

Diagnóstico prenatal ultrarrápido de triploidía por PCR fluorescente

Roberto Coco, Judith Mincman, María Eugenia Polo, Irma Coco, Fernando Gismondi

Fecunditas-Instituto de Medicina Reproductiva –Afiliado a la Facultad de Medicina de la UBA.
Reproducción 2008;23:3-8

Resumen

Se presenta el diagnóstico prenatal de una triploidía digínica detectada por el estudio ecográfico a las 18 semanas de gestación. Los signos de alarma fueron: arteria umbilical única, ventriculomegalia cerebral bilateral, agenesia del cuerpo calloso, circunferencia abdominal disminuida, bradicardia, cinética fetal disminuida y oligohidramnios, los cuales nos llevaron a sospechar la existencia de una aneuploidía cromosómica por trisomía 18 o por triploidía. Se practicó una amniocentesis, y el líquido fue procesado para cultivo estándar de amniocitos para estudio cromosómico y para estudio de aneuploidías por PCR fluorescente usando microsatélites de los cromosomas 13, 15, 16, 18, 21, 22, X e Y. Los resultados de la PCR fluorescente, al mostrar tres señales de cada uno de los cromosomas analizados, nos permitió inferir que se trataba de una triploidía, la cual fue corroborada con el estudio citogenético convencional de los amniocitos cultivados.

Se recalca el valor diagnóstico adquirido de la PCR fluorescente cuando se sospecha una aneuploidía luego de efectuar un screening ultrasonográfico.

Ultra-rapid Prenatal Diagnosis of Triploidy by Fluorescent-PCR

Summary

We present the prenatal diagnosis of triploidy detected by the ultrasonogram study perfor-

med on week 18 of gestation. The principal signs of alarm were the followings: unique umbilical artery, ventriculomegalia, agenesis of corpus callosum, abdominal circumference diminished, bradycardia, fetal kinetic diminished and oligohydramnios. All these signs allow us to suspect the existence of chromosomal aneuploidy, either by chromosome 18 trisomy or triploidy. We performed the amniocentesis. One part of amniotic liquid was processed for standard culture of amniocytes to analysis the karyotype, and the other was ready processed for molecular aneuploidy study using STRs of 13, 15, 16, 18, 21, 22, X and Y chromosomes. The result of the QF-PCR, showing three signal of each one of the analyzed chromosomes, allowed us to conclude a digenic triploidy by an error during first division of the oocyte. The result was corroborated with the conventional cytogenetic analysis of cultured amniocytes.

We stress the diagnosis value acquired of the QF-PCR then of the abnormal obstetric ultrasonogram analysis.

Introducción

La triploidía es una anomalía cromosómica letal que se caracteriza por tener un complemento haploide adicional ($3n = 69$ cromosomas). Esta grosera anomalía cromosómica es causa de aborto espontáneo precoz, nacimiento prematuro y muerte perinatal (Jambon y col, 1998).

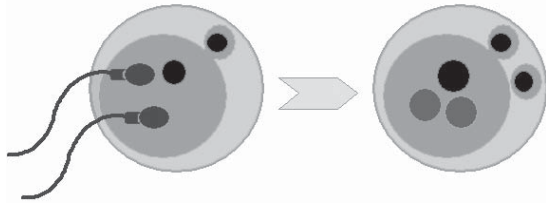
Existen dos mecanismos responsables de la fecundación anormal que origina a la triploidía: la penetración del ovocito por dos espermatozoides y la fecundación de

Correspondencia: Roberto Coco
E-mail: robertococo@fecunditas.com.ar

una de las gametas diploides (ver Esquemas 1, 2, 3 y 4 sobre el origen de triploidías por diandria y diginia).

Esquema 1.

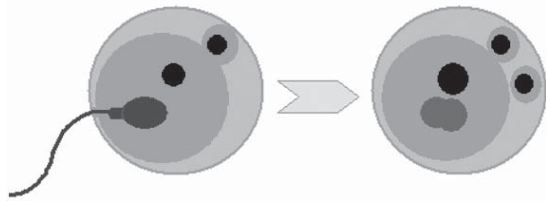
- Diandria por doble penetración



Ovocito normal fecundado por dos espermatozoides.

Esquema 2.

