

ESTUDIO CITOGENETICO
EH
VELLOSIDADES CORIALES

Universitat Autònoma de Barcelona
Servei de Biblioteques



1500492082

La Dra, Carmen Fuster Marqués, Profesora Titular de la
Universidad Autónoma de Barcelona, y

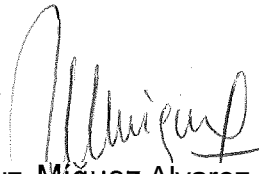
la Dra. M^a Mar Pérez Iribarne, Doctora en Ciencias
Biológicas por la Universidad Autónoma de Barcelona,

CERTIFICAN:

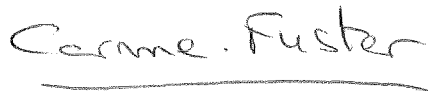
Que Luz Míguez Alvarez ha realizado, bajo su dirección, el
trabajo "Estudio Citogenético en Vellosidades Coriales" para
obtener el título de Doctor en Ciencias Biológicas.

Este trabajo se ha realizado en el Departamento de Biología
Celular y Fisiología (Unidad de Biología de la Facultad de
Medicina) de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Bellaterra, Octubre de 1996



Luz Míguez Alvarez



Carmen Fuster

Dra. Carmen Fuster Marqués



Mª Mar Pérez Iribarne

Dra. M^a Mar Pérez Iribarne

índice

1 INTRODUCCIÓN

- 1.1 Anomalías cromosómicas en la especie humana
 - 1.1.1 Incidencia de anomalías cromosómicas en recién nacidos
 - 1.1.2 Incidencia de anomalías cromosómicas en abortos espontáneos muertes perinatales
 - 1.1.3 Incidencia de anomalías cromosómicas en células germinales
- 1.2 Población de riesgo de tener un hijo con anomalía cromosómica
- 1.3 Diagnóstico prenatal
 - 1.3.1 Técnicas en diagnóstico prenatal
 - 1.3.1.1 Técnicas no invasivas
 - 1.3.1.2 Técnicas invasivas
- 1.4 Vellosidades coriales
 - 1.4.1 Origen y evolución
 - 1.4.2 Tipos de células
- 1.5 Citogenética del corion
 - 1.5.1 Ventajas
 - 1.5.2 Limitaciones
 - 1.5.3 Mosaicismo
- 1.6 Objetivos

2 MATERIAL Y MÉTODOS

- 2.1 Material biológico
- 2.2 Material de laboratorio
 - 2.2.1 Productos
 - 2.2.1.1 Medios base de cultivo
 - 2.2.1.2 Soluciones y Productos
 - 2.2.1.3 Material y soluciones para microfotografía
 - 2.2.2. Aparatos
- 2.3 Metodología experimental en muestras de vellosidades coriales
 - 2.3.1 Preparación medios de cultivo
 - 2.3.2 Extracción de la muestra
 - 2.3.2.1 Semanas de gestación
 - 2.3.2.2 Biòpsia transabdominal y transcervical
 - 2.3.2.3 Recogida y conservación de la muestra
 - 2.3.3 Técnica de procesado de la muestra
 - 2.3.3.1 Caracterización, lavado y selección de la muestra
 - 2.3.3.2 Morfología de las vellosidades coriales
 - 2.3.4 Modalidades de cultivo y extracción del mismo

- 2.4 Técnicas de identificación cromosómica
 - 2.4.1 Tinción uniforme
 - 2.4.2 Tinción de bandas
 - 2.4.2.1 Bandas G
 - 2.4.2.2 Bandas C
 - 2.4.3 Tinción secuencial uniforme-bandas G
- 2.5 Análisis citogenético

3 RESULTADOS

- 3.1 Características generales de la serie estudiada
 - 3.1.1 Indicaciones diagnósticas
 - 3.1.2 Semanas de gestación
 - 3.1.3 Medios de cultivo empleados
 - 3.1.4 Cantidad de muestra y técnica de extracción ginecológica
 - 3.1.5 Frecuencia de abortos debido a la técnica de extracción
- 3.2 Resultados citogenéticos
 - 3.2.1 Rendimiento de la técnica
 - 3.2.1.1 Factores que influyen en la obtención de diagnóstico citogenético
 - 3.2.1.2 Obtención de diagnósticos mediante repetición de la extracción de muestra
 - 3.2.2 Anomalías cromosómicas observadas
 - 3.2.2.1 Tipo y frecuencia de anomalías cromosómicas
 - 3.2.2.2 Mosaicos cromosómicos
 - 3.2.2.3 Discrepancias cromosómicas
 - 3.2.3 Factores que influyen en la aparición de anomalías cromosómicas
 - 3.2.3.1 Indicación diagnóstica
 - 3.2.3.2 Edad materna
 - 3.2.3.3 Edad gestacional
 - 3.2.3.4 Medio de cultivo
- 3.3 Fragilidad cromosómica espontánea
 - 3.3.1 Posible influencia del medio de cultivo utilizado y de la edad gestacional
 - 3.3.2 Distribución de las lesiones cromosómicas en el cariotipo
- 3.4 Descondensación de la heterocromatina constitucional
 - 3.4.1 Posible influencia del medio de cultivo utilizado y de la edad gestacional.

4 DISCUSIÓN

- 4.1 Características generales de la serie estudiada
 - 4.1.1 Indicaciones diagnósticas
 - 4.1.2 Posible efecto de la metodología de extracción de vellosidades coriales en la evolución fetal y perinatal
- 4.2 Optimización de la técnica citogenética para el análisis de vellosidades coriales
- 4.3 Valoración del Rendimiento de la técnica
 - 4.3.1 Factores que influyen en la obtención de diagnóstico citogenético
 - 4.3.1.1 Cantidad y calidad de la muestra
 - 4.3.1.2 Edad gestacional
 - 4.3.1.3 Edad materna
 - 4.3.1.4 Medio de cultivo
 - 4.3.2 Obtención de diagnósticos mediante repetición de muestra
- 4.4 Valoración del diagnóstico citogenético
 - 4.4.1 Anomalías cromosómicas
 - 4.4.1.1 Tipo y frecuencia de anomalías cromosómicas
 - 4.4.1.1.1 Tipo y frecuencia de anomalías cromosómicas en vellosidades coriales respecto a otros tejidos del proceso reproductivo
 - 4.4.1.2 Mosaicos cromosómicos
 - 4.4.1.3 Discrepancias cromosómicas
 - 4.4.2 Factores que influyen en la aparición de anomalías cromosómicas
 - 4.4.2.1 Indicación diagnóstica
 - 4.4.2.2 Edad materna
 - 4.4.2.3 Edad gestacional
 - 4.4.2.4 Medio de cultivo: pseudomosaicos
- 4.5 Fragilidad cromosómica espontánea
 - 4.5.1 Relación con el tipo de medio de cultivo utilizado y la edad gestacional
 - 4.5.2 Distribución de las lesiones cromosómicas en el cariotipo.
- 4.6 Descondensación de la heterocromatina
 - 4.6.1. Posible influencia de las condiciones de cultivo en la descondensación espontánea de la heterocromatina constitutiva en vellosidades coriales.
 - 4.6.2 Posible influencia de la edad gestacional o de la duración de la fase G_2 en la descondensación espontánea de la heterocromatina en vellosidades coriales.
 - 4.6.3 Posible papel de la heterocromatina descondensada en vellosidades coriales.

5 CONCLUSIONES

6 BIBLIOGRAFÍA

1. INTRODUCCIÓN

1, INTRODUCCIÓN

1.1 Anomalías cromosómicas en la especie humana

La infertilidad y la elevada tasa de mortalidad que afecta al proceso reproductivo humano son cuestiones de gran interés a las que se ha dedicado y se le siguen dedicando trabajos exhaustivos en diferentes equipos de investigación.

Analizando los factores que pueden incidir en la viabilidad de embriones preimplantacionales, Edwars (1986), ha estimado que un 70% de las concepciones humanas se pierden durante el primer trimestre de la gestación. Por tanto, sólo el 30% de las gestaciones sobreviven hasta el 2º trimestre de gestación (Figura 1).

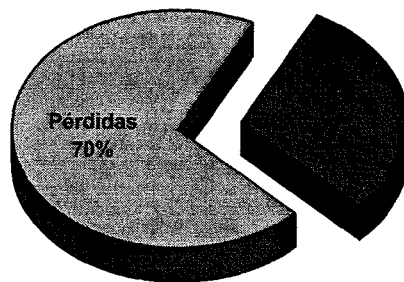


Figura 1. Evolución de las concepciones en el primer trimestre de gestación

De las concepciones reconocidas un 15% originarán abortos espontáneos, un 1,7% son muertes perinatales (nacidos muertos y muertes tempranas de neonatos), y el 83,3% restante conseguirán llegar al final de la gestación (nacidos vivos). (Sankaranarayan, 1979; UNSCEAR, 1982). (Figura 2).

Las anomalías cromosómicas son una de las causas más importantes de la reducida fecundidad en la especie humana y constituyen el grupo etiológico más frecuente de deficiencia mental grave en los países desarrollados. Es necesario hacer estudios citogenéticos en diferentes momentos del proceso reproductivo para determinar la incidencia, supervivencia y posible transmisión de las anomalías cromosómicas a la descendencia. Cuatro de cada mil adultos son portadores de una cromosomopatía. Aproximadamente la mitad de ellas se presentan de forma equilibrada, generalmente sin repercusión fenotípica en el portador, pero con la posible aparición de problemas reproductivos. (Jacobs, 1987).

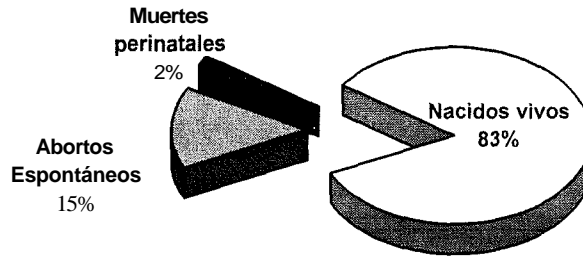


Figura 2. Evolución de los embarazos una vez detectados

En la población general, las anomalías cromosómicas constituyen un importante problema sanitario. La incidencia de anomalías cromosómicas graves es aproximadamente de 1 cada 200 nacidos vivos (0,6%); 1 de cada 20 muertes perinatales (5%) y 1 de cada 2 en abortos espontáneos (50%).

En la Tabla 1 se indican las frecuencias y tipos de anomalías cromosómicas en recién nacidos, muertes perinatales y abortos espontáneos (Sankaranarayanan, 1979; UNSCEAR, 1982).

Las anomalías cromosómicas más comunes son las trisomías autosómicas (trisomía 21, trisomía 18 y trisomía 13) y cuatro tipos de aneuploidías sexuales: Síndrome de Turner (45,X), Síndrome de Klinefelter (47,XXY), 47,XYY y 47,XXX. La triploidía y tetraploidia ocurren en un pequeño número de casos, particularmente en abortos espontáneos (Figura 3).

Tabla 1.- Anomalías cromosómicas en recién nacidos, muertes perinatales y abortos espontáneos (Sankaranarayan, 1979; UNSCEAR, 1982).

		Nacimientos 850.000		Abortos espontáneos 150.000 (15%)	
		Nacidos 833.000(98%)		Muerte Perinatal 17.000 (2%)	
		5.248 (0,6%)		850 (5%)	
				75.000 (50%)	
Anomalías cromosómicas					
Aneuploidías sexuales		1.960	(37.0%)		14.100 (19%)
Varones		1.513	(77.0%)		
47,XYY		533	(35,2%)		
47,XXY		521	(34,4%)		
Mosaico		459	(30,3%)		
Mujeres		447	(22,8%)		
47,XXX		298	(66,6%)		
45,X		25	(5,6%)		
Mosaico		124	(27,7%)		
Trisomías autosómicas		1.179	(23 %)	640	(75,%) 39.975 53%)
+21		1.005	(85,2%)		
+18		100	(8,5%)		
+13		37	(3,1%)		
Mosaico		37	(3,1%)		
Anomalías estructurales					
Equilibradas		1.650	(31.0%)	170	(20.%) 3.075 (4.%)
t-Robertsonianas		769	(46,6%)		
t-recíprocas		732	(44,4%)		
inversiones		149	(9.0%)		
No equilibradas		459	(9.0%)	40	(5%) 17.900 (24%)
Triploidías					12.300 (16.4%)
Tetraploidía					4.200 (5.6%)
Poliploidías				40	(5%)
Otros					1.350 (1.8%)

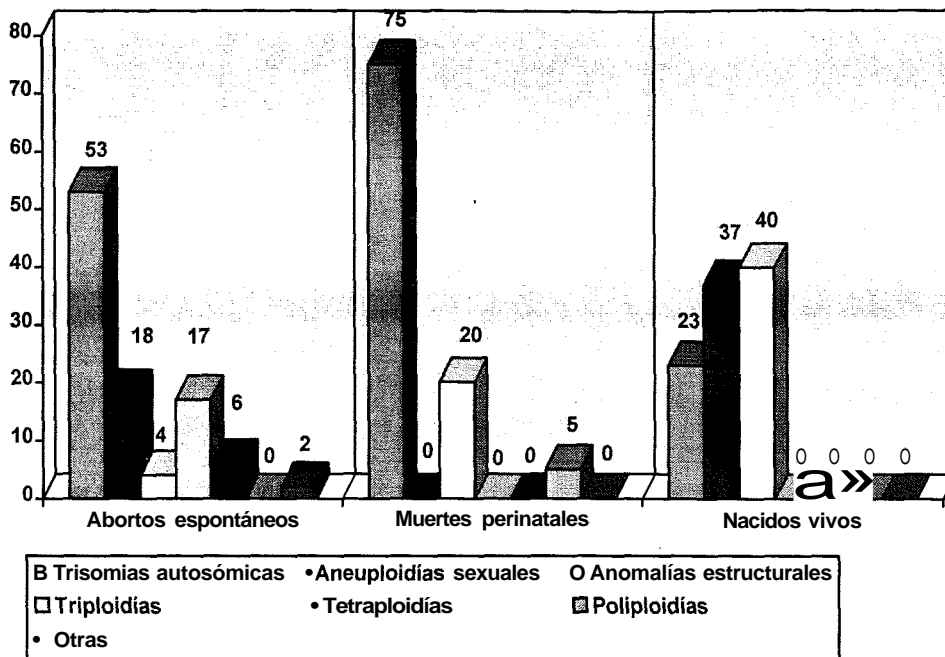


Figura 3. Frecuencia de anomalías en abortos, muertes perinatales y recién nacidos

1.1.1 Incidencia de anomalías cromosómicas en recién nacidos.

Los primeros estudios que incluyen series amplias de anomalías cromosómicas en la población de recién nacidos se iniciaron en los años sesenta. Hook y Hamerton en 1977 publican una recopilación de seis series en las que analizan un total de 56.952 nacimientos. Thompson (1991) analiza la frecuencia de anomalías cromosómicas en recién nacidos sobre 10.000 casos. En la Tabla 2, se muestran los resultados citogenéticos de ambas publicaciones así como los publicados por UNSCEAR, (1982).

Tabla 2 Anomalías cromosómicas en recién nacidos.

Anomalías	Hook 1977 %	UnscEAR 1982 %	Thompson 1991 %
Total anomalías cromosómicas	0,62	0,63	0,57
Sexuales	0,22	0,24	1,08
Autosómicas	0,14	0,14	0,14
Estructurales equilibradas	0,19	0,20	0,18
Estructurales no equilibradas	0,06	0,06	0,05
Otras	0,01	-	0,02

El porcentaje de anomalías cromosómicas en recién nacidos es del orden del 0.6%, lo que significa 1 anomalía de cada 160 nacidos aproximadamente.

La Tabla 3 muestra con detalle la incidencia de cada tipo de anomalía según los datos publicados por UNSCEAR (1982). Hacemos referencia a esta serie debido a que es la más amplia. Las anomalías observadas con mayor frecuencia son las aneuploidías sexuales que suponen un 0,24% del total de nacidos vivos (1 de cada 425) y un 37% del total de anomalías. Las aneuploidías sexuales en varones están presentes en un 0,18% del total de nacidos (1 de cada 551), y un 77,2% del total de las aneuploidías sexuales. La más común es la trisomía 47,XYY seguida de la 47,XXY y de anomalías en mosaico. Las anomalías sexuales en mujeres son mucho menos frecuentes, del orden del 0,05% del total de nacidos (1 de cada 1864). y un 22,8% de las aneuploidías sexuales. La de mayor incidencia es la trisomía 47,XXX seguida de anomalías en mosaico y la monosomía 45,X.

Tabla 3. Incidencia de las principales anomalías cromosómicas en recién nacidos (UNSCEAR, 1982)

Tipo de Anomalía	Incidencia
Aneuploidías sexuales	1/425
Varones	1/551
47,XYY	1/1563
47,XXY	1/1599
Mosaico	1/1815
Mujeres	1/1864
47,XXX	1/2795
45,X	1/33320
Mosaico	1/6718
Trisomías autosómicas	1/707
+21	1/829
+18	1/8330
+13	1/22514
Mosaico	1/22514
Estructurales equilibradas	1/505
t-Robertsonianas	1/1083
t-recíprocas	1/1138
inversiones	1/5591
Estructurales no equilibradas	1/1815

Las anomalías estructurales equilibradas siguen en frecuencia a la aneuploidías sexuales, ya que suponen el 0,19% del total de nacidos (1 de cada 505) y el 31% del total de anomalías cromosómicas. Encontramos en este grupo las translocaciones Robertsonianas, translocaciones recíprocas e inversiones.

Las trisomías autosómicas, suponen un 0,14 % del total de nacidos (1 de cada 707), y un 23% del total de anomalías cromosómicas. Del grupo de anomalías autosómicas, la trisomía 21 es la más frecuente con un 85,2% (1/829) seguida de la trisomía 18 (8,5%), trisomía 13 (3,1%) y mosaicos (3,1%).

Finalmente, las anomalías estructurales no equilibradas representan un 0,06% del total de nacidos (1/1815) y suponen un 9% del total de anomalías cromosómicas.

1.1.2 Incidencia de anomalías cromosómicas en abortos espontáneos y muertes perinatales.

Un 15-20% de las concepciones reconocidas degeneran en abortos espontáneos (Warburton, 1987; Creasy, 1988), es decir, la interrupción del embarazo antes de la veinte semana de gestación o cuando el feto presenta un peso inferior a 500 gramos. Esta incidencia está subestimada y la frecuencia incrementa al tener en cuenta las pérdidas preimplantacionales.

Es difícil hacer una estimación de la incidencia de pérdidas preimplantacionales debido a que la mayoría se produce antes de la primera falta menstrual y pasan desapercibidas. Los valores estimados varían según los estudios. Las primeras estimaciones presentan valores bajos: del 30% y del 43% (Carr, 1971; Opitz, 1987). A medida que se perfeccionan las técnicas de análisis los valores de estimación de las pérdidas preimplantacionales aumentan. Edmonds y col. (1982) empleando una técnica de radioinmunoensayo, determina los niveles de la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana en la orina , y encuentran un 62% de pérdidas gestacionales. Edwards (1986), teniendo en cuenta los factores que pueden incidir en la viabilidad de embriones pre-implantacionales, propone que un 70% de todas las concepciones humanas se pierden en el primer trimestre de la gestación.

Recientemente se han publicado estudios de embriones pre-implantacionales obtenidos de series de fecundación "in vitro", después de una selección morfológica y una elección de los embriones morfológicamente correctos para la implantación, los embriones desechados han sido analizados mediante técnicas de hibridación "in situ". (Pellestor y col., 1994; Munné y col. 1994), para los tres cromosomas estudiados (X, Y, 18) el porcentaje de embriones con anomalías cromosómicas numéricas ha sido del 56,5%. Con cariotipo diploide, un 43,5% fueron normales y un 6,1% aneuploidías totales. Un 18,3% han sido mosaicos. Respecto a

los embriones poliploides (mosaicos y no mosaicos) el porcentaje de anomalías ha sido del 32,8% (Munné y col, 1994).

En cuanto a las pérdidas postimplantacionales, un 90% se producen durante el primer trimestre de la gestación, correspondiendo a una edad gestacional inferior a las ocho semanas. A la muerte embrionaria le sigue un periodo de retención dentro del útero, inferior a las ocho semanas de gestación (Boué y col. 1985).

Se considera que un 50-60% de los abortos espontáneos del primer trimestre presentan una anomalía cromosómica (Kajii y col. 1980; Boué y col. 1985; Ohno y col. 1991; De Vita y col., 1993). Las anomalías cromosómicas numéricas son las más frecuentes, constituyendo casi la totalidad de las anomalías halladas (95%) (Andrews y col. 1984; Boué y col. 1985; Creasy, 1988; Appelman y col 1990; Eiben y col. 1990; De Vita y col., 1993). Las anomalías cromosómicas estructurales presentan un 4-5% (Boué y col. 1985); Cano de Trigo y col. 1985; Creasy, 1988; Eiben y col. 1990; Ohno y col. 1991). Respecto a estas últimas el 50% son heredadas y el otro 50% se producen "de novo" (Boué, 1980).

De las anomalías cromosómicas numéricas las más frecuentes son las trisomías (26,7%), seguidas de las aneuploidías sexuales (9,4%), las triploidías (8,2%), y las tetraploidías (2,8%). Se han descrito trisomías para todos los cromosomas humanos excepto para el cromosoma número uno (Boué y col. 1985), aunque Watt y col. (1987), han publicado el hallazgo de un embrión de veinte células, de un programa de fecundación "in vitro", con trisomía 1. Según los estudios realizados por Lauritsen (1982), la trisomía 16 es la más frecuente con una incidencia del 32,3%. Le siguen en frecuencia las trisomías 21 y 22 con un 9,4 % y 10,2% respectivamente. Otras trisomías como las de los cromosomas del grupo D (16,9%), la 18 (5,1%), la 2 (4,9%) y la 7 (4%), son también frecuentes. Las trisomías para los cromosomas 3, 5, 6, 7, 11, 12, y 19 son raras. (Figura 4).

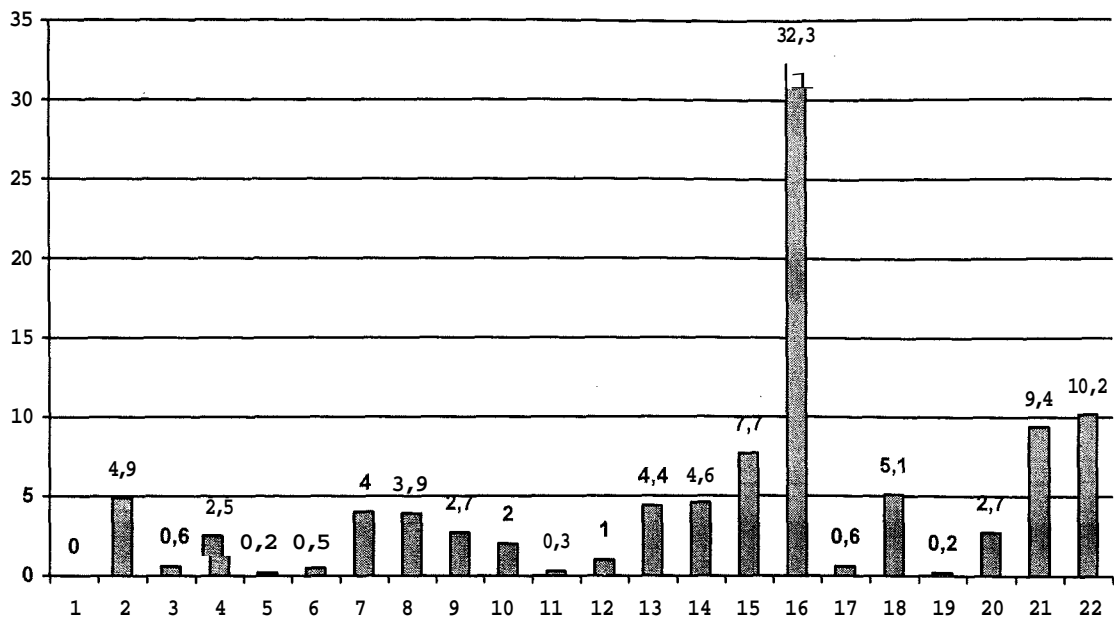


Figura 4. Trisomías en abortos espontáneos

En contraposición con las trisomías autosómicas, las monosomías autosómicas son muy raras, sólo se han descrito la monosomía 21 en mosaico (Ghidini y col., 1993), y la monosomía 22 completa (Merino y col., 1995).

La incidencia de anomalías cromosómicas en abortos disminuye a medida que aumenta el tiempo de gestación (Boué y col. 1985).

Un 2% de los embarazos a término pueden evolucionar como una muerte perinatal. De ellas un 5% son debidas a anomalías cromosómicas, aunque Hsu (1986) propone una incidencia algo superior 6,3%. Las más frecuentes son las trisomías (3,76%), seguidas de aberraciones estructurales (1%).

1.1.3. Incidencia de anomalías cromosómicas en células germinales

Los estudios citogenéticos realizados en abortos espontáneos y muertes perinatales han demostrado la gran frecuencia y variedad de las anomalías cromosómicas que pueden producirse en la concepción. Según Boué y col (1985), parece que cualquier posible error responsable de una anomalía cromosómica podría ser observado en el momento de la concepción.

Hasta hace relativamente poco tiempo, los datos sobre anomalías cromosómicas en gametos humanos eran inexistentes. Basándose en estudios de abortos se hacían

extrapolaciones para calcular la posible frecuencia de anomalías cromosómicas producidas en la concepción. Estos cálculos variaban de un 20% (Ford, 1972) a un 50% (Boué y col. 1975).

