



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ANEUPLOIDÍAS  
EN LOS CROMOSOMAS; 13, 16, 18 Y 21,  
MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA  
POLIMERASA POR FLUORESCENCIA  
CUANTITATIVA (QF-PCR)**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller **Ana Kharina Hernández**, como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutora: Antrop. Mary Acosta Loyo

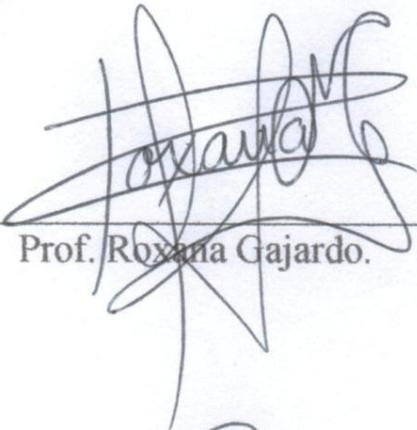
Asesor académico: Dra. Guillermina Alonso.

CARACAS, VENEZUELA  
MAYO - 2018

**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL  
DE GRADO DE LA Br. Ana Kharina Hernández Hernández.**

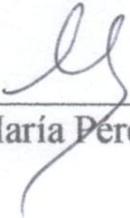
Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del (la) Br. Ana Kharina Hernández Hernández, C.I: V-22.351.022, titulado “**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ANEUPLOIDÍAS EN LOS CROMOSOMAS; 13, 16, 18 Y 21, MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA POR FLUORESCENCIA CUANTITATIVA (QF-PCR)**”, para optar al título de Licenciado (a) en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 23 días del mes de mayo del año 2018, dejando constar que la Prof. Guillermina Alonso actuó como Coordinadora del jurado examinador.



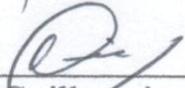
---

Prof. Roxana Gajardo.



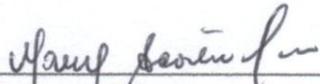
---

Prof. María Pérez.



---

Prof. Guillermina Alonso  
(Co-Tutora )



---

Antrop. Mary Acosta.  
(Tutora)

## *Agradecimientos*

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

A mi tutora, antropólogo Mary Acosta, le agradezco profundamente por haber confiado en mí para llevar a cabo este proyecto de tesis y por compartir conmigo sus conocimientos con excelencia y disposición. Sin sus correcciones, experiencia y consejos no hubiese sido posible la elaboración de este trabajo de tesis.

A la profesora, Guillermina Alonso por su ayuda, dedicación y asesoramiento. Por involucrarme en el maravilloso mundo de la Genética y enseñarme que el ADN es la molécula perfecta.

A las profesoras Roxana Gajardo, María Carolina Pérez y Vincenza Cervino, por estar involucradas en la guía y desarrollo de esta tesis especial de grado.

A mis profesores de la Escuela de Biología: Gracias por ser la base de mi formación académica y profesional.

Al Laboratorio de Genética Molecular Genmolab, por el apoyo financiero del proyecto.

Al licenciado Rubén Monasterios, por creen en mí y animarme a superarme constantemente. La generosidad y amabilidad demostrada en cada momento han sido un gran apoyo.

Al Dr. Orlando Arcia, por su importante aporte y participación en el desarrollo de esta tesis.

A todo el equipo de Genmolab, Rubén, Mary, Lucía, José Luis, Vilma y Yohan, por su sincero compañerismo que hace tan agradable el trabajo en el laboratorio, por los cafés, almuerzos y fiestas compartidas y por estar conmigo durante este largo y a veces difícil camino.

A mis padres Ana y Ricardo, por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado y motivarme siempre a estudiar y dar lo mejor de mí. A mi hermano por ser parte importante en mi vida. A mi gato Pinkis por ser mi compañero incondicional.

A todos ellos, mil gracias!

## ÍNDICE GENERAL

Índice general	iv
Índice de figuras	v
Índice de tablas	vii
Lista de abreviaturas	viii
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes	12
4. Objetivos	17
5. Material y métodos	18
5.1.Materiales	18
5.2.Métodos	22
6. Resultados	47
6.1.Estandarización	47
6.2.Resultados de muestras de pacientes	65
7. Discusión	78
8. Conclusiones	88
9. Bibliografía	89

## Índice de figuras

<b>Fig. 1.</b> Programa informático “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST)	23
<b>Fig. 2.</b> Programa informático “UCSC In-SilicoPCR”	24
<b>Fig. 3.</b> Programa informático “Primer3Plus v2.4.2”	25
<b>Fig. 4.</b> Protocolo de extracción de ADN por método salino	29
<b>Fig. 5.</b> Protocolo de purificación de ADN con perlas magnéticas	30
<b>Fig. 6.</b> Protocolo de extracción y purificación de ADN mediante columnas de sílica (estuche comercial)	32
<b>Fig. 7.</b> Programa de PCR 1	35
<b>Fig. 8.</b> Programa de PCR 2	36
<b>Fig. 9.</b> Programa de PCR 3	37
<b>Fig. 10.</b> Gel de agarosa 1%-TBE con ADN genómico de muestras de líquido amniótico	47
<b>Fig. 11.</b> Gel de agarosa 1%-TBE con productos de PCR simple de cada sistema STR, donde se utilizó 1 $\mu$ M de cebador	48
<b>Fig. 12.</b> Gel de agarosa 1%-TBE con productos de PCR simple de cada sistema STR, donde se utilizó 2 $\mu$ M de cebador	49
<b>Fig. 13.</b> Gel de agarosa 1%-TBE con productos de PCR simple de los sistemas D21S1411, D21S1435, D18S386 y D16S514, donde se utilizó 2 $\mu$ M de cebador	50
<b>Fig 14.</b> Sistema Penta D, ubicado en el cromosoma 21, amplificado con ADNg 9947A	51
<b>Fig 15.</b> Sistemas D21S11, D21S1435 y D21S1411, ubicados en el cromosoma 21, amplificados con ADNg 9947A	52
<b>Fig. 16.</b> Sistemas D18S51 y D18S386, ubicados en el cromosoma 18, amplificados con ADNg 9947A	53
<b>Fig. 17.</b> Sistemas D13S317 y D13631, ubicados en el cromosoma 13, amplificados con ADNg 9947A	54
<b>Fig. 18.</b> Sistemas D16S539 y D16S514, ubicados en el cromosoma 16, amplificados con ADNg 9947A	55

<b>Fig. 19.</b> Sistemas D21S11, amplificado con líquido amniótico, y D21S1435, amplificado con tejido. Ambos individuos trisómicos	56
<b>Fig. 20.</b> Sistemas Penta D y D21S1411, amplificados con líquido amniótico de un individuo trisómico	57
<b>Fig. 21.</b> Sistemas D18S51 y D18S386, amplificados con líquido amniótico de un individuo trisómico	58
<b>Fig. 22.</b> Sistemas D13S5317 y D13S63, amplificados con líquido amniótico de un individuo trisómico	59
<b>Fig. 23.</b> Sistemas D16S539 y D16S514, amplificados con tejido de un individuo trisómico	60
<b>Fig. 24.</b> Electroferograma de PCR múltiple 1, amplificado con ADNg 9947A	61
<b>Fig. 25.</b> Electroferograma de PCR múltiple 2, amplificado con ADNg 9947A	62
<b>Fig. 26.</b> Electroferograma de PCR múltiple 3, amplificado con ADNg 9947A	63
<b>Fig. 27.</b> Electroferogramas de PCR múltiple 1. Amplificado de muestra biológica sin diluir (arriba) vs diluida (abajo)	64
<b>Fig. 28.</b> Electroferogramas de PCR múltiple 1, 2 y 3, amplificados con líquido amniótico de un individuo no afectado	65
<b>Fig. 29.</b> Electroferogramas de PCR múltiple 1, 2 y 3, amplificados con líquido amniótico de un individuo trisómico en el cromosoma 21	66
<b>Fig. 30.</b> Electroferogramas de PCR múltiple 1, 2 y 3, amplificados con líquido amniótico de un individuo trisómico en el cromosoma 18	67
<b>Fig. 31.</b> Electroferogramas de PCR múltiple 1, 2 y 3, amplificado de líquido amniótico de un individuo trisómico en el cromosoma 13	68
<b>Fig. 32.</b> Electroferogramas de PCR múltiple 1, 2 y 3, amplificado de vellosidades coriónicas poliploides	69
<b>Fig. 33.</b> Gráfico. Resultados obtenidos de las 37 muestras biológicas analizadas	77

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Descripción de cebadores seleccionados para este trabajo de tesis	27
<b>Tabla 2.</b> Condiciones de amplificación para cada uno de los sistemas STRs	38
<b>Tabla 3.</b> Interpretación de acuerdo al rango de relación entre los picos	45
<b>Tabla 4.</b> Indicaciones médicas de las muestras estudiadas	70
<b>Tabla 5.</b> Resultados obtenidos utilizando PCR múltiple, el estuche comercial Devyser® o Cariotipo	72

## **Lista de abreviaturas**

**A:** Adenina.

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**C:** Citocina.

**EMA:** Edad Materna Avanzada.

**FISH:** Hibridación fluorescente in situ.

**G:** Guanina.

**μl:** Microlitro ( $10^{-6}$  L).

**mL:** Mililitro ( $10^{-3}$  L).

**pb:** Pares de bases.

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

**nmol:** Nanomol ( $10^{-9}$  mol ).

**QF-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa por fluorescencia cuantitativa.

**STR:** Repeticiones cortas en tándem.

**T:** Timina.

**T13:** Trisomía 13.

**T18:** Trisomía 18.

**T21:** Trisomía 2

## 1. RESUMEN

El término aneuploidía se refiere a la variación numérica de los cromosomas, en el caso de los seres humanos puede consistir en un aumento o disminución del número de cualquiera de los 23 pares de cromosomas. La presencia de una aneuploidía puede generar manifestaciones clínicas, físicas o psíquicas muy graves, y han sido identificadas como responsables de una gran porción de abortos espontáneos.

Clásicamente las aneuploidías han sido estudiadas mediante cariotipo e hibridación fluorescente in situ (FISH). A partir del año 2000 se comienzan, a gran escala, los estudios de aneuploidías mediante la reacción en cadena de la polimerasa por fluorescencia cuantitativa (QF-PCR por sus siglas en inglés). La QF-PCR consiste en la amplificación y cuantificación de las variantes genéticas presentes en regiones específicas del ADN (STRs o Short Tandem Repeat) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando cebadores marcados con fluorescencia, que permiten que un secuenciador de ADN de electroforesis capilar, registre los fragmentos productos de la PCR como picos de excitación en un gráfico denominado electroferograma.

El objetivo de este trabajo de tesis fue el estudio de aneuploidías en muestras de restos abortivos y líquido amniótico mediante la selección y diseño de cebadores para regiones repetitivas tipo Short Tandem Repeats en los cromosomas 13, 16, 18 y 21 por medio de la técnica de QF-PCR con fines diagnósticos.

Para ello, se sintetizaron diez pares de cebadores, cuatro para el cromosoma 21, dos para el cromosoma 13, dos para el cromosoma 18 y dos para el cromosoma 16. Los cuales se amplificaron mediante tres PCRs múltiples, que contienen los diez sistemas STRs estudiados.

Se evaluó un total de 37 muestras biológicas, distribuidas de la siguiente manera: 26 líquidos amnióticos, 08 vellosidades coriónicas y 03 tejidos fetales. Del total de las muestras, 28 resultaron ser fetos no afectados (76%). Se detectaron 9 anomalías cromosómicas, 05 trisomías en el cromosoma 21 (13%), 02 trisomías en el cromosoma 13 (5%), 01 trisomía en el cromosoma 18 (3%) y 01 poliploidía (3%). Estos resultados se correspondieron en su totalidad a los encontrados mediante el estuche comercial Devyser® o cariotipo.

La estandarización de la QF-PCR de forma manual logró disminuir los costos del diagnóstico en un 95%, en comparación con los estuches comerciales y demostró ser una técnica, fiable, rápida y de fácil análisis, que permite el diagnóstico de aneuploidías en muestras de líquido amniótico, vellosidades coriónicas y restos abortivos.

**Palabras clave:** QF-PCR, estandarización, aneuploidías, diagnóstico prenatal.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades o anomalías cromosómicas son alteraciones esporádicas y de baja frecuencia (3 a 4% de los embarazos clínicamente reconocidos) que se originan por la alteración del número o la estructura de los cromosomas. El cariotipo no afectado en los seres humanos es de 23 pares de cromosomas, la alteración de la dosis o estructura de los mismos genera lo que se denomina anomalías cromosómicas (Herráez y Sánchez, 2012), Entre las alteraciones numéricas se encuentran las aneuploidías y euploidías. El término aneuploidía se refiere a la variación numérica de los cromosomas en un individuo y puede consistir en un aumento o disminución del número de cualquiera de los cromosomas. Las euploidías consisten en la pérdida o ganancia de dotaciones haploides de cromosomas (Pierce, 2009).

Las aneuploidías se generan por falta de disyunción durante la meiosis, es decir, un fallo en la separación normal de un par de cromosomas o de cromátidas hermanas. Las consecuencias del proceso son diferentes dependiendo de la división meiótica (I o II) en la que se produzca el fallo. La ausencia de disyunción cromosómica durante la meiosis I hace que los dos homólogos del cromosoma afectado pasen juntos a uno de los gametocitos secundarios (células germinales), y el otro gametocito quede sin este cromosoma. En la subsiguiente meiosis II, con disyunción normal, se separan todas las parejas de cromátidas. Finalmente los gametos maduros tienen una cromátida de más, o bien una de menos. La no disyunción de las cromátidas hermanas durante la meiosis II, tras una meiosis I normal, hace que ambas pasen juntas a un mismo gameto, que queda así con dos copias del

cromosoma afectado, mientras el otro no contiene ninguna, se forman otros dos gametos no afectados. El resto de los cromosomas separan sus cromátidas correctamente. Las aneuploidías se generan cuando alguno de los gametos afectados es fecundado por un gameto con carga cromosómica haploide (normal) (Herráez y Sánchez, 2012).

Las anomalías cromosómicas por aneuploidías muestran manifestaciones clínicas, físicas o psíquicas muy graves, que varían según el cromosoma afectado (Herráez y Sánchez, 2012). Las más frecuentes en seres humanos son:

- Trisomía en el cromosoma 21 (Síndrome de Down): Los individuos que presentan esta anomalía son viables, sin embargo, presentan retraso mental, afecciones del corazón y tienen como características fenotípicas; cara ancha y achatada, estatura pequeña, ojos con pliegue epicántico y lengua grande (Conde, 2016).

- Trisomía en el cromosoma 18 (síndrome de Edwards): Estos individuos presentan una tasa de mortalidad de 95% en el primer año de vida. Muestran malformaciones físicas generales, afecciones cardíacas, orejas de implantación baja, talones prominentes y retardo mental profundo (Conde, 2016).

- Trisomía en el cromosoma 13 (síndrome de Patau): Alrededor del 50% de los individuos con esta anomalía fallecen durante el primer mes de vida y a los 6 meses han fallecido el 70% de los nacidos vivos. Se estima que entre el 80 y 90% de los fetos con esta afección no llegan a término. Estos individuos presentan anomalías múltiples, como labio

leporino o paladar hendido, convulsiones, ojo cíclope (un solo ojo en lugar de dos), dedos adicionales en manos o pies, entre otros (Conde, 2016).

- Síndrome de Turner: XO (monosomía): Son individuos viables. Fenotípicamente son hembras de baja estatura, presentan pliegues en el cuello que van desde la parte superior de los hombros hasta los lados del cuello, ovarios no funcionales, baja ubicación de las orejas, entre otros (Conde, 2016).

- Síndrome de Klinefelter: XXY: Son individuos viables. Fenotípicamente son varones, altos en estatura y ligeramente feminizados. Manifiestan coeficiente intelectual reducido, atrofia testicular y desarrollo mamario (Conde, 2016).

Además, las aneuploidías han sido identificadas como responsables de una gran porción de abortos espontáneos. La trisomía en el cromosoma 16 se considera no compatible con la vida y constituye la causa más común de abortos por aneuploidías, con una frecuencia de 30% en mujeres abortivas a repetición. Los individuos sólo son viables si la trisomía en el cromosoma 16 se encuentra en forma de mosaico, existen pocos casos descritos de individuos con esta anomalía cromosómica, en todos ellos los sujetos presentan retraso en el crecimiento, defectos cardíacos congénitos, hipoplasia pulmonar, dolicocefalia, entre otros (Kalousek y col., 1993)

Se estima que el aborto espontáneo ocurre en alrededor de 15% de los embarazos clínicamente reconocidos. A pesar de que puede ocurrir en cualquier momento del

embarazo, es más frecuente durante el primer trimestre (Lathi y col., 2011). Siendo las aneuploidías cromosómicas una de las principales causas, con una frecuencia de incluso 50%. De éstas, 52% corresponden a trisomías, 18% monosomías, 22% poliploidias y 8% a otro tipo de alteraciones estructurales o en estado de mosaico (López y col., 2011). El riesgo de aborto se modifica según el antecedente de la mujer, particularmente si ha tenido descendencia viva. En este caso, el riesgo es: sin aborto previo 5%, con un aborto previo de 20 a 25%, dos abortos previos de 25% y tres abortos previos 30%. En las pacientes sin descendencia viva y tres abortos previos el riesgo de recurrencia es de 30 a 40%. En parejas con un aborto y cariotipo no afectado, es más probable que sí ocurre otra pérdida, el estudio citogenético sea no afectado. En cambio, si hay una alteración cromosómica en un aborto previo, en caso de otra pérdida lo más probable es que ésta tenga también una alteración cromosómica, por ello la importancia del diagnóstico de aneuploidías en restos abortivos (López y col., 2011).

Algunas hipótesis sugieren que la mayoría de las trisomías autosómicas son de origen materno, porque el gameto femenino permanece detenido durante mucho tiempo en diplotene (prophase I). En las mujeres, la meiosis comienza durante su desarrollo fetal y se detiene hasta el momento previo a la ovulación, años después, el largo tiempo entre la detención de la meiosis y la ovulación es el que permitiría que la edad materna afecte los mecanismos celulares y así posiblemente se originen las aneuploidías (Valdez y col., 2012). Mientras que la mayoría de las aneuploidías sexuales son de origen paterno, resultado de la falta de homología en la pareja de cromosomas X e Y (Coco y col., 2008).

Después de las aneuploidías, la anomalía cromosómica más frecuente es la translocación, que es una alteración de tipo estructural; esta consiste en el desplazamiento de un segmento de un cromosoma a un nuevo lugar en el genoma, lo que podría generar individuos con trisomías cromosómicas parciales.

Otra anomalía de importancia puede ocurrir por la no disyunción de los cromosomas durante la mitosis, cuando las células se dividen durante el desarrollo embrionario, como resultado de este fenómeno se originan dos líneas celulares, a lo cual se le denomina mosaico. Al realizar el análisis cromosómico de los individuos afectados, se pueden observar dos o más genotipos, con diferente número de cromosomas, alguna de las líneas celulares podría ser trisómica, mientras que la otra es normal (Kaminker y Armando, 2008).

El diagnóstico prenatal de aneuploidías es muy importante para evaluar 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 (Castro y col., 2010).

La indicación más frecuente para realizar una prueba de diagnóstico prenatal invasiva es la edad materna avanzada. En la mayoría de los países se considera que la edad materna avanzada es de 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. Esta indicación como criterio único detecta, según la bibliografía, 30% de los fetos con trisomía en el cromosoma 21 (Brendaña, 2008).

Igualmente, la ecografía permite detectar algunas alteraciones morfológicas y analizar los llamados marcadores ecográficos de cromosomopatías. Uno de los más importantes es la translucencia nuchal, que es un cúmulo fisiológico de líquido en la región de la nuca fetal, que procede embriológicamente del sistema linfático para-cervical (Chitty y col., 2006). Su medida es expresada en milímetros (mm) y se realiza en el plano sagital entre la parte externa del hueso occipital y la parte interna de la piel en la zona nuchal. 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 nuchal y la incidencia de cromosomopatía (a mayor medida, mayor riesgo). En los fetos con trisomía 21, aproximadamente el 75% tiene translucencia nuchal aumentada y en el 70% está ausente el hueso nasal, además presentan húmero corto, higroma quístico y defectos cardíacos (Nicolaidis, 2004).

Hay otros marcadores que se asocian con alguna aneuploidía en particular. Por ejemplo, la ecografía de un feto con trisomía 18 puede mostrar polihidramnios u oligohidramnios (aumento o disminución de la cantidad de líquido amniótico), higroma quístico, mielomeningocele (masa quística formada por la médula espinal), hidrocefalia, hernia diafragmática, restricción del crecimiento intrauterino, entre otros (Matthews, 1999). En un feto con trisomía 13 es posible encontrar restricción del crecimiento intrauterino, manos y pies malformados, anomalías renales, craneofaciales y de la pared abdominal, además de polihidramnios u oligohidramnios (Matthews, 1999).

También existen marcadores bioquímicos para descartar aneuploidías, conocidos como pruebas hormonales, estas pruebas consisten en la cuantificación de los niveles de estos marcadores en el suero materno de la mujer embarazada, durante el primer trimestre de gestación. Los marcadores en suero que se utilizan para descartar el 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), incluyendo 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 valores 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 (Matthews, 1999).

El cariotipo es la técnica más utilizada para diagnosticar anomalías cromosómicas y tiene una alta especificidad, consiste en el análisis numérico y estructural de los cromosomas mediante un cultivo celular que requiere que las células estén detenidas en una fase específica del ciclo celular, llamada metafase. Para la realización del cultivo celular se necesita gran cantidad de muestra biológica, en el caso de líquido amniótico se manejan entre 7 a 15 mL de muestra. Es una técnica con un procedimiento laborioso, que requiere de varios días de trabajo, existe posibilidad de falla en el cultivo en alrededor de 20% de las muestras y de contaminación con células maternas (Castillo y col., 2014).

La introducción de técnicas de biología molecular en la citogenética ha proporcionado los medios para estudiar de manera más específica los cromosomas, lo que ha mejorado y facilitado su análisis convencional. Los estudios moleculares no requieren que la célula este en una fase específica del ciclo celular, de manera que no se precisa del cultivo celular y el estudio se efectúa directamente sobre el material biológico, ya sea, líquido amniótico, tejido, sangre, etc., lo que representa un gran ahorro de tiempo y recursos (Bendaña y col., 2009).

Entre los estudios moleculares más recientes para el análisis cromosómico se encuentra la reacción en cadena de la polimerasa por fluorescencia cuantitativa (QF-PCR por sus siglas en ingles) que consiste en la amplificación y cuantificación de variantes génicas altamente polimórficas denominadas STR (Short Tandem Repeats), por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando cebadores marcados con fluorescencia, que permiten que un secuenciador de ADN de electroforesis capilar, registre los fragmentos producto de la PCR como picos de excitación en un gráfico denominado electroferograma (Nicolini y col., 2004).

La QF-PCR es un método rápido y eficiente para detectar el número de copias de uno o varios cromosomas. Una de las características más favorables, es la poca cantidad de muestra requerida para el análisis y que en casos de individuos afectados por alguna aneuploidía, se puede brindar información sobre el origen parental del cromosoma extra, también es posible obtener resultados concluyentes en muestras contaminadas con ADN materno (Diego y col., 2005).