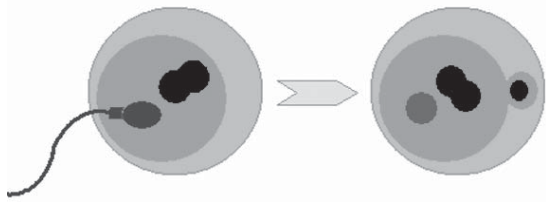
- Diandria por espermatozoide diploide



Ovocito anormal fecundado por un espermatozoide diploide.

Esquema 3.

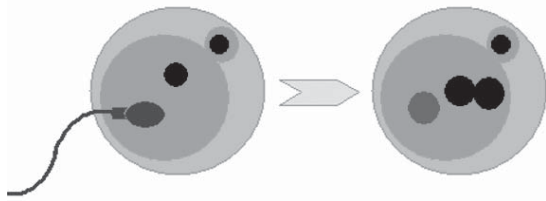
- Diginia por retención del 1^{er} cuerpo polar



Fecundación de un ovocito con retención del primer cuerpo polar por un espermatozoide normal.

Esquema 4.

- Diginia por retención del 2^{do} cuerpo polar



Fecundación de un ovocito normal con un espermatozoide normal, pero con retención del segundo cuerpo polar.

El origen parental del complemento haploide extra incide en el desarrollo fetal y en el tipo de placenta (McFadden & Kaloused, 1991). En la triploidía diándrica en donde el *set* extra es de origen paterno el crecimiento del feto es normal o bien presenta un moderado retraso de tipo simétrico con una placenta con degeneración hidrópica o molar. En cambio, en la triploidía digínica, en donde el *set* extra es de origen materno, la placenta es de tipo normal, pero el feto presenta severo retardo de crecimiento de tipo asimétrico y anomalías tales como: macrocefalia, micrognatia, defectos del sistema nervioso central, ventriculomegalia, anomalías cardíacas, renales, mielomeningocele y deformidades en las extremidades.

Aportamos un nuevo caso de triploidía neonatal pesquisada por el *screening* ecográfico de aneuploidías del segundo trimestre del embarazo, el cual permitió evidenciar que el feto tenía: arteria umbilical única, ventriculomegalia cerebral bilateral, agenesia del cuerpo calloso, circunferencia abdominal disminuida, bradicardia, cinética fetal disminuida y oligohidramnios.

Pacientes y métodos

Se trata de una pareja sana, no consanguínea, de 25 y 29 años de edad, con un hijo previo normal.

El *screening* ecográfico se realizó a las 18 semanas de embarazo evidenciándose los signos de alarma descritos en la introducción.

La pareja, en respuesta a la información recibida, decide realizar la punción de líquido amniótico.

Una parte del líquido amniótico fue procesado para citogenética convencional en medio amniomax durante 7 días para el establecimiento de las colonias y posterior sacrificio de las mismas para estudio cromosómico. Otra parte fue procesada directamente para estudio molecular de aneuploidías cromosómicas por PCR fluorescente. Para ello se realizaron tres *multiplex* con los STRs de los cromosomas 13, 15, 16, 18, 21, 22, X e

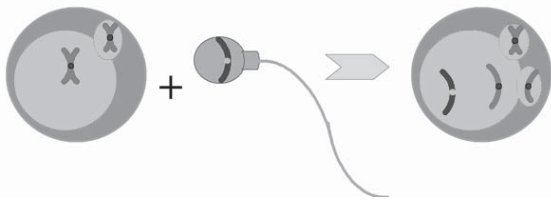
Y, de acuerdo con el protocolo de nuestro laboratorio (Primost y col, 2007).

Los STRs usados fueron: D13S631, D13S284, D15S211, DXS15, D16S520, D16S3082, D18S386, D18S1145, D21S1412, D21S1411, D21S268, D22S280, DXS1055, y AMXY.

Ambos miembros de la pareja fueron caracterizados con los mismos marcadores. Por lo tanto, los tres ADNs fueron analizados para establecer el origen de la segregación de acuerdo a los esquemas explicativos (ver Esquemas 5, 6, 7 y 8 sobre la enumeración cromosómica de acuerdo a la segregación del STR).

Esquema 5.