Con la introducción de los tratamientos de fecundación "in vitro" y de la técnica de fertilización interespecifica hámster-humano, se ha podido acceder al estudio citogenético de ovocitos y espermatozoides humanos. La incidencia de anomalías cromosómicas en espermatozoides humanos varía en cada serie estudiada, oscilando entre el 7% y el 15% (Tabla 4). La incorporación de la técnica de hibridación "in situ" ha permitido realizar las primeras estimaciones de aneuploidías en espermatozoides. Los valores obtenidos se refieren a cromosomas concretos estudiados en cada una de las series. Las sondas más utilizadas suelen ser para los cromosomas 1, 12, 15, 18, X e Y (Bischoff y col, 1994; Spriggs y col, 1995; Pellestor y col, 1996). Bischoff y col (1994) determinan un porcentaje de aneuploidías en espermatozoides de 19% para los cromosomas 1,12,15,16,X e Y. Spriggs y col (1995) realizan un estudio para los cromosomas 1,3,4,6,7,8,10,11,12,15,16,17,18, X e Y, los valores hallados en disomías oscilan entre un 0,07% para el complemento cromosómico XX y un 0,21% para el YY. Pellestor y col.(1996) utiliza las técnicas de FISH y PRINS para el estudio de núcleos de espermatozoides humanos y obtiene valores de disomías y diploidías para los cromosomas 4 (0,27%),9 (0,30%)y 18 (0,32%).

Tabla 4. Anomalías cromosómicas del espermatozoide humano

	espermatozoides		aneuploidias	estructurales.	total
	nº	%	%	%	%
Rudak y col (1978)	60	5,0	1,7		6,7
Martin y col (1983)	1000	5,1	3,3		8,4
Kamiguchi y Mikamo (1986)	1091	0,9	13,0		13,9
Benet y col (1988)	505	4,0	6,9		10,9
Mikamo y col (1990)	9820	1,4	13,9		15,3
Martin y col (1991)	5629	1,4	9,4		10,8
Pellestor (1991)	1561	6,1	3,5		9,6
Estop y col (1991)	555	4,0	3,6		7,6
Brandriff y col (1994)	5998	1,6	6,9		8,5

En ovocitos los valores oscilan entre un 20% y un 35% (Tabla 5). Estos valores indican que las células germinales masculinas y femeninas difieren claramente en sus frecuencias de anomalías cromosómicas, siendo mucho mayor en ovocitos. Existen además diferencias en cuanto a los tipos de anomalías encontradas. En ovocitos son casi exclusivamente numéricas, mientras en espermatozoides también encontramos anomalías estructurales con una elevada frecuencia. En general, tanto en ovocitos como en espermatozoides las hipohaploidías son más frecuentes que las hiperhaploidías (Martin y col. 1991).

Tabla 5. Anomalías cromosómicas en ovocitos humanos

Autores	Metafases II analizadas	aneupl. %	Estruç %	Total %
Wramsby y Liedholm (1984)	8	25,0	-	25,0
Martin y col (1986)	50	30,0	4,0	34,0
Wramsby y Fredga (1987)	52	50,0	1,9	51,9
Veiga y col (1987)	102	10,8	4,9	15,7
Wramsby y col (1987)	21	57,1	-	57,1
Plachot y col (1988)	316	24,0	-	24,0
Bongso y col (1988)	251	21,1	0,4	21,5
Van Blerkom y Henry (1988)	135	8,1	-	8,1
Djalali y col (1988)	96	27,1	-	27,1
Ma y col (1989)	65	26,1	-	26,1
Pieters y col (1989)	28	21,4	-	21,4
Benkhalifa y col (1990)	302	24,8	-	24,8
Delhanty y col (1990)	155	45,8	-	45,8
Macas y col (1990)	55	25,4	3,6	29,0
Pellestor (1991)	413	27,3	0,7	28,0
Martin y col (1991)	772	18,5	1,2	19,7
Kamiguchi y col (1993)	185	11,4	4,9	16,3

1.2 Población de riesgo de tener un hijo con anomalía cromosómica

Cualquier pareja tiene un riesgo potencial de tener un hijo con una malformación congénita. Sin embargo, hay embarazos con mayor riesgo que el de la población general. Se conocen una serie de indicaciones que determinan la necesidad de aplicar un diagnóstico prenatal para detectar alteraciones cromosómicas. Entre las principales se encuentran la edad materna, el aborto de repetición, padres portadores de una translocación o inversión equilibrada e hijo anterior afecto.

Edad materna. Se ha determinado la existencia de una relación estrecha entre la edad materna y el riesgo de tener descendencia con trisomías (Figura 5). Dentro de las trisomías autosómicas las principales son la trisomía 21, la 13 y la 18; y dentro de las trisomías sexuales se encuentran la 47,XXY y 47,XXX (Penrose y Smith, 1966; Turpin y Lejeune, 1969; Hook y col, 1984; Hasold y Jacobs, 1984; Ferguson-Smith y Yates, 1984; Snijders y col, 1994; Little y col, 1995).

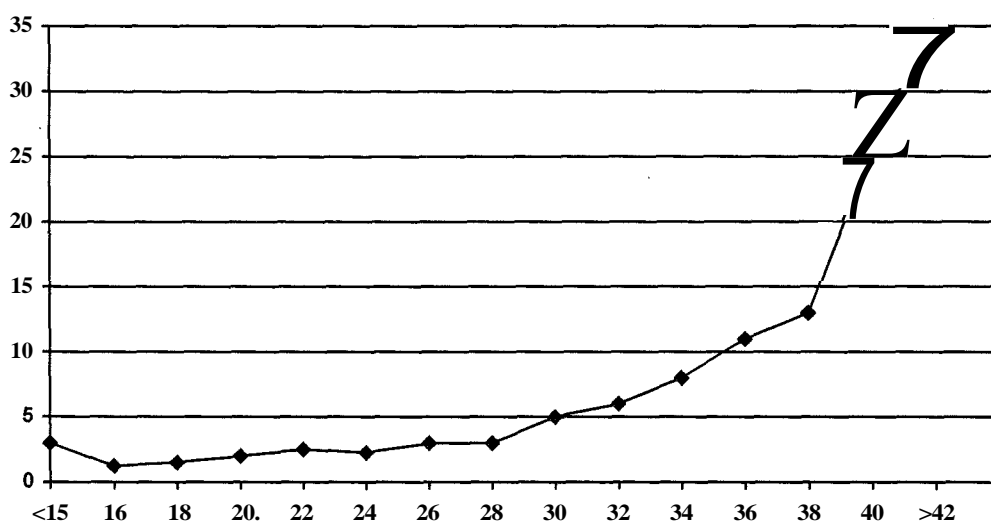


Figura 5. Incidencia de trisomías respecto a la edad materna (Hasold y Jacobs, 1984).

No existe una evidencia del efecto de las condiciones ambientales sobre las aneuploidías, pero en las poblaciones en las que existe un aumento de edad de las gestantes, se observa un aumento de las frecuencias de anomalías cromosómicas en su descendencia. Ello hace pensar que el aumento de edad podría influir en el origen de las anomalías (Evans y col, 1986; Connor y Ferguson-Smith, 1993).

Aunque Penrose (1933) estableció la relación, por primera vez, entre aparición de trisomía 21 y edad materna, esta asociación ha sido confirmada posteriormente por diversos autores (Lejeune y col, 1959; Ford y col, 1959; Bricarelli y col, 1989; Connor y col, 1993; Muller y col, 1994).

En nuestros días el efecto de la edad materna no está totalmente conocido. Existen numerosas hipótesis para explicar la aparición de procesos de no-disyunción y la edad materna en humanos. Entre las más importantes figuran las siguientes:

Nucléolo persistente La frecuencia de un nucléolo persistente en profase I, se incrementa con la edad de la madre (Polani y col, 1960; Miller, 1981). Los cromosomas acrocéntricos se aproximan al nucléolo evitando la formación de quiasmas normales, lo que puede provocar errores en el apareamiento de los bivalentes, posibilitando una mala segregación. Esta hipótesis no explicaría la alta frecuencia de trisomías de cromosomas no acrocéntricos observada en abortos (Hasold, 1986).

Recombinación de no-homólogos Es una modificación de la hipótesis anterior propuesta por Choo (1990), propone que la fusión nucleolar en profase I, conduce a la recombinación entre cromosomas no-homólogos. La no-disyunción en cromosomas podría estar condicionada no sólo por la homogeneidad del DNA centromérico de los cromosomas acrocéntricos, sino tal como ha observado Palka y col. (1990) por la asociación de regiones de heterocromatina. Esta hipótesis explicaría la elevada frecuencia de trisomía 16 en abortos, ya que dicho cromosoma posee un gran bloque de heterocromatina centromérica.

Desequilibrio hormonal. El desequilibrio hormonal observado al principio y final de la vida reproductiva de la mujer, explicaría el incremento de aneuploidías observada en los primeros años de vida reproductiva y el periodo pre-menopausico (Erikson, 1978; Crowley y col 1979; Hassold, 1984).

Microcirculación. Recientemente, Gaulden (1992) propone una hipótesis para la explicación de la no-disyunción y la edad materna. Según este autor, los ovocitos aneuploides se originan por una concatenación de sucesos. Estos comenzarían por un desequilibrio hormonal, que originaría un desarrollo menor de la microvasculación que rodea a los folículos maduros, decreciendo la capilaridad perifolicular y reduciéndose el volumen de sangre en esta área. El déficit de oxígeno y el incremento de dióxido de carbono y productos anaerobios producidos dentro del folículo provocaría el desplazamiento y no-disyunción de los cromosomas.

Selección de ovocitos. Existe un mecanismo que favorece la maduración y utilización de los ovocitos normales en detrimento de los aneuploides producidos por no-disyunción. Con la edad se observaría la alteración de este mecanismo lo que explicaría el incremento de la utilización de los ovocitos aneuploides con la edad avanzada (Zheng y Byers, 1992).

Impronta genómica. Se ha observado que determinados genes son activados o inactivados de forma específica en los cromosomas de origen materno o paterno. Además, el hecho de que un 95% de las trisomías 21 sean de origen materno (Serra y Neri, 1990) ha llevado a sugerir que los casos de trisomía 21 de origen paterno sean menos viables, mientras que los de origen materno serían más viables (Egozcue, 1991).

Aborto de repetición. La incidencia de alteraciones cromosómicas en la descendencia de individuos con abortos de repetición es 10 veces superior que en la población general. La existencia de una anomalía cromosómica en uno de los miembros de la pareja es una de las causas de aborto habitual (Tho y col. 1979; Harger y col. 1983; Stray-Pedersen 1984; Coolam, 1986; Partnoi y col, 1988; Connor y col, 1993). Después de dos abortos espontáneos se considera necesario realizar el cariotipo paterno y materno por sospecha de un complemento cromosómico anómalo.

Padres portadores de una translocación o inversión equilibrada. Si uno de los dos progenitores es portador equilibrado, durante su meiosis pueden producirse gametos con un complemento equilibrado o desequilibrado. La frecuencia de gametos anómalos y el riesgo de recurrencia dependen del tipo de alteración cromosómica de que sean portadores y, en algunos casos, del sexo del progenitor portador.

En el caso de translocaciones que involucran a cromosomas del grupo G con los del grupo D, pueden darse tres tipos de cariotipo en la descendencia: uno con trisomía, otro normal y otro con la misma translocación equilibrada que la del progenitor portador. El riesgo teórico para cada componente cromosómico es del 33%. El riesgo de recurrencia observado depende del sexo del progenitor portador. Si la portadora es la madre es un 11%, mientras que si es el padre es de un 2%, siendo la disyunción 3:1 más frecuente en la gametogénesis femenina. (Iselius y col, 1983). Las razones para esta discrepancia de las tasas esperadas es desconocida.

En el caso de una translocación Robertsoniana 21q; 21q, independientemente del sexo del progenitor portador, todos los gametos serán anormales y sólo se formarán cigotos monosómicos inviables o trisómicos.

Una de las inversiones equilibradas más comunes es la inversión pericéntrica del cromosoma 9. La frecuencia de aparición en la población general es del 1,2%. Esta

frecuencia es ligeramente superior (2,4%) en parejas con problemas reproductivos (Galán y col. 1991). La inversión pericéntrica del cromosoma 9 se ha relacionado con la influencia de aneuploidías en la descendencia. Sutherland y col. (1976), han determinado que los heterocigotos para esta inversión tienen un riesgo de tener descendencia con aneuploidías de un 5-10% si han tenido un hijo previamente afectado, y del 1% si su descendencia ha sido normal. El riesgo de repetición es de 5% si el portador es el padre y 10% si la portadora es la madre.

Hijo anterior afecto. Cuando una pareja ha tenido un hijo anterior portador de una anomalía cromosómica es necesario determinar el tipo de anomalía y si ésta se ha producido "de novo" o es heredada de uno de los progenitores.

En el caso de la trisomía 21, las gestantes que han tenido previamente un hijo con Síndrome de Down, tienen un 15-20% de riesgo adicional de tener un nuevo hijo con dicho Síndrome con independencia de la edad. El riesgo aumenta de 30 a 50 veces más si la madre tiene menos de 25 años (sospecha de alteración cromosómica en uno de los progenitores) y 45 veces más si tiene una edad entre 25 y 39 años. En general, una de cada 60 mujeres con un hijo con Síndrome de Down engendrará otro hijo con la misma anomalía cromosómica.

Otras indicaciones. Además de todas las detalladas anteriormente, el diagnóstico prenatal es indicado para casos de familias con retraso mental ligado al X, en Síndromes de inestabilidad cromosómica, en casos con consanguinidad, meiosis paterna anómala, exposición a radiación, diagnóstico ecográfico previo que muestra anomalías en el desarrollo, e incluso la ansiedad materna.

1.3 Diagnóstico Prenatal

En los últimos veinticinco años, debido al avance en la investigación médica y a la introducción de nuevas tecnologías, se ha alcanzado un mayor conocimiento sobre el feto que ha posibilitado el diagnóstico prenatal de un gran número de defectos congénitos. Por tanto, una mayor proporción de la población puede beneficiarse de este conocimiento, e introducir de esta manera una mejora en la calidad de vida. Estas facilidades asistenciales no dependen sólo de los progresos científicos realizados, sino que son el resultado del mejor nivel económico-social y de la capacidad de la sociedad de incorporar estos avances en el campo de la medicina aplicada.

Según la Organización Mundial de la Salud (1980) el diagnóstico prenatal consiste en "todas aquellas acciones prenatales que tengan por objeto el diagnóstico de un defecto congénito, entendiéndose por tal toda anomalía del desarrollo morfológico, estructural, funcional o molecular presente al nacer (aunque puede manifestarse más tarde)".

El ámbito del diagnóstico prenatal abarca todas las acciones que permitan determinar malformaciones, disrupciones, deformaciones y displasias, alteraciones cromosómicas, deficiencias mentales y sensoriales, alteraciones congénitas del metabolismo, endocrinopatías prenatales o cualquier tipo de anomalía o perturbación del desarrollo fetal normal.

El objetivo del diagnóstico prenatal no es simplemente la detección de anomalías en la vida fetal ni la posibilidad de una interrupción del embarazo en el caso de un feto afecto, sus objetivos son más extensos, ya que permite a las parejas con riesgo de tener un hijo con un defecto específico comenzar una gestación con el conocimiento de que se puede confirmar la presencia o ausencia de anomalía. Antes, estas parejas, después del consejo genético, a menudo renunciaban a tener descendencia. Una faceta importante del diagnóstico prenatal es proporcionar seguridad, información y reducción de la ansiedad, principalmente en grupos de riesgo.

En la práctica médica el 98% de los diagnósticos prenatales realizados, suponen la continuación del embarazo; mientras que un 2% o menos acaban en una interrupción voluntaria de la gestación (Thompson, 1991).

El diagnóstico prenatal es una empresa multidisciplinaria que abarca desde el análisis citogenético, bioquímico y molecular hasta la asistencia médica.

La historia del diagnóstico prenatal se inicia con la accesibilidad fetal. Los primeros cultivos en células de líquido amniótico se deben a Steele y Breg, 1966. Jacobson y Barter (1967)

efectúan el primer diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas. En años sucesivos se van publicando series con distintas cromosopatías (Jacobson y Barter , 1967, Nadler, 1968, 1970, Nichd, 1979), Los primeros diagnósticos de errores congénitos del metabolismo se iniciaron en 1968 (Nadler y Dancis en 1968). En el 72 ya se podían diagnosticar prenatalmente más de cuarenta defectos congénitos del metabolismo (Milunsky, 1970; 1972). Brock y col. (1972) determinan la utilidad de la alfa-fetoproteína para el diagnóstico de los defectos del cierre del tubo neural.

Durante los años sesenta se inicia el estudio de la morfología fetal con la introducción de la ecografía bidimensional en obstetricia (Donald, 1965). En un principio sólo las anomalías más groseras podían ser estudiadas, por ejemplo la anencefalia (Donald 1969, Campbell 1972 etc.). En el momento actual es posible diagnosticar más del 80% de los defectos congénitos con manifestación morfológica. Actualmente el diagnóstico ecográfico es un elemento esencial en el diagnóstico prenatal, debido a que constituye por sí mismo un elemento diagnóstico así como por ser un elemento de soporte para la realización de otras técnicas diagnósticas.

En la década siguiente, el desarrollo tecnológico de la fetoscopia permite realizar diagnóstico prenatal mediante la observación directa del feto (Rodeck y col, 1980). Nicolaides (1982) consigue la extracción de sangre fetal y con ella permite aumentar las posibilidades diagnósticas tanto en el campo citogenético, como en el bioquímico y en el molecular.

En 1983 Brambati y Simoni utilizan las vellosidades coriales para el diagnóstico de anomalías cromosómicas. Esta nueva técnica se presenta como una alternativa al cultivo de líquido amniótico, permitiendo el análisis cromosómico en el primer trimestre de gestación, así como el estudio de determinadas enfermedades monogénicas mediante pruebas bioquímicas y moleculares.

La experiencia sobre muestras de líquido amniótico, biopsia de corion y sangre fetal aumenta día a día, y con ella la mejora tecnológica que permite un diagnóstico prenatal más rápido y seguro.

1.3.1. Técnicas en diagnóstico prenatal

Existen dos grandes grupos de técnicas en diagnóstico prenatal: las técnicas invasivas y las no invasivas. Las primeras requieren una metodología obstétrica para obtener la muestra fetal que será analizada. El segundo grupo incluye las técnicas de análisis que no requieren un abordaje directo al feto.

1.3.1.1 Técnicas no invasivas

La técnica más utilizada es la **ecografía**. Esta técnica permite la visualización del feto mediante ultrasonidos. Se basa en la utilización de una onda ultrasónica consistente en la agitación vibratoria sucesiva de moléculas o un grupo de ellas a lo largo de un eje de presión longitudinal. Cuando el haz atraviesa medios de diferente densidad se produce una reflexión de parte de la onda, el resto continúa su propagación. Esta onda reflejada, o eco, es la que se observa y es el fundamento de su utilización diagnóstica.

No se ha demostrado que perjudique al feto ni a la madre aunque hay estudios como los de Carrera y col. (1990) que afirman que aumenta el número de intercambios de cromátidas hermanas en vellosidades coriales en el primer trimestre después de una exposición ultrasónica.

La ecografía permite diagnosticar un 80% de los defectos congénitos. El número de malformaciones congénitas diagnosticadas por ecografía aumenta día a día y depende de la experiencia del ecografista y de la definición del aparato empleado. Actualmente se utilizan aparatos de "tiempo real" que permiten la visión dinámica del feto. Para gestaciones del primer trimestre se utilizan aparatos de sonda vaginal aunque los más empleados son los de sonda transabdominal.

La ultrasonografía es una técnica de diagnóstico en sí misma pero además constituye el elemento de soporte imprescindible para poder realizar las técnicas denominadas invasivas.

1.3.1.2 Técnicas invasivas

Amniocentesis. Consiste en la obtención de líquido amniótico por punción transabdominal bajo control ecográfico. En el líquido amniótico se encuentran células que proceden de la descamación de las membranas que rodean al feto y del propio feto. La extracción se realiza normalmente entre la 16 y 18 semanas de gestación debido a que la cantidad de células viables para el cultivo celular es mayor en este periodo. Algunos autores como Rooney y col. (1989), Stripparo y col. (1990); Rebello y col. (1991); Eiben y col. (1994) y Shalev y col. (1994), presentan estudios realizados entre la 12 y 14 semanas de gestación (amniocentesis precoz).

La pérdida fetal post-amniocentesis precoz oscila entre el 1,6% (Díaz Vega y col, 1996) y el 3,2% (Shalev y col, 1994); la de amniocentesis medio-trimestre, mucho más estudiada, es del orden de 0,9% (Shalev y col, 1994).

Para realizar un estudio citogenético o bioquímico es necesario realizar un cultivo de las

células de líquido amniótico. Estos cultivos requieren condiciones similares a las de otros tipos de cultivos (como un ambiente con un 5% de CO₂, un 95% de humedad relativa y 37° C de temperatura).

Para el análisis citogenético, las células se siembran directamente o después de una centrifugación (a 2.000 r.p.m. durante 10 minutos) en medio de cultivo completo en frascos tipo Falcón o en cápsulas de Petri. En este último tipo de cultivo se incluye un cubreobjetos en el fondo que permite la realización de la técnica de cultivo "in situ". Este método presenta ventajas, frente al cultivo en Falcon ya que favorece el análisis de los clones celulares y ayuda en los estudios de mosaicismos (diferenciar los mosaicismos verdaderos de los pseudomosaicismos), así como a distinguir las contaminaciones maternas. Con este cultivo no hace falta contar tantas metafases como en el caso del cultivo tipo Falcon (producto de tripsinización) (Cheung y col. 1990).

En el caso de un diagnóstico bioquímico, el estudio se realiza determinando la ausencia del enzima o bien la presencia del producto acumulado, directamente sobre el cultivo de amniocitos. Para determinar defectos del cierre del tubo neural, se hacen determinaciones de alfa-fetoproteína y acetil-colinesterasa en el sobrenadante de la muestra centrifugada.

En el caso de un diagnóstico molecular, los amniocitos no son una fuente de ADN celular adecuada debido a la poca cantidad de muestra. Estos estudios suelen utilizar muestras de vellosidades coriales debido al mayor número de células obtenidas.

Biòpsia de corion. Consiste en la obtención de una muestra de vellosidades coriales, las cuales tienen la misma constitución genética que el feto. La extracción de la muestra se realiza, principalmente, entre la 8 y 14 semana de gestación, presentándose como una alternativa a la extracción del líquido amniótico. La figura 6 muestra la relación anatómica de una gestación temprana en el momento de realizar una biòpsia de corion. Con este método se consigue un diagnóstico en el primer trimestre de gestación, aunque también puede realizarse en el segundo y hasta en el tercer trimestre.

La extracción de vellosidades coriales se realiza por aspiración (con cánulas flexibles, semirrígidas o rígidas), o por pinza o microforceps. Las vías de acceso al corion son la transcervical o vaginal y la vía transabdominal (Figura 7). En las biopsias del segundo o tercer trimestre sólo se utiliza la última vía. La extracción está siempre guiada por ecografía (Figura 8).

El porcentaje de pérdida fetal oscila entre el 2 y el 5% (Brambati y col, 1988; Rhoads y col, 1989; Clark y col, 1989; Lunshof y col. 1995) superiores a la pérdida fetal post-amniocentesis. Estos valores entran dentro de la incidencia general del aborto espontáneo en la época de

gestación considerada. Este valor puede ir decreciendo con la experiencia del operador.

Para el estudio citogenético se pueden emplear dos grupos de técnicas: las directas o semidirectas y las de cultivo largo que serán ampliamente explicadas en el apartado 2.3.

El diagnóstico bioquímico puede hacerse directamente sobre las vellosidades coriales intactas o después de un cultivo celular, mediante el estudio del enzima por defecto o por exceso (producto acumulado). El número de enfermedades metabólicas diagnosticadas mediante vellosidades coriales es cada vez más elevado. El análisis de la alfa-fetoproteína para la detección de los defectos del cierre del tubo neural no es posible en tejido coriónico. El tejido coriónico es idóneo para análisis de ADN y por tanto el más ampliamente utilizado. Este análisis se efectúa por identificación directa del gen defectuoso cuando se dispone de la sonda adecuada, o por asociación de marcadores polimórficos cercanos mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En los últimos años el número de enfermedades diagnosticables por este método ha crecido de forma exponencial.

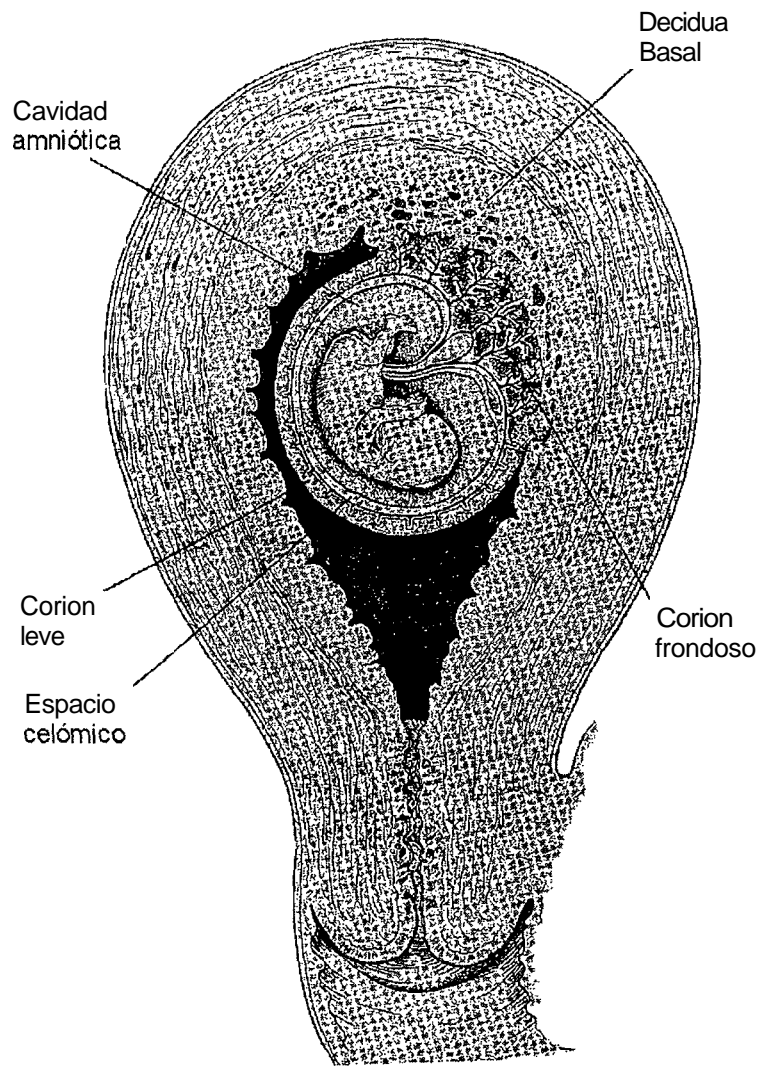


Figura 6. Relación anatómica de la posición de las vellosidades coriales en una gestación temprana (8-14 semana) (Brock y col., 1992).

