

## Diagnóstico prenatal en amniocitos sin cultivar: el FISH, un método rápido y eficaz.

### Prenatal diagnosis in amniocytes without culture: FISH, a rapid and safe method.

Luis Alberto Méndez Rosado,<sup>I</sup> Celia Llanusa Ruiz,<sup>II</sup> Alfredo Nodarse Rodriguez,<sup>III</sup> Minerva García Rodríguez,<sup>IV</sup> Odalys Molina Gamboa,<sup>V</sup> Gretel Huertas Pérez,<sup>VI</sup> Ursulina Suárez Mayedo,<sup>VII</sup> Norma de León Ojeda.<sup>VIII</sup>

Este trabajo fue presentado en la Convención Internacional de Salud Pública Cuba Salud 2012

#### Resumen

La utilización de la técnica de hibridación in situ con fluorescencia aplicada al diagnóstico prenatal citogenético es una vía rápida para establecer un nexo entre los genes y los cromosomas sin necesidad de realizar cultivos celulares, permitiendo la detección de anomalías cromosómicas en células en interfase. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los resultados obtenidos en la introducción de este método para el diagnóstico prenatal. Se diagnosticaron 104 casos de alto riesgo genético, predominando la indicación de alteraciones fetales detectadas por ecografía. Fueron diagnosticados 11 casos positivos, de los cuales 6 fueron síndromes Down, 2 fueron síndromes de Patau, un síndrome Edward, una polisomia del X y una delección 22q11.2. En mitad de los casos positivos no se realizó estudio de corroboración por citogenética convencional por varias razones: primero por existir una correlación entre el hallazgo ecográfico y el diagnóstico por FISH. Otra razón fue la avanzada edad gestacional con que se realizaron estos casos que no permitía el cultivo de amniocitos, y por último que en algunos de ellos fue imposible realizar una cordocentesis por la ubicación de la placenta. Se presentó un caso normal por FISH que nació con múltiples malformaciones y el análisis clínico del recién nacido sugiere una delección del brazo corto del cromosoma 4. En conclusión la técnica FISH en células en interfase combinada con un correcto manejo de las indicaciones de riesgo genético y el cariotipo convencional, cuando sea posible, constituye una nueva estrategia para el diagnóstico prenatal en Cuba.

**Palabras clave:** FISH, diagnóstico prenatal, delección 22q11.2, aneuploidía

#### Abstract

Fluorescence in situ hybridization applied to the cytogenetic prenatal diagnosis is a rapid way to establish a nexus between genes and chromosomes without cellular culture and allows detection of chromosomal abnormalities on interphase cells. The aim of the present study was to evaluate this method as a tool in prenatal diagnosis in high risk pregnancies. Prenatal diagnosis was carried out in 104 high-risk pregnancies, in which the indication of fetal alterations through echography predominated. There were diagnosed 11 positive cases, from which 6 were Down syndrome, 2 Patau syndrome, one Edward syndrome, one X polysomy and a 22q11.2 deletion. Corroboration studies through conventional cytogenetic methods was not carried out in the half of these positive cases due to several reasons: First, there was a correlation between echographic finding and FISH analyses. Second, the advanced pregnancy age did not allow amniocytes culture. Last, in certain cases it was impossible to carry out a cordocentesis due to the location of the placenta. A normal case diagnosed through FISH was born with several abnormalities and the clinical analysis of the newborn suggest a chromosome 4 short arm deletion. To conclude, FISH technique applied on interface cells combined with the right management of genetic risk indications and conventional karyotype, when it is possible to be carried out, constitute a new strategy for prenatal diagnosis in Cuba.

**Keywords:** FISH, prenatal diagnosis, 22q11.2 deletion, aneuploidy.

<sup>I</sup> Doctor en Ciencias de la Salud. Licenciado en Biología. Investigador Titular. Profesor Titular. Centro Nacional Genética Médica. Universidad de Ciencias Médicas. La Habana, Cuba. E-mail: albermen@infomed.sld.cu

<sup>II</sup> Especialista Primer Grado en Genética Clínica. Master en Enfermedades Infecciosas. Profesor asistente. Hospital Ginecobstétrico Docente "Ramón González Coro". La Habana, Cuba.

<sup>III</sup> Especialista de II Grado en Ginecobstetricia. Profesor Auxiliar. Departamento de Genética. Hospital Gineco-Obstétrico "Ramón González Coro". La Habana, Cuba.