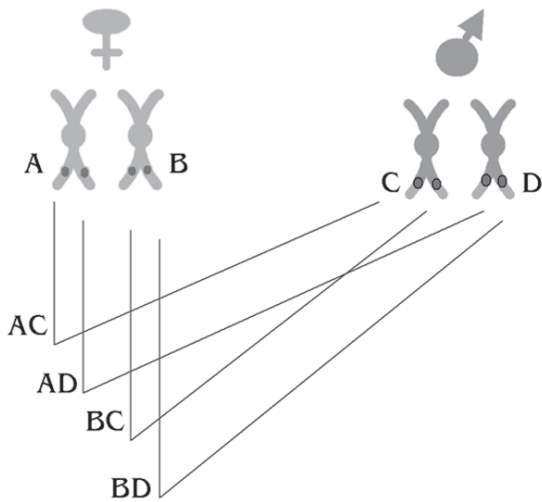
● Segregación en la fecundación normal



Representación de los cromosomas en el ovocito y en el espermatozoide. Solamente se esquematiza a un solo cromosoma de los 23 existentes en cada gameta.

Esquema 6.

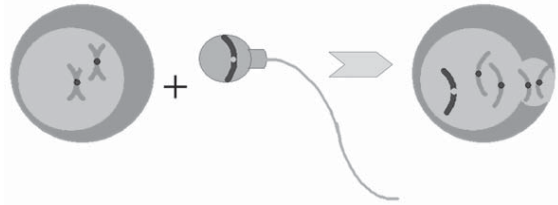
● Segregación normal del marcador



Representación de las cuatro posibilidades de segregación normal de los dos alelos diferentes de los marcadores polimórficos correspondientes a un par cromosómico de los padres.

Esquema 7.

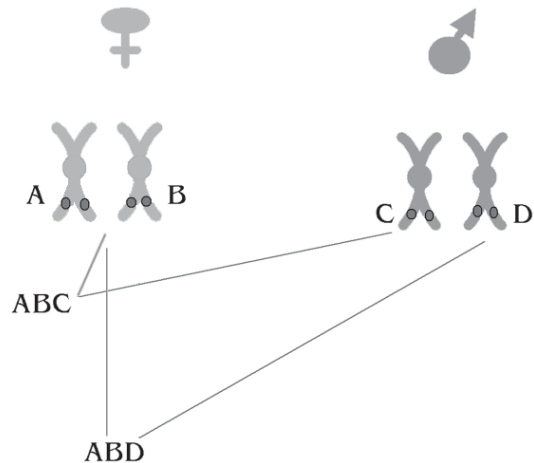
● Fecundación de un ovocito diploide por retención del 1^{er} CP



Representación cromosómica de la fecundación de un ovocito con retención del primer cuerpo polar.

Esquema 8.

● No disyunción materna

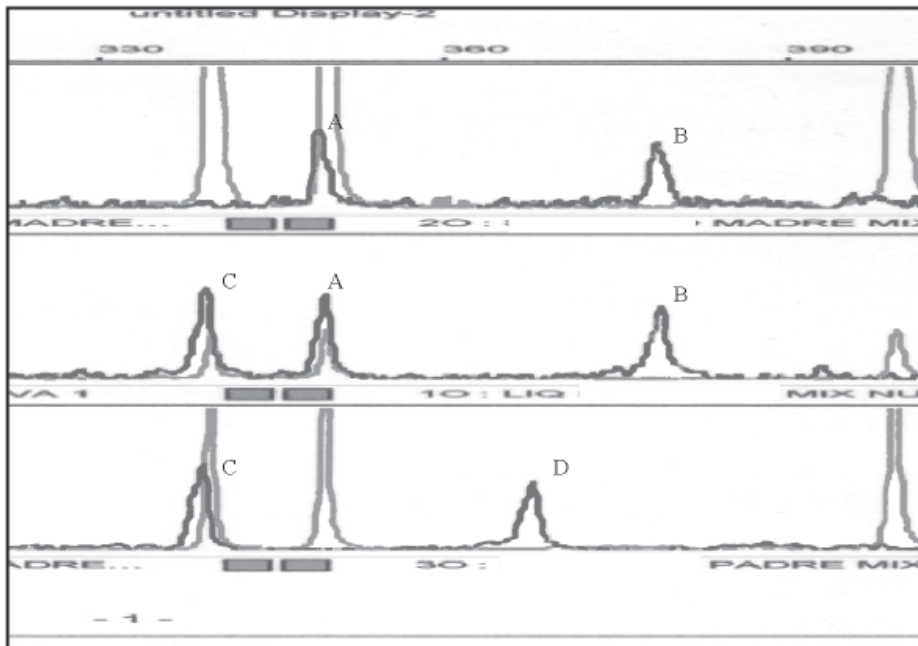


Representación de las dos posibilidades de combinación de los alelos parentales de un par cromosómico cuando el ovocito retiene al primer cuerpo polar.