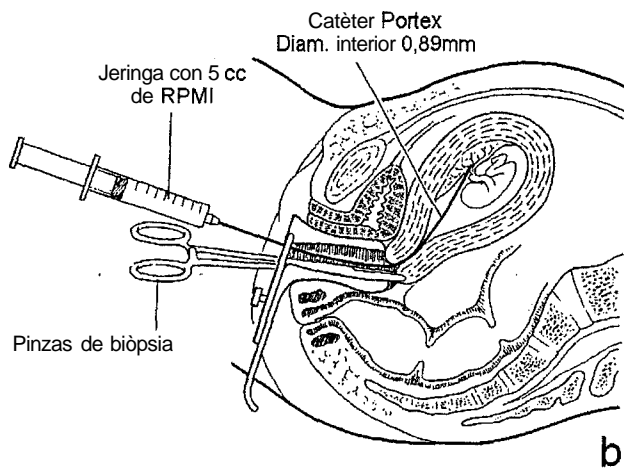
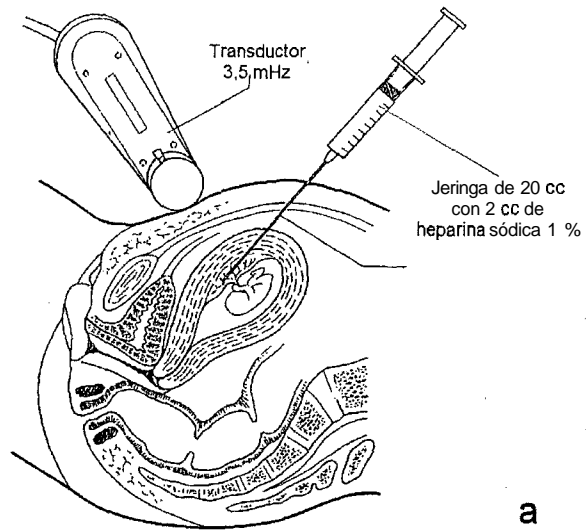


Figura 7. Extracción de vellosidades coriales a) vía transabdominal. b) vía transcervical. (Brock y col., 1992)

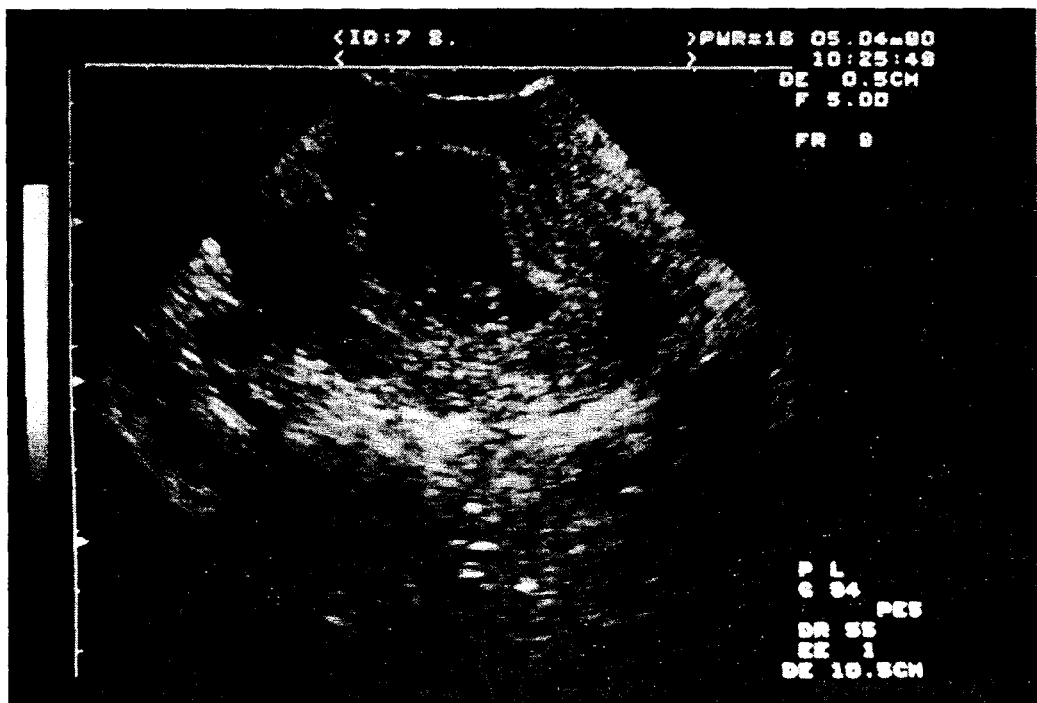
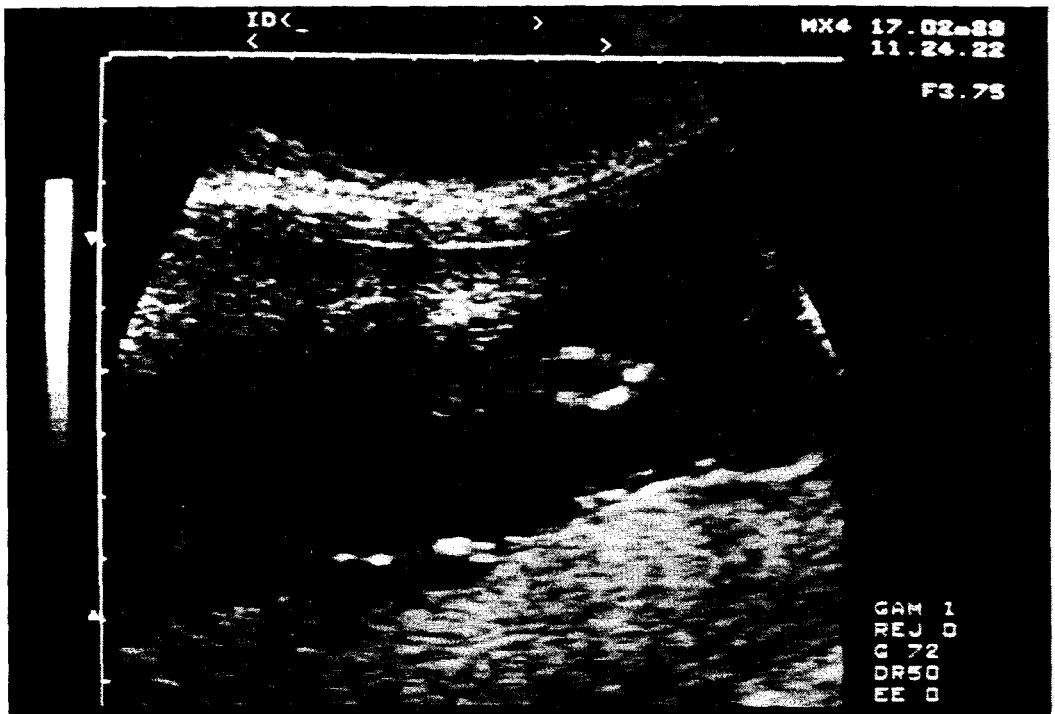


Figura 8. Extracción de vellosidades coriales bajo guía ultrasónica: a) localización de la placenta. b) Pinza de extracción guiada por ecografía. (Fotografías cedidas por Alegre M. y Sostoa M., Diagnosic Prenatal. Barcelona).

Funiculocentesis Esta técnica se emplea para obtener sangre fetal directamente del cordón umbilical (normalmente cerca de la inserción placentaria). La extracción se realiza a partir de la 18 semana de gestación en casos como la observación de una malformación mediante ecografía, la necesidad de una segunda muestra para confirmar un diagnóstico, cuando es demasiado tarde para realizar otras pruebas de diagnóstico prenatal. También se realiza cuando es necesario estudiar infecciones fetales o enfermedades hematológicas. La extracción se realiza a través de la pared abdominal anterior materna. Se realiza bajo guía ultrasónica. El riesgo de pérdida fetal es de 1-5% (Nicolaidis KH y col. 1986; Nicolini y Rodeck, 1992).

1.4 Vellosidades coriales

1.4.1. Origen y evolución

Veinte horas después del encuentro entre el óvulo y el espermatozoide, el patrimonio genético, contenido en ambos núcleos celulares, termina por unirse para formar un nuevo individuo.

Posteriormente el cigoto comienza su desarrollo con una serie de divisiones mitóticas que se producen cada 12 ó 15 horas. El cigoto llega a la fase de mórula (formado por 12 células), y a través de las trompas, continua su viaje hacia el útero donde llega entre el 7° y 8° dfa ya en fase de blastocito.(Figura 9.a). Hasta este momento el blastocito sigue cerrado dentro de la zona pelúcida.

En esta fase de más de 16 células, se diferencian dos zonas diferentes: una masa celular externa y una masa celular interna. A la llegada al útero comienza una penetración de líquido a través de la zona pelúcida y de los espacios intercelulares de la masa celular interna, formándose el *Blastocele* , Las células de la masa celular interna se orientan a un polo formando el *Embrioblasto*. Las células de la masa celular externa se aplanan y forman el *Trofoblasto*. La evolución del embrioblasto dará lugar al embrión propiamente dicho, mientras que el trofoblasto evolucionará en las estructuras necesarias para la supervivencia del embrión en el útero materno. En este punto el blastocele continua aumentando de tamaño y se produce una eclosión de la zona pelúcida y las células del embrioblasto se unen al endométrio produciéndose *la implantación*.

Al final de la primera semana del desarrollo el *Embrioblasto* se diferencia en el *Epiblasto* y el *Hipoblasto* (Figura 9b).Las células del Epiblasto son células cúbicas que envuelven la cavidad amniótica en contacto con los amnioblastos. Las células del Hipoblasto son células cúbicas más externas que envuelven al saco vitelino por la parte externa.

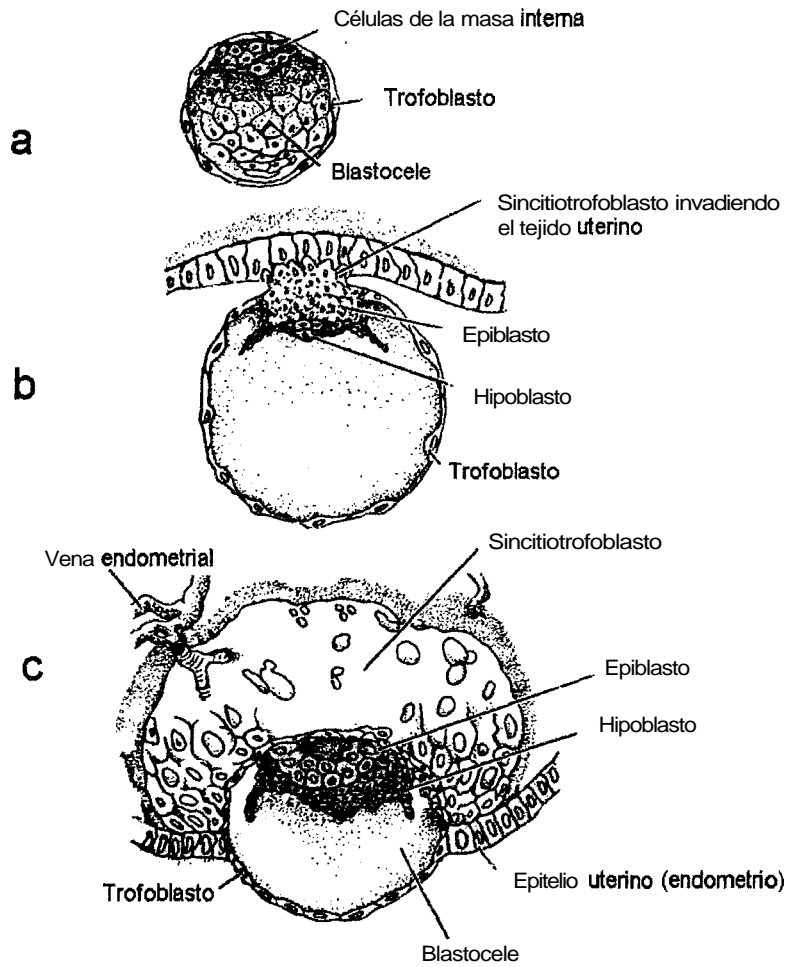


Figura 9. Evolución del blastocito. a) **blastocito** primitivo aún incluido en la zona **pelúcida**. b) diferenciación del **embrioblasto** en hipoblasto y epiblasto, c) formación del sincitiotrofoblasto y situación del blastocito en el endometrio. (Gilbert, 1991).

Por otra parte, el *Trofoblasto* también sufre un proceso de diferenciación. Las células trofoblásticas en un principio son de apariencia nucleada, posteriormente evolucionarán transformándose en una población celular multinucleada, al producirse divisiones celulares con ausencia de citocinesis (estructura sincitial). Así se distinguen dos tipos de células en el trofoblasto embrionario:

-Sincitiotrofoblasto. Capa externa hormonalmente activa que erosiona los tejidos maternos provocando el hundimiento progresivo del embrión en la mucosa uterina.

- Citotrofoblasto. Tipo celular inicial de proliferación activa. El citotrofoblasto se adhiere a la pared uterina (endometrio) a través de series de adhesión de moléculas, además contiene enzimas proteolíticas que permiten adentrarse en el endometrio reorganizando los vasos sanguíneos uterinos para que la sangre materna bañe los vasos sanguíneos fetales. Esta actividad proteolítica se suspende después de la doce semana de gestación (Fisher y col, 1989).

Mientras tanto, en el útero hay un incremento de vasos y capilares sanguíneos en esta área de contacto con el Sincitiotrofoblasto. Las masas trofoblásticas crecen rápidamente en extensión y sus particularidades de crecimiento dan lugar a la formación de *cordones* que se desparan y anastomosan, incluyendo espacios irregulares, en el Sincitiotrofoblasto. Son las *lagunas trofoblásticas*. Los embriones con este trofoblasto desparado se denominan *embriones prevellosos*. (Figura 9c).

Al final de la segunda semana el Sincitiotrofoblasto ocasiona la erosión de los sinusoides maternos, la sangre de la madre pasa a la red lacunar y se inicia la circulación uteroplacentaria.

El citotrofoblasto forma columnas celulares que penetran en el Sincitiotrofoblasto y son rodeadas por éste. Dichas columnas constituyen el *Tronco de la vellosidades primarias*. El tejido mesodérmico, formado a partir del epiblasto, se extiende hacia el exterior desde el embrión en fase de gastrulación. Este tejido mesodérmico migra a través de la línea primitiva formando el mesodermo extraembrionario que llena el espacio entre el trofoblasto, el amnios y la membrana exocelómica por dentro (Luckett, 1978). Posteriormente, se desarrollan vacuolas en este tejido y se forma el celoma extraembrionario o cavidad coriónica (Figura10).

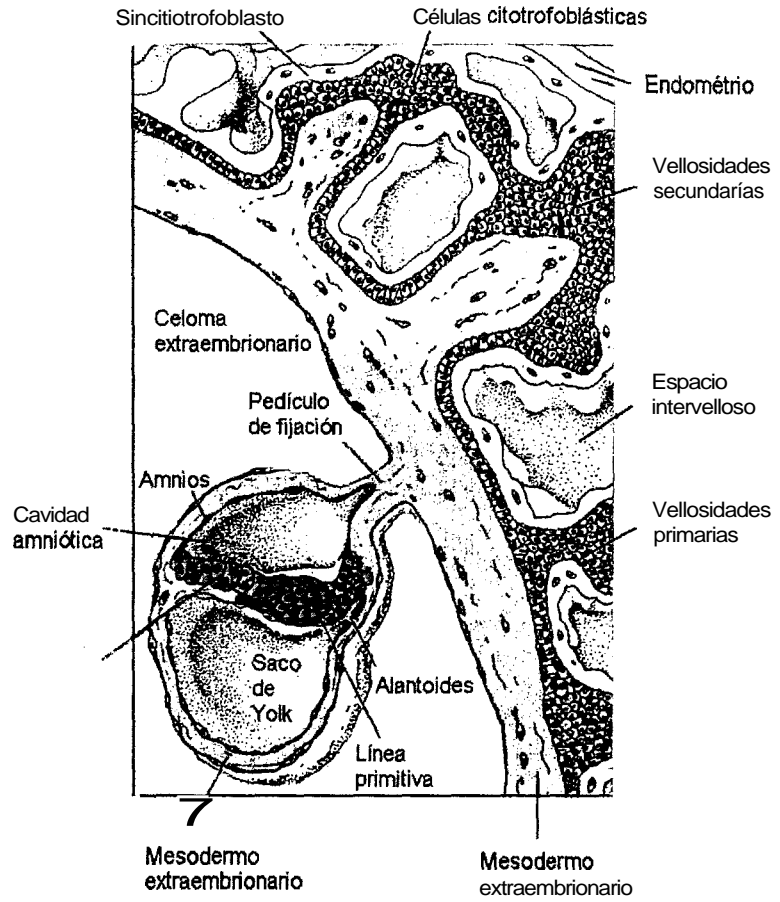


Figura 10. Reorganización de las células embrionarias. Gastrulación humana al final de la tercera semana de gestación. (Gilbert, 1991).

Al terminar la segunda semana, el blastocito está incluido por completo en el endometrio y la solución de continuidad producida en la mucosa ha cicatrizado.

Durante la tercera semana las vellosidades primarias adquieren un núcleo mesenquimatoso, a partir de las células del mesodermo extraembrionario, formando las vellosidades secundarias. Cuando las células del mesodermo se diferencian en capilares sanguíneos, se forman las vellosidades terciarias (Figura 11)

Una vez los capilares contactan con los de la lámina coriónica y el pedículo de fijación, el sistema velloso está preparado para suministrar al embrión los elementos nutritivos y el oxígeno que necesita y para eliminar productos de deshecho (principalmente dióxido de carbono y urea) a la circulación materna (Figura 12).

Entretanto, tiene lugar el fenómeno más característico de la tercera semana de desarrollo embrionario: la aparición de la *Línea Primitiva*, y la constitución de las tres capas germinativas básicas para comenzar la formación de nuevos tejidos y la diferenciación de los órganos.

Así pues, el corion se forma a partir del desarrollo de las células trofoblásticas y del mesodermo extraembrionario. Funcionalmente adhiere e inserta el embrión en la pared uterina, actuando como tejido de intercambio de gases y nutrientes entre la madre y el feto. Pero además el corion tiene una función endocrina. La porción del sincitiotrofoblasto produce tres hormonas esenciales para el desarrollo: la gonadotropina coriónica, la progesterona, y la somatotropina coriónica. Estudios recientes sugieren una función inmunológica principalmente de protección fetal frente a la respuesta inmunitaria materna (Chaouat, 1990). En la figura 13 se resume el origen de las membranas fetales y del embrión durante el desarrollo embrionario.

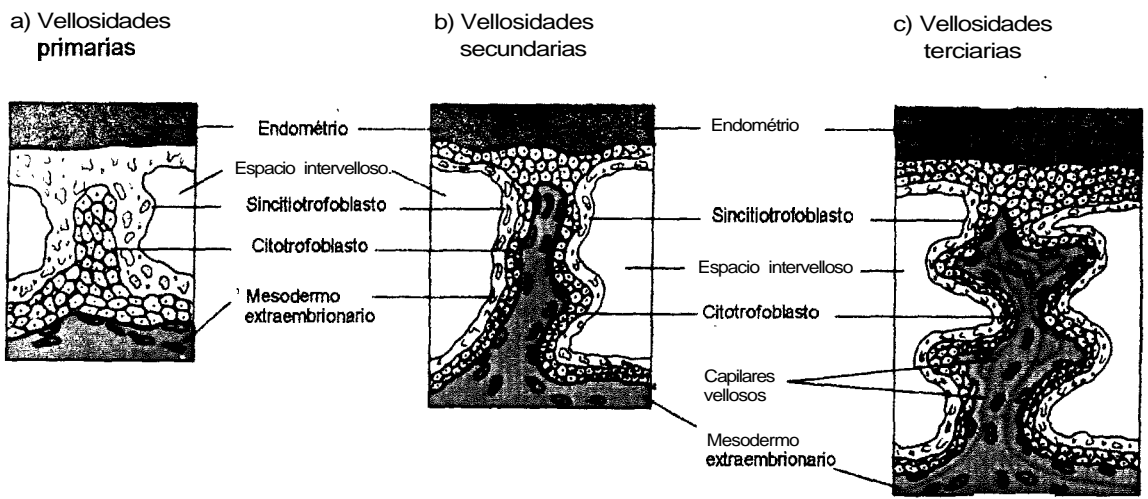


Figura 11. Características de diferentes estadios de las vellosidades coriales durante la 3ª semana de gestación. a) vellosidades primarias. b) vellosidades secundarias. c) vellosidades terciarias (Gilbert, 1991).

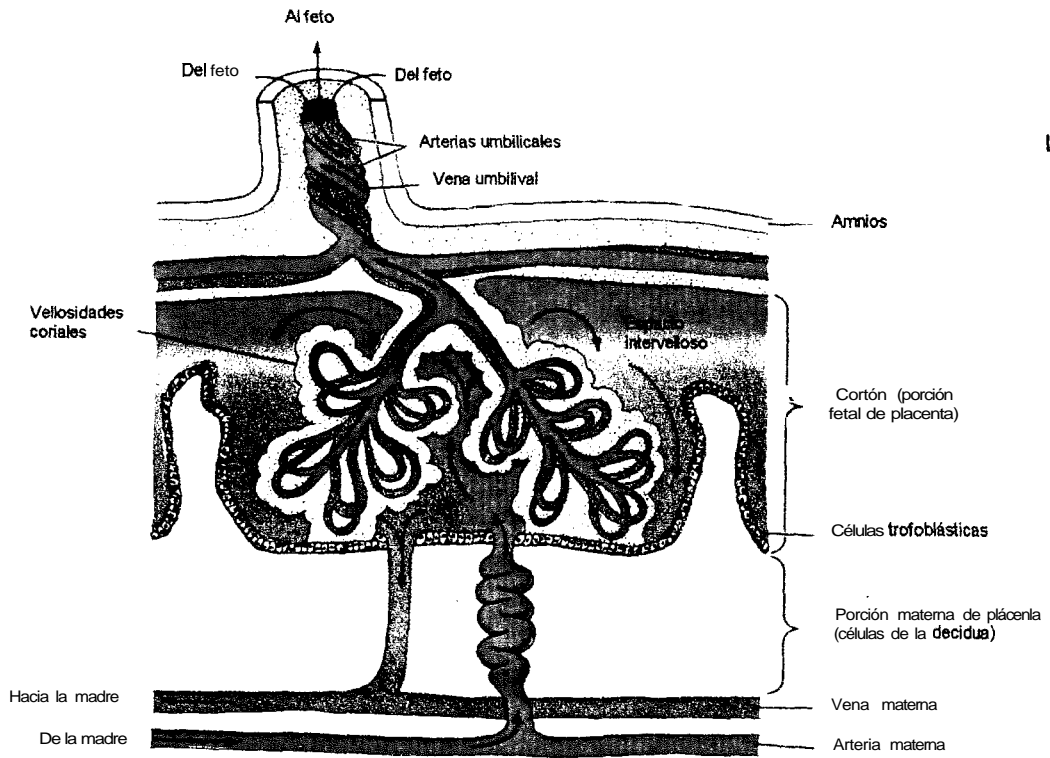


Figura 12. Relación de las vellosidades coriales y la sangre materna en el útero (Gilbert, 1991).

