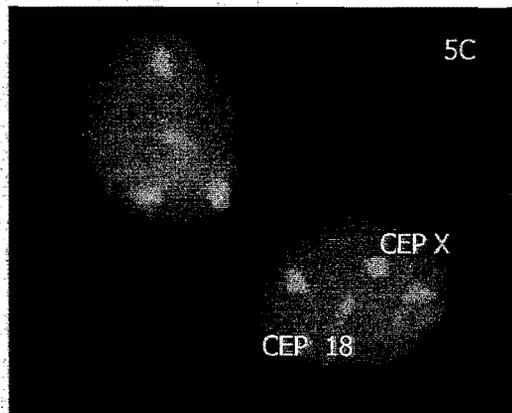
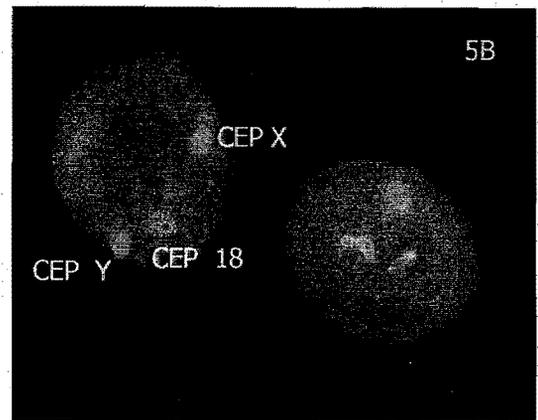
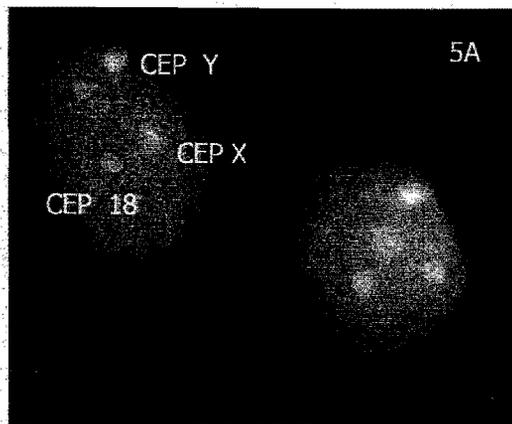


Figura 5. Amniocitos no cultivados con el coctél de sondas centroméricas 18 (aqua)/X (verde)/Y (naranja), se muestra la disomía 18 y el complemento XY (**5A**); Amniocitos no cultivados con el coctél de sondas centroméricas 18/X/Y en fase G2 del ciclo celular, se muestra la disomía 18 y el complemento XY (**5B**); Amniocitos no cultivados con el coctél de sondas centroméricas 18/X/Y, se muestra la disomía 18 y el complemento XX (**5C**); Amniocitos no cultivados con el coctél de sondas de secuencia única 13 (verde)/21 (naranja), se muestra disomía para los cromosomas 13 y 21.