## Introducción

La citogenética convencional constituye una herramienta insustituible tanto en los estudios prenatales, postnatales como en investigaciones relacionadas con el cáncer. No obstante, actualmente en nuestro país con los medios de cultivos que contamos el diagnóstico prenatal citogenético (DPC) demora un promedio entre 15 a 20 días, siendo necesario el cultivo celular para la obtención de cromosomas y el diagnóstico al microscopio óptico. Con la introducción de la técnica FISH (siglas del inglés *fluorescence in situ hybridization*) aplicadas a células amnióticas en interfase, el resultado puede ser obtenido en tan solo dos días, diagnosticándose las más frecuentes aneuploidías del segundo trimestre del embarazo, evitando así en gran medida la ansiedad prolongada por la espera del resultado del DPC. También con la introducción del diagnóstico citogenético molecular por FISH se logran complementar los resultados de la citogenética clásica y detectar aberraciones crípticas imposibles de diagnosticar por métodos convencionales. La mayor revolución que se produce al introducir el FISH en nuestro medio es que da la posibilidad de realizar el diagnóstico citogenético en cualquier fase del ciclo celular y en múltiples tejidos. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar los resultados obtenidos en la nueva modalidad de DPC aplicando la técnica FISH en células en interfase, a un grupo de embarazos de alto riesgo.

## Materiales y métodos

### Muestras de estudio

Se estudiaron 104 gestantes entre las 16 y 33 semanas, procedentes de la Red Nacional de Genética Médica en el periodo de trabajo comprendido entre 2010-2012.

Los casos de diagnóstico prenatal fueron remitidos al laboratorio por pertenecer a diferentes grupos de riesgo de cromosomopatías como: alteraciones detectadas por ecografía fetal que implicaban un riesgo de enfermedad de origen cromosómico, embarazadas mayores de 38 años y adolescentes, alteraciones en marcadores séricos maternos, sospecha de mosaicismo

cromosómico y casos con antecedentes familiares de enfermedades de origen cromosómico.

### Obtención de las muestras de líquido amniótico

Se extrajeron 10 mL de líquido amniótico en un periodo de la gestación que osciló entre las 16 y 33 semanas de embarazo mediante la amniocentesis. Las muestras en el laboratorio se procesaron el mismo día de la extracción. En los casos que fueron posibles se realizó el cultivo celular y obtención de cromosomas por los métodos convencionales, según técnica descrita por Margaret y colaboradores<sup>1</sup> y modificada en el laboratorio.

### Preparación de la muestra

Se escogieron muestras en las que el líquido fuera de color claro, para evitar contaminación con sangre materna. Por cada muestra se tomaron de 5-10 mL de líquido amniótico que fue centrifugado a 1 000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue removido y se le añadieron al pellet 4 mL de EDTA-tripsina a 37 °C durante 20 min. Se le realizó la hipotonía (solución de KCl al 0,56 %) durante 20 min a 37 °C. Se realizaron dos fijaciones con metanol-ácido acético (3:1) se guardó a 4 °C durante 1 h. La extensión celular se realizó en láminas limpias y frías. La calidad de la preparación fue verificada en microscopio de contraste de fase.

### Hibridación y detección

Para la identificación de los cromosomas 18, X y Y fueron utilizados un kit de sondas Aneuvision para sondas α -satélite CEP 18 (p11.1-q11.1) marcada con fluorocromo SpectrumAqua, X(p11.1-q11.1) marcada con fluorocromo SpectrumGreen y Y (p11.1-q11.1) marcada con fluorocromo SpectrumOrange.

Para la identificación de los cromosomas 13 y 21 fueron utilizados un kit de sondas Aneuvision para sondas LSI 13 (13q14) marcada con fluorocromo SpectrumGreen y 21 (q22.13-q22.2) marcada con fluorocromo SpectrumOrange. Para la identificación de la delección en 22q11.2 fueron utilizadas las sondas

<sup>IV</sup> Licenciada en Farmacia Clínica. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba

<sup>V</sup> Licenciada en Biología. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba

<sup>VI</sup> Especialista Primer Grado en Genética Clínica. Hospital Pediátrico Docente Pedro Borrás. La Habana, Cuba.

<sup>VII</sup> Técnico de Laboratorio. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba.