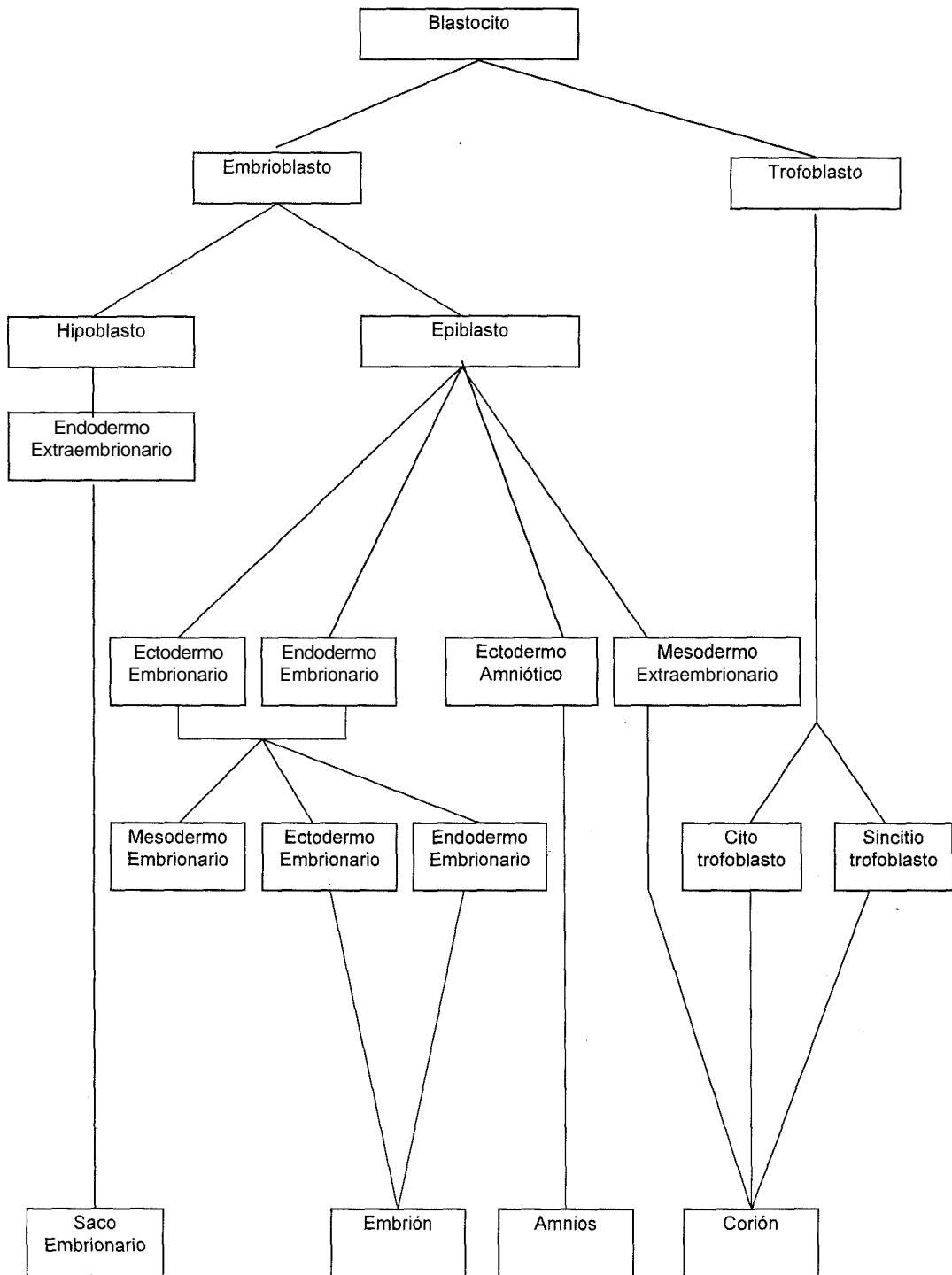


Figura 13.- Esquema del desarrollo embrionario

1.4.2. Tipos de células

Desde el punto de vista histológico, las vellosidades coriales en el primer trimestre de gestación muestran un núcleo mesenquimatoso rodeado por una capa interna de citotrofoblasto, una capa externa de sincitiotrofoblasto y una densa columna terminal de células citotrofoblásticas (Boya y Hamilton, 1970). En el núcleo mesenquimatoso y en el citotrofoblasto se observan divisiones celulares; por el contrario, el sincitiotrofoblasto no muestra mitosis.

Se ha observado que la distribución de las células en división no es homogénea (Koulischer, 1985), existiendo tres niveles de estudio en el árbol corial: la región basal, la región media y las células de la columna citotrofoblástica. (Figura 14)

La incorporación "*in vitro*" de timidina tritiada en las vellosidades trofoblásticas muestra que la región que más prolifera se localiza en las células de la columna citotrofoblástica (Koulischer, 1985). Las mitosis espontáneas observadas en las técnicas citogenéticas directas o de semicultivo corresponden a esta región. Por ello, es importante preservar la integridad de estas células durante la extracción y procesamiento de las vellosidades coriales para el estudio cromosómico fetal. La ausencia de mitosis en preparaciones directas es bastante común debido a la pérdida accidental de las células de la columna citotrofoblástica.

En cultivos largos se analizan células del núcleo mesenquimático. El bajo número de divisiones en estas regiones dificulta, además de enlentecer, el diagnóstico prenatal en este tipo de cultivos.

Raabe (1990) ha analizado la proliferación celular entre la 8 y 12 semanas de gestación, mediante la técnica de condensación prematura de centrómeros, analizando el índice de proliferación potencial. Este varía entre un 18% y 73%. Estos valores son similares a los de tejidos de proliferación intensa como carcinomas sólidos y leucemias agudas. El índice de proliferación potencial del 73% corresponde a células del citotrofoblasto a las 9-10 semanas de gestación, mientras que el 17% a la región mesenquimática. Esto indica que existe una actividad proliferativa específica en estas semanas de gestación.

Este incremento de la actividad proliferativa a la 9 semana de gestación, coincide con un incremento de la actividad de crecimiento del sincitiotrofoblasto (Kaufmann, 1981). La actividad mitótica de las células de Langhams en el citotrofoblasto que se diferencian en la capa sincitial y en los brotes vellosos sería la responsable de la actividad proliferativa observada en ambas regiones (Verlinsky y col, 1985).

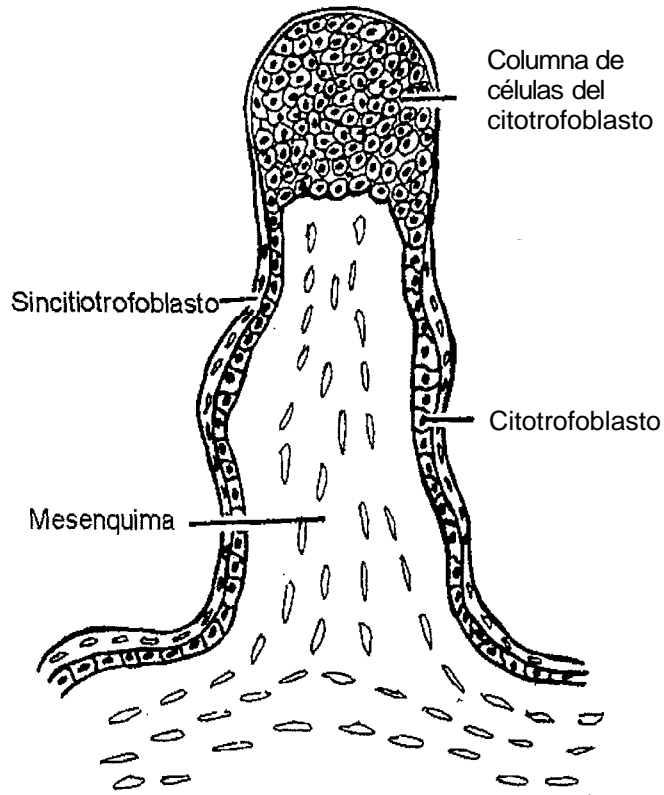


Figura 14, Niveles de división en el árbol corial (Koulischer, 1985).

El alto índice de proliferación en células del citotrofoblasto a las 9 semanas de gestación puede explicar, en parte, las diferencias cromosómicas observadas entre células del citotrofoblasto, células del mesenquima y tejidos fetales. El riesgo de aparición de una aneuploidía cromosómica se incrementa en tejidos de proliferación intensa como leucemias y carcinomas sólidos (Yunis,1983). Este mecanismo podría ser también el responsable del alto número de aberraciones cromosómicas en células de vellosidades coriales y en concreto del citotrofoblasto (Crane y Cheung, 1988).

1.5 Citogenética del corion

El objetivo final de todo laboratorio citogenético orientado a diagnóstico prenatal es la obtención de prometafases o metafases susceptibles de análisis; es decir, cromosomas en el grado de condensación necesario para aplicar diferentes técnicas de tinción y obtener el cariotipo fetal.

Los primeros estudios realizados sobre muestras de vellosidades coriales y cultivo de células trofoblásticas fueron publicadas en los años setenta paralelamente por Kullander y Sandhal (1973) y por Hahnemam (1974)

Las células trofoblásticas mostraban un bajo potencial de crecimiento en condiciones de cultivo de manera que los estudios citogenéticos fallaban aproximadamente en la mitad de las muestras procesadas. El análisis citogenético se limitaba a la predicción del sexo fetal por ensayos de la cromatina X e Y (Masa Barr y Masa F). La identificación y selección de material fetal puro no resultaba sencilla y la contaminación materna presentaba un serio problema. Las metodologías para la obtención de las muestras eran variadas: desde la succión de sangre con cánula metálica (100 casos; Anshan group, 1975) hasta el catéter de plástico guiado por ultrasonido (9 casos; Ward y col, 1983 y 41. casos de Brambati y Simoni, 1983). La biopsia forceps guiada por ultrasonidos fue utilizada por primera vez en 1972 por el grupo de Kazy y col (26 muestras) y por Groossens y col en 1983 (5 muestras). Hasta 1983 (Brambati y Simoni, 1983), la experiencia mundial no sobrepasaba los 181 casos, no utilizándose las vellosidades coriales para el diagnóstico de anomalías cromosómicas. Hasta entonces, el líquido amniótico era el único tejido empleado para diagnóstico prenatal.

Un fenómeno bien conocido era la existencia de actividad mitótica en el tejido trofoblástico, ya que el examen histológico revelaba numerosas células en división en las lagunas de Langhans. Watanabe y col.(1978), estimaron que el número de mitosis espontáneas en el tejido citotrofoblástico era del 1%. Basándose en estos datos Simoni y col.(1983, 1984) pusieron a punto un método de diagnóstico basado en el análisis de las mitosis espontáneas, presentes normalmente en la vellosidad placentar durante el primer trimestre de gestación. Su técnica se basa en el análisis citogenético directo utilizando al final una solución acuosa de ácido acético al 60% descrita por Fox y Zeiss (1961) y utilizada por Evans y col.(1972) para la obtención de preparaciones cromosómicas directas con membranas de embriones de ratón.

De este modo se pusieron a punto los cultivos cortos y poco después pudieron utilizarse también cultivos largos de vellosidades coriales para realizar diagnóstico prenatal (Niazy y col, 1981; Simoni y col, 1983; Heaton y col, 1984). Los cultivos largos presentan, respecto al corto, la ventaja de una mayor concordancia diagnóstica con el cariotipo fetal , pero tienen

como inconveniente que favorecen el crecimiento de las células maternas que han podido ser extraídas conjuntamente (contaminación materna).

En 1983 solo habla cinco centros que publicaban sus trabajos realizados en un pequeño número de muestras. Un año mas tarde habian más de 40 centros, la mayoría en Europa y Norte América con más de 3.000 diagnósticos a partir de vellosidades coriales (Jackson, 1985). En 1986, Simoni y col., publican una serie de 1000 diagnósticos.

En 1989, Vejerslev y Mikkelsen, publican un estudio colaborativo europeo de mosaicismo con un total de 11.855 muestras de vellosidades coriales. El Estudio Colaborativo de Vellosidades Coriales en los Estados Unidos recopila 11.473 muestras, procedentes de nueve centros (Ledbetter y col., 1992). La experiencia española abarca un estudio colaborativo con un total de 1.282 biopsias coriales practicadas desde 1985 en seis centros hospitalarios. (Salvador y col., 1989), entre ellos una parte de los datos del presente estudio y que son los aportados por el Hospital de la Santa Creu i San Pau de Barcelona. Posteriormente se han publicado del Hospital Clínico de Barcelona 700 casos (Costa y col., 1992), 1173 casos (Soler y col 1992); y 1000 biopsias transcervicales de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid (Ramos y col., 1992).

1.5.1 Ventajas

La biòpsia de corion, al realizarse en el primer trimestre de gestación, se presenta como una alternativa de indudables ventajas frente a la amniocentesis cuya extracción se realiza durante el segundo trimestre de gestación.

Además contribuye a la reducción de trastornos psicológicos de la madre y, en el caso de una interrupción del embarazo, supone ventajas obstétricas

Diagnóstico en el primer trimestre. La extracción de una biòpsia corial se puede realizar a partir de la 8 semana de gestación; tras un día de incubación y cinco de proceso se obtiene el resultado citogenético. Se puede obtener un resultado citogenético en una semana (demora diagnóstica).

En el caso de la amniocentesis la extracción no se realiza hasta, al menos, la catorce semana de gestación. El tiempo de cultivo varía entre 9 y 14 días y el tiempo medio de demora diagnóstica es de 21 días (Tabla 6).

Tabla 6. Tiempos requeridos para la obtención de un diagnóstico prenatal

	BIÒPSIA DE CORION	LIQUIDO AMNIOTICO
Extracción	Desde la 8 semana	Desde la 15 semana
Resultado	6 días	21 días
Cultivo	1 día	9-14 días

Si estos tiempos se suman a la semana de gestación de la paciente nos encontramos, en muchas ocasiones, al borde del límite marcado por la ley en el caso de decidir realizar una interrupción voluntaria del embarazo (22 semanas). En definitiva, la indudable ventaja de la biòpsia de corion para el diagnóstico prenatal, es que posibilita información citogenética más precozmente que la amniocentesis.

Reducción de trastornos psicológicos de la madre. Son muy frecuentes los trastornos psicológicos en la madre como consecuencia del estrés emocional sostenido durante las semanas de demora diagnóstica. Este hecho se empeora debido a que en el segundo trimestre de gestación la madre ya es capaz de percibir los movimientos fetales (Blumberg, 1975; Bracken y Kasl, 1975).

Ventajas obstétricas. Si se plantea la necesidad de realizar una interrupción voluntaria del embarazo en el segundo trimestre de gestación, la técnica obstétrica utilizada es mucho más peligrosa. A pesar de los progresos en este campo (postaglandinas, etc.) las técnicas son más difíciles que en el primer trimestre comportando un mayor número de riesgos y complicaciones obstétricas (Cates, 1977).

1.5.2 Limitaciones

La biòpsia de corion presenta diversas limitaciones como pueden ser la cantidad y calidad de metafases obtenidas, la contaminación materna o la pérdida fetal debida al riesgo de la técnica de extracción. Los mosaicismos y discrepancias pueden ser considerados como limitaciones, sin embargo debido a su importancia se les ha dedicado un apartado específico.

Contaminación materna. La naturaleza de la unión corio-decidual determina que en el proceso de extracción puedan arrastrarse fragmentos de decidua materna (Simoni y

col.,1983). Esta potencial contaminación supone un problema mayor en muestras de vellosidades que en amniocentesis.

Se ha sugerido que el método directo eliminaba el riesgo de contaminación materna (Simoni y col.1984; Máchese, 1984). En un estudio para evaluar la contaminación materna en cultivos de corión, Cooke y col.(1986), han determinado un solo caso con contaminación sobre un total de 26 muestras analizadas de fetos varones. Este estudio revela que la disección del material para eliminar la supuesta decidua materna es esencial para minimizar el problema de contaminación.

En el método de cultivo largo las células de decidua materna pueden desarrollarse contaminando las células de origen fetal y de este modo alterar el resultado diagnóstico. (Simoni y col. 1983; Miny y col. 1985).

Cantidad de muestra. Debido a la dificultad de la técnica de extracción, posición fetal, localización de la placenta, etc., en ocasiones puede extraerse poca cantidad de vellosidades coriales. Se considera que se puede realizar un diagnóstico citogenético a partir de 5 mg. de tejido.

Pérdida fetal. Como riesgos de la técnica de extracción se han descrito, entre otros: la muerte embrionaria, el aborto, la infección intrauterina, la rotura prematura de membranas, el desprendimiento prematuro de placenta. Es difícil precisar el riesgo exacto de la técnica, ya que depende de muchas variables, tales como el tipo de procedimiento empleado, la época de realización, el grado de seguimiento posterior, el número de intentos, etc. Sin embargo, el aumento del porcentaje de pérdida fetal va directamente relacionado con la experiencia del operador.

1.5.3. Mosaicismo

Uno de los problemas que merece especial atención en el diagnóstico prenatal citogenético es el mosaicismo. Se considera una condición de mosaicismo cuando se produce una distribución anómala de los cromosomas durante la división celular postzigótica originando una o más líneas celulares con diferentes constituciones cromosómicas que coexisten en un mismo individuo.

El origen puede ser por no disyunción postzigótica o, menos comúnmente, debido a reorganizaciones estructurales. Vogel y Motulsky (1986) proponen además, que también se puede originar un mosaico a partir de un cigoto trisómico primario que pierde un cromosoma en anafase (pérdida anafásica).

Los efectos fenotípicos de los mosaicos dependen de los cromosomas involucrados, su distribución en los diferentes tejidos y del estadio de desarrollo en el que se origina la línea anómala.

Cuando la aparición del mosaicismo ocurre en fase de blastocito, esto es, antes de la diferenciación entre los compartimentos coriales y el embrión, el mosaicismo es general: está presente en la placenta y el tejido fetal (Figura 15 a). Cuando la mutación cromosómica ocurre en un estadio gestacional más tardío, las células anómalas pueden estar confinadas a la placenta (Figura 15b), con dicotomía entre placenta y embrión (Figura 15c) o confinada al embrión (Figura 15d) (Kalousek y col., 1992)

La observación de múltiples líneas celulares cromosómicamente diferentes en muestras de vellosidades coriales, es un hecho bastante frecuente detectándose en un 1% de las muestras (Vejrerslev y Mikkelsen, 1989; Ledbetter y col , 1990). La frecuencia de mosaicismo observada en líquido amniótico es mucho menor del 0,25% (Hsu and Perlis, 1984). Es de destacar que la frecuencia de mosaicismo en vellosidades coriales es diez veces mayor que el observado en recién nacidos (0,08%-0,09%). (Ferguson-Smith y Yates, 1984).

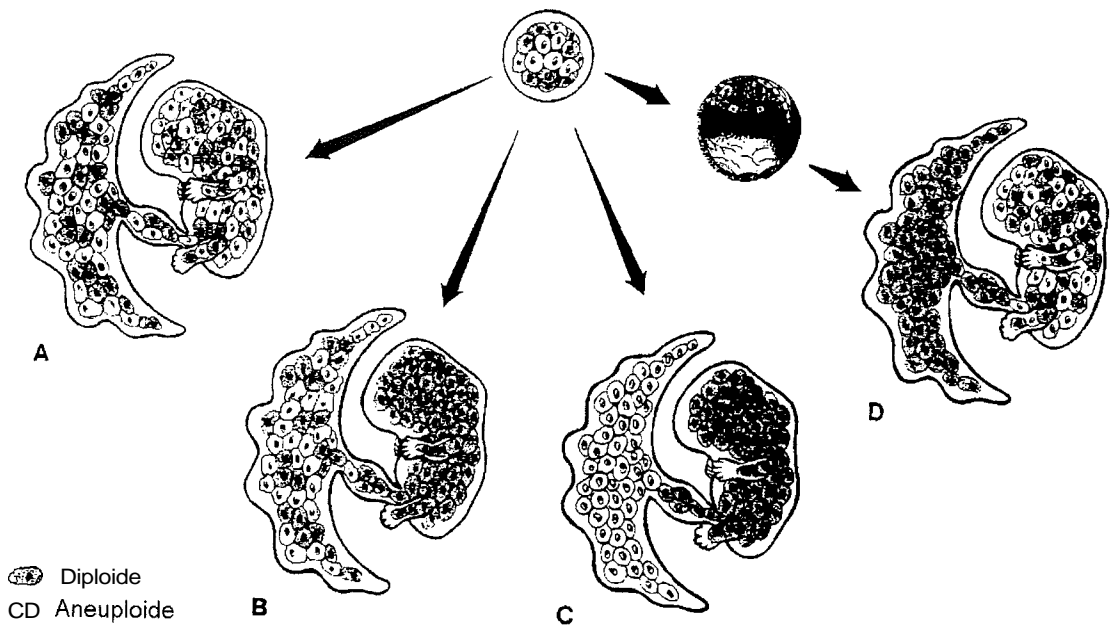


Figura 15. Tipos de mosaicismos: a) generalizado afectando a la placenta y al tejido fetal; b) confinado a la placenta; c) con dicotomía entre placenta y embrión; d) confinado al embrión (Kalousek, 1992).

El problema del mosaicismo se agrava con las denominadas **discrepancias**: No todos los mosaicos observados en los diagnósticos en vellosidades coriales se van a confirmar en el feto. Se han descrito casos en los que la existencia de mosaicismos confinados a la placenta no refleja la composición genética del embrión (Kalousek y col. 1985).

La posibilidad de un mosaicismo confinado a tejidos extraembrionarios fue sugerida por Ford(1969) al descubrir una línea celular aneuploide confinada a las membranas fetales de un ratón. En 1978 Warburton y col., encontraron una inesperada alta frecuencia de mosaicos de trisomías autosómicas en cultivos de abortos espontáneos, sugiriendo que al no configurarse siempre el mosaico en tejido fetal, el mosaico podría afectar a células de origen extra-fetal.

Cada vez, el número de publicaciones en las que se describen discrepancias entre resultados realizados en vellosidades coriales y tejido fetal es mayor(Simoni y col, 1984; Heimun y col, 1985; Simoni y col, 1986; Hogge y col,.1986; Martin y col,.1986; Schulze y col,.1986; Bartels y col, 1986; Martin y col,.1986 Lillard y col,.1987; Leschot y col,.1987; Levis y col,.1989; Míguez y col, 1992; Míguez y col, 1993; Wang y col, 1993; Simoni y Sirchia, 1994; Wolstenholme y col, 1994; Torricelli y col, 1994; Míguez y col, 1994).

La mayoría de los mosaicos detectados en vellosidades coriales son debidos a mosaicismos confinados a la placenta y sólo el 23% de los mosaicos detectados en corion se confirma en el feto.

Kalousek y col (1991, 1992), han detectado la existencia de una relación entre la alta frecuencia de retardo de crecimiento intrauterino y determinados mosaicos confinados a la placenta, realizando una clasificación de dichos mosaicismos en tres tipos diferentes según en el tipo de tejido (citotrofoblasto o mesenquima) en el que se detecta la discrepancia respecto al tejido fetal. Dicha anomalía puede detectarse en mosaico o en no mosaico (Tabla 7).

Tabla 7 Tipos de mosaicismo confinado a la placenta en gestantes con un feto cromosómicamente normal.(Kalousek y col, 1992).

MOSAICISMO CONFINADO A LA PLACENTA			
TEJIDO	TIPO I	TIPO II	TIPO III
CITOTROFOBLASTO (M. Directo/Semicultivo)	Aneuploidia mosaico o no mosaico	Normal	Aneuploidia mosaico o no mosaico
MESENQUIMA (Cultivo largo)	Normal	Anepludia mosaico o no mosaico	Anepludia mosaico o no mosaico
TEJIDO FETAL	Normal	Normal	Normal

El tipo I es el más común. Se observa con la aplicación del método directo (Células del citotrofoblasto); no se observa una influencia con el crecimiento intrauterino. El tipo II es poco común y se observa al analizar células de un cultivo largo; ha sido asociado, en algunos casos, con retardo del crecimiento fetal. El tipo III es muy raro; el mosaicismo está presente en células del citotrofoblasto y del mesenquima. Se asocia con retardo del crecimiento y muerte fetal.

También se pueden encontrar anomalías cromosómicas confinadas a la placenta de tipo no mosaico (Tharapel y col., 1989; Ledbetter y col., 1990; Dorfmann y col., 1992)

En todos los casos en los que se observa un mosaico o una aneuploidía cromosómica rara es aconsejable realizar un estudio en líquido amniótico para confirmar el cariotipo fetal.

1.6 Objetivos

Al iniciar el presente trabajo, los objetivos que nos propusimos abordar fueron los siguientes:

- 1) Optimizar la técnica citogenética en vellosidades coriales.
- 2) Determinar aquellos factores que pueden influir en la obtención de un diagnóstico citogenético.
- 3) Establecer el tipo y frecuencia de anomalías cromosómicas, especialmente de mosaicos y discrepancias.
- 4) Determinar los posibles factores que pueden contribuir en la aparición de anomalías cromosómicas.
- 5) Analizar la fragilidad cromosómica espontánea.
- 6) Estudiar la descondensación espontánea de las zonas de heterocromatina constitutiva.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Material biológico

El estudio citogenético se ha llevado a cabo a partir de 1112 muestras de vellosidades coriales recogidas para la realización de un diagnóstico prenatal. La procedencia de los casos estudiados, corresponde tanto a centros públicos (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau) como privados (Diagnòstic Prenatal, Centre Clínic d'Obstetrícia i Ginecologia, Clínica Nuestra Señora del Remei). (Figura 16).

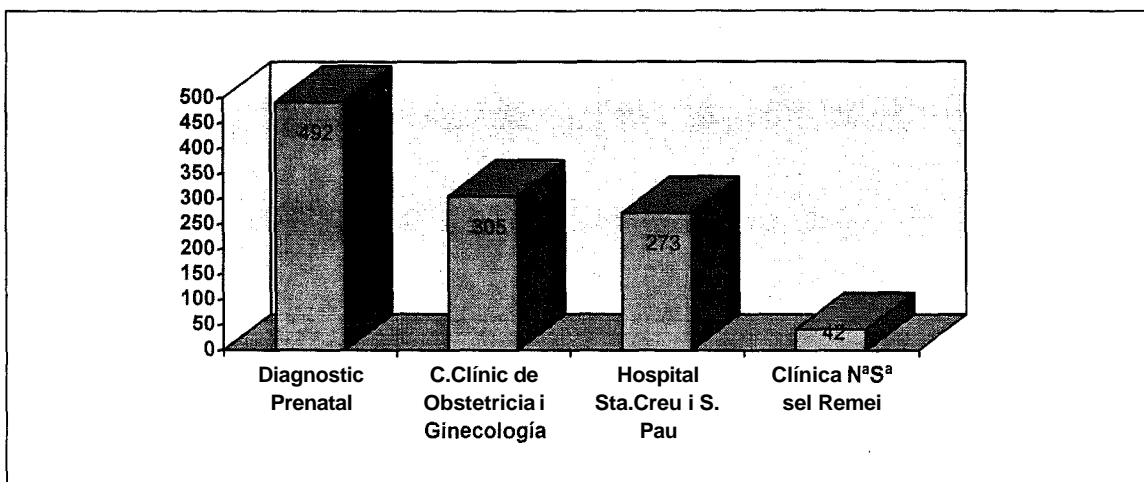


Figura 16. Procedencia de las muestras

2.2 Material de laboratorio

2.2.1 Productos

2.2.1.1 Medios base de cultivo

En el procesado de las muestras se han empleado tres medios base de cultivo:

- MEDIO RPMI-1640, sin L-Glutamina (Biological Industries)
- MEDIO HAM F-10, sin L-Glutamina (Biological Industries)
- MEDIO CHANG (Hana Biologies, Inc.)