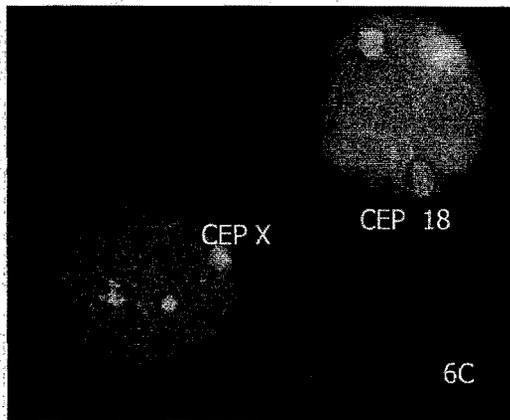
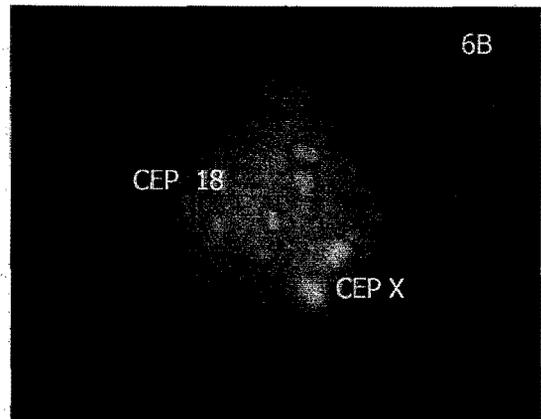
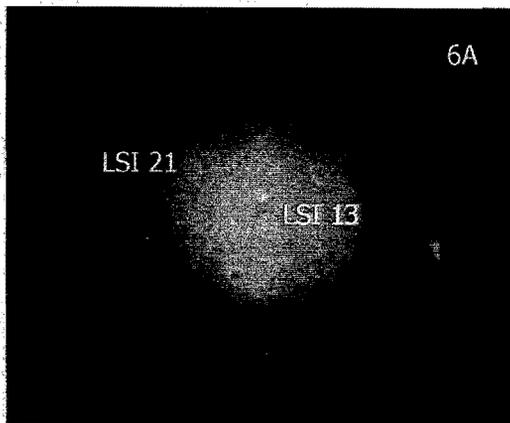


Figura 6. Amniocito no cultivados con el coctél de sondas de secuencia única 13 (verde)/21 (naranja), se muestra disomía para el cromosoma 13 y trisomía para el 21 (**6A**); Amniocito no cultivados con el coctél de sondas centroméricas 18 (aqua)/X (verde)/Y (naranja), se muestra la trisomía 18 y el complemento XX (**6B**); Amniocitos no cultivados con el coctél de sondas centroméricas 18/X/Y, se muestra la disomía 18 y monosomía de cromosoma X (**6C**).

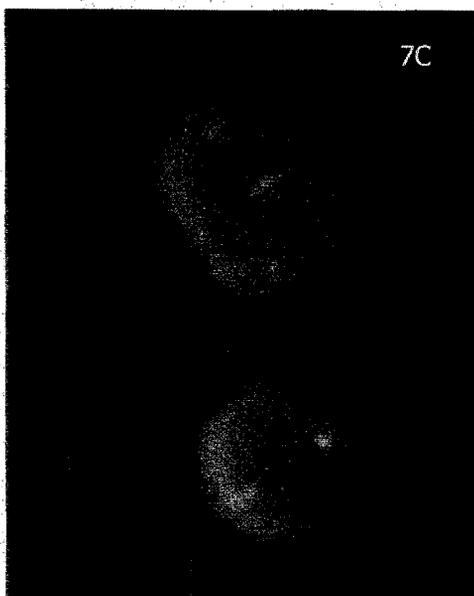
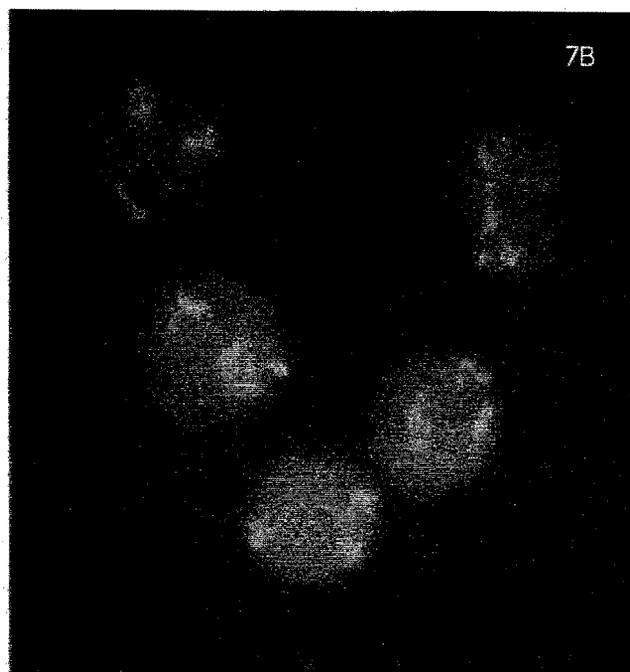
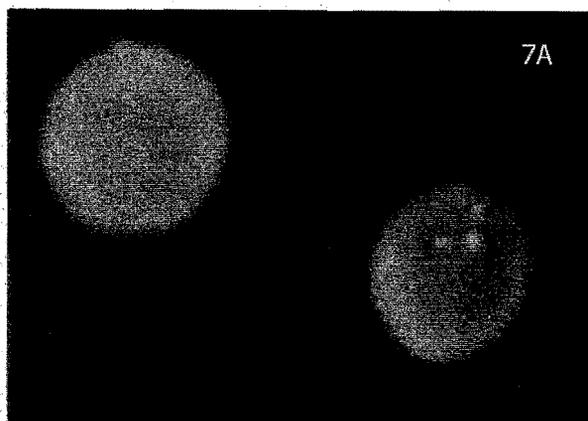