Los microsatélites tipo STRs están presentes en todo el genoma, son particularmente abundantes en regiones centroméricas o en porciones heterocromáticas de los cromosomas. Consisten en secuencias formadas por nucleótidos, de 2 a 6 pares de bases, repetidos varias veces en tanda. La cantidad de repeticiones de un determinado STR varía de un alelo a otro, formando secuencias de diferentes longitudes, lo que permite distinguir entre ellos al realizar una electroforesis capilar (Ochshorn y col., 2006). Los STRs están ubicados en regiones intrónicas, son codominantes, es decir, no hay dominancia o recesividad entre alelos y el fenotipo y genotipo se corresponden. Los microsatélites poseen una alta tasa de mutación, lo que los hace muy polimórficos a nivel poblacional. Se ha estimado que la tasa de mutación en los microsatélites varía entre  $10^{-2}$  y  $10^{-5}$  por generación y el mecanismo que explica su alto grado de polimorfismo es la acumulación de errores producidos por el deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del ADN (Sirvent y Gómez, 2012).

El análisis de STRs en la detección de aneuploidías se realiza mediante un gráfico denominado electroferograma, donde las señales a observar dependerán de homo/heterocigocidad entre los alelos parentales y la dosis de cada alelo en particular. En un individuo no afectado que tiene diferente número de repeticiones en cada alelo, se observa en el electroferograma dos picos con relación 1:1, el individuo es heterocigoto y se dice que el marcador es informativo. Las trisomías son visualizadas como tres picos, cuando los tres alelos son heterocigos entre sí, o bien, dos picos con relación 2:1, cuando dos de los tres alelos son homocigos, la relación se calcula de acuerdo al área de los picos (Ochshorn y col., 2006).

El manual más aceptado para el diagnóstico de aneuploidías mediante QF-PCR es la “Guía de la Asociación para citogenética clínica”. Esta indica que al dividir las áreas de los picos se obtiene un valor denominado rango de relación (RR), si este se encuentra entre los valores 0,8 y 1,4, se concluye que el individuo es disómico (no afectado) en ese sistema, si el RR es menor a 0,6 o mayor a 1,8, se interpreta como una trisomía. El RR es no concluyente si se encuentra entre 0,6 y 0,8 o 1,4 y 1,8.

La Guía de la Asociación para citogenética clínica establece, además, que se deben evaluar un mínimo de 4 sistemas por cromosoma y que deben haber, al menos, dos sistemas claramente trisómicos para concluir que un individuo posee una anomalía cromosómica.

### 3. ANTECEDENTES

Desde 1960 se ha observado una relación entre las anomalías cromosómicas y los abortos espontáneos. Esta relación se reforzó en 1975 cuando Boue y colaboradores publicaron uno de los primeros grandes estudios citogenéticos en tejido de abortos durante primer trimestre. En este trabajo se estudiaron casi 1.500 muestras de tejido fetal y embrionario y se encontró una tasa de anormalidad del 60% (Boue y col., 1975). En 1987 surgió un avance en la forma de realizar estudios cromosómicos por medio de técnicas citogenéticas, se comenzó a utilizar vellosidades coriales de los productos de aborto, en lugar de tejido fetal (Boue y col., 1975). Estos estudios tenían una tasa mucho menor de falla en el cultivo y mostraron una tasa de anormalidad mayor. Esta mejora en la metodología, junto con los avances en la detección temprana del embarazo, apoyó la creencia de que la incidencia de anormalidades cromosómicas es mayor que la estimada anteriormente. Sin embargo, ciertas tendencias se han mantenido, entre estas que las aneuploidías explican la mayor proporción de las anormalidades observadas en los productos de aborto del primer trimestre (Castro y col., 2010).

La distribución de las anomalías cromosómicas, según la bibliografía, parece bastante constante, las trisomías representan 64% de anomalías, las triploidías 11%, monosomías del X 10%, aneuploidías múltiples 6%, anormalidades estructurales 4%, tetraploidías 4% y monosomías autosómicas 1% (principalmente la monosomía del cromosoma 21) (Menasha y col., 2005).

Las anomalías más comunes en los abortos son trisomías en los cromosomas 16, 21 y 22, la primera es la más frecuente de las alteraciones numéricas (Castro y col., 2010). Los cromosomas que con mayor frecuencia están involucrados en las aneuploidías múltiples son el 7, 14, 15, 16, 21 y 22. Las aneuploidías en los cromosomas 1 y 19 se encuentran con poca frecuencia, debido a que son responsables de abortos tempranos que no se detectan ya que no se logra un embarazo viable. La trisomía en el cromosoma 1 sólo se ha reportado dos veces en la literatura y la trisomía 19 en una ocasión, utilizando técnicas de citogenética molecular. Se sabe que el cromosoma 19 es particularmente rico en genes críticos que requieren de una dosificación exacta para el desarrollo embrionario no afectado (Castro y col., 2010).

Desde 1920 las aneuploidías han sido estudiadas mediante cariotipo. En 1969 surgió otra técnica para estos estudios, la hibridación fluorescente *in situ* (FISH), es una técnica citogenética de marcaje de cromosomas, mediante la cual los cromosomas son hibridados con sondas de ADN complementarias a ciertas regiones de los cromosomas, las sondas están marcadas con fluorescencia y permiten así la visualización, distinción y estudio de los cromosomas así como de las anomalías que estos puedan presentar (López y col., 2011).

En 1980, Alec Jeffreys desarrolló una técnica para el estudio de los perfiles genéticos usando mini satélites tipo VNTR (Número variable de repeticiones en tanda), que permitiría la identificación genética de personas. Luego en 1989 Michael Litt y Jeffrey Luty descubren los STRs (Litt y Luty, 1989). El desarrollo de la PCR, en 1983 por Kary Mullis, sumado a la invención de los secuenciadores de ADN, a principios de

los noventa, permitió el estudio automatizado de los STRs, lo que favoreció particularmente a la genética forense y la genética de poblaciones.

El estudio de aneuploidías mediante el uso STRs fue reportado por el Dr. Mansfield, en 1993, quien utilizó este método para el diagnóstico prenatal del síndrome de Down. En el año 2000, comienzan en Europa, los estudios con un gran número de muestras, liderados por el Dr. Vincenzo Cirigliano (Cirigliano y col., 2006), a esta técnica se le llamó QF-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa por fluorescencia cuantitativa).

El Dr. Cirigliano y colaboradores trabajaron con aproximadamente 50.000 muestras biológicas, principalmente líquido amniótico y vellosidades coriónicas, en un estudio titulado: “Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR, results of 9 years of clinical experience” (Diagnóstico prenatal rápido de aneuploidías frecuentes mediante QF-PCR, resultado de 9 años de experiencia clínica), donde se evaluaron los cromosomas 13, 18, 21 y sexuales. Se encontró que 96.2% de los fetos eran no afectados, 1.8% presentaban trisomía en el cromosoma 21, 0.7% mostraban trisomía en el cromosoma 18, 0.3% manifestaban trisomía en el cromosoma 13 y 1% correspondían a otras anomalías, principalmente aneuploidías en cromosomas sexuales y mosaicos (Cirigliano y col., 2009).

En Venezuela se han realizado pocos estudios para la detección de aneuploidías mediante QF-PCR, ya que se trata de una técnica reciente, el uso de STRs se ha

implementado principalmente para establecer filiaciones biológicas, identificar personas fallecidas en catástrofes naturales, estudios poblacionales, así como en la identificación de restos antiguos y agresiones sexuales.

Luego de hacer una extensa revisión bibliográfica, encontramos que no hay estudios publicados de QF-PCR en Venezuela, existe un solo estudio, en fase de publicación, llamado: “Diagnóstico prenatal de aneuploidías frecuentes (13, 18, 21 y sexuales X, Y) mediante la técnica QF-PCR en muestras de pacientes de venezolanos”, donde se estudiaron 200 muestras biológicas de pacientes de diferentes regiones de Venezuela, por medio de un estuche comercial. Todas las muestras estudiadas tenían indicación médica. En este estudio se obtuvo que: el 85% de las muestras analizadas correspondían a fetos no afectados, 8% eran trisómicos en el cromosoma 21, 3% presentaban trisomía en el cromosoma 13, 2% en el cromosoma 18 y 2% presentaban otras anomalías cromosómicas. También se encontró que todas las muestras analizadas por la técnica de QF-PCR se correspondían en un 100% con el resultado en cariotipo y que la edad promedio de las madres con fetos afectados fue de 32 años (Acosta y col.).

Comúnmente el diagnóstico de aneuploidías mediante la técnica QF-PCR se realiza utilizando estuches comerciales. Este trabajo de tesis forma parte un proyecto más amplio desarrollado por el laboratorio GENMOLAB, que contempla analizar cuatro sistemas para cada uno de los cromosomas estudiados (13, 16, 18 y 21), además de los cromosomas sexuales (X e Y), siendo este el primer estudio en Venezuela que plantea estandarizar la técnica de QF-PCR de forma manual, es decir, diseñando,

escogiendo y sintetizando los cebadores, de esta forma se espera sustituir el estuche comercial, lo que contribuye de forma significativa a disminuir los costos del diagnóstico, permitiendo que sea accesible a un mayor número de personas.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Estudiar las aneuploidías en muestras de restos abortivos y líquido amniótico mediante la escogencia y diseño de cebadores para regiones repetitivas tipo Short Tandem Repeats en los cromosomas 13, 16, 18 y 21, utilizando la técnica de QF-PCR con fines diagnósticos.

### 4.2 Objetivos Específicos

- 1- Escoger, diseñar y sintetizar cebadores marcados con fluoróforos para determinadas regiones con repeticiones cortas en tándem (STRs) en los cromosomas 13, 16, 18 y 21.
- 2- Estandarizar la extracción y purificación de ADN genómico de muestras de restos abortivos y líquido amniótico.
- 3- Estandarizar la PCR y la separación por electroforesis capilar automatizada de los productos de la PCR.
- 4- Evaluar la eficiencia de la técnica diseñada, mediante muestras previamente analizadas con estuches comerciales.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1. 1 Material biológico.

En este trabajo de tesis se analizaron un total de 37 muestras biológicas, distribuidas de la siguiente manera:

- 26 muestras de líquido amniótico, que es el fluido que rodea al feto en gestación, cuya obtención se hizo mediante una amniocentesis practicada por el médico obstetra tratante de cada paciente en particular, el procedimiento en general, consiste en la extracción de 20 a 30 mL de líquido amniótico por medio de una jeringa que se introduce de forma trans-abdominal, la toma de la muestra se realiza a partir de las semanas 14 a 16 de gestación, mientras mayor sea la edad gestacional se requiere menor cantidad de muestra, ya que hay mayor número de células fetales inmersas en el fluido. La cantidad promedio de muestra recibida para nuestro estudio fue de 5mL.
- 08 muestras de vellosidades coriónicas, estas emergen del corion (envoltura externa que recubre el embrión) permitiendo el intercambio de nutrientes entre la madre y el feto, brindan la misma información genética que las células fetales por derivarse del cigoto, el muestreo de vellosidades coriónicas es la técnica más utilizada para la obtención de ADN fetal durante el primer trimestre, se realiza entre las semanas 10 y 13 de la gestación, las muestras pueden obtenerse de manera trans-abdominal o trans-cervical, la cantidad recibida fue variable (de 1 a 15 mm).
- 03 muestras de tejido fetal, cuyas biopsias fueron obtenidas directamente de restos abortivos.

Todas las muestras fueron tomadas desde el primer trimestre del año 2016 hasta el primer trimestre del año 2018, se transportaron al laboratorio bajo cadena de frío hasta ser procesadas. La mayoría de las muestras fueron obtenidas mediante la colaboración del servicio de citogenética del laboratorio Diagenit y preparadas por el Médico Genetista Orlando Arcia, también se estudiaron muestras obtenidas directamente de las pacientes del Laboratorio Genmolab, C.A. Todas las pacientes de las cuales provinieron dichas muestras llenaron una encuesta mediante la que se obtuvo información sobre la edad, tiempo de gestación e indicación de estudio, a su vez firmaron un consentimiento informado donde se les explicó de que trata el estudio, sus alcances y se pidió su autorización para poder utilizar la muestra de manera confidencial. El consentimiento se muestra a continuación:

<p><u>Consentimiento Informado para el Estudio Cromosómico Prenatal</u></p> <p>Nombre del paciente: Nombre y firma del profesional que informa:  Fecha:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Las vellosidades coriónicas o restos ovulares se obtienen mediante aspiración endouterina o por expulsión espontánea y son llevadas a cabo por un médico especialista.</li><li>2. Las técnicas pueden fracasar por contaminación o daño del material biológico por exposición a reactivos que dañen el ADN (como formol)</li><li>3. Mediante el análisis molecular se podrá determinar anomalías en los cromosomas 13, 16, 18, 21 y sexuales.</li><li>4. En análisis mediante esta técnica sólo nos informará de posibles anomalías cromosómicas frecuentes, y no de defectos congénitos de otra naturaleza, y por tanto, el resultado normal de un estudio genético <b>no garantiza</b> que el feto carezca de defectos de otra índole.</li><li>5. Como cualquier otro método de análisis, las técnicas tienen <b>limitaciones propias</b> como la posibilidad de la presencia de mosaicismo de baja frecuencia y la presencia de anomalías estructurales que por su tamaño solamente pueden evidenciarse por otros procedimientos diagnósticos.</li><li>6. El resultado será entregado con la debida urgencia y dada su confidencialidad, únicamente a los solicitantes y al médico tratante.</li><li>7. En los casos de anomalías detectadas, se recomienda la asesoría genética por el médico tratante para la interpretación, alcance, y de ser necesario posibles alternativas terapéuticas que se deriven de los resultados de la prueba.</li><li>8. Los resultados obtenidos podrían ser utilizados con fines de investigación y publicaciones científicas, sin que se vulnere la confidencialidad de la identidad de los solicitantes.</li></ol> <p>De acuerdo con la información recibida y a la aclaración de las dudas planteadas CONSENTIMOS la realización del estudio citogenético _____ y molecular _____.</p> <p>Firma de la madre: Cédula de Identidad:</p> <p>Firma del padre: Cédula de Identidad:</p>	
---	--

### 5.1.2 Material de laboratorio

El estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Genética Molecular GENMOLAB, ubicado en el Municipio Carrizal del estado Miranda, Venezuela. El laboratorio está dividido en secciones separadas y diferentes para la extracción de ADN, preparación de PCR, y secuenciación de ADN.

En el área de extracción de ADN se utilizaron los siguientes materiales de laboratorio: Pipetas automáticas de 20, 200 y 1000  $\mu$ L marca Gilson, vortex modelo Genie® 2 marca Daigger, micro-centrifuga modelo 5415C marca Eppendorf, bloque seco marca Scientific. puntas plásticas desechables esterilizadas para cada tipo de pipeta, tubos plásticos estériles de 15 mL, tubos de 1,5 mL libre de Rnasas marca Eppendorf, gradillas para tubos de 1,5 mL, guantes de nitrilo libres de polvo y marcadores indelebles para rotular las muestras.

En el cuarto de Pre-PCR, que es el lugar donde se prepararon las mezclas para la PCR, se utilizó una campana de flujo laminar vertical marca Labconco, pipetas automáticas de 10, 20, 200 y 1000  $\mu$ L marca Gilson, tubos plásticos estériles y libre de Rnasas marca Eppendorf de 200  $\mu$ L. Gradillas para tubos de 200  $\mu$ L, agua ultra pura, guantes de nitrilo libres de polvo, puntas plásticas desechables con filtros para cada tipo de pipeta y marcadores indelebles para rotular las muestras.

En el área de PCR, se utilizó un termociclador modelo PCR System 9700 marca GeneAmp® (Applied Biosystems). Para la electroforesis en gel se utilizó una fuente de poder marca biotech® y guantes de nitrilo libres de polvo.

En el área de secuenciación de ADN se utilizaron los siguientes materiales y equipos: secuenciador automatizado de ADN modelo 310, marca Applied Biosystems, pipetas automáticas de 2 y 10µL marca Eppendorf, tubos plásticos de 600 µL estériles, libres de Rnasas, marca Eppendorf, guantes de nitrilo libres de polvo y marcadores indelebles para rotular las muestras

### 5.1.3 Reactivos

La extracción de ADN de las muestras se realizó por medio del estuche comercial Gsync™ DNA Extraction Kit (100 Preps) de Geneaid. En la fase de estandarización también se probó la extracción por método salino o Salting out ( Miller, et al,1998), para ello se utilizaron los siguientes reactivos: Buffer de lisis ( Tris-HCl, Cloruro de sodio 400 mM y Na<sub>2</sub>EDTA 2mM, pH 8), Proteinasa K (1mg de Proteinasa K en SDS 1% y Na<sub>2</sub>EDTA 2mM) y perlas magnéticas MagneSil® GREEN de Promega, Etanol absoluto grado molecular, marca Fermont. Además se realizó electroforesis en geles de agarosa, para ello se utilizó: Agarosa Le Agarose de AcroGene®, buffer TBE 1X (Tris borato EDTA), como buffer de carga azul de bromofenol DV437A de Promega.

Para la amplificación y marcaje de las muestras ya extraídas, se emplearon diez pares de cebadores: cuatro para el cromosoma 21, dos para el cromosoma 13, dos para el cromosoma 18 y dos para el cromosoma 16, los cuales fueron sintetizados en Integrated DNA Technology, Inc. Para la mezcla de PCR se utilizó una mezcla de dNTPs a una concentración de 2.5 Mm por cada dNTP, marca Maxim Biotech, Inc., Taq Platinum (platinum DNA polimerase + cloruro de magnesio 50 Mm y buffer 10X) de Thermo Fisher Cientific y agua ultra pura de Promega. Para la corrida electroforética se utilizó formamida HiDi™ (ABI) y Liz®500 (ABI). Para el análisis de los datos se utilizaron los software Data Collection® v 3.1.0 y Gene Mapper® V3.2 Applied Biosystems.

En todas las áreas se utilizó la indumentaria adecuada y recomendada para un laboratorio de genética molecular: bata de laboratorio, guantes diferentes en cada área del laboratorio, zapatos cerrados y tapaboca.

## 5.2 Métodos.

### 5.2.1 Selección de cebadores.

Como se indicó anteriormente, el presente trabajo de tesis forma parte un proyecto más amplio del laboratorio Genmolab, en el cual se contempla la síntesis de cuatro pares de cebadores para el análisis de cada uno de los cromosomas de interés:

13, 16, 18, 21 y cromosomas sexuales. Este trabajo de tesis conforma la primera etapa de ese macro proyecto, siendo el primer trabajo de su tipo en Venezuela.

Cada una de las secuencias de cebadores que forman parte de este proyecto se sometió a diferentes programas informáticos. Primero se utilizó el programa “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) NCBI-NIH (BLAST, N. a better web interface Johnson), donde se introduce la secuencia a evaluar y se selecciona el organismo en estudio, en este caso “human genomic”, con esta información el programa revela las secuencias con las cuales hay homología y en que cromosoma están ubicadas, de este modo se verificó que las secuencias de los cebadores correspondían a los cromosomas esperados. A continuación se muestra el análisis del cebador sentido de sistema D21S11 mediante este programa:



Genomic sequences [show first]						
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Homo sapiens chromosome 21, alternate assembly CHM1.1.1</a>	48.1	1160	100%	1e-04	100% <a href="#">NC_018932.2</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Homo sapiens chromosome 21, GRCh38.p7 Primary Assembly</a>	48.1	1372	100%	1e-04	100% <a href="#">NC_000021.9</a>

**Fig. 1.** Programa informático “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST).

Posteriormente se realizó una PCR virtual, usando el programa “UCSC In-SilicoPCR” (In-Silico PCR, diseñado por Jim Kent), en el cual se introducen las secuencias de los cebadores, sentido y anti-sentido y el organismo a estudiar. Tras analizar estos datos el programa arroja la secuencia que es hibridada por los cebadores, el fragmento que genera y el cromosoma al cual corresponde esta secuencia, así se corroboró que el rango de tamaño del amplificado coincidía con el esperado. En seguida se muestra, a modo de ejemplo, el estudio de los cebadores del sistema D21S11 mediante de este programa:

The image shows the UCSC In-Silico PCR web interface. The top navigation bar includes links for Genomes, Genome Browser, Tools, Mirrors, Downloads, My Data, Help, and About Us. The main form is titled "UCSC In-Silico PCR" and contains the following fields:

- Genome:** Human (selected from a dropdown menu)
- Assembly:** Dec. 2013 (GRCh38/hg38) (selected from a dropdown menu)
- Target:** genome assembly (selected from a dropdown menu)
- Forward Primer:** TATGTGAGTCAATTCCCCAA (text input)
- Reverse Primer:** GTTGTATTAGTCAATGTTCTC (text input)
- submit** button
- Max Product Size:** 4000 (text input)
- Min Perfect Match:** 15 (text input)
- Min Good Match:** 15 (text input)
- Flip Reverse Primer:**

Below the form, the results are displayed in a yellow box with the following content:

**UCSC In-Silico PCR**

```
>chr21:19181942+19182165 224bp TATGTGAGTCAATTCCCCAAGTGA GTTGTATTAGTCAATGTTCTCCAG
TATGTGAGTCAATTCCCCAAGTGAattgccttctatctatctatctatct
gtctgtctgtctgtctgtctgtctatctatctatactatctatctatctatca
tctatctatccatctatctatctatctatctatctatctatctatctatctatcta
tctatctatcgtctatctatccagtctatctacctcctattagctgtct
CTGGAGAACATTGACTAATAACAAC
```

**Primer Melting Temperatures**

```
Forward: 62.8 C tatgtgagtcaattccccaagtga
Reverse: 54.8 C gttgtattagtcaatgttctccag
The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing
oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from Primer3.
```

*Fig. 2. Programa informático “UCSC In-SilicoPCR”.*



Para este trabajo de tesis se escogieron diez pares de cebadores, cuatro para el cromosoma 21, dos para el cromosoma 13, dos para el cromosoma 18 y dos para el cromosoma 16. El criterio de escogencia de los cebadores fue el siguiente: algunos, eran de los más reportados en la bibliografía, por tanto, los más proclives a ser exitosos experimentalmente, todos amplifican regiones STRs con alto porcentaje de heterocigosidad (mayor a 77%), lo que hace que a nivel poblacional exista una variabilidad alélica alta, además, se seleccionaron de acuerdo al rango del tamaño del amplificado, con la idea de realizar el análisis final mediante PCRs múltiples, entonces se escogieron de modo que no hubiese solapamiento entre los rangos de tamaño de los diferentes sistemas al momento de realizar la electroforesis capilar automatizada.

Los cebadores sentido de los diez pares de cebadores, fueron marcados en el extremo 5' con algún fluoróforo, 6-FAM (azul) o HEX (verde). Se seleccionaron por ser fluoróforos estables en el tiempo, además, son compatibles con una de matrices programadas en el secuenciador de ADN y son económicos en relación a otros fluoróforos ofrecidos en el mercado.