Los dos primeros son medios base estándar para la obtención de cromosomas metafásicos. El medio Chang es específico para células fetales debido a la incorporación de una hormona

(la progesterona) que impide el crecimiento de células maternas. En la Tabla 8 se muestran las diferencias de los principales componentes de estos medios base de cultivo.

Tabla 8. Principales componentes de cada medio base de cultivo

Componentes	mg/l.	Componentes	mg/l.
Medio RPMI-1640			
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1000,0	KCl	4000,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1000,0	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	15120,0
Glucosa	20000,0	L-Asparagina	500,0
L-Cistina	500,0	L-Isoleucina	500,0
L-Leucina	500,0	L-Lisina HCl	400,0
L-SERINA	300,0	i-Inositol	350,0
 Medio Ham F-10:			
CaCl ₂ ·2H ₂ O	44,0	KCl	285,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	152,8	NaCl	7400,0
NaHCO ₃	1200,0	Na ₂ HPO ₄	153,7
Glucosa	1100,0	Piruvato de sodio	110,0
L-Arginina HCl	211,0	L-glutamina	146,0
L-Histidina HCl·H ₂ O	23,0	L-Leucina	13,0
L-Lisina HCl	29,0	L-Prolina	11,5
L-Serina	10,5		
 Medio CHANG			
Sales	7900,0	Dextrosa	1400,0
Aminoácidos	1000,0	Polipéptidos	66,0
Vitaminas	22,0	Desoxiribonucleósidos	20,0
Piruvato de sodio	110,0	Hormonas	0,002
Hormonas esteroides	0,001	Suero de ternera (v/v)	8,0

Ninguno de los tres medios base empleados es específico para poner de manifiesto la fragilidad cromosómica. En la Tabla 9 se muestran los principales componentes de cada medio de cultivo que influyen en la expresión de la fragilidad cromosómica.

Tabla 9. Principales componentes, de cada medio base de cultivo, que influyen en la expresión de la fragilidad cromosómica.

COMPONENTE	RPMI-164	HAM F-10	CHANG
Timidina	-	0,70 mg/l.	-
Acido Fólico	10,00 mg/l.	1,32 mg/l.	10,00 mg/l.
Hipoxantina	-	4,00 mg/l.	-
Metionina	150,00 mg/l.	4,48 mg/l.	150,00 mg/l.

2.2.1.2 Soluciones y productos

- a) COMPONENTES QUE SE AÑADEN AL MEDIO BASE DE CULTIVO:
 - Suero fetal de ternera (Biological Industries)
 - L-Glutamina (200 mM)(Gibco)
 - Penicilina (1000 uni/ml) (Biological Industries)
 - Estreptomicina (10 mg/ml) (Biologival Indistries).

- b) SOLUCIÓN SALINA
 - Solución Salina de Hanks sin calcio ni magnesio (Gibco)

- c) ANTIMITOTICO
 - Colcemid (2µg/ml) (Gibco)
 - Se utiliza 0,1 ml de la solución de Colcemid por cada ml de medio de cultivo.

- d) HIPOTONICO:
 - Citrato trisódico al 1% (Merck)

- e) FIJADOR:
 - Acido acético, etanol 4:1

- f) PRODUCTOS UTILIZADOS EN LAS TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN CROMOSÓMICA:
 - a) COLORANTES:
 - Leishman al 20% en tampon Leishman ph 6,8 (BDH)
 - Wright al 25% en tampón Sørensen ph 6,8 (Sigma).

- b) SOLUCIÓN DE 2 x SSC (NaCl 0,3 M) (Merck) y
CITRATO TRISODICO (0,03 M) (Merck)
- c) SOLUCIONES ENZIMATICAS:
-Solución de tripsina (1:250, Difco) al 0,05% en tampón
Leishman ph 6,8 (BDH).

2.2.1.3 Material y soluciones para microfotografía

- a) REVELADOR: Valca Universal
-Para película se utiliza una preparación de 1:19 (revelador: agua destilada)
-Para papel 1:9 (revelador: agua destilada)
- b) BAÑO DE PARO: Acido Acético al 5% en agua destilada.
- c) FIJADOR: Final Fijador ácido rápido (Valca)
- d) PELÍCULA FOTOGRÁFICA: AGFA COPEX RAPID A.H.U. (AGFA), 100 Asa.
- e) PAPEL PARA POSITIVOS:
-AGFA GEVAERT BROVIRA-BSI n°.2
-AGFA GEVAERT BROVIRA-BSI n°.3
-AGFA GEVAERT BROVIRA-BSI n°.4

2.2.2 Aparatos

- Agitador magnético (Selecta)
- Amplificadora Durst Laborator 1200
- Balanza de precisión (Sartorius)
- Baños termostáticos (Selecta)
- Cabinas de flujo laminar (Telstar)
- Centrífuga de rotor oscilante (Janetzky t5)
- Congelador (Philips)
- Esmaltadora (Geisa)
- Incubador de CO₂ (Forma scientific)
- Estufa de esterilización (Selecta)
- Lupa SZM (Olympus)
- Microscopio óptico AXIOPLAN MC 63 (Zeiss)
- Microscopio invertido (Nikon)

2.3 Metodología experimental en muestras de vellosidades coriales

2.3.1 Preparación medios de cultivo

Se han empleado tres medios base de cultivo: medio RPMI-1640, medio F-10 y medio Chang. Son medios estándar para la obtención de cromosomas metafásicos.

El medio Chang es específico para células fetales y consta de dos fracciones:

-fracción A: liofilizada

-fracción B: líquida

La fracción A se reconstituye con 20 ml. de agua destilada y se mezcla con la fracción B en proporción 10 a 90 respectivamente.

Las proporciones de los componentes añadidos a los medios base se detalla en la Tabla 10. El pH del medio debe mantenerse a 7,3 mediante el empleo de HCl 1N ó NaOH 1N. Durante todo el proceso es imprescindible mantener las condiciones de esterilidad.

Tabla 10. Concentración de los componentes añadidos a los medios base de cultivo expresados en ml/100 ml. de medio base.

	F-10	RPMI 1640	CHANG
Suero fetal de ternera inactivado	5	5	-
L-Glutamina	2	2	2
Penicilina/Streptomycin	2	2	2

El medio completo de F-10 y RPMI-1640, puede mantenerse en perfectas condiciones, durante seis meses, a -20°C. Es preferible no descongelar y congelar el medio ya preparado para evitar pérdida de actividad del suero fetal. Por ello se congela fraccionado en viales de 10 ml. En el caso del medio Chang, el tiempo desde la preparación a la utilización no debe exceder de una semana (Tabla 11).

Tabla 11 Temperatura de conservación en C° de los medios base y medios completos.

	F-10	RPMI 1640	CHANG	
			A	B
Conservación medio base	4	4	-20	4
Conservación medio completo	-20	-20	4	4

2.3.2 Extracción de la muestra

2.3.2.1 Semanas de gestación

La mayoría de extracciones coriales se han realizado entre la diez y la catorce semana de gestación, cuando las vellosidades tienen de 1 a 15 mm. de diámetro y forman el corion frondoso que dará lugar a la placenta. En este periodo las vellosidades tienen las características morfológicas y citológicas idóneas para la obtención de cromosomas a partir de las divisiones celulares espontaneas.

2.3.2.2. Biòpsia transcervical y transabdominal

Previamente a la extracción de la muestra coriònica se realiza una ecografia para localizar el lugar de la placenta, determinar la edad gestacional y comprobar que no existen contraindicaciones mèdicas como pèrdidas hemàticas o contracciones. Según la situación del feto y la implantación placentaria se opta por efectuar una extracción de muestra corial por vía transcervical o por vía transabdominal. En las biopsias del segundo o tercer trimestre sólo se utiliza la última vía.

Biòpsia transcervical

Tras la asepsia de cérvix uterino, bajo control ecogràfico se introduce la pinza de biòpsia y se obtienen las vellosidades coriales. El apartado 1.3.1.2 de Introducción muestra un esquema de la técnica utilizada en este método (Figura 7b).

Biòpsia transabdominal

Bajo control ecogràfico y tras la asepsia de la pared abdominal, se introduce una aguja del calibre 20 hasta llegar al corion frondoso y las vellosidades coriales se obtienen por aspiración. La Figura 7a, muestra un esquema de la técnica utilizada en este método.

2.3.2.3 Recogida y conservación de la muestra

El tejido extraído se recoge en un tubo de fondo cónico que contiene medio base de cultivo RPMI 1640 con 2% de antibióticos (penicilina/estreptomicina), 2% de L-Glutamina y 1% de heparina.

Es importante que el tubo utilizado se llene hasta el borde con el fin de que las vellosidades no se adhieran a las paredes del mismo y queden sin contacto con el medio. Este ha de estar precalentado a 37°C para que la muestra sufra lo mínimo posible el cambio de condiciones ambientales.

El tiempo de demora hasta que la muestra llega al laboratorio ha de ser el mínimo posible, conservándose la muestra a temperatura ambiente.

Si después de la extracción no se puede iniciar de inmediato el cultivo citogenético, la muestra se recoge en un tubo de fondo cónico conteniendo medio completo de cultivo y así puede mantenerse 24 horas a temperatura ambiente.

Todas las manipulaciones a las que se someten las muestras, desde la extracción hasta el momento de finalizar el cultivo para su análisis citogenético, deben hacerse en condiciones estériles, trabajando en la campana de flujo laminar y utilizando material estéril desechable o autoclavado.

2.3.3. Técnica de procesado de la muestra

Para la obtención de cromosomas a partir de células de vellosidades coriales se ha utilizado la técnica descrita por Simoni y col. (1983) modificada en nuestro laboratorio.

2.3.3.1 Caracterización, lavado y selección de la muestra

La observación de la muestra se realiza con un estereomicroscopio de 50 aumentos situada dentro de la cabina de flujo laminar para extremar las medidas de esterilidad. La muestra se coloca en una cápsula de Petri de 35 mm. de diámetro conteniendo 2 ml. de solución salina.

Las vellosidades coriales pueden presentarse en medio de una solución hemática, a veces coagulada, de la que es necesario separarla con ayuda de dos agujas que actúan como dos pequeños escisores. Si es necesario se renueva la solución salina varias veces hasta visualizar el tejido con nitidez.

Durante el proceso de extracción pueden arrastrarse fragmentos de decidua materna. Es necesario un examen minucioso para separar el tejido fetal del supuesto materno. El tejido decidual materno presenta un aspecto celular compacto y poco transparente que contrasta con el aspecto celular de las vellosidades coriales (Figura 17).

La presencia de decidua materna es más frecuente en biopsias transcervicales en las que se obtiene un "tronco" amplio de vellosidades coriales. Es necesario separar meticulosamente todas y cada una de las "ramas" coriales para eliminar cualquier tejido denso (grumo) de decidua materna adherida en los bordes. Este paso es especialmente importante en el caso del cultivo. Si la selección de tejido corial se realiza cuidadosamente es posible evitar los pseudomosaicismos debidos a la contaminación materna. En caso de duda sobre el origen del tejido es recomendable establecer un cultivo paralelo. Procesar separadamente la muestra que presenta problemas en la identificación y al final del estudio contrastar los resultados.

Cantidad de muestra.. Después de realizada la separación del supuesto tejido materno, se hace una estimación del peso, en miligramos, de las vellosidades coriales mediante comparación con una serie fotográfica correspondiente a pesos escalonados como muestra la Figura 18. Esta comparación sirve de referencia al operador para hacer una valoración del peso de la muestra (Newport y col, 1986).

2.3.3.2 Morfología de las vellosidades coriales

El tronco de vellosidades coriales ha de presentar la morfología típica en condiciones fisiológicas normales de desarrollo. Las vellosidades terciarias han de tener forma de "árbol", cuyo tronco ha de presentar numerosos brotes o yemas, además de buena irrigación. La Figura 19 muestra el aspecto de la morfología normal de una vellosidad corial.

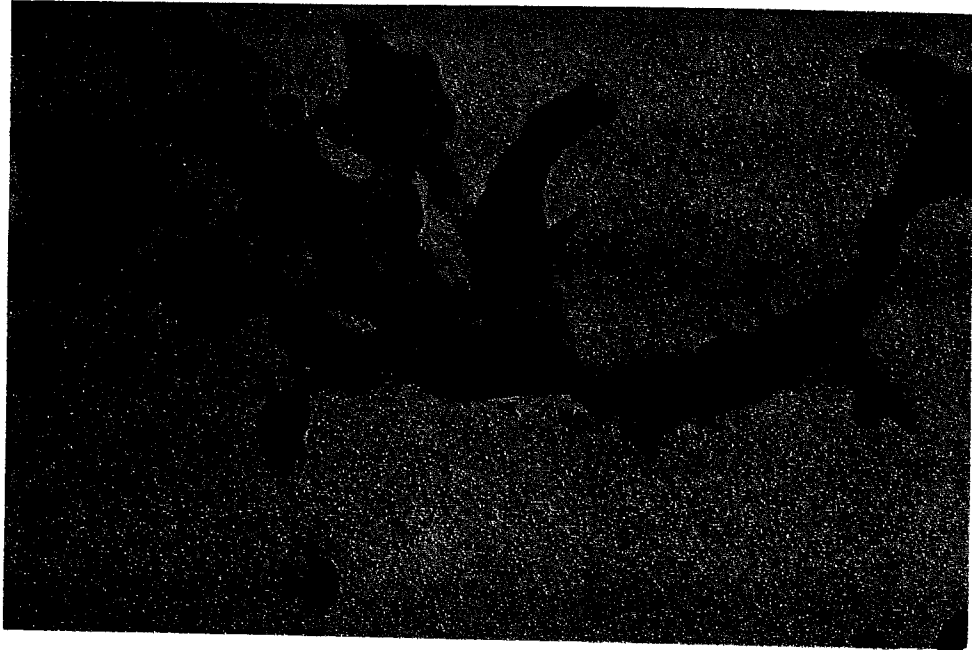


Figura 17. **Detalle** de vellosidades c3rtales y decidua materna (cedida por Cuatrecasas).

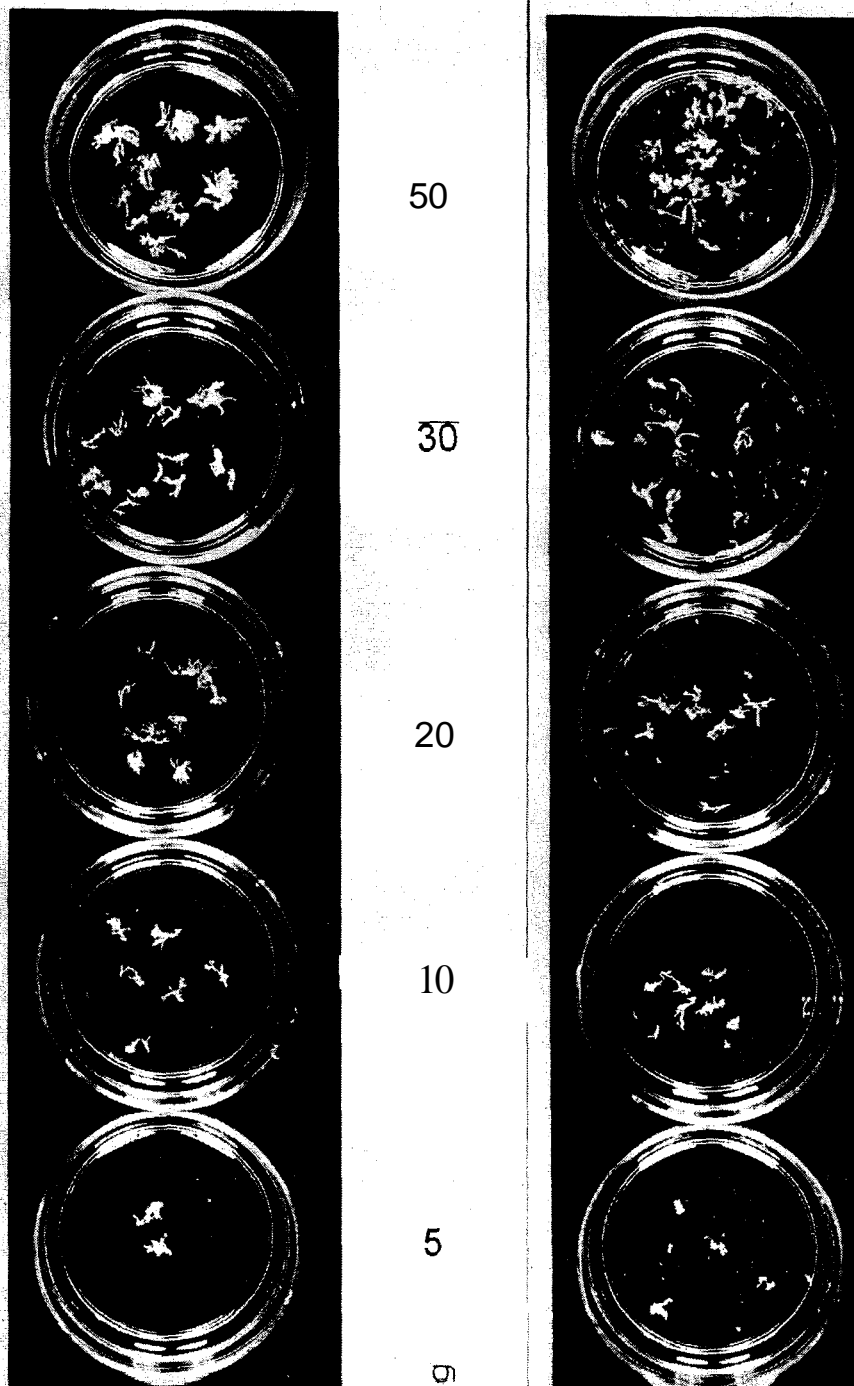


Figura 18. Muestras de vellosidades coriales con diferente cantidad de tejido (5-50 mg.)
(Fotografías cedidas por Simoni)

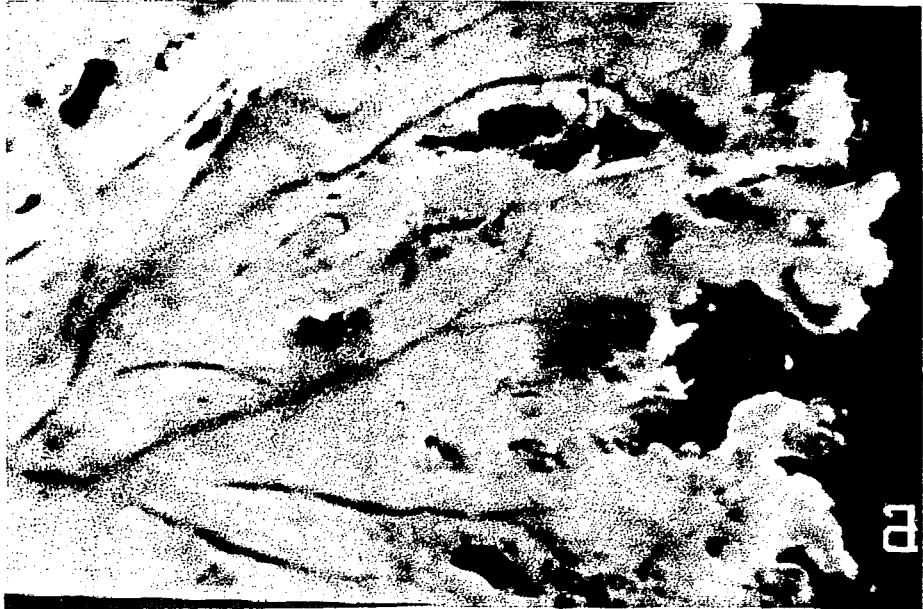


Figura 19. Morfología típica de las vellosidades coriales mostrando la irrigación sanguínea y el aspecto digitiforme con numerosos brotes. Dos aspectos, a diferente aumento, de la misma muestra: a) 10x b) 20x. (Cedidas por Custrecasas).

Handwritten arrows pointing from the caption to the corresponding images.

2.3.4 Modalidades de cultivo y extracción del mismo

Una vez seleccionado y tipificado el tejido, la muestra está preparada para poder seguir cualquiera de las tres modalidades diferentes de procesado: Método directo, Cultivo 24-48 horas (semidirecto) y Cultivo Largo.

Dadas las características embrionarias del tejido corial es posible analizar directamente las metafases espontáneas que se producen en las células del citotrofoblasto. El hecho de cultivar el tejido 24-48 horas mejora la cantidad y calidad de dichas divisiones. Algunos laboratorios utilizan el cultivo largo a partir de fibroblastos para asegurar el resultado en casos de muestras escasas o para controlar mejor las discrepancias diagnósticas. Dicho cultivo largo, obedece a una técnica de cultivo primario convencional, por el que se obtienen numerosas células en división, pero requiere de 8-10 días de cultivo por lo que demora sensiblemente el diagnóstico.

En nuestro estudio siempre se ha utilizado cultivo de 24 horas. Sólo en cinco ocasiones, en las que era necesario garantizar el resultado citogenético, se realizaron ambos cultivos.

Cultivo 24-48 horas (Semidirecto)

Este método de cultivo es el más utilizado siendo una modificación del descrito por Simoni y col. (1983). En este método se procede de la siguiente forma:

- Con una pipeta Pasteur se traspasan las vellosidades coriales a una placa de Petri de 35 mm. de diámetro. Esta debe contener 2 ml. de medio de cultivo completo precalentado a 37° C.

- Se incuba durante 24 horas en una estufa a 37° C. y 5% de CO₂.

- Con el fin de conseguir el máximo número de células en metafase, se añade al cultivo 0,2 ml de antimetabólico (Colcemid, a una concentración de 10µg/ml) durante 60 minutos. Al unirse el antimetabólico a los dímeros de tubulina, provoca la despolimerización de los microtúbulos que forman las fibras del huso, bloqueando así la división celular en prometáfase/metáfase.

- Pasado ese tiempo se traspasa el tejido a un tubo de centrifuga con tapón de rosca y se añade la solución hipotónica (citrato trisódico al 1%). Se incuba en un baño termostático a 37° C. durante unos 20 minutos.

- Seguidamente con ayuda de una pipeta Pasteur se elimina la solución hipotónica.

-Se añade fijador (ácido acético-etanol, 4:1), dejándolo actuar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Es necesario mantener el tubo tapado debido a la gran volatilidad de los componentes de la solución.

-A continuación, se debe extraer cuidadosamente el fijador. Repitiendo dos veces más la operación de añadir y eliminar fijador, siempre a temperatura ambiente. Para conseguir mejores resultados es aconsejable dejar la muestra un mínimo de 20 minutos en el fijador para cada lavado.

-Para terminar se procede a la última fijación, esta vez manteniendo los tubos a 4° C. durante toda la noche.

La eliminación e incorporación de los reactivos debe hacerse con suavidad haciendo "mover" las vellosidades para que estos lleguen a toda la superficie de la muestra. Es importante evitar que esta se "apelmace" en forma de botón en la base del tubo en el que se realiza el procesado. Hay que destacar que en esta etapa, dado que se trata aún de restos de un tejido compacto, es necesario disgregar las células antes de proceder a la realización de las preparaciones cromosómicas.

El número de metafases completas, es decir metafases con el número cromosómico completo, incrementa manteniendo el último fijador durante 12 horas a 4°C.

En la Figura 20, se resumen los pasos seguidos en este tipo de cultivo y en la extracción del mismo.

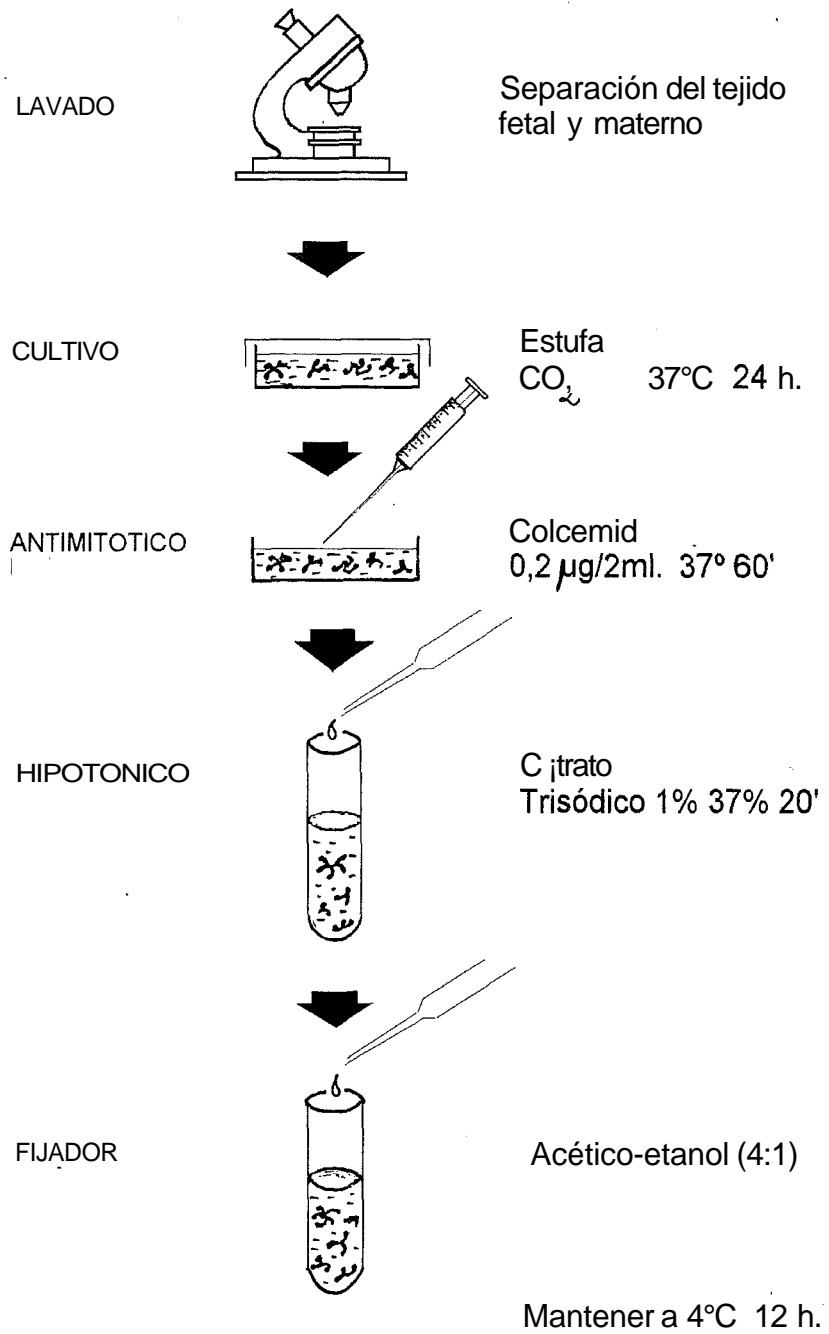


Figura 20. Metodología empleada en el cultivo semidirecto para la obtención de cromosomas a partir de muestras de vellosidades coriales.