Figura 7. Amniocitos no cultivados con el coctél de sondas centroméricas 18 (aqua)/X (verde)/Y (naranja), donde se muestra la señal que corresponde al cromosoma 18 (aqua) y al cromosoma X (verde) dispersa en el núcleo de la izquierda (**7A**); Amniocitos no cultivados con el coctél de sondas centroméricas 18 (aqua)/X (verde)/Y (naranja), en la muestra que presento monosomía del X se observa un campo donde las señales del 18 y X se observan dispersas (**7B**); Amniocitos no cultivados con el coctél de sondas centroméricas 18/X/Y, donde se muestra la señal aqua que corresponde al cromosoma 18 (aqua) y al cromosoma X (verde) dispersa en el núcleo de la parte superior (**7C**).

11. Discusión

En la literatura no se reporta un número estándar óptimo de núcleos analizados, algunos autores sugieren un mínimo de 50 núcleos (Hogge A, y cols 1996), mientras que otros reportan hasta 30 núcleos, (Jalal SM y cols, 1998) por lo que en el presente trabajo se analizaron todos los núcleos que fueron observados (55 a 150 núcleos). En 2001 la Asociación de Citogenetistas de Gran Bretaña sugiere que el análisis por FISH en amniocitos no cultivados debe ser de 30 células por cada sonda.

Se propone que uno de los factores importantes que influyeron en la hibridación podría ser la edad gestacional pues las muestras 7 y 28 presentan menor porcentaje de hibridación debido a que la gran mayoría de las células tenían citoplasma y no pudo penetrar la sonda, aunque se incluyeron en el estudio porque se pudo detectar la aneuploidia. Se sugiere que esto se atribuye a que la piel del feto se queratiniza conforme avanza la edad gestacional (Milunsky A y cols, 1990; Larsen W, 1997).

Phillip y colaboradores (1994) y Spathas y colaboradores (1994) reportan que no es recomendable hacer FISH a edades gestacionales tardías por la gran cantidad de células cornificadas que hay, lo cual impide una buena penetración de la sonda en el núcleo obteniendo resultados no informativos.

Por otra parte, en algunas muestras, aunque tenían edad gestacional similar, se encontraron diferencias en los porcentajes de hibridación, esto se puede atribuir a factores estocásticos que escaparon de nuestro control, como la presencia de citoplasma, ya que fue el mayor problema para lograr un porcentaje alto de hibridación, por lo que se presentó un porcentaje variable de eficiencia de hibridación. La optimización del pretratamiento de las muestras con proteasas (tripsina y pepsina) en las células de líquido amniótico ayuda a que la sonda penetre adecuadamente, ya que este tratamiento permitió que la gran mayoría de las células quedaran libres de citoplasma. Además, se reporta en la literatura que hay grandes diferencias entre los amniocitos cultivados y no cultivados, como son el tamaño del núcleo que es más pequeño y la cantidad de citoplasma es mayor en los amniocitos no cultivados que en los cultivados. (Cacheux V y cols, 1994). Sin embargo pese a que algunas muestras no tuvieron el 100% de hibridación, 37/39 muestras (94.8%) de la población de estudio fue informativa.