Los cebadores sentido de los STRs; D21S11, D21S1411, D21S1435, D18S51, D18S386 y D13S631, se marcaron con el fluoróforo 6-FAM y los sistemas STRs Penta D, D13S317, D16S539 y D16S514, se marcaron con el fluoróforo HEX. La tabla que se presenta a continuación, muestra la descripción de los cebadores seleccionados. Se indica el nombre de cada marcador STR, su ubicación cromosómica, el porcentaje de heterocigosidad, la secuencia de cada uno de los cebadores, el fluoróforo con el cual se

encuentra marcado el cebador sentido, el rango de tamaño de cada uno de los productos de PCR y por último la referencia.

*Tabla 1. Descripción de cebadores seleccionados para este trabajo de tesis.*

Cromosoma estudiado	Nombre del marcador	Ubicación cromosómica	Heterocigosidad	Secuencia del cebador	Fluoróforo	Tamaño del amplificado (pb)	Referencia
21	D21S11	21q21	90%	TATGTGAGTCAATCCCCAAGTGA (F)	6-FAM	225-280	Pertl y col., 1996.
				GTTGTATTAGTCAATGTTCTCCAG (R)			
	Penta D	21q22.3	85%	TGGAAGGTCGAAGCTGAAGTG (F)	HEX	377-455	Urquhart y col., 1994,
				GTAAGAATTCTTTAATCTGGACACAA (R)			
	D21S1411	21q22.3	93%	ATGATGAATGCATAGATGGATG (F)	6-FAM	239-323	Pertl y col., 1996.
				AATGTGTGTCCTCCAGGC (R)			
	D21S1435	21q21	79%	TCCCCTCTCAATTGTTGTCTACC (F)	6-FAM	163-187	Cirigliano y col., 2001,
				GCAAGAGATTTCAAGTCCAT (R)			
18	D18S51	18q21.33	88.5%	TGAGCCATGTTTCATGCCACTG (F)	6-FAM	290-350	Schmid y col., 2000.
				CAAACCCGACTACCAGCAAC (R)			
	D18S386	18q22.1-22.2	92,30%	TCAGGAGAATCACTTGGAAAC (F)	6-FAM	330-387	Pertl y col., 1999.
				TCCATGAAGTAGCTAAGCAG (R)			
13	D13S317	13q31.2	80%	ACAGAAGTCTGGGATGTGGA (F)	HEX	176-204	Rodríguez y Medinilla, 2014,
				GCCCCAAAAGACAGACAGAA (R)			
	D13S631	13q31-32	83%	TGGGCAACAAGAGCAAACTCT (F)	6-FAM	189-223	Annese y col., 2003,
				TAGCCCTCACCATGATTGG (R)			
16	D16S539	16q24.1	77,90%	AGATCCCAAGCTCTTCTCTT (F)	HEX	120-180	Rodríguez y Medinilla, 2014,
				ACGTTTGTGTGTGCATCTGT (R)			
	D16S514	16q21.1	82%	CTATCCACTCACTTCCAGG (F)	HEX	117-129	Annese y col., 2003,
				TCCCACTGATCATCTTCTC (R)			

En la tabla anterior se resumen de las características generales de los diez pares de cebadores escogidos para nuestro trabajo.

Los cebadores se recibieron liofilizados y se re-suspendieron en agua ultra pura. Para preparar una solución madre de concentración 100  $\mu\text{M}$ , la fórmula del cálculo fue la siguiente:

$$100 \mu\text{M} = X \text{ nmol cebador liofilizado} + (X \times 10 \mu\text{l H}_2\text{O}).$$

Se tomó la cantidad de nmol indicado en el tubo del cebador y se multiplicó por 10, este es el número de  $\mu\text{l}$  de agua ultra pura que se agregó para obtener la solución madre de concentración 100  $\mu\text{M}$ . Luego se realizó una dilución 1/10 para obtener una concentración final de 10  $\mu\text{M}$  en cada cebador.

### 5.2.2. Extracción y purificación de ADN.

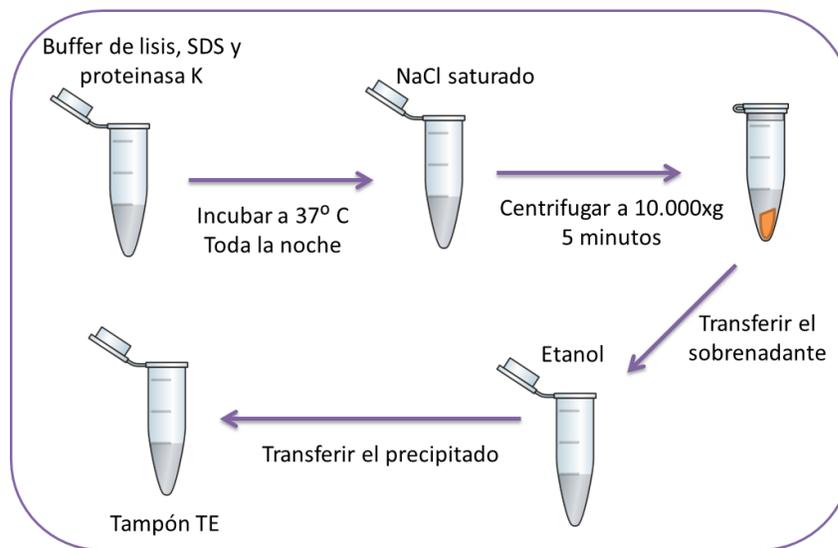
Se probaron dos métodos de extracción de ADN; el método salino y el método de columnas de sílica.

El primer paso antes de comenzar la extracción de ADN, indistintamente del método de extracción que se utilice, es la centrifugación de la muestra. El líquido amniótico es de 98 a 99% agua, el resto se encuentra entre solutos orgánicos, inorgánicos y células. Al centrifugar separamos las células que se encuentran inmersas en el líquido y se descarta el sobrenadante, que es en su mayoría agua. En el caso de las vellosidades coriónicas y restos abortivos, por medio de la centrifugación, se separa el tejido presente en la muestra del medio en el cual se encuentre.

5.2.2.1 Extracción de ADN por método salino o Salting-out y purificación de ADN con perlas magnéticas.

Extracción de ADN por método salino

Este método fue reportado por Miller en 1988. Consiste en la precipitación de proteínas por deshidratación, con solución saturada de NaCl. A continuación se describe el protocolo utilizado:



**Fig. 4.** *Protocolo de extracción de ADN por método salino.*

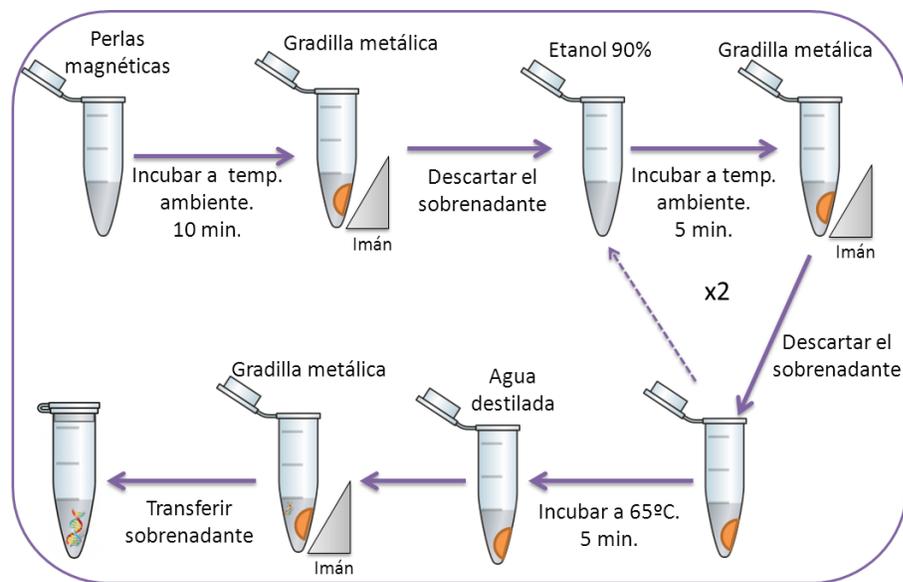
1. La muestra se suspendió en 1 mL de buffer de lisis (10 mM Tris-HCl, NaCl 400 mM y 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,2) y se incubó durante toda la noche a 37 °C, con 20 µL SDS (detergente) al 10% y 20µL de proteinasa K.
2. Luego de la digestión, se agregó a la muestra 150 µL NaCl saturado (5M) y se agitó vigorosamente durante 15 segundos.
3. Posteriormente se centrifugó por 5 minutos. El precipitado contiene las proteínas y el sobrenadante contiene el ADN.

4. El sobrenadante fue transferido a otro tubo y se le agregaron 2 a 3 mL de etanol absoluto a temperatura ambiente. El ADN es insoluble en alcohol por lo tanto precipita. En la solución los iones de sodio o amonio se unen a los grupos fosfato, esta mezcla reduce las fuerzas repulsivas entre las cadenas y permite que el ADN se pliegue sobre sí mismo haciéndolo insoluble.

5. La malla de ADN se retiró con una pipeta y se transfirió a un tubo de plástico de 1,5 mL, que contenía de 30 a 50µL buffer TE (10 mM Tris-HCl, 0,2 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7,5). El volumen de buffer TE depende de la magnitud de la malla de ADN, mientras mayor sea la malla, mayor es el volumen de buffer en el cual se eluye.

#### Purificación de ADN con perlas magnéticas.

Este método se basa en la interacción electromagnética entre el ADN, cargado negativamente y las perlas magnéticas (MagneSil GREEN<sup>®</sup>), cargadas positivamente. En seguida se describe el protocolo utilizado:



**Fig. 5.** Protocolo de purificación de ADN con perlas magnéticas.

1. Se agregaron 100µL de perlas magnéticas al ADN extraído anteriormente por el método salino, esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos.

2. Luego el tubo que contenía la mezcla se colocó en una gradilla magnética y se descartó el sobrenadante. Las perlas magnéticas retienen selectivamente el ADN por interacción de cargas, quedando en el sobrenadante elementos que no son de nuestro interés.

3. El tubo se retiró de la gradilla magnética y se agregaron 100µL de etanol 90% y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Luego se colocó en la gradilla magnética y se descartó el sobrenadante. Se repitió este paso.

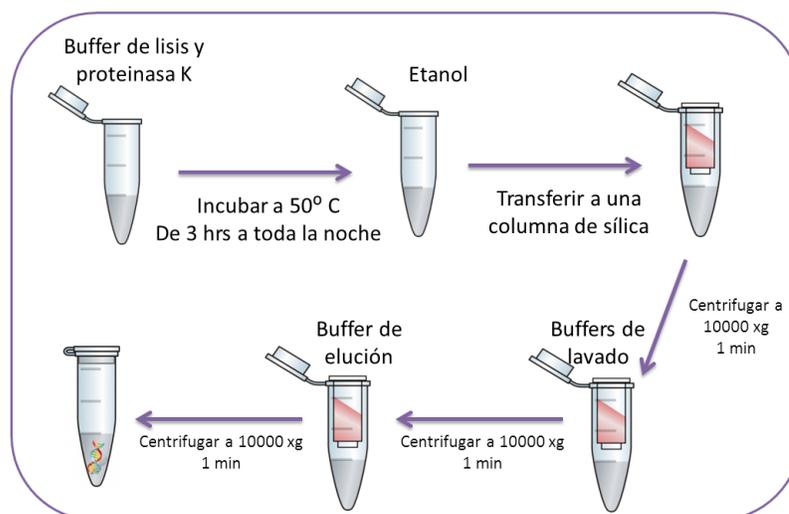
4. Posteriormente se colocó el tubo que contenía las perlas magnéticas y el ADN adherido a estas en un bloque seco a 65°C por 5 minutos, con la finalidad de evaporar por completo el etanol.

5. Finalmente se agregaron de 15 a 20µL de agua destilada, con la finalidad de eluir el ADN adherido a las perlas magnéticas. El tubo nuevamente se colocó en la gradilla magnética y el sobrenadante, que en este caso es el agua que contiene inmerso el ADN se transfirió a un nuevo tubo de plástico.

#### 5.2.2.2 .Extracción y purificación de ADN mediante columnas de sílica (estuche comercial).

La extracción y purificación de ADN por medio de columnas de sílica consiste en la aplicación de buffer de digestión y proteinasa K a la muestra, con una posterior incubación

que puede variar de 3 horas a toda la noche, dependiendo del material de partida, el tejido puede requerir mayor tiempo que los líquidos. En seguida se muestra el protocolo detallado:



**Fig. 6.** *Protocolo de extracción y purificación de ADN mediante columnas de sílica (estuche comercial).*

1. Se agregaron 200  $\mu$ L de buffer de digestión, el cual contiene sales caotrópicas que desorganizan la red tridimensional del agua influyendo en la organización de sus moléculas a través de sus puentes de hidrógeno, y en la interacción de estos con macromoléculas tales como proteínas tendiendo a desnaturalizarlas o disolverlas (Rådström y col., 2004). Este buffer también contiene detergentes; iónicos, como SDS (dodecilsulfato sódico) o no iónicos, como Tween-20 y Triton X-100 necesarios para eliminar las membranas. Se agregaron 20  $\mu$ L de proteinasa K, que es una proteasa y se incubó de 3 horas a toda la noche a 50°C.

2. Posteriormente se agregaron 200 $\mu$ L de etanol. El ADN es insoluble en alcohol por lo tanto precipita (Rådström y col., 2004), el alcohol sobrenadante mantendrá

las sales añadidas previamente. En la solución los iones de sodio o amonio se unen a los grupos fosfato, esta mezcla reduce las fuerzas repulsivas entre las cadenas y permite que el ADN se pliegue sobre sí mismo haciéndolo insoluble.

3. Luego se trasladó el lisado a la columna de centrífuga y se centrifugó a 10.000xg por un minuto. Estas columnas poseen una membrana de sílica que retiene selectivamente el ADN y permite el paso de las moléculas y sales que acompañan la reacción de lisis (Rådström y col., 2004).

4. En el tubo de recogida queda el alcohol que contenía las sales, este se descartó y cambió por un nuevo tubo de recogida, el ADN se mantiene fijado a la membrana de sílica.

5. Luego se realizaron dos lavados con diferentes buffers que constan mayormente de alcohol, donde, luego de centrifugar, se descarta el tubo de recogida que contiene un lavado de sales y otros elementos del lisado que no son de nuestro interés.

6. Posteriormente se agregaron de 20 a 30  $\mu$ L de buffer de elución que consta principalmente de agua, buffer TRIS (tris-hidroximetil-aminometano) y agente quelante EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), el ADN se re-suspende y es recuperado tras centrifugar. El volumen de buffer de elución depende de la cantidad de pellet celular que se observe inicialmente al centrifugar la muestra.

### 5.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación y marcaje, se emplearon diez pares de cebadores, cuatro para el cromosoma 21, dos para el cromosoma 13, dos para el cromosoma 18 y dos para el cromosoma 16. El ciclado se realizó en un termociclador GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (ABI).

Para la estandarización de la PCR se realizaron tres ensayos, uno de sensibilidad, otro de especificidad y luego se procedió a estandarizar tres PCRs múltiples.

Ensayo de sensibilidad: Se realizó con el fin de establecer la cantidad mínima de cebadores y ADN necesarias para una amplificación exitosa. Se utilizó ADN 9947A de ABI, que es de concentración conocida (0.1ng).

Inicialmente se realizó una mezcla de reacción de PCR simple para cada uno de los sistemas STRs, con las siguientes características:

#### Mezcla de PCR 1:

Buffer [1x]

dNTPs [200µM]

MgCl [1,5mM]

DNA polimerasa [1U/µL]

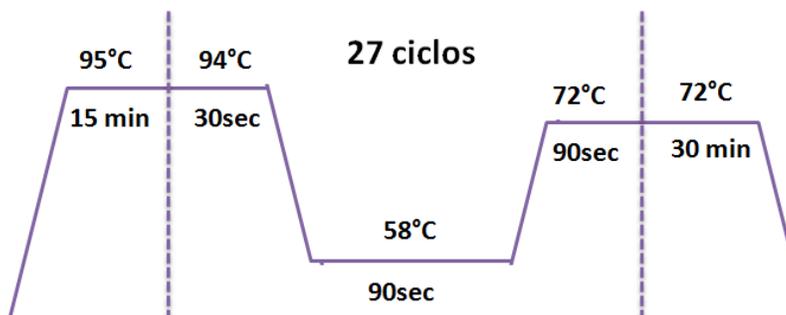
Cebador sentido [1 µM]

Cebador anti-sentido [1  $\mu$ M]

+ADN 9947A (0.1ng)

Esta mezcla se realizó por duplicado, con el fin de amplificar mediante dos programas de PCR; el primero, es el programa base que trae el termociclador y cuya temperatura de hibridación se ajusta más al promedio de temperaturas de nuestros cebadores. Se muestra a continuación:

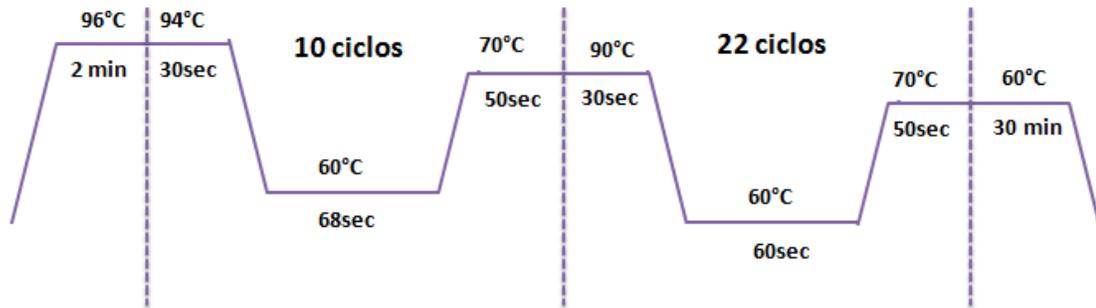
Programa de PCR 1:



*Fig. 7. Programa de PCR 1.*

El segundo programa de PCR tiene mayor número de ciclos y la temperatura de hibridación es superior a la de media de nuestros cebadores, sin embargo, este programa ha probado ser exitoso en la amplificación de STRs y es el siguiente:

Programa de PCR 2:



*Fig. 8. Programa de PCR 2.*

Los productos de la amplificación utilizando ambos programas, se verificaron en un gel de agarosa, este se preparó a concentración 1%, se utilizó buffer TBE y la corrida electrofética se realizó a 100 voltios, durante 10 minutos. En el gel, no se observó amplificación, por lo que se procedió a aumentar la concentración de cebadores, mientras que el resto de las condiciones se mantenían igual, resultando la siguiente mezcla de reacción:

Mezcla de PCR 2:

Buffer [1x]

dNTPs [200 $\mu$ M]

MgCl [1,5mM]

DNA polimerasa [1U/ $\mu$ L]

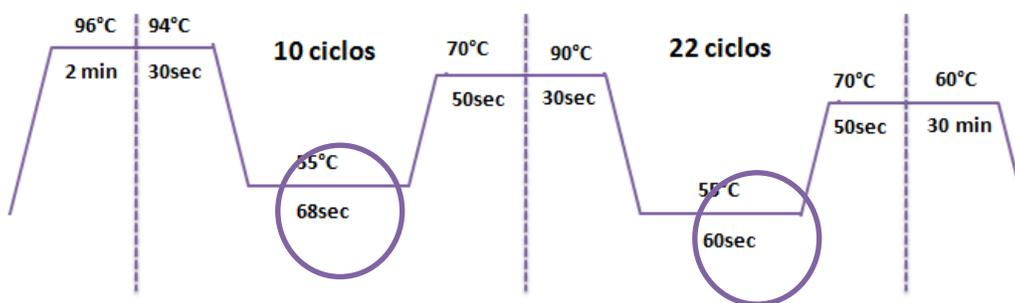
Cebador sentido [2  $\mu$ M]

Cebador anti-sentido [2  $\mu$ M]

+ADN 9947A (0.1ng)

Los productos de PCR se visualizaron nuevamente en un gel de agarosa 1%, observándose amplificación en los sistemas D21S11, D18S51, D13S317, Penta D, D13S631 y D16S539. Mientras que los sistemas D21S1411, D21S1435, D18S386 y D16S514 no amplificaron. Al observar este resultado, se decidió variar la temperatura de hibridación a 55°C, en estos cuatro sistemas, ya que se observó que estos cebadores tenían temperatura de hibridación inferior a los demás, el resto de las condiciones permanecieron iguales. El programa de PCR modificado se muestra a continuación:

Programa de PCR 3:



*Fig. 9. Programa de PCR 3.*

Luego de esta modificación se consiguió amplificación en los sistemas D21S1411, D21S1435, D18S386 y D16S514.

De este modo las condiciones de amplificación se lograron estandarizar en cada uno de los sistemas STRs. En cuanto a la cantidad de ADN, no fue necesario variarla, ya que el experimento funcionó con la misma cantidad de ADN que se consideró en un principio (0.1ng). En la tabla 2, se indica el nombre del sistema estudiado, el

cromosoma en el cual se encuentra ubicado, la concentración mínima de cebador y ADN requerida y el programa de PCR con el cual amplifica.

**Tabla 2.** Condiciones de amplificación para cada uno de los sistemas STRs.

Sistema STR	Cromosoma	Concentración de cebadores	Cantidad de ADN	Programa de PCR
D21S11	21	2 $\mu$ M	0,1 ng	Programa de PCR 2
Penta D	21	2 $\mu$ M	0,1 ng	Programa de PCR 2
D21S1411	21	2 $\mu$ M	0,1 ng	Programa de PCR 3
D21S1435	21	2 $\mu$ M	0,1 ng	Programa de PCR 3
D18S51	18	2 $\mu$ M	0,1 ng	Programa de PCR 2
D18S386	18	2 $\mu$ M	0,1 ng	Programa de PCR 3
D13S317	13	2 $\mu$ M	0,1 ng	Programa de PCR 2
D13S631	13	2 $\mu$ M	0,1 ng	Programa de PCR 2
D16S539	16	2 $\mu$ M	0,1 ng	Programa de PCR 2
D16S514	16	2 $\mu$ M	0,1 ng	Programa de PCR 3

Ensayo de especificidad: Se hizo con la finalidad de establecer la capacidad de los cebadores de discriminar entre individuos trisómicos y no afectados. Para este ensayo se utilizaron las condiciones de amplificación estandarizadas previamente y descritas en la tabla 2. Esta vez, se amplificaron muestras biológicas, previamente analizadas con estuche comercial o cariotipo, tanto de individuos trisómicos como no afectados en los cromosomas de interés.