Para realizar extensiones y obtener preparaciones cromosómicas se efectúa el procedimiento siguiente:

-Se extrae meticulosamente el fijador del tubo.

-La disgregación celular se realiza añadiendo ácido acético al 60% unos 5 minutos. La cantidad de ácido incorporado es variable y directamente proporcional a la cantidad de muestra. Para facilitar la disgregación se realiza agitación mecánica.

-Se procede a limpiar y desengrasar los portaobjetos pasándolos por agua y posteriormente por etanol al 70% a -20° C. Se secan con papel de filtro, precalentándolos a 37°-40° C. sobre una placa calefactora.

-Se deja caer una gota de la suspensión celular sobre el portaobjetos situado sobre la placa desde una distancia de 25 cm. de alto.

-Con el fin de obtener una extensión homogénea de la suspensión se mueve manualmente el portaobjetos y se deja secar hasta que no haya rastro de humedad.

Previamente a la tinción, para tener una noción de la cantidad y calidad de las metafases obtenidas por este procedimiento, se observan las preparaciones al microscopio invertido.

Cultivo largo

Consiste en la puesta en cultivo de las vellosidades coriales para obtener cromosomas a partir de fibroblastos. El proceso es similar al empleado en cualquier otro tipo de tejido. Tras la disgregación del tejido se siembran mediante el método "Sandwich" y se establecen cultivos primarios. En ocasiones es necesario realizar subcultivos (cultivos secundarios). El método de extracción del cultivo y de extensiones se efectúa siguiendo el protocolo de cultivos primarios convencionales. Entre el 10-14 día de cultivo es posible obtener cromosomas de las muestras para su posterior análisis.

2.4. Técnicas de identificación cromosómica

2.4.1. Tinción uniforme

La coloración uniforme del cromosoma, permite la observación de ambas cromátides y posibilita el estudio del número de cromosomas, su morfología, tamaño, posición del centrómero y constricciones secundarias de los mismos. Así mismo mediante la tinción uniforme se ponen de manifiesto alteraciones numéricas y algunas estructurales, así como gaps y roturas tanto de cromosoma como de cromátide.

El procedimiento seguido para obtener preparaciones con este tipo de tinción ha sido el siguiente:

-Sobre cada portaobjeto en posición horizontal se añaden 5 ml. de solución colorante Leishman: Tampon Leishman(4:1). Dejando que actúe durante 30 minutos. Se lava con agua corriente y se deja secar al aire.

La Figura 21 muestra metafases parciales con diferentes lesiones cromosómicas.

2.4.2. Tinción bandas

2.4.2.1. Bandas G

Ponen de manifiesto un patrón de bandas, gracias al cual se pueden caracterizar y diferenciar cada una de las parejas de cromosomas homólogos y permite localizar cada una de las zonas y regiones de los mismos. Con este tipo de tinción se pueden identificar además de las anomalías cromosómicas numéricas, anomalías de tipo estructural que pueden pasar desapercibidas con tinción uniforme así como determinar el punto exacto implicado en dicha alteración estructural o de lesiones cromosómicas.

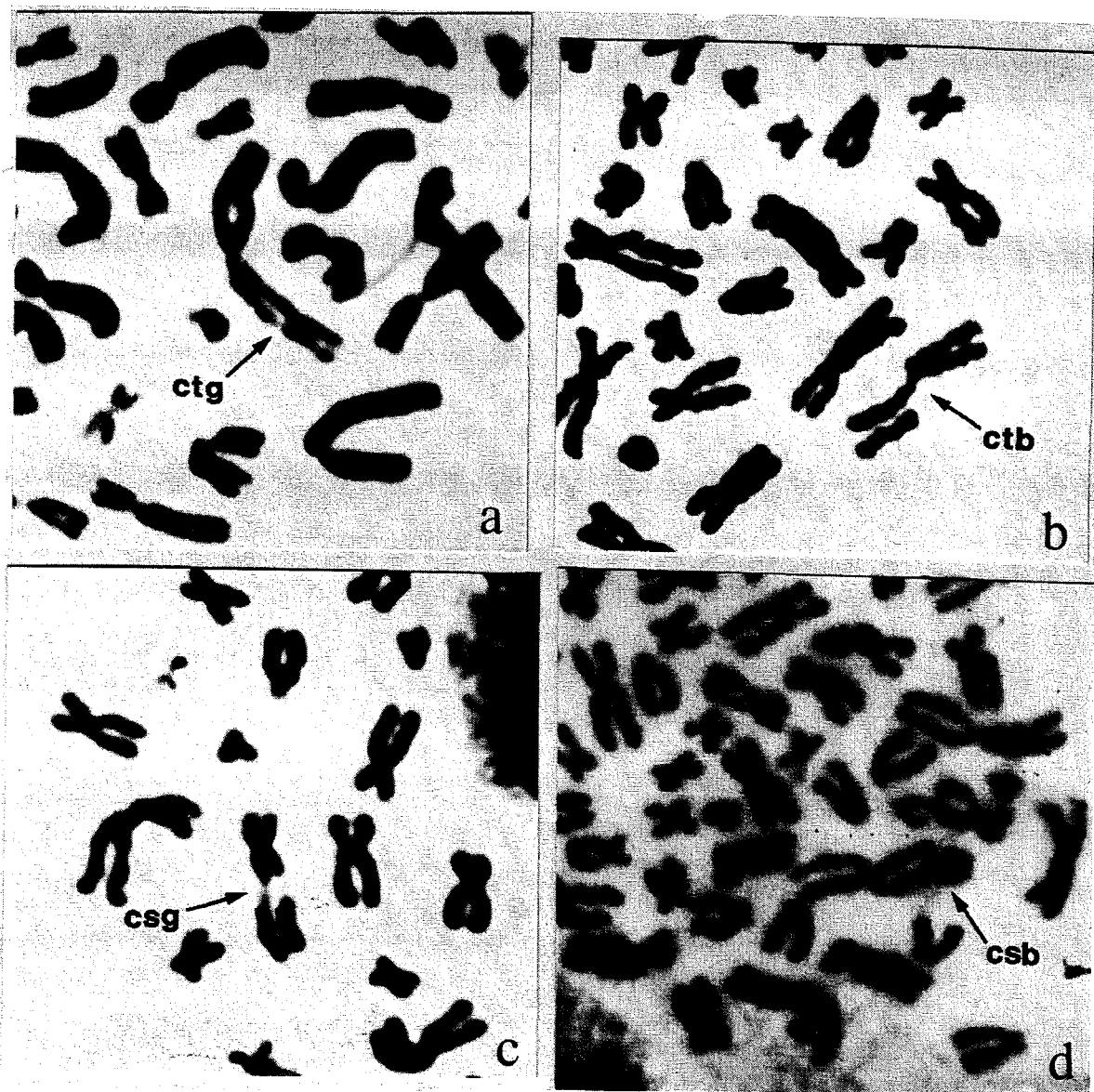


Figura 21. Metafases parciales de vellosidades coriales tratadas con tinción uniforme mostrando diferentes lesiones cromosómicas. a) gap de cromátide (ctg). b) rotura de cromátide (ctb) c) gap de cromosoma (csg) y d) rotura de cromosoma (csb).

Se han descrito muchos procedimientos para la tinción de bandas G. En nuestro estudio se han empleado dos que se describen a continuación.

a) Tratamiento mediante tripsina

Para la obtención de este tipo de bandas se ha utilizado una adaptación del método de Gallimor y Richardson (1973), que consiste en los siguientes pasos:

- Se incuban las preparaciones con solución salina 2 x SSC a 65°C. durante 5-15 minutos.
- Se lavan las preparaciones con agua corriente y se dejan secar al aire.
- Se introducen en una solución de tripsina al 0,05% en tampon Leishman durante 1-3 segundos.
- Se lavan con agua corriente y se dejan secar al aire.
- Se tiñen las preparaciones con colorante Leishman al 25% en tampón Leishman durante 5 minutos.
- Se lavan y se dejan secar al aire.

Los tiempos empleados para el tratamiento con solución de 2 x SSC como para la tripsina, varían según el tiempo de envejecimiento de las preparaciones (tiempo transcurrido entre la realización de las extensiones y la aplicación de las técnicas de bandas, que normalmente suele ser 3-4 días) y de otros factores muy variables como la temperatura y humedad ambiental. Es importante realizar el tratamiento con tripsina durante el tiempo adecuado ya que al actuar como agente proteolítico, si actúa durante un periodo de tiempo demasiado largo, provoca la digestión excesiva del cromosoma.

b) Tratamiento mediante Wright

En este caso se ha utilizado una adaptación de la técnica descrita por Yunis (1982):

- Se incuban las preparaciones en solución de 2 x SSC a 65°C. durante 1/2-10 minutos.
- Se lavan con agua corriente y se dejan secar al aire.
- Se tiñen con colorante Wright en tampón de Sørensen (1:3) durante 2-4 minutos.
- Se lavan con agua corriente y se secan al aire.

En aquellos casos que el tratamiento haya sido insuficiente se procede a repetir el proceso. Esto es, destinción con metanol y nuevo tratamiento con 2 x SSC y tripsina o Wright.

La calidad de las bandas mediante ambos métodos es equivalente, aunque el efecto de la tripsina es más drástico (Figura 22).

2.4.2.2. Bandas C

Mediante esta técnica se tiñen las zonas de heterocromatina constitutiva de los cromosomas. Es muy útil en el caso de que existan polimorfismos cromosómicos como por ejemplo las inversiones pericéntricas del cromosoma 9. en las que se distingue la zona heterocromática invertida localizada en los brazos cortos del cromosoma 9.

La técnica empleada es una adaptación de la de Sumner (1972) en la que:

-Se sumergen las preparaciones en una cubeta con HCl 0,2 N durante 30 minutos a temperatura ambiente.

-Se lavan con agua destilada.

-Se incuban en solución de $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ al 25%, a 60°C., durante un minuto y treinta segundos.

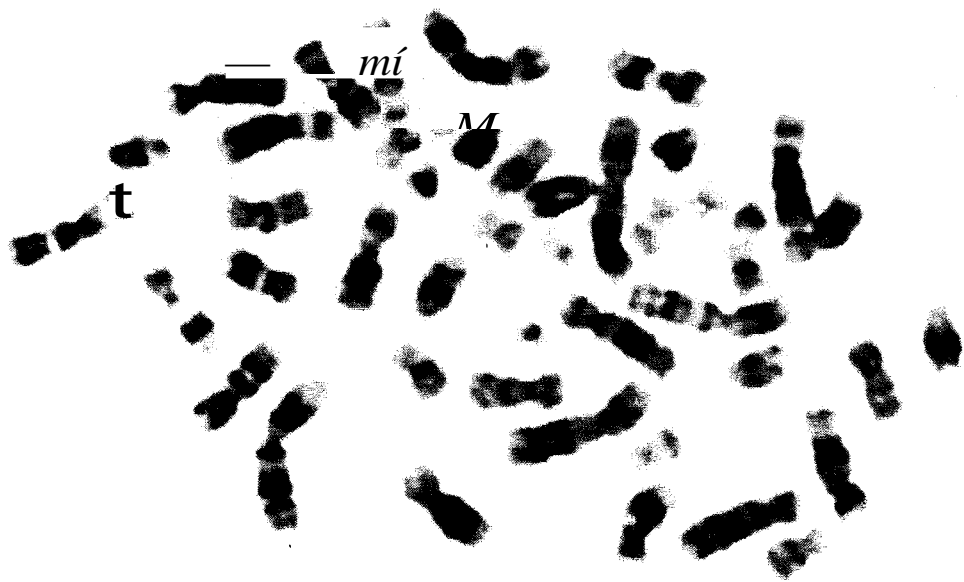
-Se lavan con metanol y agua destilada dos veces para eliminar bien los restos del hidróxido bórico.

-Se ponen en solución de 2 x SSC a 65°C. durante una hora y media.

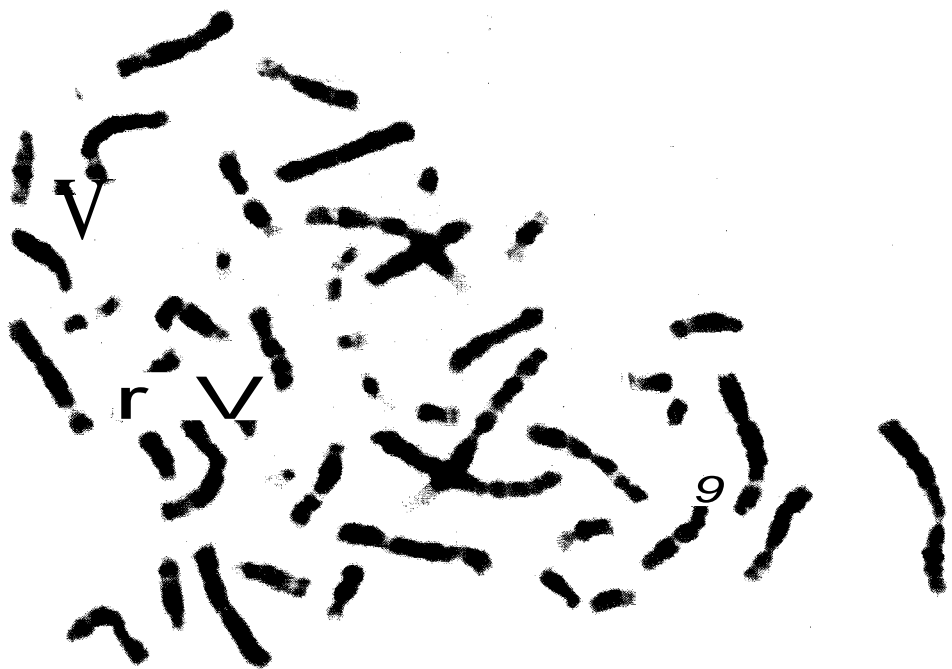
-Se lavan con agua corriente y se dejan secar al aire.

-Se tiñen con Leishman al 25% en tampón Leishman durante quince minutos. Se lava y se deja secar al aire.

La Figura 23 muestra dos metafases con tinción de bandas C poniendo de manifiesto las zonas heterocromáticas de los cromosomas 1, 9, 16 e Y.



a



b

Figura 22. Metafasas de vellosidades coriales con bandas G, obtenidas mediante diferentes tratamientos. a) Tripsina. b) Colorante Wright.

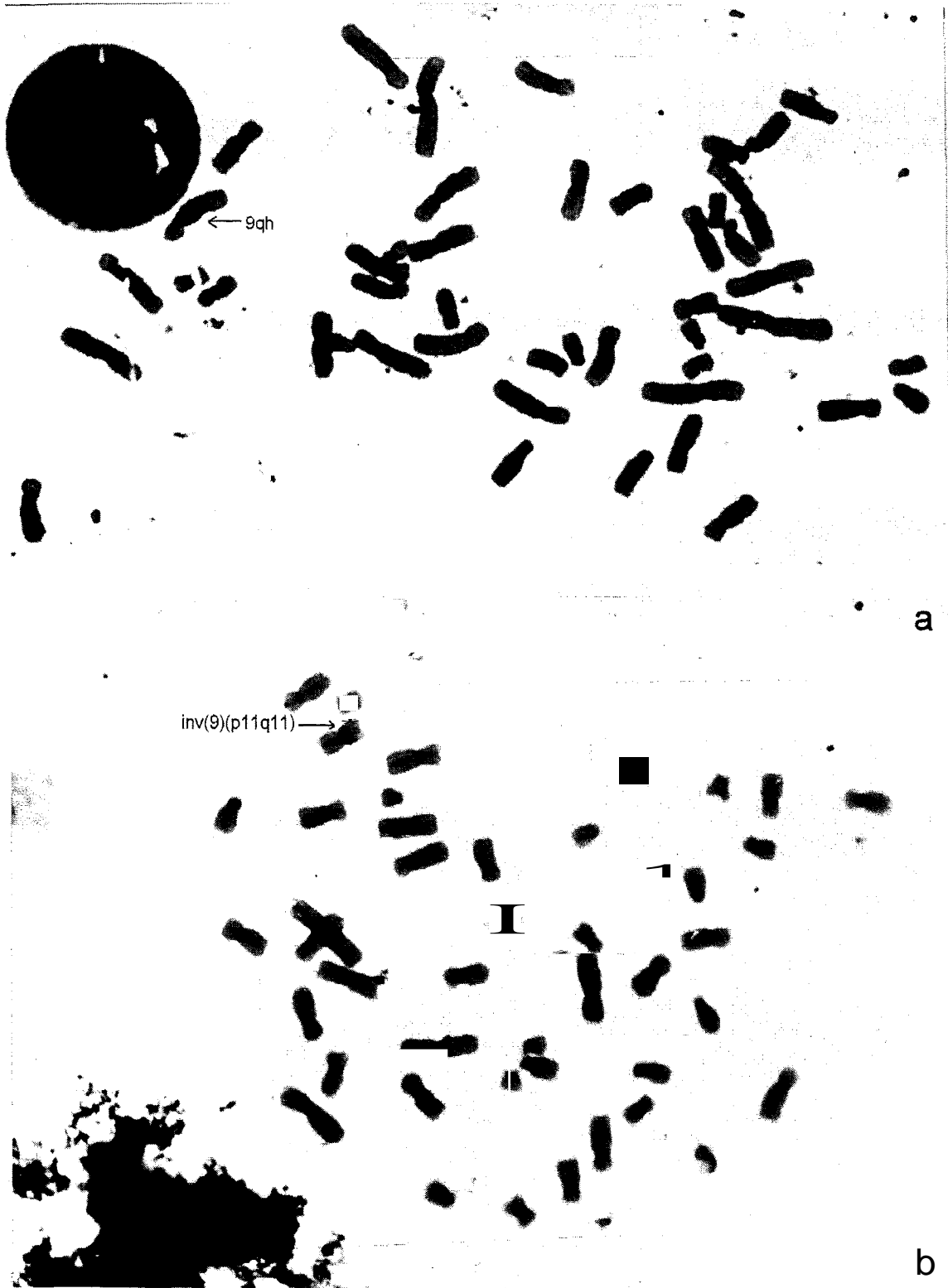


Figura 23. Metafases de vellosidades coriales obtenidas mediante tinción de bandas C. a) metafase mostrando una abundante heterocromatina constitutiva en el cromosoma 9. b) metafase con una inversión pericéntrica del cromosoma 9.

2.4.3. Tinción secuencial uniforme-Bandas G

La técnica secuencial de bandeado cromosómico Leishman-Wright permite el estudio de la misma metafase con tinción uniforme y bandas G. Con el colorante Leishman, que permite la coloración homogénea del cromosoma, se pone de manifiesto la morfología de los cromosomas, permitiendo la observación de las lesiones cromosómicas producidas (gaps y roturas). La tinción de bandas G permite la identificación del cromosoma y la localización del punto exacto en el que se produce la lesión. Uno de los objetivos del presente estudio ha sido la puesta a punto de esta técnica de bandeado secuencial en este tipo de tejido (Pérez y col, 1990). La técnica comprende los siguientes pasos:

-Se observan al microscopio las preparaciones teñidas uniformemente. Se fotografían las metafases con lesiones cromosómicas o que nos interesen para el análisis.

-Dos o cinco días después de realizar las extensiones, las preparaciones se someten a la técnica de bandas G, según la metodología descrita en el apartado 2.4.2.1., procediéndose antes a desteñir las preparaciones.

-Se desteñen los portaobjetos sumergiéndolos en una serie de baños de solución de etanol en concentración creciente (del 30%, 70% y 90%), después en orden decreciente (90%, 70%, y 30%) dejándolo un minuto en cada cubeta. Se termina hidratando los portaobjetos en una cubeta con agua destilada durante cinco minutos. Se dejan secar al aire.

-En aquellos casos en que el tratamiento con 2 x SSC o con Wright ha sido insuficiente, se repite el proceso: desteñición de las preparaciones, tratamiento con 2 x SSC y tinción para bandas G.

-Una vez teñidas las preparaciones se procede a la observación y fotografiado de aquellas metafases analizadas previamente con tinción uniforme.

La Figura 24 muestra un esquema de esta técnica, y la Figura 25 muestra una misma metafase después de aplicar esta metodología.

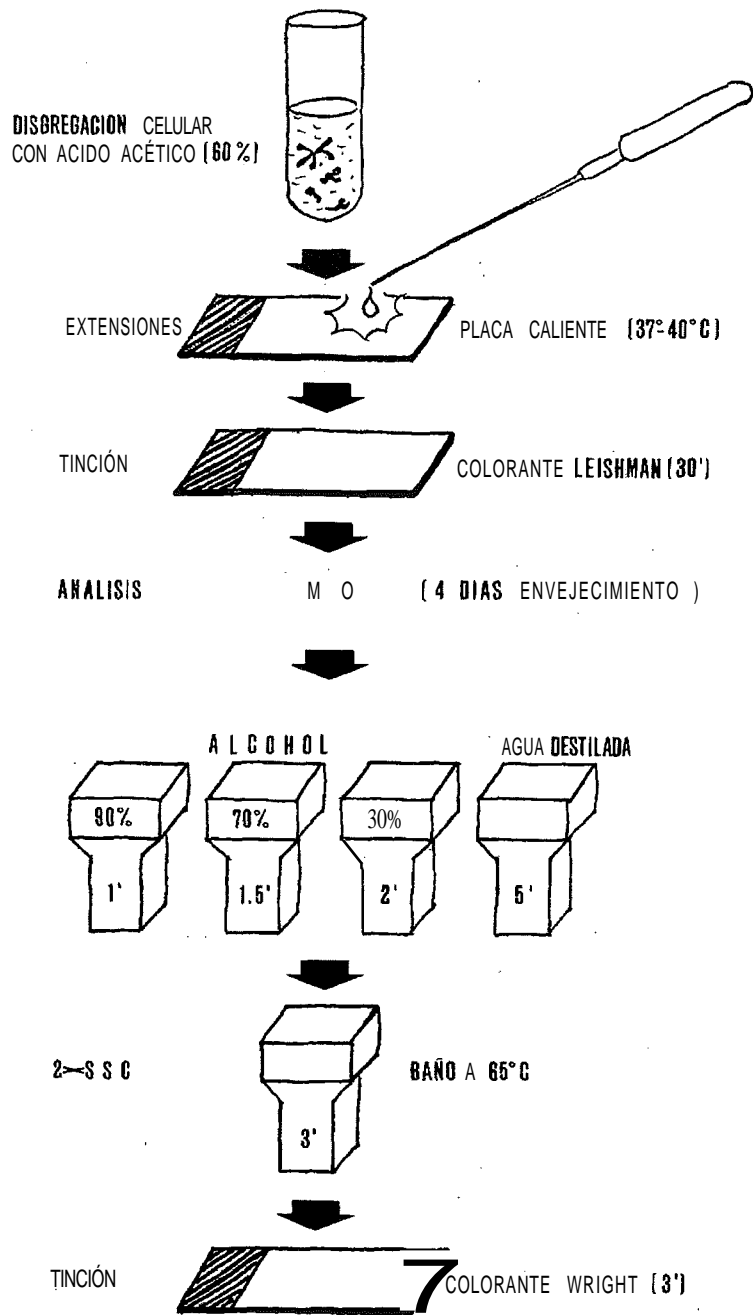
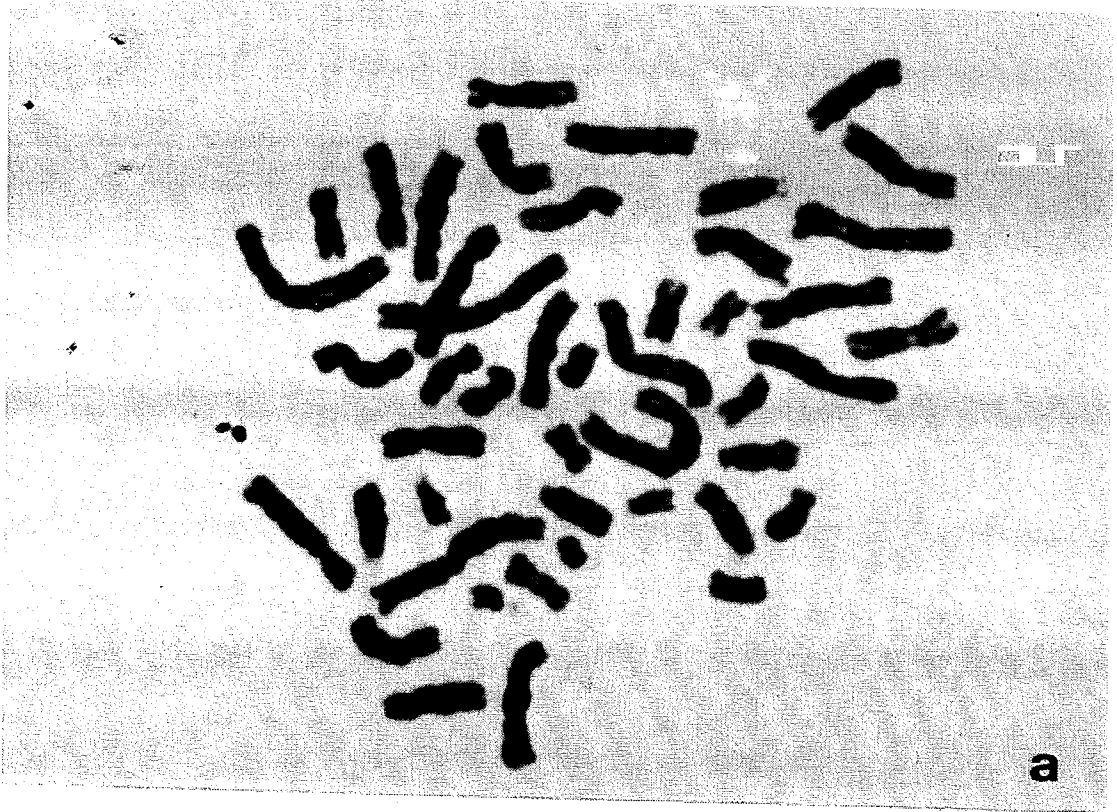
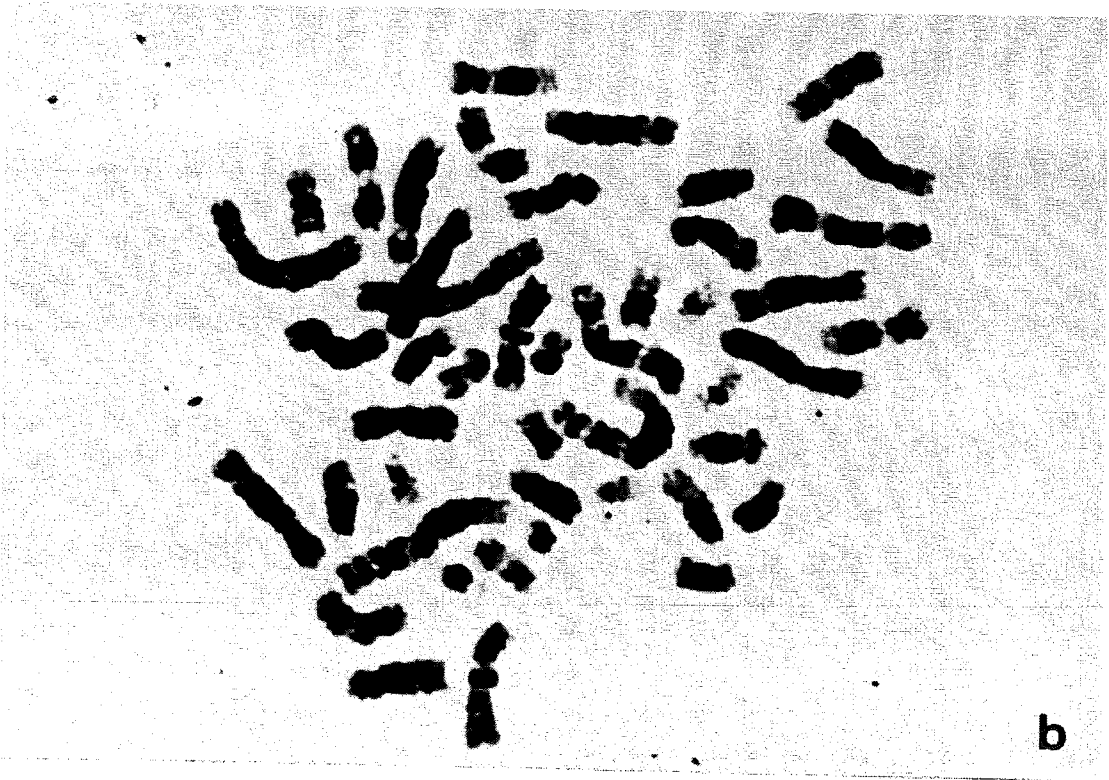