<sup>VIII</sup> Master en Ciencias en Bioética. Doctora en Medicina. Especialista de Segundo Grado en Genética Clínica. Profesor Asistente. Departamento de Genética Clínica. Hospital Pediátrico Docente William Soler. La Habana. Cuba.

LSI N25 spectrum orange- LSI ARSA spectrum green o la sonda LSI TUPLE 1 spectrum orange- LSI ARSA spectrum green.

### El análisis cuantitativo

Para la evaluación de las señales fluorescentes la observación se realizó con un lente de inmersión 100X. Los núcleos libres de citoplasma donde el marcaje era evidente fueron los seleccionados para el conteo de las señales. Se analizaron aquellos que tenían 1, 2, 3 y 4 señales dentro del núcleo, se descartaron los que aparecían superpuestos, con una intensa luminosidad o un marcaje débil. Se consideró como una señal si el marcaje estaba dividido en 2, pero la distancia entre las mismas era menor al ancho de una de estas señales. En el presente estudio para el conteo de las señales se asumió el criterio analítico de Ward y colaboradores.<sup>2</sup>

Sobre el análisis del resultado de la técnica FISH las muestras fueron consideradas como informativas normales o anormales. Las muestras fueron consideradas normales/disómicas cuando como mínimo el 90 % de los núcleos examinados mostraron 2 señales para cada cromosoma autosómico analizado (21,18 y 13) y un patrón que se correspondió con la hibridación de los cromosomas sexuales (XX o XY). La muestra se consideró anormal cuando el 60 % o más de los núcleos analizados que hibridaron con las sondas de los cromosomas autosómicos (21,18 y 13) presentaban 3 señales

o un patrón de señales para los cromosomas sexuales diferente al XX o XY. El criterio para la definición del mosaicismo cromosómico aún no está bien definido internacionalmente pero consideramos que con un 20 % o más de células con un patrón de signos diferentes, existe un alto riesgo de mosaicismo cromosómico. Este criterio fue asumido de acuerdo a lo descrito en el prospecto del Kit Aneuvision para estas sondas y la experiencia de otros autores.<sup>3,4</sup>

### Captura y procesamiento de imágenes

Se utilizó el software Cytovision versión 3.9, sección Genus de Applied Imaging para la captura, procesamiento y análisis de las imágenes. Las imágenes fueron capturadas desde microscopios con fluorescencia OLYMPUS BX51. De cada imagen tomada se guardó una versión cruda, como evidencia del marcaje real en los núcleos. Por cada caso se analizaron los núcleos, utilizando un set de filtros individuales para DAPI, Spectrum Aqua, Spectrum Green y Spectrum Gold.

### Aspectos éticos

Las muestras de líquido amniótico se obtuvieron mediante el procedimiento de rutina del DPC establecido en el país que incluye el consentimiento informado previo a la pareja, o al menos a la gestante. El protocolo de esta investigación fue aprobado por el Comité de Ética del Centro Nacional de Genética Médica

### Resultados

El presente estudio implica el periodo de trabajo comprendido entre 2010-2012, donde fueron realizados 104 DPC por la técnica FISH, distribuidos de la siguiente manera: 4 casos en el año 2010, 43 casos en 2011 y 57 casos hasta el 31 de julio del 2012. El motivo de indicación que predominó para la remisión del estudio al laboratorio fue el hallazgo de alguna alteración fetal por ecografía prenatal, seguido de los casos con una avanzada edad materna, casos con antecedentes familiares de enfermedades de origen cromosómico y la indicación *otros* donde están incluidas las gestaciones en adolescentes, fallos en una amniocentesis previa, la ansiedad materna, el descartar un posible mosaicismo en el resultado de una amniocentesis previa y madre portadora de una aberración cromosómica. De los 104 casos diagnosticados se observaron 11 casos positivos: cinco con síndrome Down, uno con trisomía 18 (síndrome de Patau), uno con trisomía 13 (síndrome Edward), un mosaico de síndrome Down, una polisomía del cromosoma X, un posible mosaico de trisomía 18 y una delección en 22q 11.2. Con estos resultados se obtuvo un índice de positividad del 10.5%. De estos 11 casos ocho fueron remitidos al laboratorio por alteraciones detectadas en la ecografía fetal, de los restantes tres casos uno fue remitido debido a que la madre es portadora de un mosaicismo de trisomía 21 y presentaba tres cromosomas X (48,XXX +21[4]/47,XXX[15]), otro porque en una amniocentesis previa de 12 metafases analizadas se observó una con trisomía 21 y el tercero fue un resultado fallido de una amniocentesis previa en una mujer de 43 años. De los casos diagnosticados como positivos por FISH se corroboraron por citogenética convencional dos casos de síndrome Down, un caso de trisomía 18, el caso de trisomía 13, y el mosaicismo de trisomía 21. No fue corroborado por citogenética convencional uno de los casos de síndrome Down. No se realizaron estudios de corroboración citogenética en dos de los casos de síndrome Down, en el caso de la polisomía del X y el de la delección 22q11.2 (Tabla 1).