Resultados

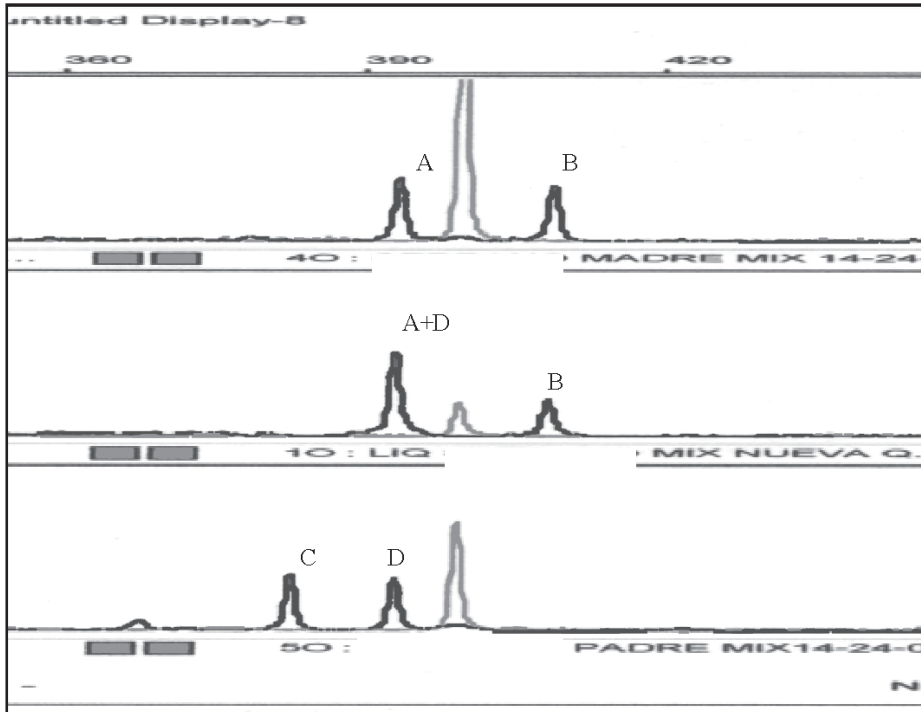
Todos los STRs con alelos diferentes en ambos progenitores evidenciaron tres señales, dos correspondientes a los alelos maternos y un al paterno con un patrón 1:1:1 en el ADN fetal. En cambio, aquellos alelos que fueron iguales en la madre y en el padre evidenciaron un patrón 2:1 en el feto. (ver Figuras I y II de los electroferogramas de dos STRs correspondientes a dos cromosomas diferentes).

Figura 1.



En el panel superior se puede apreciar los dos alelos de un STR para un cromosoma determinado en la madre. En el medio el correspondiente al ADN fetal y en el de abajo al del padre. Claramente se evidencia que la mamá aportó los alelos A y B mientras que el papá el C.

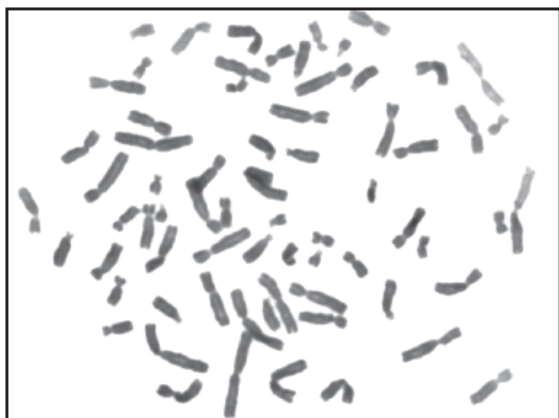
Figura 2.



En el panel superior figuran los alelos maternos, en el del medio los del feto y en el de abajo los del padre. Se puede apreciar que los alelos A de la madre y el D del padre son iguales y que el feto heredó el A y B de la madre y el D del padre, dando un patrón 2:1 debido a que un pico corresponde a la suma de A y D y el otro al B.

El estudio citogenético en los amniocitos cultivados evidenció un cariotipo 69, XXX (ver Foto 1).

Foto 1.



Metafase proveniente de los amniocitos cultivados coloreada convencionalmente con Giemsa.

Discusión

La triploidía es una anomalía frecuente en abortos espontáneos. Su incidencia en nacidos vivos es 1 en 2.500. En línea pura el pronóstico es indefectiblemente letal.