Estandarización de PCR múltiple: Con la finalidad de disminuir tiempo y costos en cada reacción, se procedió a estandarizar la amplificación conjunta de los 10 sistemas (PCR múltiple). Inicialmente nos propusimos realizar dos PCRs múltiples, de 5 sistemas STRs cada uno, sin embargo, debido a que en el ensayo de sensibilidad se estableció que la temperatura de hibridación variaba entre los sistemas, se realizaron tres PCRs múltiples, las mezclas se detallan a continuación:

Mezcla de PCR múltiple 1:

- Buffer [1x]
- dNTPs [200 $\mu$ M]
- MgCl [1,5mM]
- DNA polimerasa [1U/ $\mu$ L]
- Cebador sentido de los sistemas D21S11, D18S51, D13S317 y Penta D [2  $\mu$ M c/u]
- Cebador anti-sentido de los sistemas D21S11, D18S51, D13S317 y Penta D [2  $\mu$ M c/u]

Mezcla de PCR múltiple 2:

- Buffer [1x]

- dNTPs [200 $\mu$ M]
- MgCl [1,5mM]
- DNA polimerasa [1U/ $\mu$ L]
- Cebador sentido de los sistemas D13S631 y D16S539 [2  $\mu$ M c/u]
- Cebador anti-sentido de los sistemas D13S631 y D16S539 [2  $\mu$ M c/u]

Mezcla de PCR múltiple 3:

- Buffer [1x]
- dNTPs [200 $\mu$ M]
- MgCl [1,5mM]
- DNA polimerasa [1U/ $\mu$ L]
- Cebador sentido de los sistemas D21S1411, D21S1435, D18S386 y D16S514 [2  $\mu$ M c/u]
- Cebador anti-sentido de los sistemas D21S1411, D21S1435, D18S386 y D16S514 [2  $\mu$ M c/u]

Las tres mezclas de PCR múltiple se realizaron por duplicado, y se amplificaron con un control positivo (ADN 9947A) y con un control negativo (mezcla sin ADN). La mezcla 1 y 2 se amplificaron con el programa de PCR 2 y la mezcla 3 se amplificó con el programa de PCR 3. Se obtuvieron resultados exitosos con las tres mezclas de PCR múltiple probadas.

Una vez estandarizadas las condiciones de PCR se procesaron las 37 muestras biológicas de pacientes con las mezclas de PCR múltiple 1, 2 y 3, incluyendo en todos los casos un control negativo por cada mezcla.

Paralelamente a nuestro estudio, el servicio de diagnóstico de aneuploidías de Genmolab y Diagentit, analizaron estas mismas muestras, utilizando cariotipo o el estuche comercial Devyser Complete® (que detecta aneuploidías, mediante el uso de 26 sistemas STRs ubicados en los cromosomas 13, 18, 21 y sexuales), lo cual nos sirvió con fines comparativos.

#### 5.2.4. Electroforesis capilar

La separación electroforética de los productos de la PCR se realizó en un secuenciador ABI modelo 310, con capilar de silica fundida de 50µM de diámetro, se utilizó polímero POP-4 (Polidimetil acrilamida) y Buffer TAP (tris-hidroximetilmetilamino) pH: 8.0.

#### Programación del equipo:

Previo a comenzar la electroforesis capilar, se programó en el Software “Data Collection”, en una hoja denominada “sample sheet”, el orden de las muestras y la matriz con la cual se realizaría la corrida electroforética; en este caso la DS33 de 5 colores (azul 6-6-FAM, verde VIC, amarillo NED, rojo PET y naranja LIZ) de ABI.

Posteriormente utilizando el mismo software, se programaron las condiciones de corrida electroforética, en un hoja denominada “Gene Scan injection list” y fueron las siguientes:

Tiempo de inyección: 5 segundos.

Voltaje de inyección y electroforesis: 319V/cm.

Tiempo de electroforesis: 40 minutos.

Temperatura del horno: 60°C.

Filtro: G (5 colores).

En el secuenciador, una cámara CCD es capaz de captar la fluorescencia emitida por cada uno de los fragmentos de ADN marcados, el sistema de adquisición de datos tiene un programa que se encarga de identificar y separar los picos, que se comparan con fragmentos de ADN de tamaño conocido (en este caso LIZ<sup>®</sup>500), de esta forma el programa hace una interpolación lineal para determinar el tamaño de cada fragmento de ADN de la muestra. Finalmente se exportan los datos a un archivo que contiene información acerca del tamaño de los fragmentos de ADN detectados, la intensidad de cada fragmento (altura de los picos) y el área bajo cada pico. A partir de estos datos se genera, por medio de un software llamado Gene Mapper<sup>®</sup> v3.2 (Applied Biosystems), un gráfico denominado electroferograma.

### Corrida electroforética:

La electroforesis capilar se realizó a partir de la siguiente mezcla:

-10 µL Formamida.

-1,5 µL de producto de PCR.

-0,5 µL de LIZ<sup>®</sup>500 (Escalera de fragmentos de ADN marcados y conocidos).

Esta mezcla se desnaturalizó a 95°C, durante 5 minutos, en un termociclador GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (ABI).

Primero se realizó, la separación por electroforesis capilar de cada producto de PCR simple. Luego, se realizó la separación electroforética de los productos de las PCR múltiples.

En algunos casos, el producto de PCR resultó muy fluorescente, por lo cual, fue necesario ajustar la fluorescencia, por medio de diluciones 1/20 con agua destilada.

#### 5.2.5. Análisis de electroferograma

Para el análisis de la corrida electroforética se utilizó el Software Gene Mapper V3.2 (Applied Biosystems). En este software se programaron las condiciones de análisis de las muestras, para ello se crearon “panels” y “bins”, los primeros son los

sistemas a analizar y los “bins” son el rango del tamaño de cada sistema, también se coloca el color utilizado en el marcaje para cada cebador.

En el electroferograma, el eje x indica los pares de bases y el eje y la emisión de fluorescencia medida en unidades relativas de fluorescencia, (RFU). Las señales a observar dependerán de la homo/heterocigocidad entre los alelos parentales y de la dosis de cada alelo en particular:

-Monosomía: Se observa una sola señal fluorescente correspondiente a dos alelos parentales homócigos.

-Disomía: Se observa como dos señales fluorescentes con una relación entre picos 1:1, pertenecientes a dos alelos parentales heterócigos.

-Trisomía: Se observan como:

a) Tres señales fluorescentes con relación 1:1:1: ocurre cuando los tres alelos con heterócigos entre sí.

b) Dos señales fluorescentes con relación 1:2 o 2:1: ocurre cuando hay dos alelos homócigos entre sí y uno heterócigo.

Para el análisis de los electroferogramas se siguen las pautas de la Guía de la Asociación de Citogenética Clínica, en esta se indica que la relación entre STRs se calcula dividiendo las áreas de los picos, así se obtiene el rango de relación. Sí la distancia que

existe entre los picos es menor a 24 pares de bases, que es lo que ocurre comúnmente, se establece la interpretación descrita a continuación en la tabla 3.

*Tabla 3. Interpretación de acuerdo al rango de relación entre los picos.*

Rangos de relación (RR) para STRs	Interpretación
(0,8 – 1,4) : 1	Disómico (No afectado)
(<0,6) o (>1,8) : 1	Trisómico (Afectado)
(0,6 – 0,8 ) o (1,4-1,8):1	No concluyente

*En un individuo no afectado se observan en el electroferograma dos picos con relación 1:1. Las trisomías son visualizadas como un pico extra en individuos trisómicos, o bien, dos picos con relación 2:1. Al dividir el área de los picos se obtiene el rango de relación (RR), si este se encuentra entre 0,8 y 1,4, se concluye que el individuo es disómico (no afectado) en ese sistema, si el RR es menor a 0,6 o mayor a 1,8, se interpreta como una trisomía. El RR es no concluyente si se encuentra entre 0,6 y 0,8 o 1,4 y 1,8.*

En caso de que la distancia entre picos sea mayor a 24 pares de bases, el RR para interpretar un sistema como disómico varía un poco, siendo de 0,8 a 1,5.

Según la guía internacional de nomenclatura de citogenética humana publicada por Mitelman, en 1994, para expresar la constitución cromosómica de un individuo se debe, en primer lugar, colocar el número total de cromosomas que posee (46 en caso de individuos no afectados) seguido de una coma y la representación de los cromosomas sexuales (XX en el caso de hembras y XY en caso de varones). Por lo tanto, un varón no afectado sería 46, XY y una hembra no afectada sería 46, XX. En individuos afectados, luego del número de cromosomas y caracteres sexuales se coloca un signo de más (+) en

caso de una trisomía o de menos (-) en caso de monosomía y se indica el cromosoma afectado, por ejemplo:

-Síndrome de Down (varón con trisomía del 21): 47, XY+21.

-Monosomía del 21 (embrión femenino): 45, XX-21.

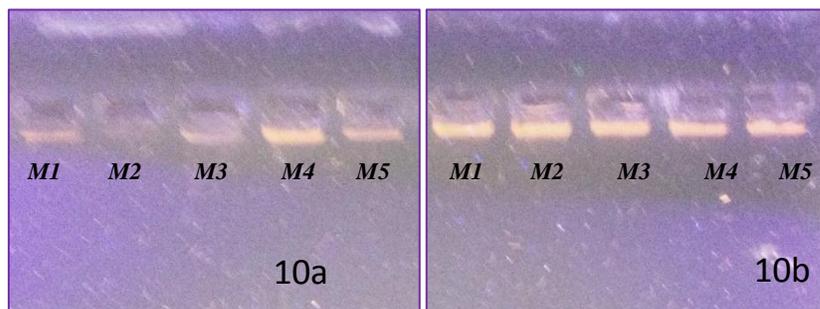
En cuanto a la interpretación por QF-PCR, lo recomendado por la Guía de la Asociación de Citogenética Clínica es concluir que el individuo es compatible con una constitución cromosómica, no afectado o trisómica, siguiendo la nomenclatura descrita anteriormente.

## 6. RESULTADOS

Los resultados presentados a continuación se encuentran divididos en dos secciones, los resultados provenientes de la estandarización y los derivados del análisis de muestras biológicas de las pacientes.

### 6.1 Estandarización:

Tal como se mencionó en la metodología, se probaron dos métodos de extracción de ADN; el método salino y el método de columnas de sílica. La extracción de ADN por el método salino implicó la adición de dos pasos extras; purificación mediante perlas magnéticas y cuantificación. Las muestras debían ser cuantificadas, ya que, se observó mucha variación en la cantidad del ADN obtenido entre una muestra y otra (figura 10a). Mientras que la cantidad de ADN en muestras extraídas por columnas de sílica permanece casi constante (figura 10b). Se decidió trabajar las 37 muestras biológicas con el método de columnas de sílica ya que no requiere pasos adicionales.

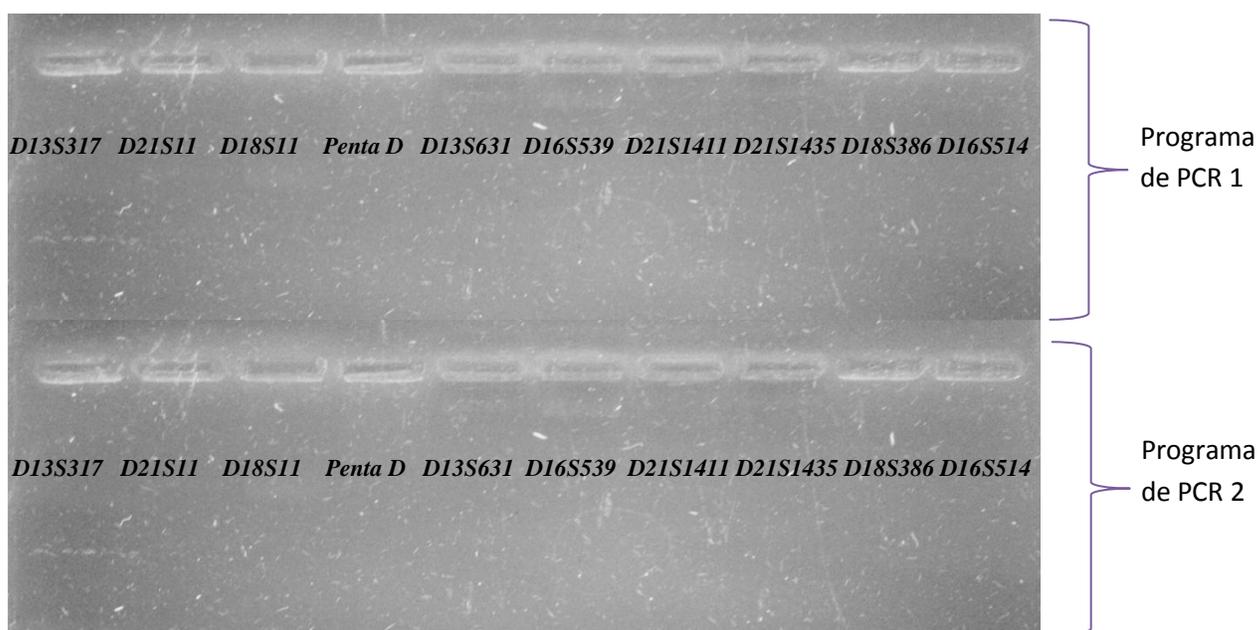


**Fig. 10.** Gel de agarosa 1%-TBE con ADN genómico de muestras de líquido amniótico. La **Figura 10a** muestra ADN genómico extraído de 5 muestras mediante el método salino (nótese la variación de intensidad entre las bandas, indicativo de distintas concentraciones de ADN). La **Figura 10b** ilustra ADN genómico extraído de las mismas muestras utilizando el método de columnas de sílica.

Para la estandarización de la PCR se realizaron tres ensayos: uno de sensibilidad, otro de especificidad y la estandarización de tres PCRs múltiples.

#### 6.1.1 Ensayo de sensibilidad:

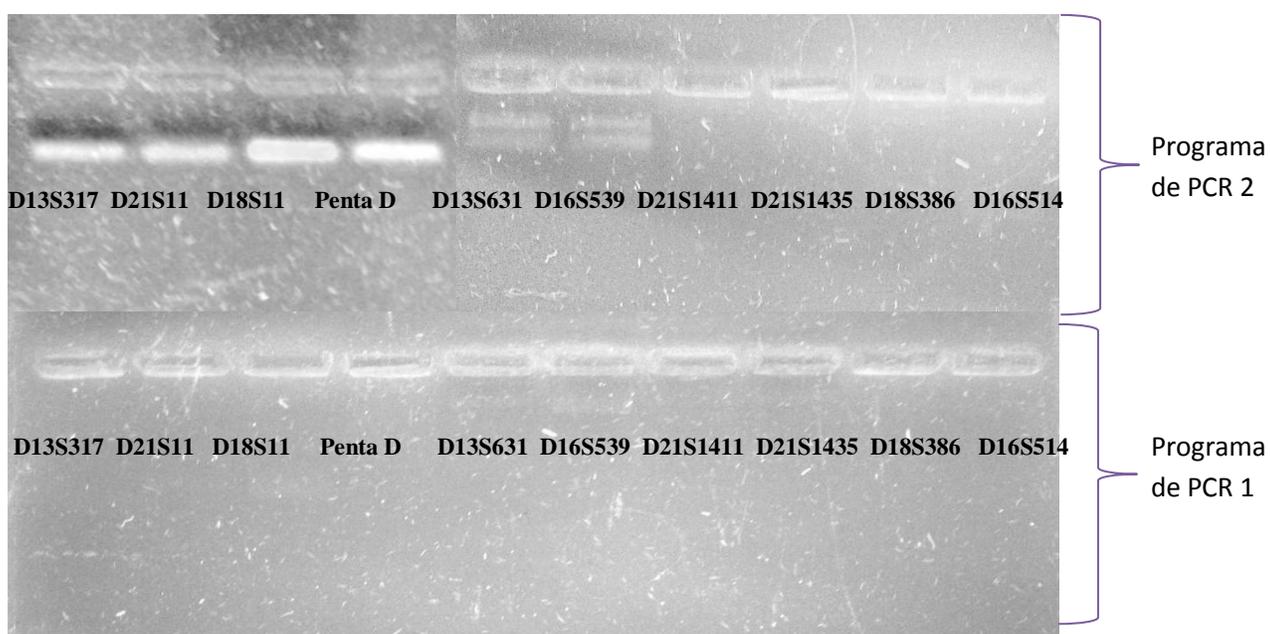
Bajo las condiciones iniciales, donde se utilizó 1 $\mu$ M de cebador, 0.1 ng de ADN y los programas de PCR 1 y 2, no se logró amplificación. Los productos de la PCR se visualizaron en un gel de agarosa 1% que se presenta a continuación:



**Fig. 11.** Gel de agarosa 1%-TBE con productos de PCR simple de cada sistema STR, donde se utilizó 1 $\mu$ M de cebador.

En la figura 11 se ilustra un gel de agarosa con los productos de PCR simple de los sistemas D13S317, D21S11, D18S11, Penta D, D13S631, D16S5396, D21S1411, D21S1435, D18S386 y D16S514 (de izquierda a derecha). No se observa amplificación con ninguno de los programas de PCR utilizados.

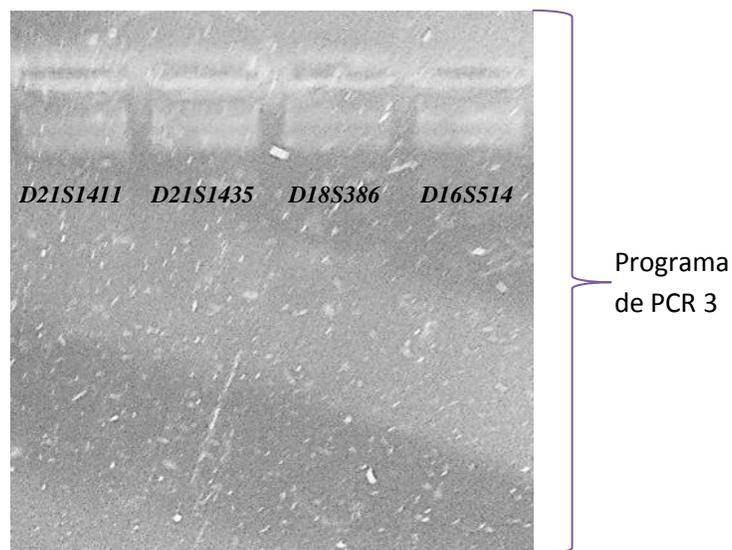
En vista del fallo del experimento anterior, se procedió a aumentar la concentración de cebadores a 2  $\mu$ M, mientras que el resto de las condiciones se mantuvieron iguales. Se consiguió amplificación en los sistemas D21S11, D18S51, D13S317, Penta D, D13S631 y D16S539, con el programa de PCR 2, mientras que en los sistemas los sistemas D21S1411, D21S1435, D18S386 y D16S514 no hubo amplificación bajo estas condiciones. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa, presentados a continuación:



**Fig. 12.** Gel de agarosa 1%-TBE con productos de PCR simple de cada sistema STR, donde se utilizó 2 $\mu$ M de cebador.

En la figura 12, se muestra un gel de agarosa con los productos de PCR simple de los sistemas D13S317, D21S11, D18S11, Penta D, D13S631, D16S539, D21S1411, D21S1435, D18S386 y D16S514 (de izquierda a derecha).

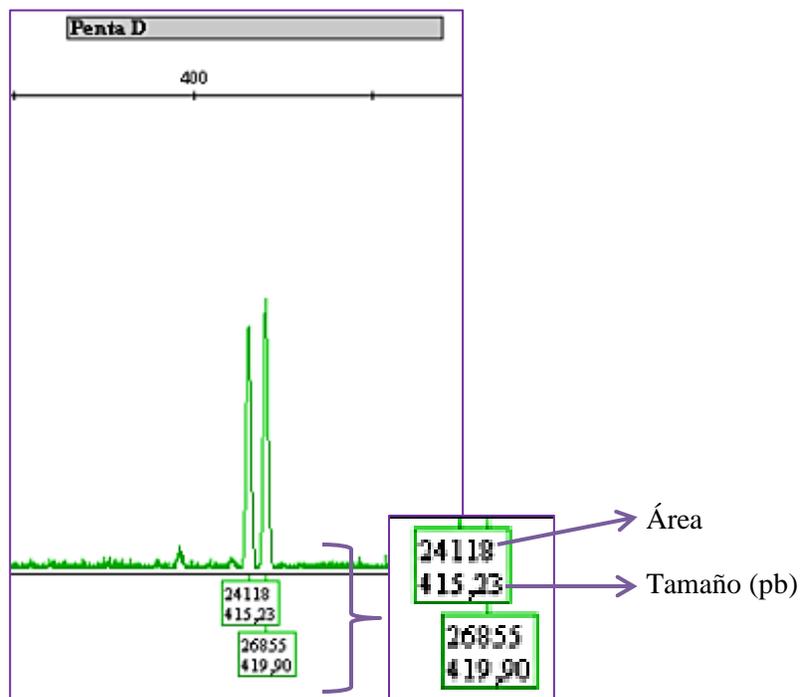
En vista de que no hubo amplificación en los sistemas D21S1411, D21S1435, D18S386 y D16S514, se procedió a ajustar la temperatura de hibridación a 55°C en estos sistemas, ya que observamos que estos cebadores tenían temperatura de hibridación inferior a los demás, el resto de las condiciones permanecieron igual. Una vez realizado este ajuste en el programa de PCR, se obtuvo amplificación, como se muestra en la figura 13.



**Fig. 13.** Gel de agarosa 1%-TBE con productos de PCR simple de los sistemas D21S1411, D21S1435, D18S386 y D16S514, donde se utilizó 2 $\mu$ M de cebador.

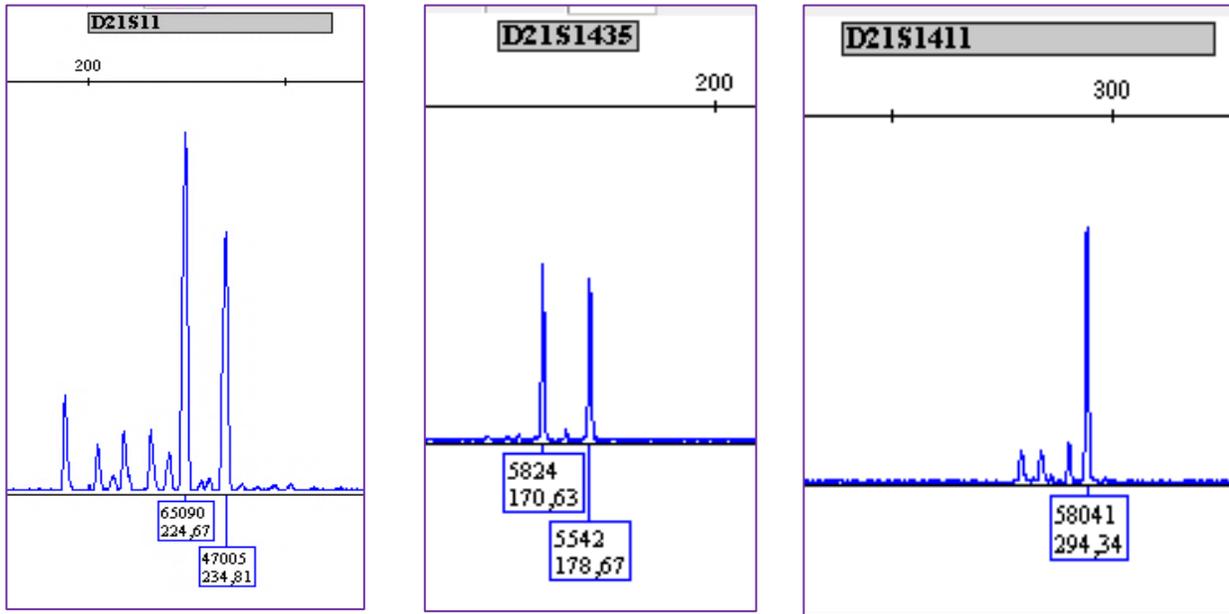
Seguidamente se muestran los resultados de las corridas electroforéticas (electroferogramas) de los productos de PCR simple de cada sistema STR, visualizados anteriormente en geles de agarosa.