Aunque anteriormente existían ciertas limitaciones, como la baja sensibilidad y especificidad de las sondas existentes de ADN, el mejoramiento en la estandarización de reactivos y protocolos junto con la exactitud, reproducibilidad y confiabilidad del análisis por FISH debido a la alta especificidad y sensibilidad de las sondas y la eficiencia en la detección de hibridación, han permitido hacer el diagnóstico preciso y

confiable.

En este trabajo se prefirió usar por su alta especificidad e informatividad sondas de secuencia única para los cromosomas 13 y 21, pues como se cita en reportes previos, las sondas centroméricas α -satélite para los cromosomas 13 y 21 no permiten que sean diferenciados en núcleos en interfase. Además de reportarse en la literatura que debido a polimorfismos puede variar el tamaño de las secuencias y por tanto algunas señales no pueden ser detectadas por ser más pequeñas o con intensidad débil (Verma RS y cols, 1992; Bossuyt PJ y cols, 1995; Cacheux V y cols, 1994).

Con respecto a las sondas centroméricas del coctél 18/X/Y, se presentaron algunos problemas de interpretación con referencia al cromosoma 18 pues como se observó en las muestras 1, 2, 16 y 17 (Fig. 7A-C) presentaron la señal muy dispersa, pues el porcentaje de señales disómicas fue de 67%, 78%, 75% y 64.6% respectivamente y se reporta que en amniocitos no cultivados la señal llega a ser difusa a diferencia de los amniocitos cultivados (Cacheux V y cols, 1994).

Con respecto a las muestras 7 y 28 aunque hubo un porcentaje de hibridación bajo debido a que la gran mayoría de las células tenían citoplasma, se incluyeron en el estudio porque se pudo detectar la aneuploidia.

En este trabajo solo la muestra 36 reporto un resultado 45, XY, der(14;21)(q10;q10) que no fue detectado por FISH debido a que para este caso, solo se utilizo el coctél de sondas 18/X/Y, en el diagnóstico por FISH no hubo sospecha de la presencia de algún mosaico que involucrara a alguno de los cromosomas estudiados en el presente trabajo.

El éxito de la aplicación de FISH multicolor en células de interfase es una gran herramienta para el diagnóstico prenatal pues se requiere poca muestra de LA para el ensayo y los resultados se obtienen en corto tiempo, además de que se pueden detectar múltiples blancos en un solo ensayo lo que permite acortar el tiempo para dar un diagnóstico preliminar.

12. Conclusiones

- El FISH representa una técnica invaluable para el diagnóstico citogenético clínico, pues es un método que proporciona resultados en corto tiempo y que requiere de poca cantidad de muestra para llevarse a cabo el estudio.
- La técnica de FISH en amniocitos no cultivados es una herramienta en el diagnóstico prenatal rápida y confiable para la detección de las aneuploidias mas frecuentes.
- Se propone que un factor importante que influye en el éxito de la técnica de FISH es la edad gestacional por lo que se sugiere hacer el FISH a edades gestacionales tempranas.
- Se plantea el uso de esta técnica ante la sospecha o alto riesgo de cromosopatía y se requiera de un diagnóstico rápido para una mejor documentación del caso y un manejo obstétrico óptimo para el binomio materno-fetal.