Figura 24. Esquema de la técnica secuencial de bandeado cromosómico Leishman-wright.



a



b

Figura 25. Metafase de una vellosidad corial obtenida mediante tinción secuencial. a) tinción uniforme con Leishman. b) bandas G mediante Wright.

2.5. Análisis citogenético

Se han analizado un mínimo de veinte metafases completas por individuo. Mediante la técnica de bandas se han detectado las anomalías y lesiones cromosómicas e identificado los cromosomas y bandas implicadas.

Se han realizado un mínimo de 8 cariotipos por individuo, pero en el caso de detectar la existencia de un clon anómalo se han analizado un mínimo de cinco cariotipos más. Se considera que existe un clon: a) en caso de pérdida cromosómica, cuando dicha alteración aparece en un mínimo de tres metafases. b) en caso de reorganizaciones estructurales o ganancia cromosómica, cuando estas se presentan en dos o más metafases.

Para la descripción del cariotipo se ha seguido la nomenclatura internacional (International System Cytogenetic Nomenclature ISCN, 1985). Los criterios utilizados para la clasificación de gaps y roturas han sido las propuestas por Vogel y Motolsky (1982).

3. RESULTADOS

3 RESULTADOS

3.1 Características generales de la serie estudiada

3.1.1 Indicaciones diagnósticas

Las indicaciones para la realización de una biòpsia de corion se muestran en la Tabla 12. Como se puede observar la indicación más frecuente ha sido la Ansiedad (40,5%), seguida de Edad Materna avanzada(39,7%).La indicación por Anomalía Génica Familiar (Diagnóstico molecular) aparece en tercer lugar con una frecuencia del 8,3%. En estos casos, parte de la muestra se reserva para realizar, además del diagnóstico molecular como prioridad, el estudio citogenético en base al riesgo potencial de cada embarazo de portar un feto con alguna anomalía cromosómica.

El 3,9% de los casos recibidos se deben a la indicación de Hijo Anterior Afecto, tanto por antecedentes de malformaciones físicas como retraso mental (sin clasificar) o cromosomopatías.

Tabla 12. Frecuencia de las Indicaciones diagnósticas de las muestras analizadas

Indicación	Casos	%
Ansiedad	450	40,5
Edad Materna Avanzada	441	39,7
Hijo Anterior Afecto	43	3,9
Antecedente Familiar	25	2,2
Anomalía Cromosómica en Progenitores	6	0,5
Anomalía Ecográfica Previa	24	2,2
Aborto de Repetición	10	0,9
Exposición a Radiación	7	0,6
Meiosis Anómala en Semen	10	0,9
Consanguinidad	4	0,5
Anomalía Génica Familiar	92	8,3
Total	1112	100.0

3.1.2 Semanas de gestación

El 84% de las muestras analizadas se encuentran entre la 10 y 14 semana de gestación. La semana 11 ha sido la más frecuente (25,45%). Entre la 15 y 17 semana el número de biopsias va decreciendo (7,82%), llegando al mínimo entre la 18 y 36 semana en el que las muestras son más escasas (5,4%). Las extracciones de muestras coriales respecto a la semana de gestación se indican en la Tabla 13.

Tabla 13. Distribución de las muestras coriales por semanas de gestación

Semana	n	%
8	7	0,63
9	23	2,07
10	205	18,44
11	283	25,45
12	218	19,60
13	140	12,59
14	88	7,91
15	35	3,15
16	34	3,06
17	18	1,62
18	18	1,62
19	13	1,17
20	13	1,17
21	6	0,54
22	3	0,27
23	-	-
24	1	0,09
25	-	-
26	-	-
27	1	0,09
28	2	0,18
29	-	-
30	1	0,09
31	-	-
32	1	0,09
33	-	-
34	1	0,09
35	-	-
36	1	0,09

3.1.3 Medios de cultivo empleados

La Tabla 14 muestra la proporción de cada uno de los medios de cultivo empleados en las muestras analizadas. El medio más utilizado ha sido el RPMI-1640 (87% de las muestras).

Tabla 14. Medios de cultivo empleados en las 1112 muestras coriales

Medios de cultivo	n	%
RPMI-1640	963	86.6
F-10	8	0.7
CHANG	141	12.7
Total	1112	100.0

3.1.4 Cantidad de muestra y técnica de extracción ginecológica

La vía de acceso utilizada para la obtención de las muestras ha sido en 572 casos la transcervical (51,4% de las muestras) y en 540 la transabdominal (48,6%). La cantidad obtenida, en miligramos, más frecuente pertenece al grupo de 5-10 mg. (463 muestras). Solamente en 79 casos ha sido menor de 5 mg. (Tabla 15).

Tabla 15. Cantidad de muestra corial y vía de extracción empleada

Cantidad de muestra (mg.)	---Muestras---		-----vía de extracción-----			
	nº	%	TA	%	TC	%
<5	79	7.1	43	54.4	36	45.6
5-10	463	41.6	225	48.6	238	51.4
11-20	283	25.5	117	41.3	166	58.7
21-30	110	9.9	63	57.3	47	42.7
>30	177	15.9	92	52.0	85	48.0
Total	1112	100.0	540	48.6	572	51.4

3.1.5 Frecuencia de abortos debido a la técnica de extracción

Para el estudio de la evolución fetal y perinatal post-extracción de muestra, se han analizado 100 casos consecutivos de pacientes con indicación para diagnóstico prenatal. Las indicaciones por las que habían sido remitidas han sido la ansiedad (53%) y la edad materna avanzada (44%) (Tabla 16).

Tabla 16. Indicaciones diagnósticas de las 100 muestras

Indicaciones	n
Ansiedad	53
Edad materna avanzada	44
Otras	3
Total	100

Las semanas de gestación en las que se han realizado las extracciones se han dividido en los siguientes grupos: menores de 10 semanas, 11 semanas, 12 semanas y mayores de 12 semanas. Aunque el mayor número de muestras corresponde a la semana 11 de gestación, en general se reparten homogéneamente en cada grupo gestacional(Tabla 17)

Tabla 17. Frecuencia de muestras por semana de gestación

Semanas de gestación	n
<10	26
11	34
12	22
>12	18
Total	100

La técnica de extracción utilizada para la obtención del tejido corial, ha sido la transcervical, en 53 casos y en los 44 casos restantes la transabdominal. La cantidad de muestra obtenida ha sido variable. En el 62% de los casos la cantidad oscilaba entre 5-15 mg., sólo en 8 ocasiones se obtuvo menos de 5 mg. de muestra (Tabla 18).

Tabla 18. Cantidad de tejido corial obtenido en la extracción

Cantidad en miligramos	n
<5	8
5-15	62
>15	30
Total	100

Los resultados citogenéticos obtenidos han mostrado que 97 casos corresponden a cariotipos normales y 3 anómalos correspondiendo a los siguientes cariotipos: 47,XX,+18; 45X; 46,XY/46,XY+13 (con el 45% de las células trisómicas). En todas las muestras se han estudiado un número de 20 metafases completas, solo en una ocasión con cariotipo 46,XY se analizaron 7 metafases. Las incidencias de la evolución perinatal, después de la extracción de la muestra, se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Incidencia de la evolución fetal y perinatal en 100 biopsias coriales.

* 2 metrorragias de primer trimestre

(parto natural a término)

* 2 roturas prematuras de membranas:

18 semanas (interrupción del embarazo)

20 semanas (interrupción del embarazo)

* 1 desprendimiento placentario en la semana 39 de gestación.

* 1 eclampsia 30 semanas (cesárea, varón, peso al nacer 1425 gr.)

* 2 recién nacidos con malformación:

1 teratoma sacrococigeo

1 hemivértebra

*5 cesáreas. Peso recién nacidos: <2500 gr - 4 casos

>4000 gr - 5 casos

Sólo en dos casos se produjo una interrupción del embarazo debida a roturas prematuras de membranas y hubo un caso de muerte perinatal. En estos casos se encontraron dos de las anomalías cromosómicas descritas: en un caso, de rotura prematura de membranas, el cariotipo correspondía a 46,XY/47,XY+13 y en el caso de la muerte perinatal el cariotipo fue 47,XX+18.

3.2 Resultados citogenéticos

3.2.1 Rendimiento de la técnica

En nuestra serie se ha obtenido un resultado citogenético en el primer intento en 1048 casos, lo que supone un éxito diagnóstico del 94,25%. Ello significa que de las 1112 muestras procesadas no se obtuvo diagnóstico citogenético en un 5,75%.

3.2.1.1 Factores que influyen en la obtención de diagnóstico citogenético

Una de las causas de la no obtención de resultados puede ser debida a las características intrínsecas de la muestra o a fallos de laboratorio. Para determinar las posibles causas, hemos analizado su relación con diferentes parámetros.

Entre los fallos atribuibles al laboratorio, consideramos los cortes de luz prolongados que alteren las condiciones del cultivo; algún producto que llega al laboratorio en mal estado; y los fallos humanos en algún momento del procesado. Estos fallos, en general, son difíciles de cuantificar.

Hemos analizado los posibles problemas intrínsecos a la muestra, tales como la cantidad de tejido en una extracción y la edad gestacional; y factores extrínsecos, tales como los medios de cultivo empleados.

La cantidad de muestra es independiente de la edad materna; la obtención de poca cantidad de tejido es debido, generalmente, a problemas obstétricos en el momento de la extracción. Extraer mayor cantidad de tejido supone aumentar el número de punciones lo que aumenta considerablemente el riesgo de aborto.

Relacionando los casos sin diagnóstico citogenético con la cantidad de muestra extraída (Tabla 20), se observa un porcentaje de fallos muy elevado en muestras de menos de 5 miligramos (31,65%). El porcentaje decrece sensiblemente en muestras mayores de 10 miligramos y se distribuye de forma homogénea entre los diferentes grupos.

Tabla 20. Frecuencia de casos sin diagnóstico citogenético en relación a la cantidad de muestra

Cantidad	nº casos	sin diagnóstico	%/cantidad	%/total
<5	79	25	31,65	2,25
5-10	463	19	4,10	1,71
11-20	283	12	4,24	1,08
21-30	110	4	3,64	0,36
>30 117	4	2,26	0,36	
Total	1112	64		5,76

También hemos comprobado que influye en el resultado la "calidad" de la muestra, que debe tratarse de un material bien irrigado y con "brotes" que garanticen su crecimiento, ya que lo que se analizará serán las mitosis espontáneas que se están produciendo en el citotrofoblasto.

Hemos analizado si la **edad gestacional** afecta a la calidad intrínseca de la muestra. La Tabla 21, muestra un porcentaje elevado de casos sin diagnóstico en dos etapas bien diferenciadas: una antes de la 10ª semana de gestación (la 8ª con 28,5% y la 9ª con el 21,7%), y la otra a partir de la 21ª semana de gestación con un 27,3%.

Tabla 21 Frecuencia de casos sin diagnóstico citogenético en relación a la edad gestacional

Semana	Casos	Sin diagnóstico	%/semana	%/Total
8	7	2	28,5	0,18
9	23	5	21,7	0,45
10	205	7	3,4	0,63
11	283	13	4,6	1,17
12	218	10	4,6	0,90
13	140	8	5,7	0,72
14	88	4	4,5	0,36
15	35	3	8,6	0,27
16	34	2	5,9	0,18
17	18	2	11,1	0,18
18	18	2	11,1	0,18
19	13	1	7,7	0,09
20	13	1	7,7	0,09
21	6	1	16,67	0,09
22	3	1	33,30	0,09
23	-	-		
24	1	-		
25	-	-		
26	-	-	(27,3)*	0,27)
27	1	-		
28	2	1		
29	-	-		
30	1	-		
31	-	-		
32	1	-		
33	-	-		
34	1	1		
35	-	-		
36	1	-		

* El 27,3% es el promedio de casos sin diagnóstico a partir de la 21 semana de gestación.

La edad materna podría afectar a la calidad intrínseca de la muestra, por lo que hemos analizado estos dos parámetros y no hemos observado ningún tipo de relación entre ambos (Tabla 22).

Tabla 22. Frecuencia de casos sin diagnóstico citogenético en relación a la edad materna.

Edad	Casos	%	Sin diagnóstico	%
17	1	0,09	-	-
18	1	0,09	-	-
19	1	0,09	-	-
20	-	-	-	-
21	3	0,27	-	-
22	4	0,36	-	-
23	7	0,63	-	-
24	21	1,89	2	9,52
25	17	1,53	2	11,77
26	34	3,06	-	-
27	41	3,69	5	12,20
28	62	5,58	6	9,68
29	65	5,58	2	3,08
30	80	7,19	7	8,75
31	96	8,63	3	3,13
32	71	6,39	3	4,23
33	74	6,66	5	6,76
34	69	6,20	5	7,25
35	118	10,61	1	0,85
36	98	8,81	5	5,10
37	76	6,84	3	3,95
38	51	4,59	7	13,73
39	42	3,78	3	7,14
40	31	2,79	3	9,68
41	24	2,16	1	4,17
42	15	1,35	-	-
43	5	0,45	-	-
44	4	0,36	-	-
45	1	0,09	1	100,0

Al analizar los casos no diagnosticados en relación al **medio de cultivo empleado**, se observa que un 25% de los mismos se producen en medio F-10, aunque hay que tener en cuenta que este medio sólo se ha utilizado en 4 muestras, mientras que en medio RPMI-1640 la frecuencia de casos sin diagnóstico ha sido del 6,2%. El medio con menor número de problemas ha sido el Chang (1,4%) (Tabla 23).

Tabla 23. Frecuencia de casos sin diagnóstico citogenético en relación al medio de cultivo y cantidad de muestra

cantidad	RPMI-1640			F-10			Chang		
	n	F	%	n	F	%	n	F	%
<5	71	24	33,8	-	-	-	8	1	12,5
5-10	417	18	4,3	3	-	-	43	1	2,3
11-20	243	10	4,1	4	2	50	36	-	-
21-30	96	4	4,2	-	-	-	14	-	-
>30	136	4	2,9	1	-	-	40	-	-
Totales	963	60	6,2	8	2	25	141	2	1,4

3.2.1.2 Obtención de diagnósticos mediante repetición de la extracción de muestra

En los 64 casos en los que no obtuvimos resultado citogenético fue necesario realizar un segundo intento de obtención de muestra. En 34 ocasiones se realizó una nueva biopsia corial, en 12 se extrajo líquido amniótico, y en 1 ocasión sangre fetal. En los 17 casos restantes no se pudo realizar el estudio citogenético posterior debido a causas ajenas a la técnica, como la no colaboración de los padres o a problemas de índole obstétrico, como el desprendimiento de placenta, etc. (Tabla 24).

En todos los casos en los que se ha extraído tejido por segunda vez, se ha obtenido resultado citogenético. Esto supone haber diagnosticado prenatalmente 1095 casos (98,5% de éxito diagnóstico).

Tabla 24. Casos y tipo de tejido extraído en la segunda muestra.

Tejido	n	%
Vellosidades coriales	34	53,1
Líquido Amniótico	12	18,8
Sangre Fetal	1	1,6
Sin muestra	17	26,6

Es de destacar que las repeticiones de muestras de biòpsia corial, han sido mayores de 5 miligramos y los medios empleados han sido el RPMI-1640, o Chang. En todas estas muestras las edades de gestaci3n han sido superiores a las 10 semanas. El anàlisis citogenético ha mostrado una proporci3n del sexo de 1:1 y que en 33 casos presentaban cariotipos normales y s3lo 1 caso an3malo correspondiendo a una anomalía en mosaico (46,XY/47,XY+2).

3.2.2 Anomalías cromos3micas observadas

De las 1112 muestras de tejido corial analizadas se han obtenido resultados citogenéticos al primer intento en 1048 ocasiones, lo que supone un 95,25% de éxito diagnóstico. Los resultados citogenéticos obtenidos muestran que en cuanto al sexo, un 50,2% corresponde a varones, y que el 49,8% restante a mujeres. El 96% de los casos presentaban un cariotipo normal, s3lo el 4% restante presentaron alg3n tipo de anomalía a nivel citogenético. El porcentaje de anomalías cromos3micas en varones(1,2%) es sensiblemente inferior al de mujeres (2,8%) siendo, en ambos, las anomalías cromos3micas numéricas las más frecuentes. En los 42 casos en los que se ha detectado alg3n tipo de anomalía cromos3mica hemos observado que las anomalías de mayor frecuencia han sido las numéricas (34/42). Este valor corresponde a un 3,23% del total de casos examinados. Es de destacar que las mujeres presentan un índice mayor de este tipo de anomalías cromos3micas.(2,5%), mientras que en varones este valor es sensiblemente inferior (0,8%). Por el contrario en las anomalías estructurales los varones figuran con una frecuencia mayor que la de las mujeres (0,5% y 0,3% respectivamente) (Tabla 25).

Tabla 25. Resultados citogenéticos según sexo

	n	%
Muestras realizadas	1048	
Varones	526	50,2
Mujeres	522	49,8
Cariotipo normal	1006	96,0
Varones	513	97,5
Mujeres	493	94,5
Anomalías cromos3micas	42	4,0
Numéricas	34	3,2
Varones	8	0,8
Mujeres	26	2,5
Estructurales	8	0,8
Varones	5	0,5
Mujeres	3	0,3

3.2.2.1 Tipo y frecuencia de anomalías cromosómicas

Los tipos de anomalías cromosómicas observadas, tanto numéricas como estructurales, se muestran en la Tabla 26.

Tabla 26. Tipo y frecuencia de las anomalías cromosómicas

Tipo de anomalía	n	% sobre total casos	% sobre anomalías
Aneuploidías autosómicas	13	1,2	31,0
+21	5	0,5	11,9
+18	3	0,3	7,1
+13	1	0,1	2,4
+22	1	0,1	2,4
+15	1	0,1	2,4
+9	1	0,1	2,4
+7	1	0,1	2,4
Poliploidías	1	0,1	2,4
triploidías	1	0,1	2,4
Aneuploidías sexuales	8	0,8	19,0
45,X	4	0,4	9,5
47,XXY	4	0,4	9,5
Otras anomalías numéricas	1	0,1	2,4
47,XX,+mar	1	0,1	2,4
Anomalías estructurales	8	0,8	19,0
Equilibradas de novo	1	0,1	2,4
Equilibradas heredadas	5	0,5	11,9
No equilibradas heredadas	1	0,1	2,4
No equilibradas de novo	1	0,1	2,4
Mosaicos	11	1,1	26,2
+2	1	0,1	2,4
+7	2	0,2	4,8
+21	3	0,3	7,1
45,X/46,XX	3	0,3	7,1
46,XY/47,XXY	1	0,1	2,4
46,XX/47,XX,+mar.	1	0,1	2,4
Total anomalías	42	4,0	

El 31% de las anomalías detectadas corresponden a aneuploidías autosómicas que son las más comunes. Dentro de este grupo la trisomía 21 es la de mayor frecuencia (11,9%) seguida de la trisomía 18 (7,1%), y la trisomía 13 (2,4%). También se han detectado en un solo caso respectivamente, las trisomías poco comunes como son la 22, 15, 9, y la 7, lo que representa una frecuencia de 2,4%.

Dentro de las aneuploidías gonosómicas, que representan el 19% de los casos con anomalías (8/42), hemos encontrado sólo la 47,XXY (9,5%) y la 45,X (9,5%). En el grupo de euploidías aparece una triploidía (2,4%).

Del total de casos analizados un 19% corresponde a anomalías estructurales. De estas 6/8 han sido equilibradas, dos de las cuales corresponden a translocaciones Robertsonianas (una "de novo" y la otra heredada vía materna), cuatro a inversiones heredadas (tres vía materna y una vía paterna). Dentro de las anomalías no equilibradas figura una inversión heredada vía materna, y un caso con cariotipo 46,XY,5q+.

Es de destacar que un gran porcentaje de las anomalías corresponden a mosaicos (26,2%).

3.2.2.2 Mosaicos cromosómicos

Tal y como hemos expuesto en el apartado anterior el 1,1% del total de casos analizados han sido anomalías en mosaico. Estos mosaicos significan un 26,2% del total de anomalías (11/42).

Los tipos de mosaicos detectados en nuestro estudio se detallan en la Tabla 27. Es de destacar que dentro de las anomalías autosómicas, la trisomía 21 es la más frecuente (3/7), seguida de la trisomía 7 (2/7). De las anomalías gonosómicas la más frecuente es la 45,X/46,XX (3/4).

Tabla 27. Tipo y frecuencia de anomalías cromosómicas en mosaico

Anomalías	% sobre n	% sobre anomalías	% sobre total casos
Autosómicas	7	16,7	0,67
+2	1	2,4	0,1
+7	2	4,8	0,19
+21	3	7,1	0,29
+mar.	1	2,4	0,10
Gonosómicas	4	9,5	0,38
45,X/46,XX	3	7,1	0,29
46,XY/47,XXY	1	2,4	0,1

La frecuencia de mosaicos autosómicos (7/11), ha sido superior a la de los gonosómicos (4/11) (Figura 26),

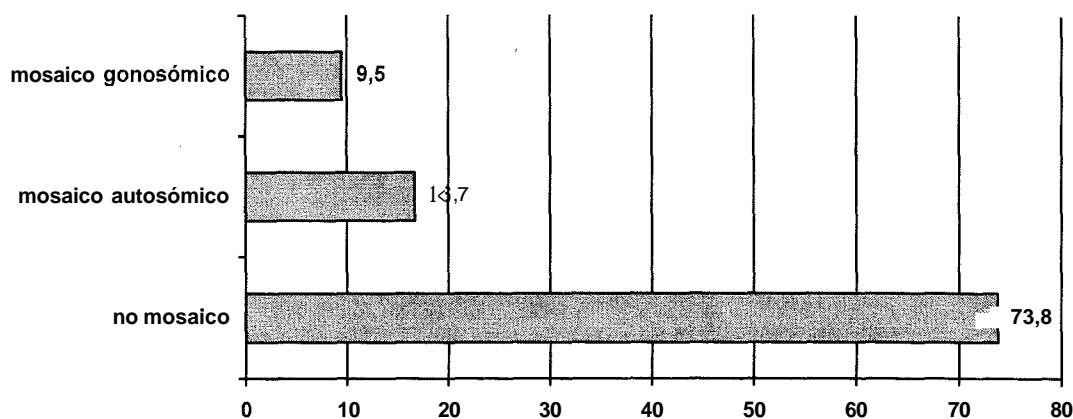


Figura 26. Frecuencia de las anomalías autosómicas y gonosómicas en mosaico en relación al total de anomalías cromosómicas encontradas en nuestra serie

La frecuencia de pseudomosaicismo (células individuales anormales), ha sido de 0,3%, encontradas en dos anomalías de tipo estructural (una inversión del cromosoma 7, y otra del cromosoma 11), y una anomalía numérica (monosomía X). En todos los casos se había empleado el medio de cultivo Chang,

No se ha observado relación entre la presencia de los mosaicos y la Edad de Gestación ya que se hallan repartidos homogéneamente entre las semanas 20^a y 30^a. Tampoco se ha visto relación con la cantidad de muestra, observándose tanto en las muestras poco abundantes (5 mg.), como en las de mayor cantidad (50 mg.)