En el electroferograma, el eje x indica pares de bases y el eje y, la emisión de fluorescencia en RFU o unidades relativas de fluorescencia. En el recuadro que se encuentra bajo cada pico se indica el área y tamaño en pares de bases (pb) de los mismos.



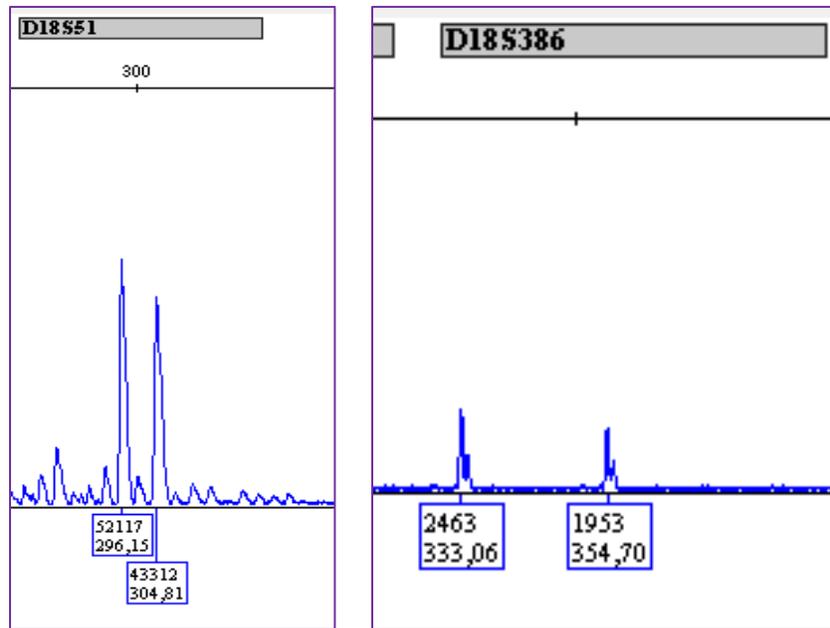
**Fig 14.** Sistema Penta D, ubicado en el cromosoma 21, amplificado con ADNg 9947A.

La figura 14 ilustra dos picos con relación 1:1, donde el RR (rango de relación) al dividir el área de los picos es 1,1, es decir, el sistema Penta D es disómico.



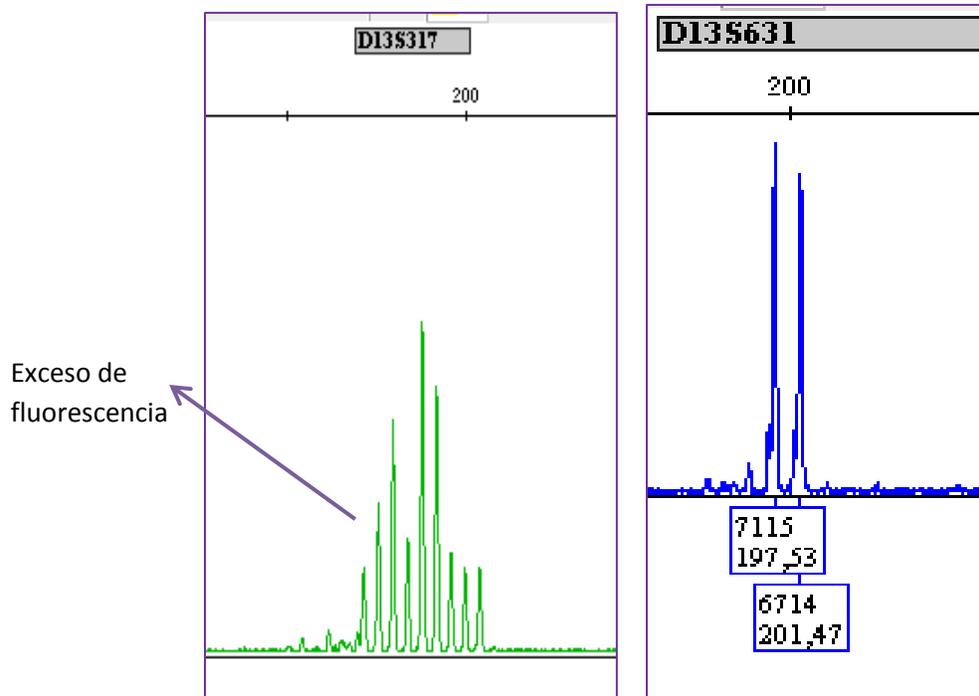
**Fig 15.** Sistemas D21S11, D21S1435 y D21S1411, ubicados en el cromosoma 21, amplificados con ADNg 9947A.

En las figuras 14 y 15 se muestran todos los sistemas STRs ubicados en el cromosoma 21. Tres de los cuatro sistemas son disómicos y los picos tienen relación 1:1. El sistema D21S1411 muestra un solo pico, siendo monósomico o no informativo. El RR en el sistema D21S11 es 1,3 y en el sistema D21S1435 es 1,0.



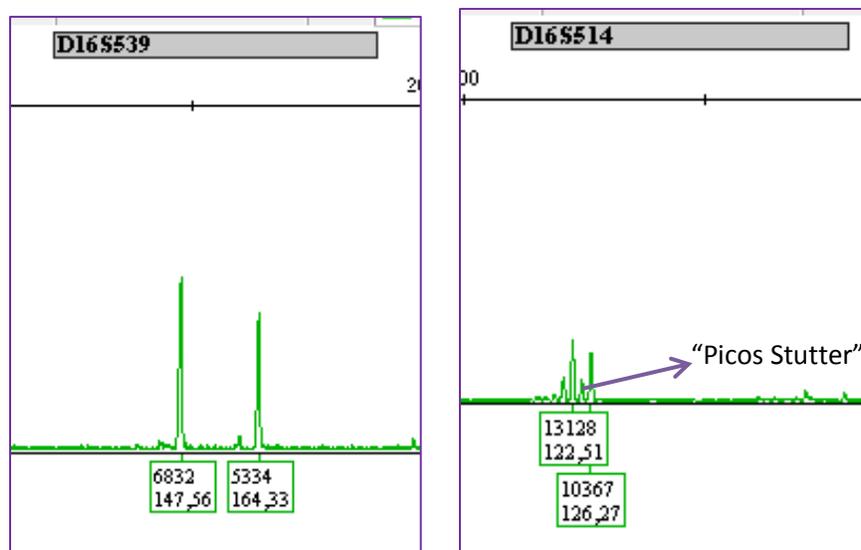
**Fig. 16.** Sistemas *D18S51* y *D18S386*, ubicados en el cromosoma 18, amplificados con *ADNg 9947A*.

En la figura 16 se muestran los sistemas STRs ubicados en el cromosoma 18. Ambos sistemas son disómicos y los picos tienen relación 1:1. El RR en los sistemas *D18S51* y *D18S386* es 1,2.



**Fig. 17.** Sistemas D13S317 y D13631, ubicados en el cromosoma 13, amplificados con ADNg 9947A.

En la figura 17, el sistema D13S317 muestra varios picos, esto se debe a exceso de fluorescencia en el producto de PCR. El sistema D13S631 muestra dos picos con relación 1:1 (RR=1,0).



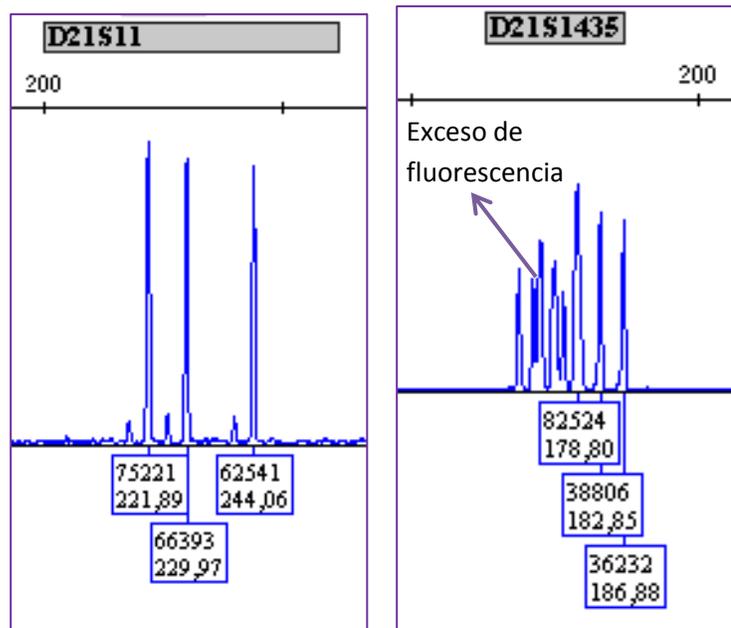
**Fig. 18.** Sistemas *D16S539* y *D16S514*, ubicados en el cromosoma 16, amplificados con ADNg 9947A.

En la figura 18 se ilustran los sistemas STRs ubicados en el cromosoma 16. Ambos sistemas son disómicos y los picos tienen relación 1:1. El RR en el sistema *D16S539* es 1,2 y en el sistema *D16S514* es 1,3.

El sistema *D16S514* muestra “picos Stutter”. Estos se encuentran en casi todos los electroferogramas y son pequeños picos que ocurren inmediatamente antes o después del pico real. Durante el proceso de amplificación de la PCR, la polimerasa puede perder su lugar al copiar una cadena de ADN, por lo general deslizándose hacia adelante o hacia atrás cuatro pares de bases, el resultado es una pequeña cantidad de fragmentos de ADN que son una repetición más grande o más pequeña que el fragmento verdadero que se amplifica (Walsh y col., 1996).

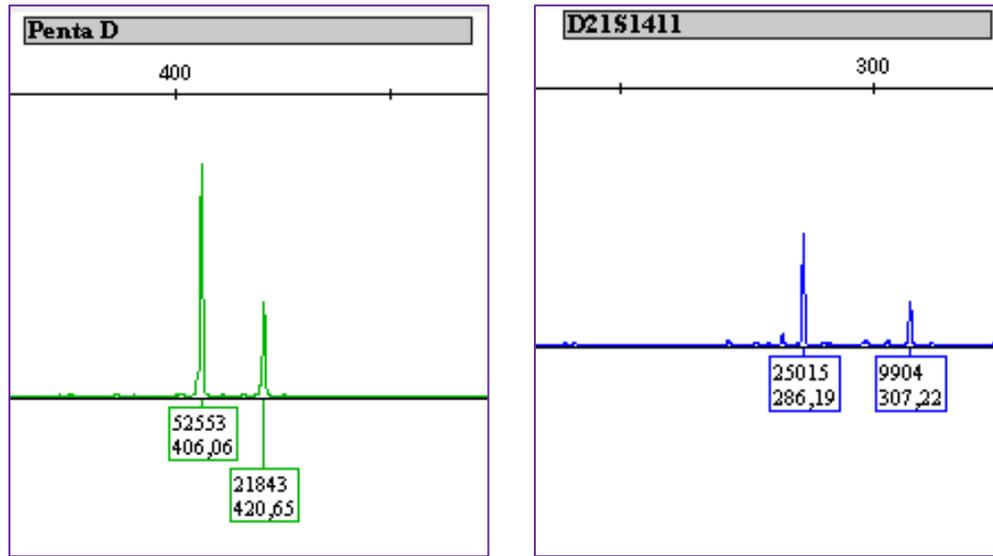
### 6.1.2 Ensayo de especificidad:

En este ensayo se amplificó cada uno de los sistemas STRs utilizando como ADN diana muestras biológicas de individuos trisómicos en los cromosomas de interés, los resultados se muestran a continuación:



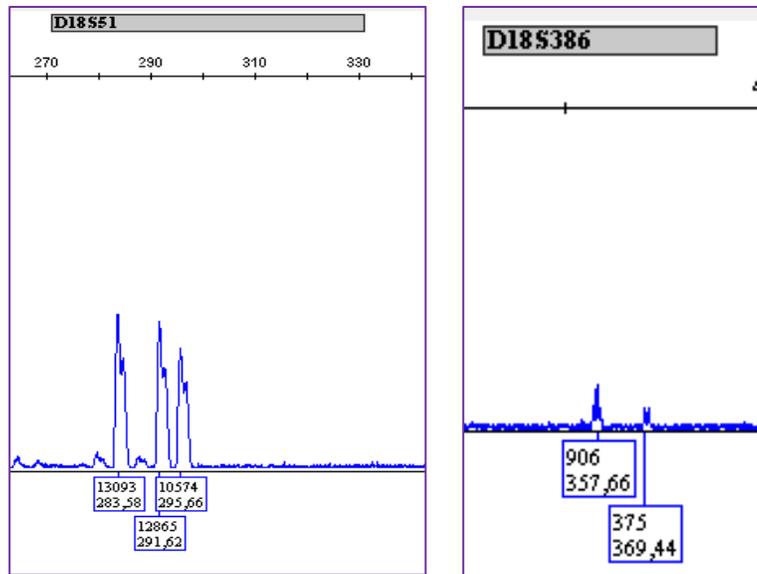
**Fig. 19.** Sistemas D21S11, amplificado con líquido amniótico, y D21S1435, amplificado con tejido. Ambos individuos trisómicos.

En la figura 19 se observan tres picos de fluorescencia, con relación 1:1:1, en los sistemas D21S11 y D21S1435, ambos sistemas se encuentran trisómicos. El sistema D21S1435 muestra varios picos adicionales, debido a exceso de fluorescencia en el producto de PCR.



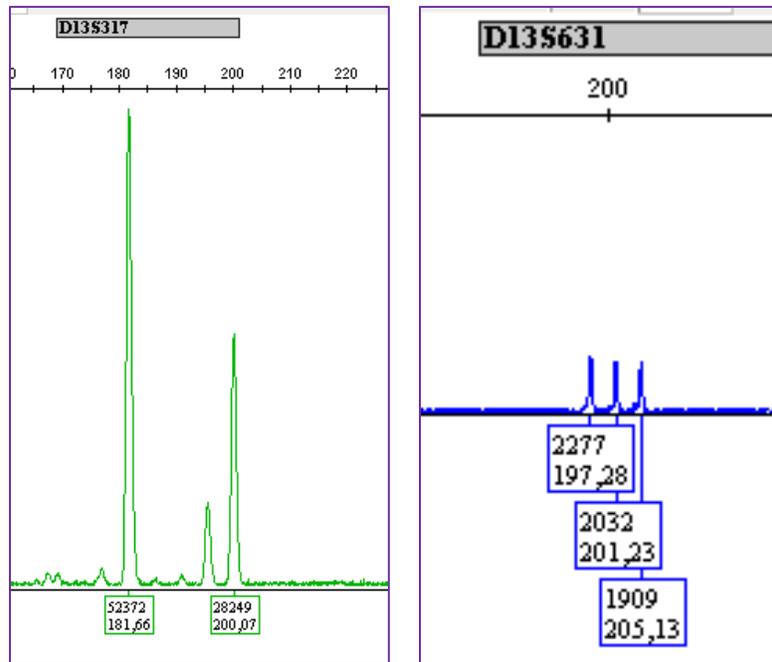
**Fig. 20.** *Sistemas Penta D y D21S1411, amplificados con líquido amniótico de un individuo trisómico.*

En la figura 20 ambos sistemas muestran dos picos de fluorescencia con relación 2:1. El RR en Penta D es 0,45 y en D21S1411 es 0,40, ambos sistemas manifiestan trisomía.



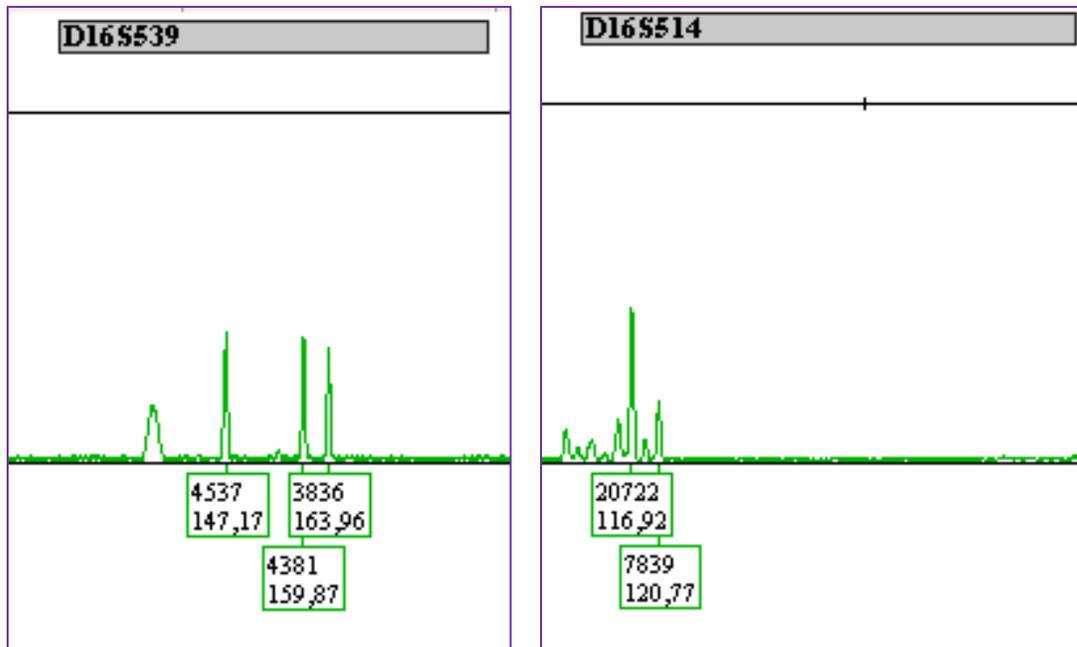
**Fig. 21.** Sistemas D18S51 y D18S386, amplificados con líquido amniótico de un individuo trisómico.

En la figura 21 el sistema D18S51 presenta tres picos de igual tamaño y el sistema D18S386 muestra dos picos con relación 2:1 ( $RR=0,4$ ). Los dos sistemas se visualizan trisómicos.



**Fig. 22.** Sistemas D13S5317 y D13S63, amplificados con líquido amniótico de un individuo trisómico.

En la figura 22 el sistema el sistema D13S317 muestra dos picos con relación 2:1 (RR=0,5) y el sistema D13S631 presenta tres picos de igual tamaño, es decir, hay trisomía en los dos sistemas.

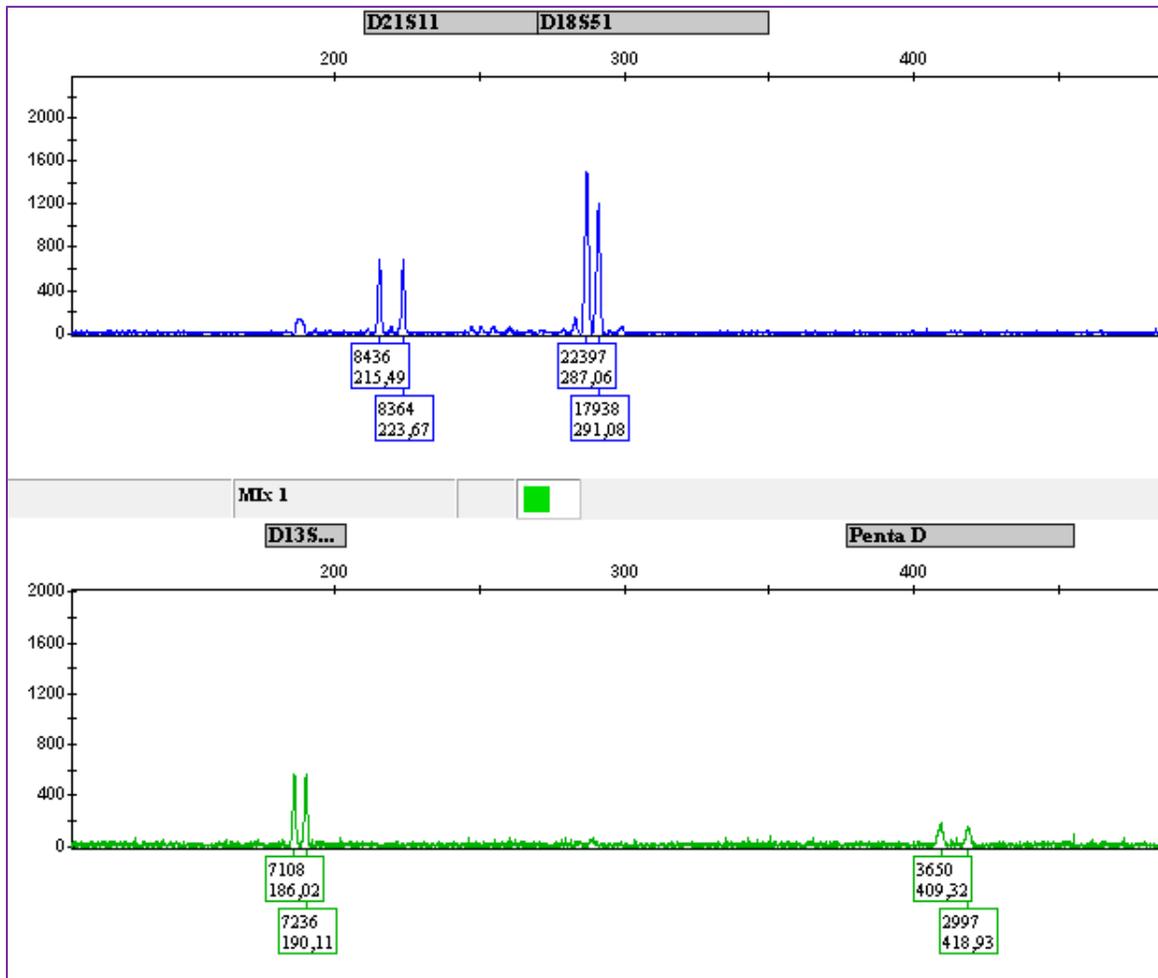


**Fig. 23.** Sistemas D16S539 y D16S514, amplificados con tejido de un individuo trisómico.

En la figura 23 se observa que el sistema D16S539 presenta tres picos de igual tamaño y el sistema D16S514 muestra dos picos con relación 2:1 ( $RR=0,3$ ), por lo tanto, hay trisomía en estos sistemas.