La triploidía constituye un síndrome polimalformativo complejo. Los principales hallazgos clínicos son: hipotonía y bajo peso al nacer; discordancia en las medidas de la cabeza y abdomen; microftalmía; hipertelorismo; colobomas; asimetría facial; orejas malformadas de implantación baja; paladar hendido; sindactilia entre el 3er y 4to dedo; holoprosencefalia; hidrocefalia; agenesia del cuerpo calloso; mielomeningocele; malformaciones cardíacas; omfalocelo; hernia umbilical; hipoplasia adrenal y anomalías genitourinarias (Obersztyn y col, 2002).

La triploidía es el resultado de la presencia extra de un complemento cromosómico hapoide, resultado de diandría o diginia. Forrester & Merz en el año 2003 en un estudio epidemiológico efectuado en Hawái durante 13 años documentaron que el 58% tenían cariotipo XXY, 39% XXX y 3% XYY.

Parece existir correlación entre el fenotipo fetal y el origen de la triploidía, presentando los fetos por diginia retraso de crecimiento, macrocefalia y placenta no quística, en cambio en la triploidía diábrica faltan las dos últimas alteraciones. La tríada degeneración hidrópica de la placenta, retardo de crecimiento intrauterino de comienzo temprano y oligoamnios siempre es sospechoso de triploidía (Salomón y col, 2005). Los hallazgos ecográficos en nuestro paciente (arteria umbilical única, ventriculomegalia cerebral bilateral, agenesia del cuerpo calloso, circunferencia abdominal disminuida, bradicardia, cinética fetal disminuida y oligohidramnios) nos llevaron a sospechar una aneuploidía por trisomía 18 o por triploidía. La constatación de las tres señales para cada uno de los STRs al día siguiente de la amniocentesis prácticamente confirmaba la triploidía, la cual fue corroborada 10 días después con el resultado del cariotipado el que evidenció 69 cromosomas con tres cromosomas X.

En nuestro paciente el mecanismo de producción más probable fue la fecundación de un ovocito diploide por retención o no expulsión del primer cuerpo polar con un espermatozoide euhaploide.

Se creía que más del 80% de las triploidías era por diandría o polipenetración. La triploidía digínica es la más frecuente en fetos y recién nacidos vivos, en cambio la diábrica lo es en abortos espontáneos.

Un 75% de las triploidías digínicas es por retención del segundo cuerpo polar (McFadden y col, 2002). El presente caso fue por retención del primer cuerpo polar.

Se puede decir que la PCR cuantitativa fluorescente es una herramienta diagnóstica de gran valor sobre todo en los casos de signos de alarma de aneuploidías detectados por *screening* bioquímicos y ultrasonográficos en los que en forma ultrarrápida se puede aseverar o descartar la existencia de la misma, como lo ha documentado nuestro

grupo en un trabajo previo publicado en el presente año (Primost y col, 2007).

Por último, además de la rapidez diagnóstica, permite aseverar el origen de la aneuploidía (Ban y col, 2002).

Referencias

Ban Z, Nagy B, Papp C, Toth-Pal E, Papp Z. Rapid diagnosis of triploidy of maternal origin using fluorescent PCR and DNA fragment analysis in the third trimester of pregnancy. *Prenat Diagn* 2002;22:984-987.

Forrester MB, Merz RD. Epidemiology of triploidy in a population-based birth Defects registry, Hawaii, 1986-1999. *Am J Med Genet* 2003;119A:319-323.

Jambon AC, Tillouche N, Valat AS, Guimonnet B, Puech F. Les triploidías. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 1998;27:35-43.

McFadden De, Kaloused DK. Two different phenotypes of fetuses with chromosomal triploidy: Correlation with parental origin of the extra haploid set. *Am J Med Genet* 1991;38:535-538.

McFadden DE, Jiang R, Langlois S, Robinson W. Dispermy—origin of diandric triploidy. *Hum Reprod* 2002; 17 (12): 3038-3038.

Obersztyn E, Kuthowska-Kazmierczak A, Jakubow-Durska K. Clinical expression of triploidy. *Med Wieku Rozwoj* 2002; 6: 329-336.

Primost I, Mincman J, García Estanga P, Coco I, Gismondi E, Neuspiller N, Coco R. Determinación de aneuploidías por PCR fluorescente. *Revista Reproducción de la Sociedad Argentina SAMER Reproducción* 2007; 22: 69-86.

Salomon LJ, Bernard JP, Nizard J, Ville Y. First-trimester screening for fetal triploidy at 11 to 14 weeks: a role for fetal biometry. *Prenat Diagn.* 2005; 25(6): 479-483.