**Tabla 1.** Casos positivos diagnosticados por la técnica FISH.

| Caso diagnosticado  | Análisis de los núcleos  | Motivo de indicación                                                                      | Corroboration por citogenética convencional                      |
|---------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Trisomía 21         | 90% con 3 señales del 21 | TN 5.4mm, AEM                                                                             | Fue corroborado                                                  |
| Trisomía 21         | 93% con 3 señales del 21 | Quistes del coléodo, pileyctasia renal bilateral                                          | No se realizó estudio de corroboración                           |
| Trisomía 21         | 65% con 3 señales del 21 | Cariotipo materno 47,XXX/48,XXX+21                                                        | Resultado del cultivo de amniocitos: 50 metafases normales 46,XY |
| Trisomía 21         | 81% con 3 señales del 21 | Cardiopatía congénita (canal A-V completo)                                                | Fue corroborado                                                  |
| Trisomía 21         | 97% con 3 señales del 21 | Amniocentesis previa fallida. Paciente de 43 años                                         | No se realizó estudio de corroboración                           |
| Mosaico Trisomía 21 | 13% con 3 señales del 21 | Amniocentesis previa con una célula con trisomía 21 de 12 analizadas                      | Se corrobora el mosaicismo en una 2da amniocentesis              |
| Trisomía 18         | 65% con 3 señales del 18 | CIV, Hernia diafragmática                                                                 | Fue corroborado                                                  |
| Mosaico trisomía 18 | 36% con 3 señales del 18 | Retardo del crecimiento, QPC bilateral, Hueso nasal pequeño, CIV, no se observa estómago. | No se realizó estudio de corroboración                           |
| Trisomía 13         | 95% con 3 señales del 13 | Holoprocencefalía, defecto cardíaco                                                       | Fue corroborado                                                  |

QPC-quistes del plexo coroide, canal A-V-canal aurícula-ventrículo, TN translucencia nucal, CIV-canal intraventricular.

De los datos colectados en el seguimiento de los embarazos, hasta el momento en los 94 casos diagnosticados como normales, solo uno presentó anomalías al nacimiento que no son compatibles con aneuploidías de los cromosomas 21,18,13, X o Y. El niño nació prematuro por lo que se esperará a los 6 meses de edad para realizarle estudio cromosómico en sangre periférica, pero debido a las características fenotípicas que presenta se sospecha una delección del brazo corto del cromosoma 4.

## Discusión

El motivo de indicación **hallazgo de alguna alteración fetal por ecografía prenatal** fue el que predominó en nuestro estudio lo cual explica el alto índice de positividad detectado. Es conocida la relación existente entre determinadas alteraciones fetales, como el aumento del grosor de la translucencia o pliegue nucal, las cardiopatías, el retardo del crecimiento fetal o la holoprocencefalía con las principales aneuploidías presentes durante el embarazo.<sup>5,6</sup> Aproximadamente a la mitad de los casos positivos (6/11) no les fue realizado estudio de corroboración por citogenética convencional, por dos razones fundamentales: en la mayoría de los casos por una avanzada edad gestacional (más de 23 semanas de embarazo) lo cual dificulta el crecimiento del cultivo de células amnióticas, que debe ser realizado entre las 16-20 semanas de gestación. En los casos restantes existió