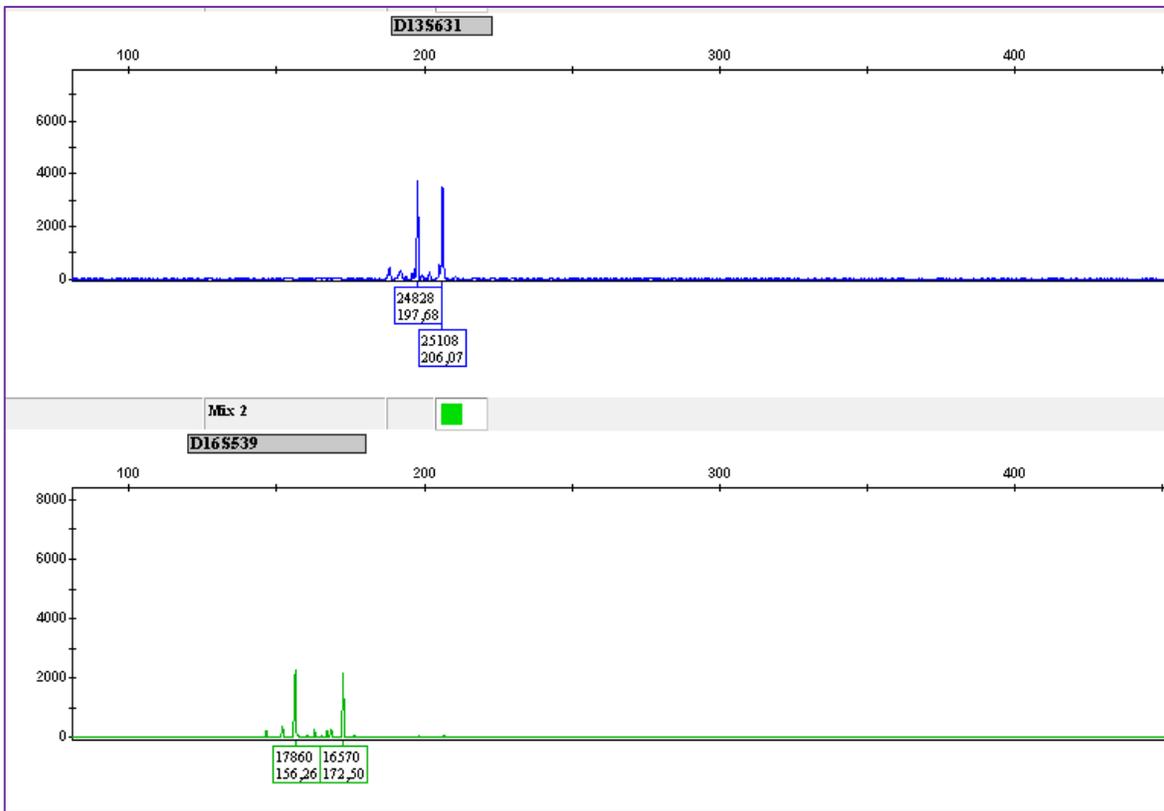
### 6.1.3 Estandarización de PCR múltiple

Con la finalidad de disminuir tiempo y costos en cada reacción, se estandarizaron tres PCRs múltiples, los resultados se muestran en seguida:



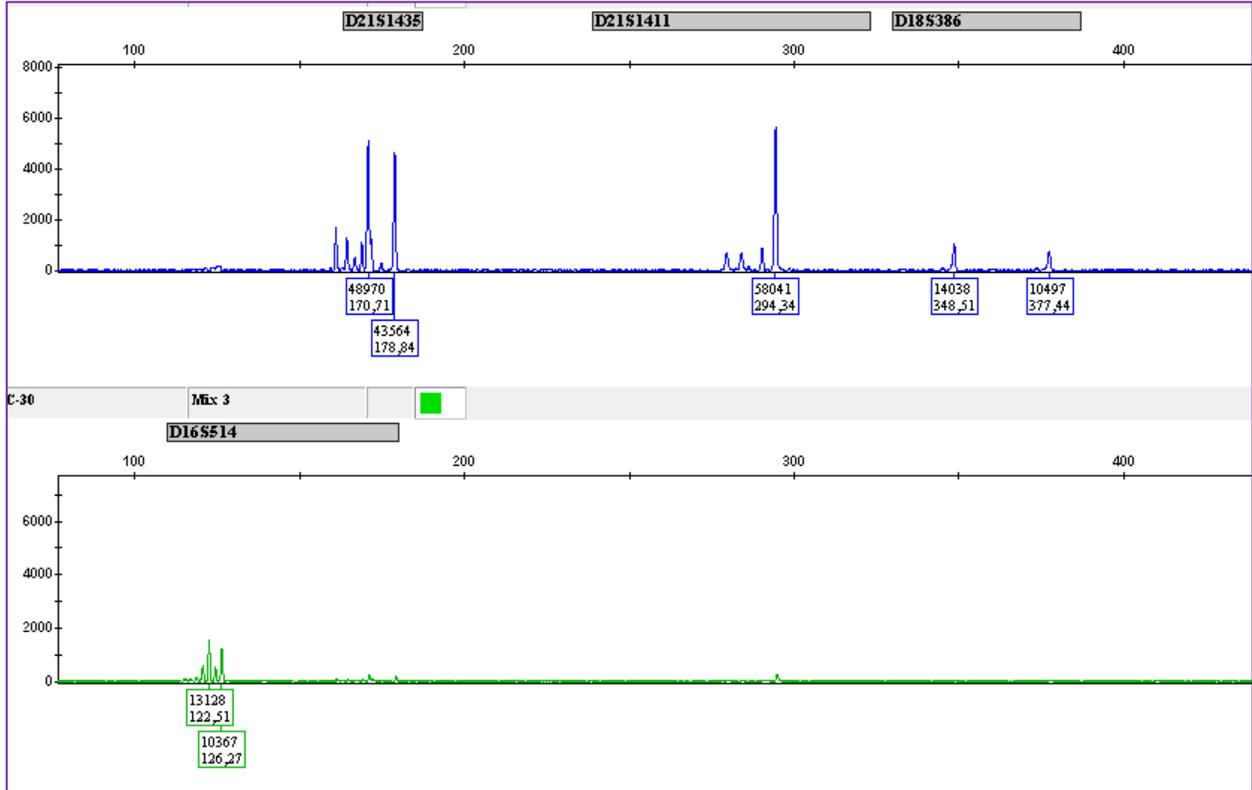
**Fig. 24.** Electroferograma de PCR múltiple 1, amplificado con ADNg 9947A.

La figura 24 muestra el electroferograma de la PCR múltiple 1, que contiene los sistemas D21S11, D18S51, D13S317 y Penta D. Hubo amplificación en los cuatro sistemas y se observó que en cada uno de ellos los picos guardan una relación 1:1.



**Fig. 25.** Electroferograma de PCR múltiple 2, amplificado con ADNg 9947A.

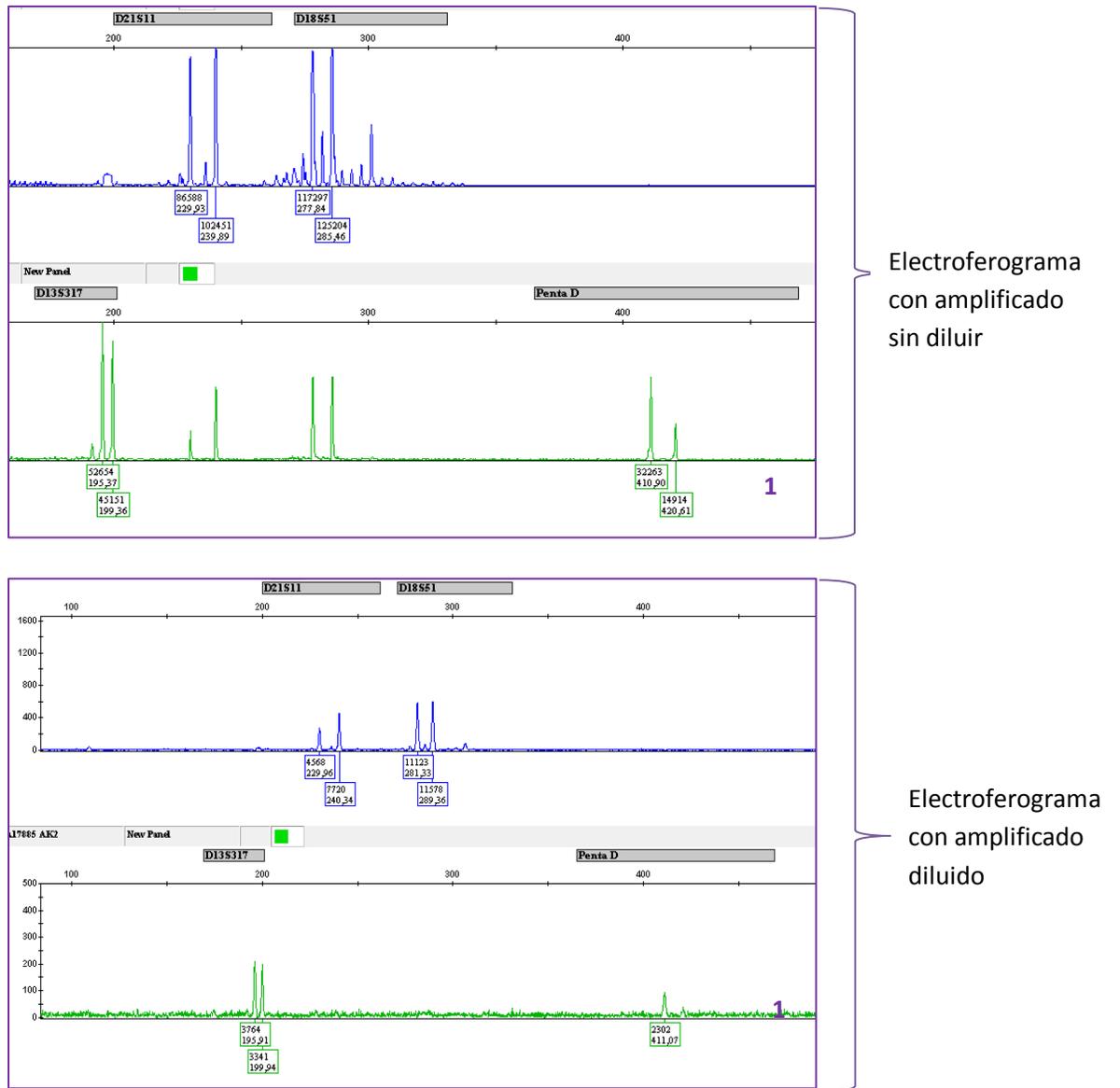
En la figura 25 se observa el electroferograma de la PCR múltiple 2, que contiene los sistemas D13S631 y D16S539. Hubo amplificación en ambos sistemas, observándose en cada uno de ellos relación 1:1 entre los picos.



**Fig. 26.** Electroferograma de PCR múltiple 3, amplificado con ADNg 9947A.

La figura 26 ilustra el electroferograma de la PCR múltiple número tres, que contiene los sistemas D21S1411, D21S1435, D18S386 y D16S514. Hubo amplificación en todos los sistemas y el genotipo se corresponde con un individuo no afectado.

Durante el proceso de corrida electroforética se observó que algunos sistemas presentaban exceso de fluorescencia, lo que se manifiesta en el electroferograma como múltiples picos diferentes a los reales (figura 17). En vista de que esto dificulta la interpretación del resultado se decidió hacer una dilución 1/20 del producto de PCR para disminuir la fluorescencia. A continuación se muestran los resultados:

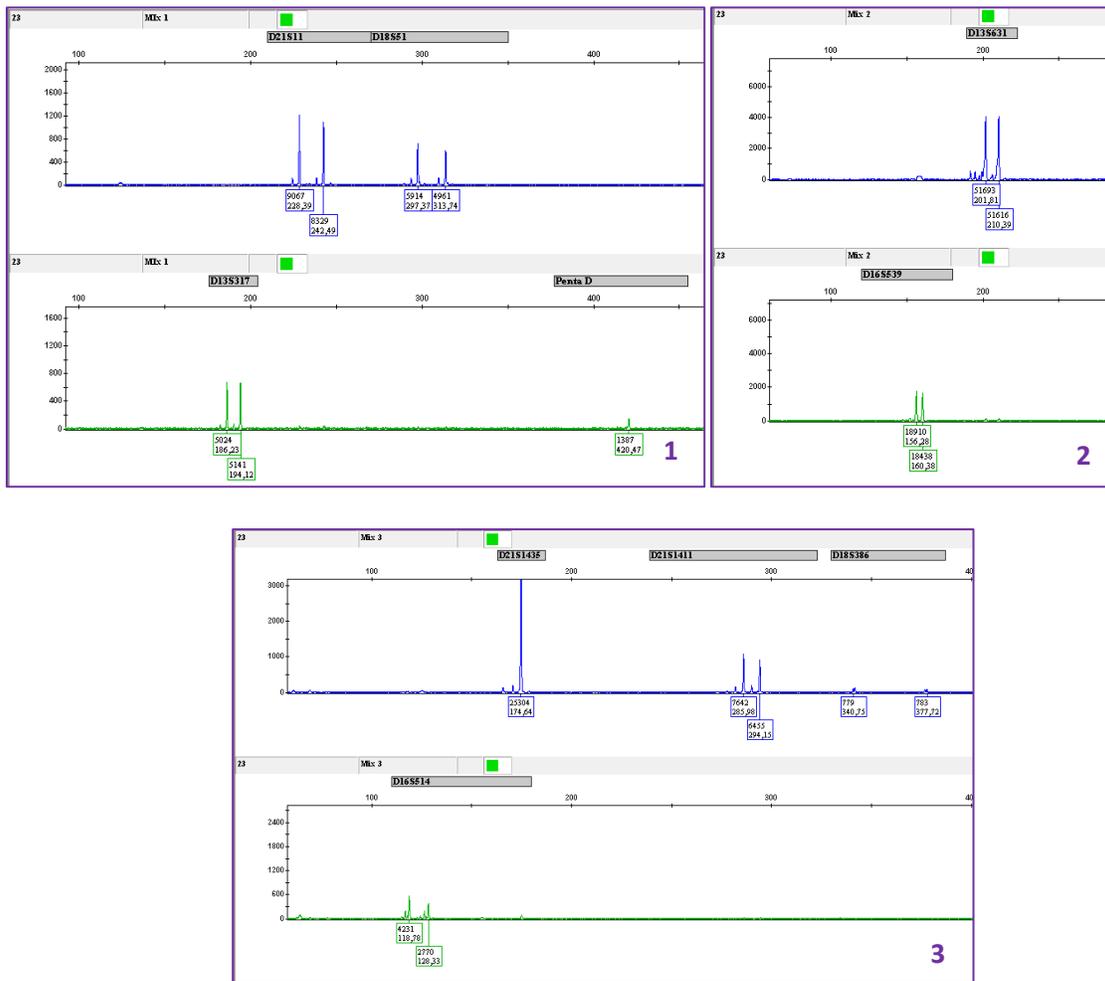


**Fig. 27.** Electroferogramas de PCR múltiple 1. Amplificado de muestra biológica sin diluir (arriba) vs diluida (abajo).

En la figura 27 se observa que las muestras diluidas mejoran la calidad del electroferograma, facilitando el análisis e interpretación, ya que no hay solapamiento entre picos de igual tamaño y el rango de relación es más preciso.

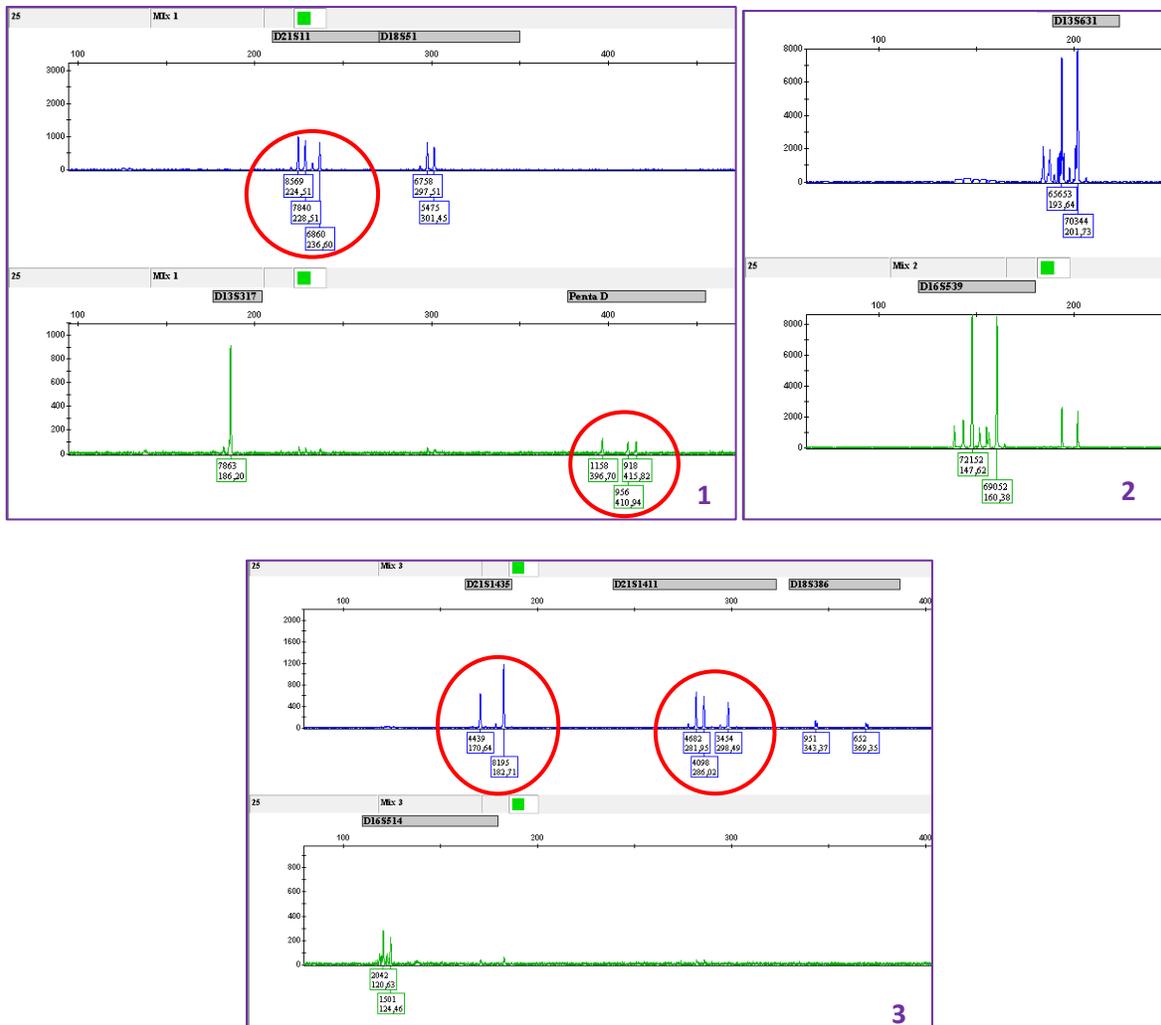
## 6.2 Resultados de muestras de pacientes:

En esta sección se muestran los resultados obtenidos en muestras biológicas de pacientes.



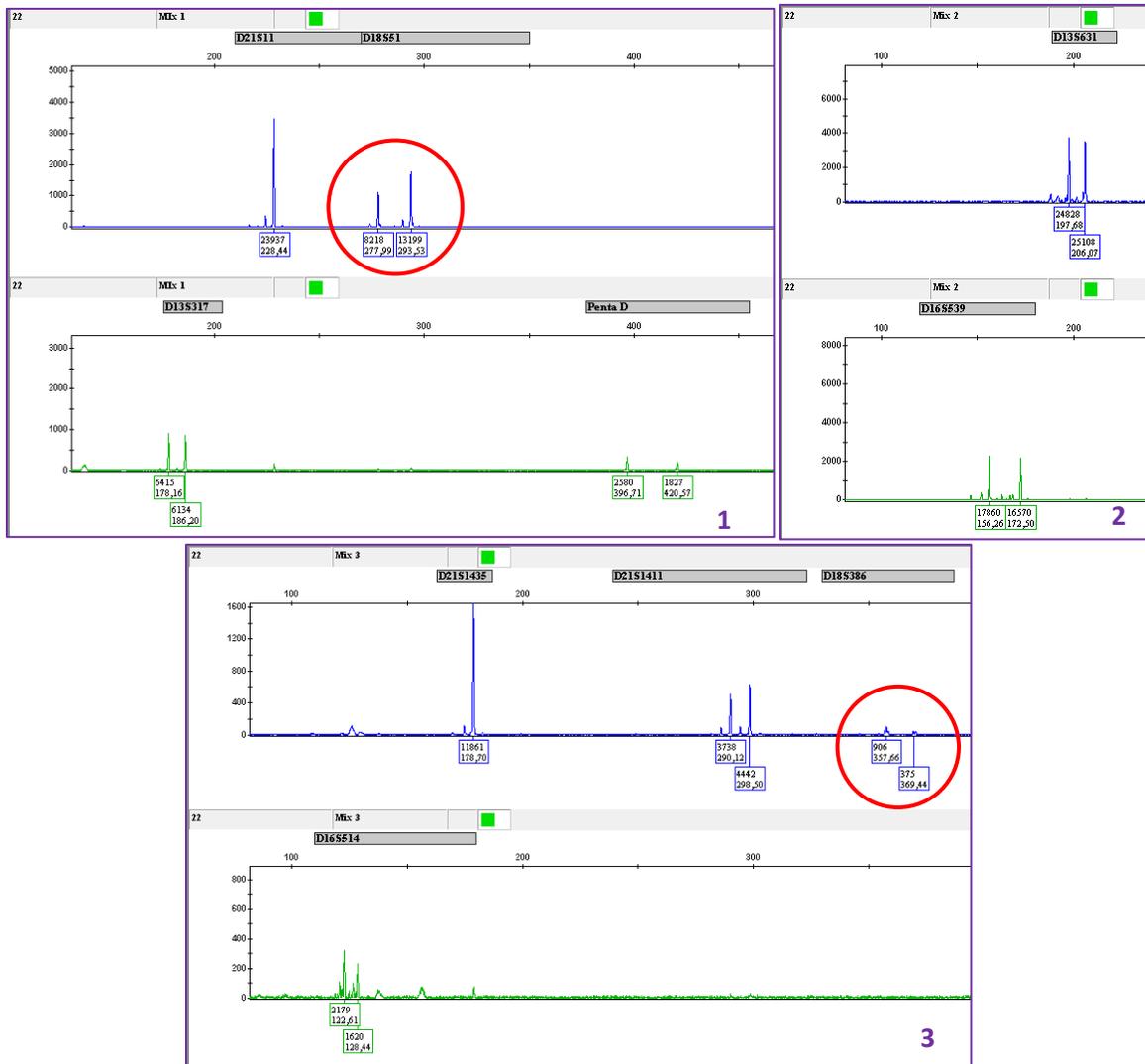
**Fig. 28.** Electroferogramas de PCR múltiple 1, 2 y 3, amplificados con líquido amniótico de un individuo no afectado.

En la figura 28 se ilustran electroferogramas de una muestra de líquido amniótico, en nueve de los diez sistemas se encuentran dos picos con relación 1:1 y uno de los sistemas en monosómico (no informativo). El individuo es no afectado en los cromosomas estudiados.