Bibliografía

- ACMG, ASHG. 2000. Technical and clinical assessment of fluorescence *in situ* hybridization: an ACMG/ASHG position statement. *Genet Med* 2(6):356-361
- American College of Medical Genetics. 1993. Prenatal interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH) policy statement. *Am J Hum Genet* 53:526-527
- Barch, M. y cols.. 1997. The AGT Cytogenetics Laboratory Manual. 3ra. Ed. RLP. 665 p.
- Blakemore KJ, Rosenberg C, Jaswaney, y cols.. 1993. Rapid diagnosis of trisomy 18 and dizygosity in twins using fluorescence *in situ* hybridization on uncultured amniocytes. *J Maternal-fetal Medicine* 2:197-200
- Bossuyt PJ, van Tienen MN, de Gruyter L, Smets V, Dumon J, Wauters JG. 1995. Incidence of low-fluorescence a-satellite region of chromosome 21 escaping detection of aneuploidy at interphase by FISH. *Cytogenet Cell Genet* 68: 203-206
- Bryndorf T, Christensen B, Vad M, Parner J, Brocks V, Philip J. 1997. Prenatal detection of chromosome aneuploidies by fluorescence *in situ* hybridization: experience with 2000 uncultured amniotic fluid samples in a prospective preclinical trial. *Prenat Diagn* 17:4 333-41
- Bryndorf T, Lundsteen C, Lamb A, Christensen B, Philip J. 2000. Rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidies by interphase fluorescence *in situ* hybridization: one-year clinical experience with high-risk and urgent fetal and postnatal samples. *Acta Obstet Gynecol Scand* 79: 8-14
- Cacheux V, Tachdjian G, Druart L, Oury JF, Sérero S, Blot P, Nessmann C. 1994. Evaluation of X, Y, 18, and 13/21 alpha satellite ADN probes for interphase cytogenetic analysis of uncultured amniocytes by fluorescence *in situ* hybridization. *Prenat Diagn* 14:2 79-86
- Carrera J.M., 1990. Diagnóstico Prenatal. Ed. Salvat. 800 p.
- Christiensen B, Bryndorf T, Philip J, Xiang Y, Hansen W. 1993. Prenatal Diagnosis by *in situ* hybridization on uncultured amniocytes : reduced sensitivity and potential risk of misdiagnosis in blood stained samples. *Prenat Diagn* 13:581-587
- Cremer T, Landegent J, Bruckner A, y cols. 1986. Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target ADNs with radioactive and non-radioactive *in situ* hibridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe LI.84. *Hum Genet* 74:346-352
- Cheong_Leung W., Chitayat D. , Seaward G., Windrim, R. Ryan, G. Barrett, J. Winsor E.J. 2001. Role of amniotic fluid interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis in patient management. *J Prenat Diagn* 21(4) :327-332
- D'Alton ME, Malone FD, Chelmow D, Ward BE, Bianchi DW. 1997. Defining the role of fluorescence *in situ* hybridization on uncultured amniocytes for prenatal diagnosis of aneuploidies. *Am J Obstet Gynecol* 176:4 769-74; discussion 774-6