una correlación entre el hallazgo de la alteración fetal detectada por ecografía y la aneuploidía diagnosticada por FISH, razón por la cual no se hizo estudio de corroboración por citogenética convencional; sin embargo, si se realizó un seguimiento del material abortivo para establecer una correlación entre los resultados del FISH y el resultado final del embarazo. Varios autores han declarado que un aborto legal del embarazo ha sido realizado en sus instituciones hospitalarias cuando ha existido una asociación entre el hallazgo de la aneuploidía detectada por FISH y las alteraciones detectadas en el feto sin realizar estudios citogenéticos convencionales de la muestra.<sup>7-9</sup> Los motivos han sido varios, entre ellos el límite de tiempo para un aborto legal que está en contraposición con la demora para obtener el resultado del cariotipo convencional, otro es la gran ansiedad materna que genera esta espera cuando ya se conoce el resultado anormal del FISH y por último la limitante del cultivo de la células amnióticas fetales después de las 20 semanas de gestación. Uno de los casos diagnosticados como positivo presentó el 65% de las células analizadas con tres señales para el cromosoma 21, además el feto provenía de una madre con un mosaicismo en baja proporción que involucraba la Trisomía 21, el ultrasonido fue normal y se decide esperar el resultado del cariotipo, que fue normal en 50 metafases analizadas, el niño nació normal. Este resultado sugiere un falso positivo, evento inusual

pero reportado por otros autores.<sup>10,11</sup>

En el caso diagnosticado por FISH como normal, que nació con múltiples malformaciones, probablemente debido a una aberración cromosómica estructural desbalanceada, fue imposible realizar una cordocentesis por presentar placenta posterior y el cultivo de células amnióticas no se realizó porque el embarazo estaba en las 25 semanas. Casos como este demuestran la importancia de un correcto asesoramiento genético antes del proceder invasivo de toma de muestra, se hace imprescindible explicarle a

la paciente las ventajas y limitaciones del diagnóstico por FISH en células en interfase. Así fue realizado en este caso y la paciente con pleno conocimiento accedió al diagnóstico prenatal. En conclusión estos resultados demuestran que la técnica FISH en células en interfase combinada con un correcto manejo de las indicaciones de riesgo genético y el cariotipo convencional, cuando sea posible, constituye una nueva estrategia para el diagnóstico prenatal en Cuba.

## Refencias bibliográficas

1. Margaret J. Barch, Turid Knutsen, Jack L. Spurbeck. The AGT Cytogenetics Laboratory Manual. 3rd Revised Edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 1997.
2. Ward DC, Gersen SL, Carelli MP, McGuire NM, Dackowski WR, Weinstein M, et al. Rapid prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by fluorescence in situ hybridization: clinical experience with 4500 specimens. Am J Hum Genet. 1993;52:854-65.
3. Philip J, Bryndorf T, Christensen B. Prenatal aneuploidy detection in interphase cells by fluorescence in situ hybridization (FISH); Prenat. Diagn. 1994;14:1203-15.
4. Eiben B, Trawicki W, Hammans W, Goebel R, Pruggmeyer M, Epplen JT. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidies in uncultured amniocytes by fluorescence in situ hybridization. Evaluation of > 3000 cases; Fetal Diagn. Therapy. 1999;14:193-7.
5. Hyett J, Snock J, Nicolaides KH. Nuchal translucency and the risk of congenital heart disease. Obstet. Gynecol 2007; 109: 1455-1456
6. Comas C, Muñoz A, Torrents M, Antolin E, Palacio M, Devesa R, et al. Screening precoz de cromosomopatías mediante ecografía y Doppler. Prog. Diagn Prenat. 1998, 10: 450-463.
7. D'Alton M, Malone F, Chelmow D, Ward B, Bianchi D. Defining the role of fluorescence in situ hybridization on uncultured amniocytes for prenatal diagnosis of aneuploidies, Am. J. Obstet Gynecol. 176 (1997) 769-776.
8. Eiben B, Trawicki W, Hammans W, Goebel R, Epplen JT. A prospective comparative study on fluorescence in situ hybridization (FISH) of uncultured amniocytes and standard karyotype analysis, Prenat. Diagn. 18 (1998) 901-906.
9. Bryndorf T, Lundsteen C, Lamb A, Christensen B, Philip J. Rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidies by interphase fluorescence in situ hybridization: a one-year clinical experience with high-risk and urgent foetal and postnatal samples, Acta Obstet Gynecol. Scand. 79 (2000) 8-14.
10. Wang JC, Bowser K, Chernos J. Shedding new light on false positive diagnosis of trisomy 21 by fluorescence in situ hybridization (FISH) on uncultured amniotic fluid cells: experiences from two Canadian cytogenetic laboratories. Prenat Diagn. 2007, 27(10):964-6.
11. George AM, Oei P, Winship I. False-positive diagnosis of trisomy 21 using fluorescence in situ hybridisation (FISH) on uncultured amniotic fluid cells. Prenat Diagn. 2003, 23(4):302-5.