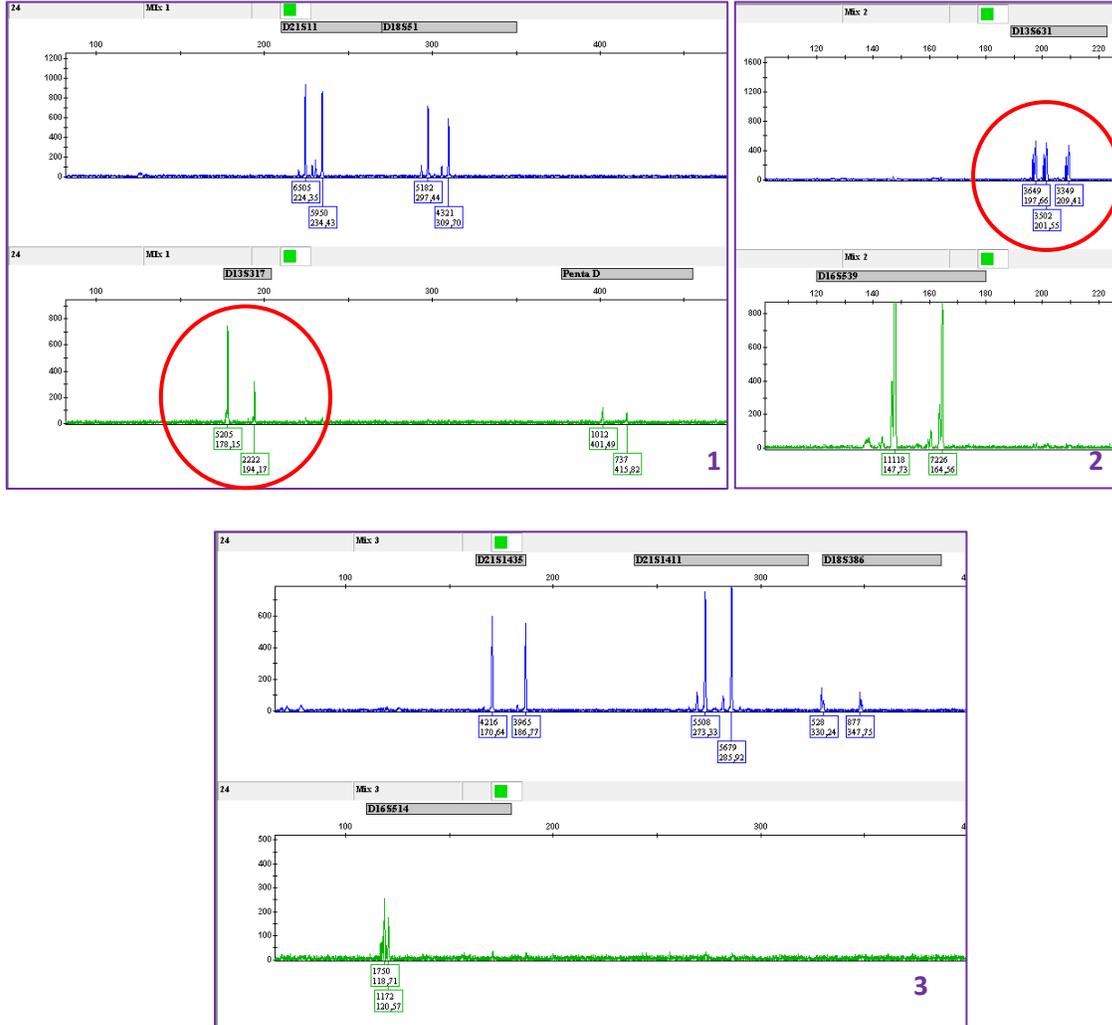
**Fig. 29.** Electroferogramas de PCR múltiple 1, 2 y 3, amplificados con líquido amniótico de un individuo trisómico en el cromosoma 21.

En la figura 29 se ilustran los electroferogramas de una muestra de líquido amniótico de un individuo trisómico en el cromosoma 21. Los sistemas D21S11, Penta D y D21S1411 presentan tres picos de igual tamaño, mientras que el sistema D21S1435 muestra dos picos con relación 2:1 ( $RR=0,5$ ). Los demás sistemas se encuentran disómicos o no informativos, como es el caso del sistema D13S317. Se evaluaron cuatro sistemas para el cromosoma 21 y todos ellos se encuentran claramente trisómicos, por lo cual se concluye que el individuo es compatible con una trisomía en el cromosoma 21.



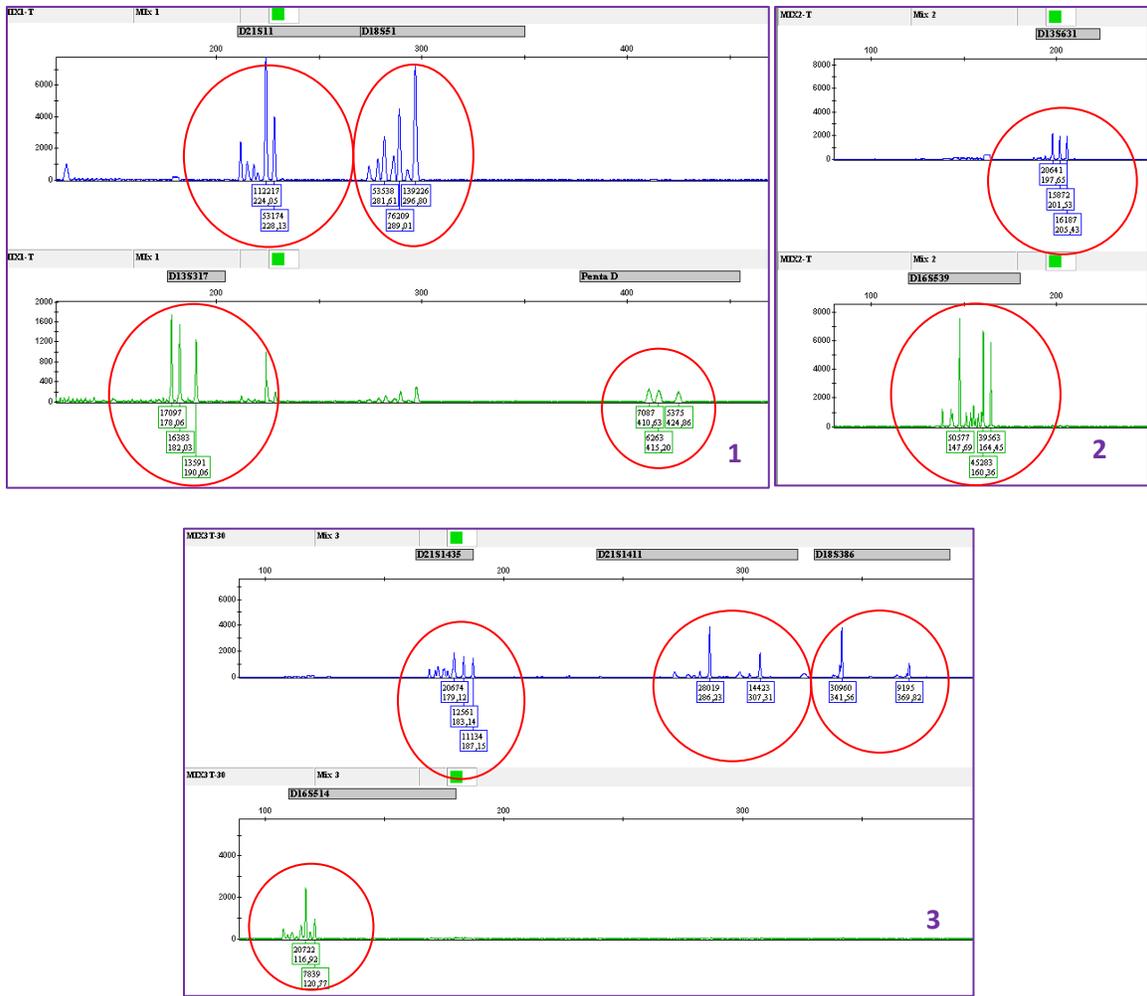
**Fig. 30.** Electroferogramas de PCR múltiple 1, 2 y 3, amplificados con líquido amniótico de un individuo trisómico en el cromosoma 18.

En la figura 30 se muestran los electroferogramas de una muestra de líquido amniótico de un individuo trisómico en el cromosoma 18. Los sistemas D18S51 y D18S386 presentan dos picos con relación 2:1, el RR es 0,5 y 0.4, respectivamente. Los demás sistemas se encuentran disómicos (no afectados). Dado que hay dos sistemas claramente trisómicos, se concluye que el individuo es compatible con una trisomía en el cromosoma 18.



**Fig. 31.** Electroferogramas de PCR múltiple 1, 2 y 3, amplificado de líquido amniótico de un individuo trisómico en el cromosoma 13.

En la figura 31 se muestran los electroferogramas de una muestra de líquido amniótico de un individuo trisómico en el cromosoma 13. El sistema D13S317 presentan dos picos con relación 2:1, el RR es 0,4, y el sistema D13S631 muestran tres picos de igual tamaño (relación 1:1:1). Los demás sistemas se encuentran disómicos (no afectados). Se concluye que el individuo es compatible con una trisomía en el cromosoma 13.



**Fig. 32.** Electroferogramas de PCR múltiple 1, 2 y 3, amplificado de vellosidades coriónicas poliploides.

La figura 32 ilustra una muestra de vellosidades coriónicas poliploides, es decir, todos los cromosomas se encuentran trisómicos. Los sistemas D21S11, Penta D, D21S1435, D18S51, D13S317, D13S631, D16S539 y D16S414 presentan tres picos de igual tamaño y los sistemas D21S1411 y D18S386 muestran dos picos con relación 2:1.

De las 37 muestras biológicas de pacientes, 26 correspondían a muestras de líquido amniótico, 08 eran vellosidades coriónicas y 03 tejidos fetales. En todos los casos se contó con la historia médica de las pacientes. En la siguiente tabla se describe, el código y tipo de muestra, la edad materna y gestacional y por último la indicación médica.

**Tabla 4.** Indicaciones médicas de las muestras estudiadas.

Código de la muestra	Tipo de muestra	Edad materna	Edad gestacional	Indicación médica
1	Líquido amniótico	31 años	17 semanas + 2 días	Marcadores séricos alterados
2	Líquido amniótico	33 años	21 semanas	Hueso nasal ausente y translucencia nuchal aumentada
3	Líquido amniótico	39 años	18 semanas	Edad materna
4	Líquido amniótico	36 años	24 semanas	Humero corto
5	Líquido amniótico	40 años	17 semanas	Edad materna
6	Líquido amniótico	39 años	17 semanas + 1 día	Edad materna
7	Líquido amniótico	31 años	17 semanas	Marcadores séricos alterados
8	Líquido amniótico	44 años	16 semanas	Translucencia nuchal aumentada
9	Líquido amniótico	19 años	17 semanas + 5 días	Marcadores séricos alterados
10	Líquido amniótico	40 años	17 semanas + 4 días	Edad materna
11	Líquido amniótico	35 años	21 semanas	Pliegue nuchal aumentada
12	Líquido amniótico	37 años	19 semanas + 2 días	Edad materna
13	Líquido amniótico	32 años	20 semanas	Cardiopatía congénita
14	Líquido amniótico	29 años	17 semanas	Higroma quístico
15	Líquido amniótico	41 años	25 semanas + 3 días	Edad materna
16	Líquido amniótico	42 años	18 semanas + 6 días	Edad materna

17	Líquido amniótico	43 años	15 semanas	Translucencia nucal aumentada
18	Líquido amniótico	34 años	19 semanas	Marcadores séricos alterados
19	Líquido amniótico	44 años	17 semanas + 4 días	Edad materna
20	Líquido amniótico	35 años	19 semanas	Interés de los padres
21	Líquido amniótico	37 años	18 semanas + 6 días	Edad materna
22	Líquido amniótico	32 años	22 semanas	Higroma quístico
23	Líquido amniótico	24 años	19 semanas + 4 días	Interés de los padres
24	Líquido amniótico	35 años	26 semanas	Polidactilia
25	Líquido amniótico	39 años	17 semanas + 2 días	Translucencia nucal aumentada
26	Líquido amniótico	23 años	26 semanas	Displasia renal
27	Vellosidades coriónicas	27 años	13 semanas + 3 días	Translucencia nucal aumentada
28	Vellosidades coriónicas	34 años	13 semanas	Translucencia nucal aumentada
29	Vellosidades coriónicas	22 años	13 semanas	Marcadores séricos alterados
30	Vellosidades coriónicas	22 años	13 semanas	Translucencia nucal aumentada
31	Vellosidades coriónicas	33 años	12 semanas + 6 días	Translucencia nucal aumentada
32	Vellosidades coriónicas	38 años	16 semanas	Edad materna
33	Vellosidades coriónicas	28 años	12 semanas	Translucencia nucal
34	Vellosidades coriónicas	43 años	12 semanas	Edad materna y translucencia nucal aumentada
35	Tejido fetal	30 años	4 semanas	Aborto espontáneo.
36	Tejido fetal	43 años	6 semanas	Aborto espontáneo.
37	Tejido fetal	44 años	3,5 semanas	Aborto espontáneo.

A modo de síntesis, todas las pacientes tenían indicación médica para la realización del diagnóstico, la edad materna promedio fue de 35 años, en el caso de los líquidos amnióticos, la amniocentesis se realizó entre las semanas 15 a 26 de gestación y las vellosidades coriónicas fueron tomadas entre las semanas 12 a 16 de gestación.

Seguidamente, se presenta una tabla descriptiva de los resultados obtenidos de las 37 muestras biológicas analizadas, en primer lugar se indica el código y tipo de muestra, luego el resultado obtenido y en último lugar la comparación con los resultados conseguidos con el estuche comercial Devyser® o con cariotipo para las mismas muestras.

**Tabla 5.** Resultados obtenidos utilizando PCR múltiple, el estuche comercial Devyser® o Cariotipo

Código de la muestra	Tipo de muestra	Resultado obtenido	Resultado Devyser®	Resultado Cariotipo
1	Líquido amniótico	Cromosoma 21: disómico	46,XY (no afectado)	
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 13: disómico		
2	Líquido amniótico	Cromosoma 21: trisómico	47, XY + 21	
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 13: monosómico		
3	Líquido amniótico	Cromosoma 21: disómico	46,XX (no afectado)	
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 13: monosómico		
4	Líquido amniótico	Cromosoma 21: trisómico	47, XY + 21	
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 18: disómico		

		Cromosoma 13: disómico		
5	Líquido amniótico	Cromosoma 21: disómico	46,XY (no afectado)	
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 13: monosómico		
6	Líquido amniótico	Cromosoma 21: disómico	46,XX (no afectado)	
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 13: disómico		
7	Líquido amniótico	Cromosoma 21: trisómico	47, XX + 21	
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 13: disómico		
8	Líquido amniótico	Cromosoma 21: trisómico	47, XY + 21	
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 13: disómico		
9	Líquido amniótico	Cromosoma 21: disómico	46,XX (no afectado)	
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 13: monosómico		
10	Líquido amniótico	Cromosoma 21: disómico	46,XX (no afectado)	
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 13: disómico		
11	Líquido amniótico	Cromosoma 21: disómico	46,XY (no afectado)	
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 13: disómico		
12	Líquido amniótico	Cromosoma 21: disómico	46,XY (no afectado)	
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 13: monosómico		
13	Líquido amniótico	Cromosoma 21: disómico	46,XX (no afectado)	
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 13: disómico		
14	Líquido	Cromosoma 21: disómico	46,XX (no	

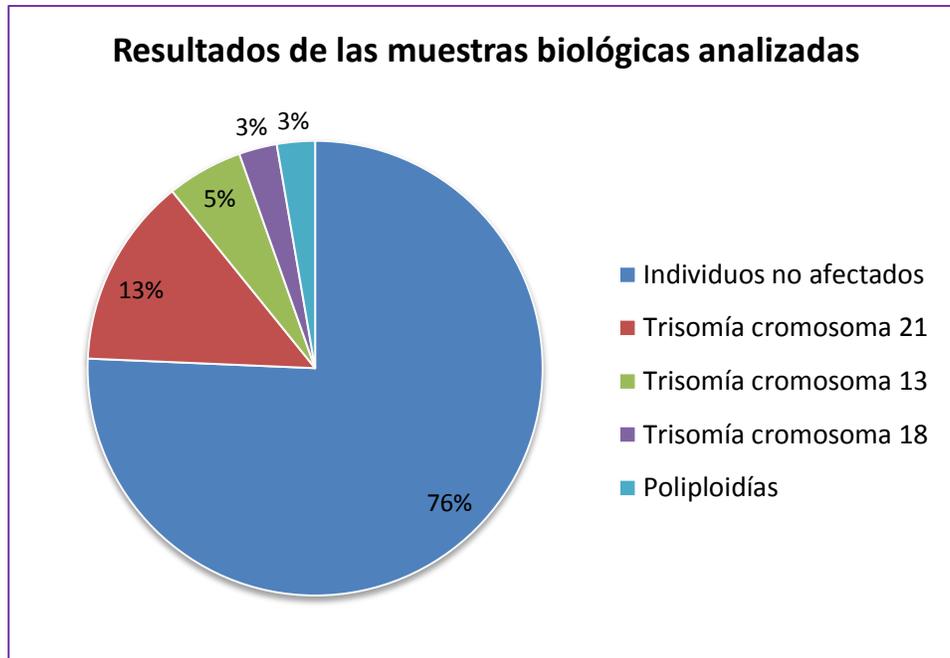
	amniótico	Cromosoma 18: disómico	afectado)	
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 13: disómico		
15	Líquido amniótico	Cromosoma 21: disómico	46,XY (no afectado)	
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 13: disómico		
16	Líquido amniótico	Cromosoma 21: disómico	46,XX (no afectado)	
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 13: monosómico		
17	Líquido amniótico	Cromosoma 21: disómico	46,XY (no afectado)	
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 13: disómico		
18	Líquido amniótico	Cromosoma 21: disómico	46,XY (no afectado)	
		Cromosoma 18: monosómico		
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 13: disómico		
19	Líquido amniótico	Cromosoma 21: disómico	46,XX (no afectado)	
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 13: disómico		
20	Líquido amniótico	Cromosoma 21: disómico	46,XX (no afectado)	
		Cromosoma 18: monosómico		
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 13: disómico		
21	Líquido amniótico	Cromosoma 21: disómico	46,XX (no afectado)	
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 13: disómico		
22	Líquido amniótico	Cromosoma 21: disómico	47,XX+18	
		Cromosoma 18: trisómico		
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 13: disómico		
23	Líquido amniótico	Cromosoma 21: disómico	46,XY (no afectado)	
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 13: disómico		

24	Líquido amniótico	Cromosoma 21: disómico	47,XY+13	
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 13: trisómico		
25	Líquido amniótico	Cromosoma 21: trisómico	47, XY + 21	
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 13: disómico		
26	Líquido amniótico	Cromosoma 21: disómico	46,XX (no afectado)	
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 13: disómico		
27	Velosidades coriónicas	Cromosoma 21: disómico		46,XX (no afectado)
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 13: disómico		
28	Velosidades coriónicas	Cromosoma 21: disómico		46,XY (no afectado)
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 13: disómico		
29	Velosidades coriónicas	Cromosoma 21: disómico		46,XX (no afectado)
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 13: disómico		
30	Velosidades coriónicas	Cromosoma 21: disómico		NC
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 13: disómico		
31	Velosidades coriónicas	Cromosoma 21: disómico		NC
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 13: disómico		
32	Velosidades coriónicas	Cromosoma 21: disómico	47,XY+13	
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 13: trisómico		
33	Velosidades coriónicas	Cromosoma 21: disómico		NC
		Cromosoma 18: disómico		

		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 13: disómico		
34	Vello­sidades coriónicas	Cromosoma 21: trisómico		69,XXY
		Cromosoma 16: trisómico		
		Cromosoma 18: trisómico		
		Cromosoma 13: trisómico		
35	Tejido fetal	Cromosoma 21: disómico		46,XX (no afectado)
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 13: disómico		
36	Tejido fetal	Cromosoma 21: disómico		Muestra con contaminación materna
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 13: disómico		
37	Tejido fetal	Cromosoma 21: disómico		46,XY (no afectado)
		Cromosoma 18: disómico		
		Cromosoma 16: disómico		
		Cromosoma 13: disómico		

*Las letras rojas indican anomalía cromosómica. Se denominó NC cuando no hubo crecimiento en el cultivo celular (en el caso de cariotipo).*

Del total de muestras analizadas, se observaron un total 9 anomalías cromosómicas: 05 trisomías en el cromosoma 21, todas ellas se diagnosticaron en muestras de líquido amniótico, 02 trisomías en el cromosoma 13, una proveniente de una muestra de líquido amniótico y otra de vellosidades coriónicas, 01 trisomía en el cromosoma 18, detectada en una muestra de líquido amniótico y 01 poliploidía diagnosticada en vellosidades coriónicas. No se observaron trisomías en el cromosoma 16. La figura 25 muestra en un gráfico los resultados descritos anteriormente.



**Fig. 33.** Gráfico. Resultados obtenidos de las 37 muestras biológicas analizadas.

*En azul se muestran los individuos no afectados, en rojo los individuos trisómicos en el cromosoma 21, en verde los individuos trisómicos en el cromosoma 13, en morado los individuos trisómicos en el cromosoma 18 y en azul claro las poliploidías.*

Utilizando la técnica QF-PCR estandarizada fue posible la obtención de resultados en un promedio de 24 horas en las 37 muestras analizadas.

## 7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de tesis se propuso la estandarización de la técnica QF-PCR de forma manual, es decir, diseñando, escogiendo y sintetizando cebadores específicos para marcadores STRs ubicados en los cromosomas 13, 16, 18 y 21, y de este modo poder detectar aneuploidías en muestras biológicas. Este trabajo forma parte un proyecto más amplio desarrollado por el laboratorio GENMOLAB, en el cual se contempla analizar cuatro sistemas para cada uno de los cromosomas estudiados, además de los cromosomas sexuales.

Nos planteamos estudiar los cromosomas 13, 18, 21 y sexuales debido a que en estos se presentan las aneuploidías más frecuentes en seres humanos, que son: trisomía en el cromosoma 21 (síndrome de Down), trisomía en el cromosoma 18 (síndrome de Edwards), trisomía en el cromosoma 13 (síndrome de Patau), síndrome de Turner: XO (monosomía) y síndrome de Klinefelter: XXY (Herráez, 2012).

Adicionalmente se decide evaluar el cromosoma 16, debido a que la trisomía en este cromosoma se considera no compatible con la vida y constituye la causa más común de abortos por aneuploidías en mujeres abortivas a repetición (Kalousek y col., 1993). La importancia del diagnóstico de aneuploidías en restos abortivos se debe a que el riesgo de aborto se modifica según el antecedente de la mujer, particularmente si ha tenido descendencia viva, en este caso, el riesgo es: sin aborto previo 5%, con un aborto previo de 20 a 25%, dos abortos previos de 25% y tres abortos previos 30%. En las pacientes sin descendencia viva y tres abortos previos el riesgo de recurrencia es de 30 a 40%. En parejas

con un aborto y cariotipo no afectado, es más probable que sí ocurre otra pérdida, el estudio cromosómico sea no afectado. En cambio, si hay una alteración cromosómica en un aborto previo, en caso de otra pérdida lo más probable es que ésta tenga también una alteración cromosómica (López y col., 2011).