- Divane A, Carter NP, Spathas DH, Ferguson-Smith MA. 1994. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy from uncultured amniotic fluid cells using five-colour fluorescence *in situ* hybridization. *Prenat Diagn* 14:11 1061-9
- Eiben B, Trawicki W, Hammans W, Goebel R, Epplen JT. 1998. A prospective comparative study on fluorescence *in situ* hybridization (FISH) of uncultured amniocytes and standard karyotype analysis. *Prenat Diagn* 18:9 901-6
- Eiben B, Trawicki W, Hammans W, Goebel R, Pruggmayer M, Epplen JT. 1999. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidies in uncultured amniocytes by fluorescence *in situ* hybridization. Evaluation of >3,000 cases. *Fetal Diagn Ther* 14:4 193-7
- Feldman B, Ebrahim SAD, Hazan SL, Gyi K, Johnson MP, Johnson A, Evans M. 2000. Routine Prenatal Diagnosis of aneuploidy by FISH studies in High-Risk Pregnancies. *Am J Med Gen* 87:203-206
- Fiddler M, Frederickson M, Chen P X, Pergament E. 2001. Assessment of fetal status of multiple gestation pregnancies using interphase FISH. *Prenat Diagn* 21:196-199
- Gersen S., Keagle M. 1999. The principles of Clinical Cytogenetics. Humana Press. 558 p.
- Guyot B, Bazin A, Sole Y, Julien C, Daffos F, F Daffos. 1988. Prenatal diagnosis with biotinylated chromosome specific probes. *Prenat Diagn* 8:485-493
- Hockstein S, Chen PX, Thangavelu M, Pergament E. 1998. Factors associated with maternal cell contamination in amniocentesis samples as evaluated by fluorescent *in situ* hybridization. *Obstet Gynecol* 92:4 Pt 1 551-6
- Hogge A, Surti U, Kochmar S, Mowery-Rushton P, Cumbie K. 1996. Molecular cytogenetics: an essential component of modern prenatal diagnosis. *Am J Obstet Gynecol* 175:353-357
- Isada N, Hume R, Reichler A, Johnson M, Klinger K, Evans M, Ward B. 1994. Fluorescent *in situ* hybridization and second-trimester sonographics anomalies: uses and limitations. *Fetal Diagn Ther* 9:367-370
- Jalal SM, Law ME, Carlson RO, Dewaield GW. 1998. Prenatal Detection of aneuploidy by directly labeled multicolored probes and interphase fluorescence *in situ* hybridization. *Mayo Clin Proc* 73 132-137
- Klinger K, Landes G, Shook D, Harvey R, Lopez L, Locke P, Lerner T, Osathanondh R, Leverone B, Houseal T, y cols.. 1992. Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Am J Hum Genet* 51:1 55-65
- Kuo WL, Tenjin H, Segraves R, Pinkel D, Golbus MS, Gray J. 1991. Detection of aneuploidy involving chromosomes 13, 18, or 21, by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) to interphase and metaphase amniocytes. *Am J Hum Genet* 49:1 112-9
- Larsen, W. 1997. Human Embriology. Ed. Churchill Livingstone. 455-469 p.
- Lewin P, Kleinfinger P, Bazin A, Mossafa H, Szpíro-Tapia S. 2000. Defining the efficiency of fluorescence *in situ* hybridization on uncultured amniocytes on a retrospective cohort of 27407 prenatal diagnoses. *Prenat Diagn* 20:1 1-6

- Lichter P, Joos S. 1996. Non-isotopic *in situ* hybridization to metaphase chromosomes and interphase nuclei. *EMBO Practical Course*.
- Luthardt FW. Chromosomal Syndromes and Genetic Disease. En Encyclopedia of life sciences. 2001. Nature publishing group. 1-11 pp
- Medina GP. Diagnóstico Prenatal. En Guizar-Vázquez J. 2001. Genética Clínica. Ed. Manual Moderno 669-775 pp
- Milunsky, A. 1975. Diagnóstico prenatal de las enfermedades hereditarias. *Pediatrica Jism Barcelona En Carrera J.M.*, 1990. Diagnóstico Prenatal. Ed. Salvat. 800 p.
- Milunsky, A. 1990. Genetic Disorders of the Fetus: Diagnosis, Prevention and Treatment, 3th edn. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Mukherjee AB, Murty VVVS, Chaganti RSK. 1992. Detection of cell-cycle stage by fluorescence *in situ* hybridization: its application in human interphase cytogenetics. *Cytogenet Cell Genet* 61: 91-94
- Nyberg, D; McGahan, J. 2003. Diagnostic Imaging of Fetal Anomalies. Ed. Lippincott Williams and Wilkins. 1091 p.
- Palomaki GE, Bradley LA, Haddow JE. 1994. A new approach to analysing fluorescence *in situ* hybridisation data for rapid detection of aneuploidy in amniocytes. *J Med Screen* 1:2 96-7
- Pergament E, Chen P X, Thangavelu M, Fiddler M. 2000. The clinical application of interphase FISH in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 20:215-220
- Philip J, Bryndorf T, Christensen B. 1994. Prenatal aneuploidy detection in interphase cells by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Prenat Diagn* 14:13 1203-15
- Pinkel D. 2000. Fluorescence *In Situ* Hybridization Principles and Practice. Wiley. 455 p.
- Salamanca, F. Aspectos citogenéticos de la herencia. En Guizar-Vázquez J. 2001. Genética clínica. Ed. Manual Moderno 73-89 pp
- Schreinemachers DM, Cross PKand Hook EB. 1982. Rates of trisomies 21,18,13 and other chromosome abnormalities in about 20 000 prenatal studies compared with estimated rate in live births. *Human Genetics* 61: 318-324.
- Spathas DH, Divane A, Maniatis GM, Ferguson-Smith ME, Ferguson-Smith MA. 1994. Prenatal detection of trisomy 21 in uncultured amniocytes by fluorescence *in situ* hybridization: a prospective study. *Prenat Diagn* 14:11 1049-54
- Soloviev I, Yurov Y, Vorsanova S, Fayet F, Roizes G, Malet P. 1995. Prenatal diagnosis of trisomy 21 using interphase fluorescence *in situ* hybridization of post-replicated cells with site-specific cosmid and cosmid contig probes. *Prenat Diagn* 15:237-248
- Schwartz S, Leana-Cox J. 1993. Fluorescent *in situ* hybridization: (FISH) a new application in the delineation of true mosaicism in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 13:661-670

- Thein ATA, Abdel-Fatta SA, Kyle P, Soothill PW. 2000. An assessment of the use of interphase FISH with chromosome specific probes as an alternative to cytogenetics in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 20:275-280
- Tkachuk DC, Pinkel D, Kuo W-L y cols.. 1991. Clinical applications of fluorescence *in situ* hybridization. *Genet Anal Tech Appl* 8:67-74
- Tepperberg j, Pettenati MJ, Rao PN, Lese CM, Rita D, Wyandt H, Gersen S, White B, Schoonmaker MM. 2001. Prenatal diagnosis using interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH): 2-year multi-center retrospective study and review of the literature. *Prenat Diagn* 21(4) : 293-301
- Van Opstal D, Van den Berg C, Galijaard RJ, Los FJ. 2001. Follow-up investigations in uncultured amniotic fluid cells after uncertain cytogenetics results. *Prenat Diagn* 21:75-80
- Verma RS, Batish SD, Gogineni SK, Kleyman SM, Stetka DG. 1992. Variations in alphoid DNA sequences escape detection of aneuploidy at interphase by FISH technique. *Genomics*. Sep;14(1):113-6.
- Ward BE, Gersen SL, Carelli MP, McGuire NM, Dackowski WR, Weinstein M, Sandlin C, Warren R, Klinger KW. 1993. Rapid prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by fluorescence *in situ* hybridization: clinical experience with 4,500 specimens. *Am J Hum Genet* 52:5 854-65
- Weremowicz S, Sandstrom D.J, Morton C.C., Niedzwiecki C.A., Sandstrom M.M., Bieber F.R., 2001. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for rapid detection of aneuploidy: experience in 911 prenatal cases. *Prenat Diagn* 21(4):262-9
- Winsor EJ, Silver MP, Theve R, Wright M, Ward BE. 1996. Maternal cell contamination in uncultured amniotic fluid. *Prenat Diagn* 16:49-56
- Yung, Jar-Fee. 1996. New FISH probes-the end in sight. *Nature Genetics* 14:10-12.

TESIS EN 7 HORAS

HERRERA CASA MATRIZ

Odontología # 65-1
Esq. Paseo de las Facultades
Copilco Universidad
Tel. 56-58-95-54
40 AÑOS
DE EXPERIENCIA

Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial 

TESIS HERRERA
MARCA 685757