En la estandarización de la técnica QF-PCR, un factor muy importante es la escogencia de los sistemas a estudiar. Para disminuir los resultados no informativos, la QF-PCR debe incluir al menos cuatro marcadores por cromosoma, con un porcentaje mínimo de heterocigosidad de 70% (Ogilvie y col., 2005.). Los STRs o microsatélites son marcadores ideales para la QF-PCR ya que poseen una alta tasa de mutación, lo que los hace muy polimórficos a nivel poblacional. Se ha estimado que la tasa de mutación en los microsatélites varía entre  $10^{-2}$  y  $10^{-5}$  por generación y el mecanismo que explica mejor su alto grado de polimorfismo es la acumulación de errores producidos por el deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del ADN (Sirvent y Gómez, 2012).

Tomando esto en cuenta, se realizó una búsqueda bibliográfica extensa de marcadores STRs ubicados en los cromosomas de interés. Finalmente se escogieron algunos de los más reportados, que cuentan con alto porcentaje de heterocigosidad y además, se seleccionaron de acuerdo al rango del tamaño del amplificado, con la idea de realizar el análisis final mediante PCRs múltiples, por lo tanto se escogieron de modo que no hubiese solapamiento entre los rangos de tamaño de los diferentes sistemas al momento de realizar la electroforesis capilar automatizada. Para este trabajo de tesis se sintetizaron

diez pares de cebadores, cuatro para el cromosoma 21, dos para el cromosoma 13, dos para el cromosoma 18 y dos para el cromosoma 16.

Se evaluó un total de 37 muestras biológicas (26 líquidos amnióticos, 08 vellosidades coriónicas y 03 tejidos fetales). La mayoría de las muestras fueron de líquido amniótico. El diagnóstico prenatal es comúnmente solicitado por los médicos si la paciente presenta algún marcador de anomalía cromosómica, como edad materna avanzada, marcadores ecográficos o marcadores séricos alterados. El diagnóstico prenatal de aneuploidías es muy importante para evaluar 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 (Castro y *col.*, 2010), por ello la importancia de la introducción de técnicas rápidas y fiables para el diagnóstico de aneuploidías.

Para el procesamiento de las muestras, se probaron dos métodos de extracción de ADN; el método salino y el método de columnas de sílica. La extracción de ADN por el método salino implicó la adición de dos pasos extras; purificación mediante perlas magnéticas y cuantificación. Las muestras debían ser purificadas dado que por este método de extracción, el ADN puede contener inhibidores de la PCR. También fue indispensable que las muestras se cuantificaran, ya que, se observó mucha variación en la cantidad de ADN obtenida entre una muestra y otra. Debido a que la PCR se puede inhibir por falta o exceso de ADN, era necesario conocer la cantidad de ADN extraído en cada muestra para lograr una amplificación exitosa.

En la extracción de ADN por el método de columnas de sílica (estuche comercial), el producto final se encuentra altamente purificado y la cantidad de ADN permanece casi constante entre una muestra y otra. Debido a esto y a que no se requiere pasos adicionales (como es el caso del método salino), se decidió trabajar con este método y se consiguió extraer ADN exitosamente de todas las muestras estudiadas.

Al realizar la separación electroforética de los productos de PCR simple se consiguió que ocho de los diez sistemas eran disómicos y los picos tenían una relación 1:1, esto es lo esperado, ya que el ADN<sub>g</sub> 9975A, con el que se amplificaron todos los sistemas, pertenece a un individuo no afectado o disómico. El sistema D13S317 presentó exceso de fluorescencia y el sistema D21S1411 se mostró monosómico, por lo tanto ambos sistemas fueron no informativos. Con la corrida electroforética de cada uno de los sistemas STRs se comprobó que la movilidad a lo largo del electroferograma era adecuada, lo cual indica que se programó de forma correcta el software de análisis en el secuenciador de ADN.

En el ensayo de sensibilidad se obtuvo que la cantidad mínima requerida para lograr amplificación en los diez sistemas es 0.1ng de ADN, que fue la cantidad con la que se iniciaron los ensayos. Debido a la alta sensibilidad de los cebadores, en algunas muestras, el producto de PCR fue muy fluorescente. El exceso de fluorescencia dificulta el análisis, hay solapamiento en el electroferograma y se altera el rango de relación entre los picos. Por lo tanto, fue necesario ajustar la fluorescencia de algunos productos de PCR, por medio de diluciones 1 en 20 con agua destilada. Las muestras diluidas fueron más fáciles de analizar,

ya que no hubo solapamiento entre picos de igual tamaño y el rango de relación fue más preciso, como se muestra en la figura 27.

El ensayo de especificidad, el cual hicimos con la finalidad de establecer la capacidad de los cebadores de discriminar entre individuos trisómicos y no afectados. La especificidad de los diez pares de cebadores se corroboró, ya que, en todos los casos de amplificación de muestras trisómicas, los sistemas se comportaron como trisómicos, presentando tres picos de igual tamaño o dos picos con relación 2:1. De igual manera, cuando se amplificaron muestras de individuos no afectados los sistemas se comportaron como disómicos. Por lo tanto, no se obtuvieron resultados contradictorios a lo esperado.

Con la finalidad de disminuir tiempo y costos en cada reacción, se procedió a estandarizar tres PCRs múltiples: la PCR múltiple 1 contiene los sistemas D21S11, D18S51, D13S317 y Penta D, la PCR múltiple 2 contiene los sistemas D13S631 y D16S539 y la PCR múltiple 3 contiene los sistemas D21S1411, D21S1435, D18S386 y D16S514.

En los PCRs múltiples se consiguió amplificación en todos los sistemas y la movilidad a lo largo del electroferograma en todos los casos fue adecuada. Quedando estandarizada la QF-PCR con estos tres PCRs múltiples, que son los que se utilizaron para el análisis de las 37 muestras de los pacientes.

En las 37 muestras biológicas estudiadas, se encontró que el 76% de los individuos fueron no afectados, se observaron un total 9 anomalías cromosómicas, lo que corresponde a 24% de las muestras, se encontraron 05 trisomías en el cromosoma 21 (13%), 02 trisomías en el cromosoma 13 (5%), 01 trisomía en el cromosoma 18 (3%) y 01 poliploidía (3%), tal como se describe en el gráfico de la figura 25.

Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Acosta y colaboradores, donde se estudiaron 200 muestras biológicas y se obtuvo que el 85% de las muestras analizadas correspondían a fetos no afectados, 8% eran trisómicos en el cromosoma 21, 3% presentaban trisomía en el cromosoma 13, 2% en el cromosoma 18 y 2% presentaban otras anomalías cromosómicas. (Acosta y col.). De igual modo en este estudio se encontró que la anomalía cromosómica más frecuente fue la trisomía en el cromosoma 21, seguida de la trisomía en el cromosoma 13, luego la trisomía en el cromosoma 18 y por último otras anomalías.

Sin embargo, nuestros resultados difieren de los encontrados por el Dr. Cirigliano y colaboradores en el 2009, los cuales trabajaron con aproximadamente 50.000 muestras biológicas y se encontraron con que el 96.2% de los fetos eran no afectados, 1.8% presentaban trisomía en el cromosoma 21, 0.7% mostraban trisomía en el cromosoma 18, 0.3% manifestaban trisomía en el cromosoma 13 y 1% correspondían a otras anomalías cromosómicas. (Cirigliano y col., 2009). En este estudio la proporción de fetos no afectados encontrada es muy alta, también se encontró que la trisomía en el cromosoma 18 es más frecuente que la trisomía en el cromosoma 13. Esta diferencia entre los resultados obtenidos

por el Dr. Cirigliano y los nuestros, puede deberse al número de muestras analizadas, ya que el N de nuestro trabajo es significativamente menor al de ellos. Por otro lado, este estudio se llevó a cabo con pacientes españolas, mientras que en este trabajo de tesis se evaluaron muestras biológicas de pacientes venezolanas. Los factores poblaciones o étnicos podrían afectar las proporciones de aneuploidías encontradas. También es considerable el hecho de que 22% de las muestras se evaluaron por ansiedad materna, mientras que en nuestro estudio todas las pacientes contaban con algún marcador de aneuploidía.

De las anomalías cromosómicas encontradas, las muestras de líquido amniótico, incluyen todos los casos de trisomía en cromosoma 21, entre las indicaciones médicas de estas pacientes, se encontraban: hueso nasal ausente, translucencia nucal aumentada, húmero corto y marcadores séricos alterados, lo que concuerda con lo descrito en la bibliografía por Nicolaidis en el 2004. Se encontró una trisomía en el cromosoma 18, esta paciente tenía como indicación médica higroma quístico, lo que se ajusta a lo reseñado por Nicolaidis en el 2004. También se detectó, en líquido amniótico, una trisomía en el cromosoma 13, en este caso el feto presentaba polidactilia, esto coincide con lo descrito por Matthews en 1999. En las vellosidades coriónicas se encontró una trisomía en el cromosoma 13 y una poliploidía, estas pacientes tenían como indicación médica; edad materna avanzada y translucencia nucal aumentada, lo que se ajusta a lo reseñado por Matthews en 1999. Es conveniente destacar que a pesar de que todas las pacientes contaban con indicación médica para la realización del diagnóstico, el 73% de los fetos fueron no afectados, lo cual muestra la importancia del diagnóstico citogenético, más allá de la sola presencia de marcadores alterados.

De las anomalías cromosómicas obtenidas, no se encontró ninguna trisomía en el cromosoma 16 en los restos abortivos estudiados. Se esperaba, al menos, una trisomía en este cromosoma, debido a que es la causa más común de abortos por aneuploidías, con una frecuencia de 30% (Kalousek y col., 1993). Esto se puede deber a que sólo se evaluaron 03 muestras de tejido fetal, es decir el N fue muy pequeño para lograr la detección.

Mediante la QF-PCR se obtuvieron resultado en los tres casos donde no se logró cultivo celular para cariotipo. Además, la edad gestacional avanzada no fue un impedimento para lograr resultado, ya que se pudo extraer ADN y realizar la PCR en muestras de hasta 26 semanas de gestación, siendo este uno de los principales motivos para el fracaso en el cultivo celular (Castro y col. 2001).

Los resultados obtenidos utilizando la QF-PCR estandarizada, se correspondieron en su totalidad a los encontrado mediante el estuche comercial Devyser<sup>®</sup> o cariotipo para las mismas muestras. Se identificaron correctamente trisomías en los cromosomas 13, 18 y 21, así como una poliploidía (euploidia). No hubo casos de falsos positivos, ni falsos negativos, lo cual revela que la técnica posee una especificidad del 100%, esto concuerdan con lo encontrado por otros autores (Pertl y col., 1999; Lee y col., 2004; Cirigliano y col., 2006).

En la mayoría de los estudios que evalúan la QF-PCR, se estima la sensibilidad de la técnica, lo cual se hace incluyendo casos de mosaicismos. Se ha obtenido que la sensibilidad siempre va de 90% a casi 100%. Esto se debe a que los casos de mosaicos no siempre pueden diagnosticarse correctamente por QF-PCR, de hecho es una de las limitaciones de la técnica (Cirigliano y col., 2001). La línea celular afectada debe ser mayor al 30% para mostrar patrones anormales de picos en la QF-PCR que permitan determinar el mosaicismo (Mann y col., 2005). De igual modo, las trisomías completas representan el 95% de los casos de aneuploidías, seguidas de las translocaciones (3 a 5%) y con menor frecuencia se encuentran los mosaicos, representando el 2 a 3% de los casos (Gallardo., 2016).

Gracias a la automatización de la electroforesis, que permite evaluar varias muestras a la vez, y a la estandarización de la QF-PCR por medio de PCRs múltiples, en este trabajo de tesis los resultados se pudieron obtener, en promedio, en menos de 24 horas, mientras que el estudio por cariotipo, que implica cultivos celulares y detención de los mismos en metafase, requiere por lo menos un par de semanas de trabajo. En muchos casos este lapso de espera provoca ansiedad en la madre, principalmente si hay sospechas de cualquier anomalía cromosómica. 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 y col., 2006). El diagnóstico rápido que brinda la QF-PCR es muy valioso en casos urgentes de los cuales dependan intervenciones médicas importantes, tales como

cirugías fetales, prescripción de medicamentos o la decisión de terminar el embarazo por cromosomopatía (Pert y col., 1999).

La estandarización de la QF-PCR de forma manual demostró reducir significativamente los costos, representando una disminución de 95% en el costo del diagnóstico.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis demuestran que la QF-PCR es una técnica, económica, fiable, rápida y de fácil análisis, que puede utilizarse como complemento del análisis citogenético convencional.

## 7. CONCLUSIONES

1. Se consiguió extraer exitosamente ADN de las 37 muestras biológicas estudiadas con el método de columnas de sílica.
2. Se logró estandarizar la QF-PCR de forma manual por medio de tres PCRs múltiples.
3. Los resultados obtenidos utilizando la QF-PCR estandarizada se correspondieron en su totalidad a los encontrados mediante el estuche comercial Devyser<sup>®</sup> o cariotipo, mostrando una eficiencia de la técnica de 100%.
4. La estandarización de la QF-PCR de forma manual demostró disminuir los costos del diagnóstico en un 95% en comparación con el estuche comercial.
5. La QF-PCR es una técnica económica, fiable, rápida y de fácil análisis, que permite el diagnóstico de aneuploidías en muestras de líquido amniótico, vellosidades coriónicas y restos abortivos.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

–Acosta, M., Arcia, O., Romero, G., Caraballo, G., Monasterios, R. Diagnóstico prenatal de aneuploidias frecuentes (13, 18, 21 y sexuales X, Y) mediante la técnica de QF-PCR en muestras de pacientes venezolanos. Aun sin publicar.

–Annese, V., Latiano, A., Palmieri, O., Li, H. H., Forabosco, P., Ferraris, A., Dallapiccola, B. 2003. Linkage of ulcerative colitis to the pericentromeric region of chromosome 16 in Italian inflammatory bowel disease families is independent of the presence of common CARD15 mutations. *Journal of medical genetics*, **40(11)**: 837-841.

–Bartlett, J., Stirling, D. 2003. A short history of the polymerase chain reaction. *PCR protocols*. **3**:6.

–Bendaña, W., Morales, F., Castro-Volio, I. 2009. Diagnóstico molecular de cromosomopatías fetales en Costa Rica. *Acta Médica Costarricense* ISSN 0001-6012, **51(4)**.

–Bendaña, M., 2008. Validación de la técnica QF-PCR para el diagnóstico de cromosomopatías en Costa Rica. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio. Costa Rica.

–Boue, J., Bou, A., Lazar, P. 1975. Retrospective and prospective epidemiological studies of 1,500 karyotyped spontaneous human abortions. *Teratology*. **12**: 11-26.

–Castillo, S., Fuentes, A., Paulos A., De la Rosa, E. 2014. Estudio cromosómico en abortos espontáneos. *Rev. chilena obst. y ginecol.* **79(1)**: 40-46.

–Castro, J., Llano, I., Aguinaga, M., Ibáñez, J., Segundo, J., Beltrán, J., Domínguez, M. 2010. Estandarización del procedimiento de toma de muestra y cultivo para estudio citogenético de tejido de abortos del primer trimestre del embarazo. *Perinatol Reprod Hum.* **24(1)**: 20-27.

–Castro, I., Sander, K., Vargas, M., Sánchez, L., Escalante, G. 2001. Diagnóstico prenatal citogenético mediante amniocentesis durante los trimestres II y III de gestación en Costa Rica. *Revista de biología tropical*, **49(3-4)**: 1227-1236.

–Cirigliano, V., Voglino, G., Ordonez, E., Marongiu, A., Paz Canadas, M., Ejarque, M., Adinolfi, M. 2009. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR, results of 9 years of clinical experience. *Prenatal diagnosis*, **29(1)**: 40-49.

–Cirigliano, V., Voglino, G., Marongiu, A., Cañadas, P., Ordoñez, E., Lloveras, E., Adinolfi, M. 2006. Rapid Prenatal Diagnosis by QF-PCR: Evaluation of 30,000 Consecutive Clinical Samples and Future Applications. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1075(1)**: 288-298.

–Cirigliano V, Lewin P, Szpiro-Tapies S, Fuster C and Adinolfi M. 2001. Assessment of new markers for the rapid detection of aneuploidies by quantitative fluorescent PCR (QF-PCR) *Annals of Human Genetics*. **65**: 421–427.

–Chitty, L., Kagan, F., Molina, J., Nicolaides. 2006. Fetal nuchal translucency scan and early prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities by rapid aneuploidy screening: observational study. *BMJ*. **332**: 452-455.

–Choueiri, M., Makhoul, N., Zreik, T., Mattar, F., Adra, A., Eid, R., Zalloua, P. 2006. The consanguinity effect on QF-PCR diagnosis of autosomal anomalies. *Prenatal diagnosis*, **26(5)**: 409-414.

–Coco, R., Mincman, J., Polo, M., Coco, I., Gismondi, F. 2008. Diagnóstico prenatal ultrarrápido de triploidía por PCR fluorescente. *Reproducción*, **23**: 3-8.

–Conde, R. 2016. *Biología 2* (Vol. 2). Grupo Editorial Patria.

–Diego, D., García, M., Trujillo, M., González, C., Rodríguez de Alba, M., Ayuso, C. 2005. Application of quantitative fluorescent PCR with short tandem repeat markers to the study of aneuploidies in spontaneous miscarriages. *Hum Reprod.* **20**:1235-12.

–Gallardo, P. 2016. Cribado de anomalías cromosómicas en el primer trimestre de gestación. Validación de la tecnología QF-PCR en relación con el cariotipo en el diagnóstico prenatal de aneuploidías. Tesis de doctorado. Universidad de Granada. España.

–Hamilton, S., Mann, K. 2012. QF-PCR for the diagnosis of aneuploidy best practice guidelines V3.01. Association for Clinical Cytogenetics and Clinical Molecular Genetics Society.

–Herráez, A., Sánchez, A. 2012. Biología molecular e ingeniería genética. Elsevier. Segunda edición. Madrid, España.

–Hultén, M., Dhanjal, S., Pertl, B. 2003. Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR. *Reproduction.* **126(3)**: 279-297.

–Kaminker, P., Armando, R. 2008. Síndrome de Down: Primera parte: enfoque clínico-genético. *Archivos argentinos de pediatría*, **106(3)**: 249-259.

–Kalousek, D., Langlois, S., Barrett, I., Yam, I., Wilson, D., Howard-Peebles, P., Giorgiutti, E. 1993. Uniparental disomy for chromosome 16 in humans. *American journal of human genetics*, **52(1)**: 8.

–Lathi, R., Hazard, F., Heerema-McKenney, A., Taylor, J., Chueh, J. 2011. First trimester miscarriage evaluation. *Seminars in reproductive medicine.* **29**:463-469.

–Lee, M., Ryu, D., Kim, B., Lee, E., Cho, J., Yang, M., Kim, J., 2004. Rapid Prenatal Diagnosis of Down Syndrome Using Quantitative Fluorescent PCR in Uncultured Amniocytes. *J Korean Med Sci.* **19**: 341-4

–Litt, M., Luty, J. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American journal of human genetics.* **44(3)**: 397.

–Littleton, H., 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

–López, Á., Huerta, S., Galván, R., Posadas, R., Del Ángel, A., González, P. 2011. Diagnóstico citogenético en aborto espontáneo del primer trimestre. *Ginecol Obstet Mex,* **79(12)**: 779-84.

–Mansfield, E. 1993. Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. *Human Molecular Genetics,* **2(1)**: 43-50.

–Matthews, A. 1999. Chromosomal Abnormalities: Trisomy 18, Trisomy 13, Deletions, and Microdeletions. *J Perinat. Neonat. Nurs.* **13(2)**:59–75

–Menasha, J., Levy, B., Hirschhorn, K., Kardon, N. 2005. Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: New insights from a 12-year study. *Genet Med.* **7(4)**: 251-632.

–Miller, S., Dykes, D., Polesky, H. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research,* **16(3)**: 1215.

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

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

–Ogilvie, M., Donaghue, C., Fox, S., Docherty, Z., Mann, K. 2005. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy using quantitative fluorescence-PCR (QF-PCR). *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **53(3)**: 285-288.

–Ochshorn, Y., Bar-Shira, A., Jonish, A., Yaron, Y. 2006. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy for chromosomes 21, 18, 13, and X by quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Fetal Diagn Ther.* **21**:326–331.

–Pertl, B., Weitgasser, U., Kopp, S., Kroisel, P., Sherlock, J., Adinolfi, M. 1996. Rapid detection of trisomies 21 and 18 and sexing by quantitative fluorescent multiplex PCR. *Human Genetics.* **98**: 55–59.

–Pertl B., Kopp S., Kroisel P., Hausler M., Sherlock J., Winter R., Adinolfi M. 1997. Quantitative fluorescence polymerase chain reaction for the rapid prenatal detection of common aneuploidies and fetal sex. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* **177**: 899–906

–Pertl B., Kopp S., Kroisel P., Tului L., Brambati B., Adinolfi M. 1999 Rapid detection of chromosome aneuploidies by quantitative fluorescence PCR: first application on 247 chorionic villus samples. *Journal of Medical Genetics.* **36**: 300–303

–Pierce, B. 2009. *Genética: Un enfoque conceptual.* Editorial Médica Panamericana. Tercera edición. Buenos Aires, Argentina.

–Rådström, P., Knutsson, R., Wolffs, P., Lövenklev, M., Löfström, C. 2004. Pre-PCR processing. *Molecular biotechnology*. **26(2)**: 133-146.

–Robinson, W., McFadden, D., Stephenson, M. 2001. The origin of abnormalities in recurrent aneuploidy/polyploidy. *The American Journal of Human Genetics*, **69(6)**: 1245-1254.

–Rodríguez, A., Medinilla, F. 2014. Estudio Genético Poblacional de Frecuencias Alélicas para 15 marcadores STR presentes en la Población del Estado de Zacatecas Aplicado a la Práctica Forense. *Archivos de medicina*, **10(1)**: 1.

–Ruíz, Y. 2013. Aplicaciones de los SNPs al Análisis Genético de Restos Óseos Antiguos en la UCCVDF-AMC. Unidad Criminalística contra la Vulneración de Derechos Fundamentales, adscrita a la Dirección de Laboratorios Criminalísticos del Ministerio Público.

–Schmidt, W., Jenderny, J., Hecher, K., Hackeloer, B., Kerber, S., Kochhan, L., Held K. 2000. Detection of aneuploidy in chromosomes X, Y, 13, 18 and 21 by QF-PCR in 662 selected pregnancies at risk. *Molecular Human Reproduction*. **6**: 855–860.

–Sirvent, M., Gómez, C. E. 2012. Marcadores moleculares basados en PCR: Marcadores SSR o STR (Simple Sequence Repeats o Short Tandem Repeats). Microsatélites. Universidad Politecnica de Valencia. España.

–Urquhart, A., Kimpton, C., Downes, T., Gill, P. 1994. Variation in short tandem repeat sequences—a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *International journal of legal medicine*. **107(1)**: 13-20.

–Valdez, F., Sessarego, T., Rubio, K. 2012. Aneuploidías en mujeres de edad avanzada, ¿cuál es el riesgo real?. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, **58(1)**: 17-22.

–Walsh, P. S., Fildes, N. J., & Reynolds, R. (1996). Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic acids research*, **24(14)**: 2807-2812.