No hemos podido analizar la influencia del medio de cultivo utilizado, ya que en la mayoría de los casos en los que se ha observado mosaicismo el medio utilizado ha sido el RPMI-1640 (10/11). Sólo en un caso se ha empleado el medio Chang.

Las indicaciones más frecuentes para realizar el diagnóstico prenatal en estos casos han sido la Ansiedad (4 casos), y la Edad Materna Avanzada (2 casos)., Otras indicaciones han sido: Anomalía Ecográfica Previa, Progenitor Portador de una Cromosomopatía, Consanguinidad, Estudio Molecular y Aborto de Repetición (1 caso respectivamente) (Tabla 28).

Tabla 28. Indicaciones diagnósticas en los casos de mosaicismo

Indicaciones	n	%
Ansiedad	4	36,4
Edad Materna Avanzada	2	18,2
Anomalía Ecográfica Previa	1	9,1
Anomalía Cromosómica Progenitores	1	9,1
Consanguinidad	1	9,1
Estudio Molecular	1	9,1
Abortos de Repetición	1	9,1
Totales	11	100.0

3.2.2.3 Discrepancias cromosómicas

En los 1048 casos diagnosticados se ha detectado la existencia de 7 discrepancias en las que el resultado del cariotipo de la muestra de vellosidades coriales no coincide con el cariotipo fetal. Lo que supone el 0,7% del total de los diagnósticos realizados y el 16,7% del total de anomalías cromosómicas. El tipo de discrepancia en todos los casos ha correspondido a falsos positivos.

El 71,4% (5/7) de las discrepancias corresponden a mosaicos, y el 28,6% restante (2/7) son discrepancias totales: con cariotipos 47,XX,+mar. y 45,X0. Las discrepancias con anomalías autosómicas son más frecuentes que las gonosómicas, siendo la trisomía 7 la más frecuente (Tabla 29).

Tabla 29. Tipo y frecuencias de Discrepancias cromosómicas

Discrepancias	n	% sobre totales	Vellosidades Coriales	Líquido Amniótico	Tipo de Discrepancia
Autosómicas	5	0,5			
+2	1		46,XY/47,XY,+2	46,XY	Mosaico
+7	2		46,XX/47,XX,+7	46,XX	Mosaico
+ mar.	1		47,XX,+mar.	46,XX	Total
	1		46,XX/47,XX,+mar.	46,XX	Mosaico
Gonosómicas	2	0,2			
X	1		45,X	46,XX	Total
	1		46,XX/45,X	46,XX	Mosaico
Totales	7	0,7			

La frecuencia de discrepancias encontradas en nuestra serie, respecto a la edad materna, se muestran en la Tabla 30. La mayor incidencia se observa en edades maternas comprendidas entre los 30 y 37 años.

Tabla 30. Discrepancias cromosómicas en relación a la edad materna

Edad materna	n	Discrepancias	%
<30	238	1	0,42
30-33	303	3	0,99
34-37	348	3	0,86
38-41	135	-	-
>41	24	-	-
Total	1048	7	0,67

Respecto a la edad gestacional, el porcentaje de discrepancias es el mismo (3/7) en el grupo con menos de 11 semanas de gestación y en el grupo de entre 11 y 14 semanas de gestación. Quedando el caso restante en el grupo de mas de 14 semanas de gestación (Tabla 31).

Tabla 31. Discrepancias cromosómicas respecto a la edad gestacional

Semana de gestación	n	Discrepancias	%
<11	221	3	1,36
11-14	694	3	0,43
>14	133	1	0,75
Total	1048	7	0,67

Con relación a la indicación el 42,9% de los casos han correspondido a Edad Materna, seguidos de los casos por Ansiedad (28,9%).

3.2.3 Factores que influyen en la aparición de anomalías cromosómicas

Se han analizado las muestras de vellosidades coriales que presentaban anomalías cromosómicas en relación a diferentes factores que pueden estar implicados en la aparición de dichas anomalías, como la indicación diagnóstica, la edad materna, la edad gestacional o el medio de cultivo utilizado.

3.2.3.1 Indicación diagnóstica

En la Tabla 32 se muestran los casos con anomalías cromosómicas detalladas en relación a la indicación de estudio.

Tabla 32. Anomalías cromosómicas en relación a la indicación diagnóstica

Indicación	Anomalías cromosómicas						
	n	Total	%	Numér	%	Estruct	%
Ansiedad	422	10	2,4	8	1,9	2	0,5
Edad Materna Avanzada	420	18	4,3	14	3,3	4	1,0
Hijo Anterior Afecto	41	2	4,9	2	4,9	-	-
Antecedente Familiar	24	-	-	-	-	-	-
Anomalía Cr. Progenitores	5	2	40,0	1	20,0	1	20,0
Anomalía Ecograf. Previa	21	4	19,0	3	14,3	1	4,7
Aborto de Repetición	9	1	11,1	1	11,1	-	-
Exposición a Radiación	6	2	33,3	2	33,3	-	-
Meiosis Anómala en Semen	9	-	-	-	-	-	-
Consanguinidad	4	1	25,0	1	25,0	-	-
Anomalía Génica Familiar	87	2	2,3	2	2,3	-	-

La presencia de una Anomalía Cromosómica en Progenitores ha sido la indicación diagnóstica con mayor frecuencia de anomalías (40%, 2/5 casos) De los dos casos observados, uno presentaba una anomalía numérica en mosaico (45,X/46,XY con 53% de mosaicismo para la línea anómala), y el otro un polimorfismo 46,XY,inv (9)(p11q11) transmitido vía materna.

La indicación de Exposición a Radiación, le sigue en frecuencia con 33,3% de casos con cromosomopatías (2/6), ambos de tipo numérico (47,XX,+18 y 47,XX,+9).

Uno de los cuatro casos con indicación de Consanguinidad, mostraba una anomalía numérica en mosaico (46,XY/47,XY,+21). Esta indicación ocupa el tercer lugar en frecuencia de anomalías cromosómicas (25%).

El cuarto lugar corresponde a la indicación Anomalía Ecográfica Previa (4/21) (19%). Tres casos presentan anomalías numéricas (47,XX,+13; 47,XX,+15 y 46,XX/47,XX,+21). El cuarto caso presenta una anomalía estructural 46,XX,t(13q;14q).

Ha sido hallado un caso con anomalía numérica en mosaico (46,XY/47,XXY), (11,1%) referido por la indicación de Abortos de Repetición.

La indicación Hijo Anterior Afecto ha mostrado dos anomalías numéricas (47,XX,+mar y 47,XXY) que suponen el 4,9% (4/41).

Respecto a la indicación de Edad Materna Avanzada se ha detectado que un 4,3% de casos presentaba anomalías cromosómicas (18/420). El 3,3% de las mismas han sido anomalías numéricas y el 1% estructurales.

Los porcentajes más bajos de anomalías cromosómicas se han detectado en las indicaciones por Ansiedad (10/422) y Análisis Molecular (2/87). No se detectaron anomalías en casos con la indicación de Antecedente Familiar ni en la de Meiosis Anómala en Semen (de las cuales se analizaron 24 y 9 casos respectivamente).

3.2.3.2 Edad Materna Avanzada

Tal y como acabamos de describir en el apartado anterior, la edad materna avanzada es uno de los factores de riesgo en diagnóstico prenatal, ocupando en nuestra serie el séptimo lugar con un 4,3%. Si analizamos el porcentaje de casos que presentan anomalías cromosómicas según la edad de las gestantes el grupo de las mujeres mayores de 35 y el de menores de esta edad tienen frecuencias similares de tener descendencia con cromosomopatías (4,3% y 3,8% respectivamente) (Tabla 33).

Tabla 33. Anomalías cromosómicas en relación a la edad materna (Incluyendo todas las indicaciones diagnósticas)

Edad	n	Anomalías cromosómicas	%
<35	605	23	3,8
>35	443	19	4,3

Para ver si las diferencias de las frecuencias halladas pudieran estar enmascaradas por otras indicaciones diagnósticas, se ha efectuado otro análisis de los datos, eliminando todos los casos que, según criterio médico, prevalecen sobre el factor Edad Materna (por ejemplo los casos con indicación por Anomalía Cromosómica en Progenitores, Aborto de Repetición, Exposición a Radiación, etc.). De este modo, sólo se analizan los casos con la indicación diagnóstica de Ansiedad Materna (<35 años) y de Edad Materna Avanzada (>35 años) El resultado que se obtiene, como muestra la Tabla 34, es una mayor diferencia entre las frecuencias de anomalías respecto a la edad materna: 2,4% para las mujeres menores de 35 años y casi el doble (4,3%) para las de 35 años en adelante. Es interesante observar que en ambos criterios el porcentaje para mayores de 35 años es el mismo (4,3%), mientras que para las <35 años ha descendido a un 2,4%. La Figura 27 muestra la diferencia de resultados al aplicar uno u otro criterio.

Tabla 34. Anomalías cromosómicas en relación a la Edad Materna (Sólo indicación de Ansiedad y Edad Materna Avanzada)

Indicación	n	Anomalías cromosómicas	%
<35 (Ansiedad)	422	10	2,4
>35 (Edad Avanzada)	420	18	4,3

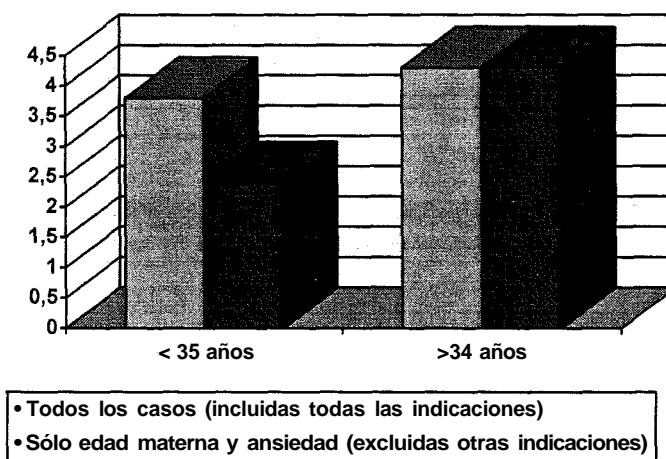


Figura 27 Comparación de frecuencias de Anomalías cromosómicas en relación a la Edad Materna, entre un grupo con el total de casos de la serie y otro con todos los casos excepto los de indicación diagnóstica que, según criterio médico, prevalecen sobre la indicación edad materna.

Dado que la gran mayoría de gestantes se encuentra comprendida entre los 25 y los 40 años, las hemos dividido en grupos de 5 años, más un grupo de cabeza que comprende a todas las menores de 25 y otro de cola con las mayores de 40. El resultado se muestra en la Tabla 35. Los casos de gestantes de más de 40 años, llegan a triplicar la frecuencia de anomalías (12,8%) en relación a las de las gestantes de los grupos de 31-35 años (4,4%) y de 36-40 años (4,0%) y a quintuplicar la frecuencia de las de los grupos de <25 años (2%) y 26-30 años (2,3%).

Tabla 35. Anomalías cromosómicas en relación a grupos de Edad Materna

Edad	casos	-----Anomalías cromosómicas-----					
		totales	%	Numéricas	%	Estructurales.	%
<25	50	1	2,0	1		-	
26-30	261	6	2,3	6		-	
31-35	412	18	4,4	13		5	
36-40	278	11	4,0	9		2	
41-45	47	6	12,8	5		1	
totales	1048	42	4,0	34	(3,2)	8	(0,8%)

El tipo de anomalías cromosómicas más frecuente, en relación con la edad, corresponde a las alteraciones numéricas 80,9% (34/42), y dentro de ellas las trisomías. Analizando la distribución de trisomías respecto a la edad materna vemos que el riesgo mayor corresponde al grupo 41-45 años con una incidencia del 6,4% (Figura 28).

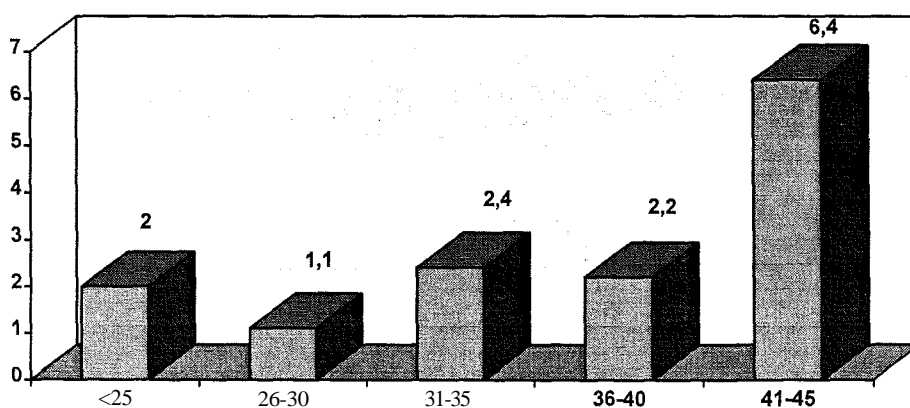


Figura 28. Trisomías respecto a la edad materna

3.2.3.3 Edad gestacional

Las frecuencias de anomalías cromosómicas en relación con la semana de gestación, se muestran en la Tabla 36, en la que aparecen desde la semana más temprana (8ª) a la 21ª y superiores. Tal como podemos apreciar el mayor número de muestras corresponden a las semanas óptimas para realizar esta técnica, 10-14 semana. En estas semanas la incidencia de anomalías cromosómicas se encuentra entre el 2,6% y 5%. Es de destacar la elevada incidencia en los extremos, 20% y 11,1% en las semanas 8 y 9 respectivamente y una frecuencia de 20% y 12,5% en las semanas 21 y superiores.

Tabla 36. Frecuencia de anomalías cromosómicas respecto a semana de gestación

Semana	n	Anomalías			
		total	%	Numér.	Estruc.
08	5	1	20,0	1	-
09	18	2	11,1	1	1
10	198	10	5,0	9	1
11	270	7	2,6	3	4
12	208	6	2,9	6	-
13	132	6	4,5	5	1
14	84	3	3,6	3	-
15	32	1	3,1	1	-
16	32	2	6,3	1	1
17	16	-	-	-	-
18	16	1	6,3	1	-
19	12	-	-	-	-
20	12	1	8,3	1	-
21	5	1	20,0	1	-
>21	8	1	12,5	1	-

3.2.3.4 Medio de cultivo

Los medios de cultivo empleados tal y como se ha indicado en el apartado 2.3.1 de Material y Métodos, han sido F-10, RPMI-1640 y Medio Chang.

Las anomalías cromosómicas observadas respecto al medio de cultivo empleado se muestran en la Tabla 37. Se puede observar que el medio más empleado ha sido el RPMI-1640, en un 86% (903/1048) de las muestras.

Tabla 37. Anomalías cromosómicas en relación al medio de cultivo

Medio	n	Anomalías cromosómicas					
		Totales	%	Numéricas.	%	Estructurales.	%
RPMI-1640	903	37	4,1	30	3,3	7	0,8
F-10	6	-		-	-	-	-
Chang	139	5	3,6	4	2,9	1	0,7

En los casos en los que se ha empleado medio RPMI-1640, se ha encontrado que un 4,1% de las muestras presentan cromosopatías (3,3% anomalías numéricas y 0,8% estructurales). En el medio F-10 sólo se han cultivado 6 muestras, en todas ellas el cariotipo ha sido normal. En medio Chang se ha observado que el 3,6% de las muestras presentan anomalías cromosómicas, las más frecuentes corresponden a anomalías numéricas (2,9%) y el 0,7% a alteraciones estructurales. En el medio Chang se han encontrado metafases "individuales" con anomalías cromosómicas (pseudomosaicismo). Del total de 139 casos, 3 presentaban una célula con una anomalía cromosómica (2,2%). Los tipos de anomalía han sido mayoritariamente de tipo estructural: una inversión del cromosoma 7 y otra del 11. Sólo se encontró una anomalía de tipo numérico: 45,X.

3.3. Fragilidad cromosómica espontanea

De las 1112 muestras orientadas a diagnóstico prenatal citogenético se han analizado al azar 244 muestras para determinar la frecuencia de lesiones cromosómicas espontáneas (Míguez y col, 1991).

3.3.1. Posible influencia del medio de cultivo utilizado y la edad gestacional

Con el fin de detectar si los diferentes medios de cultivo empleados en el procesado de las muestras o la edad gestacional podrían influir en la inducción de la fragilidad cromosómica observada en nuestro estudio, nos propusimos analizar ambos parámetros.

Respecto **al medio de cultivo**, vemos que un 71,7% (175/244) de las muestras se han cultivado en medio RPMI-1640 y un 28% (69/244) en medio Chang. El medio F10 se ha desestimado debido al bajo rendimiento observado en nuestro estudio. Se han analizado un total de 3040 metafases, en las que se observa un porcentaje de 9,1% de lesiones cromosómicas (gaps y roturas), siendo un 9,0% y un 9,3%, los porcentajes en medio RPMI-1640 y en medio Chang, respectivamente (Tabla 38).

Tabla 38. Frecuencia de lesiones cromosómicas espontaneas en diferentes medios de cultivo.

Medio	n	n° Metafases	n° Lesiones	%
RPMI-1640	175	2201	199	9,0
Chang	69	839	78	9,3
Totales	244	3040	277	9,1

El tipo de lesión más frecuente ha sido el gap de cromátide (ctg) tanto en medio RPMI-1640 como en medio Chang (49,7% y 71,8% respectivamente). La rotura de cromosoma (csb) es más elevado en medio RPMI-1640 (26%) que en medio Chang (6,4%) (Tabla 39).

Tabla 39. Tipos y frecuencias de lesiones cromosómicas en diferentes medios de cultivo

Tipo de lesión	RPMI-1640	%	Chang	%
Gaps de cromosoma(csg)	11	5,5	3	3,8
Gaps de cromátide (ctg)	99	49,7	56	71,8
Roturas de cromátide (ctb)	53	26,6	5	6,4
Roturas de cromosoma (csb)	36	18,1	14	17,9
Totales	199	9,0	78	9,3

A pesar de la dificultad de localizar el punto exacto de la lesión, debido a las características de los cromosomas de vellosidades coriales, la puesta a punto de la técnica de tinción secuencial, (Pérez y col, 1991), nos ha permitido identificar un total de 101 lesiones cromosómicas, que representan el 36% del total de alteraciones observadas (Figura 29).

Los lugares frágiles se ponen de manifiesto mediante la presencia de condiciones inductoras en el medio de cultivo. En nuestro caso, en cromosomas de vellosidades coriales, las lesiones cromosómicas observadas son espontáneas y coinciden en un 76,2% con la localización de bandas en las que se han descrito lugares frágiles (HGM 11.5). Dicha coincidencia es independiente del medio de cultivo empleado. Las lesiones coincidentes con lugares frágiles han sido de un 75,8% en medio RPMI-1640 y de un 77,1% en medio Chang (Tabla 40).

Tabla 40 Coincidencia de lesiones cromosómicas en bandas donde se localizan lugares frágiles.

Medio	n	nº de		%
		lesiones	coincidentes	
RPMI-1640	175	66	50	75,8%
CHANG	69	35	27	77,1%
Total	244	101	77	76,2%

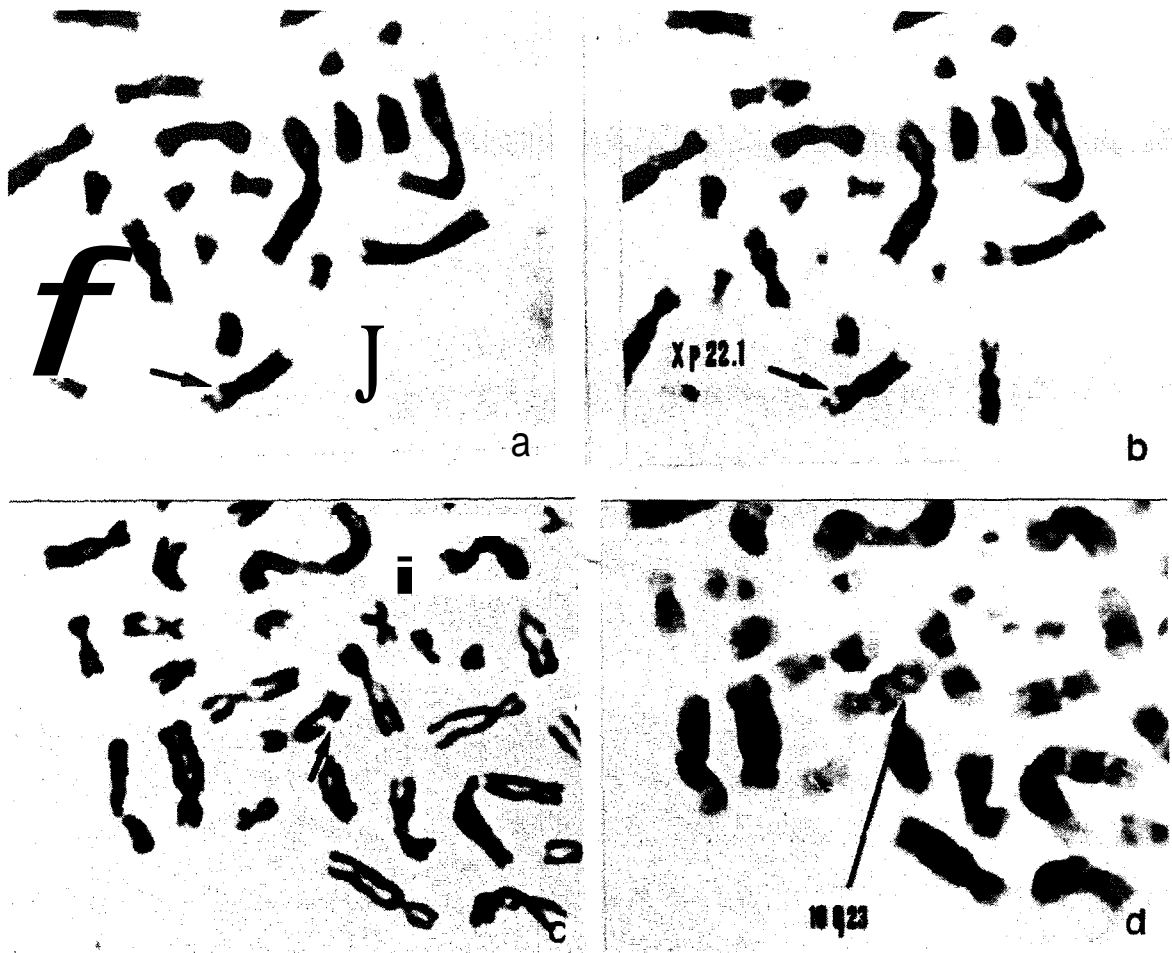


Figura 29. Metafases parciales de vellosidades coriales obtenidas por tinción secuencial. a y c) Tinción uniforme, puede visualizarse la lesión cromosómica (flechas), b y d) Bandas G, permite la localización exacta del punto de rotura.

Con el fin de determinar si la **Semana de Gestación** puede influir en la aparición de lesiones cromosómicas espontáneas, se han analizado las muestras en grupos comprendidos entre la semana 8 y 14, entre la 15 y 19, y a partir de la 20 semana. En ninguno de los grupos se han observado diferencias estadísticamente significativas, aunque es de destacar que la menor incidencia corresponde al grupo entre 15-19 semanas de gestación (6,3%), respecto al 9,4% y 9,1% que presenta los otros dos grupos (Tabla 41).

Tabla 41. Distribución de lesiones cromosómicas de acuerdo con la edad de gestación.

Semana de gestación	n	Metafasas analizadas	Metafasas con lesiones	%	total lesiones	%
8-14	200	2510	219	8,7	237	9,4
15-19	32	380	22	5,8	24	6,3
>20	8	99	9	9,1	9	9,1
Totales	240	2989	250	8,3	270	9,0

3.3.2 Distribución de las lesiones cromosómicas en el cariotipo

Como hemos indicado anteriormente, la distribución de lesiones cromosómicas (gaps y roturas) no siguen una distribución al azar en el cariotipo humano, observándose que el 76.2% (77/101) de las lesiones detectadas se localizan en bandas donde se han descrito lugares frágiles (bandas LF) (HGM 11,5).

Teniendo en cuenta que en el cariotipo humano cada una de las bandas e interbandas tienen longitudes específicas, hemos realizado un análisis estadístico para comprobar si efectivamente, teniendo en cuenta la longitud relativa de las bandas, las lesiones cromosómicas en vellosidades coriales se distribuían preferentemente en aquellas bandas donde se localizan lugares frágiles. Nuestros resultados indican una distribución preferente de las lesiones en estas bandas que es estadísticamente significativa ($\chi^2=430$; $p<0.005$).

La distribución de estas lesiones en un diagrama del cariotipo humano haploide se muestra en la Figura 30.

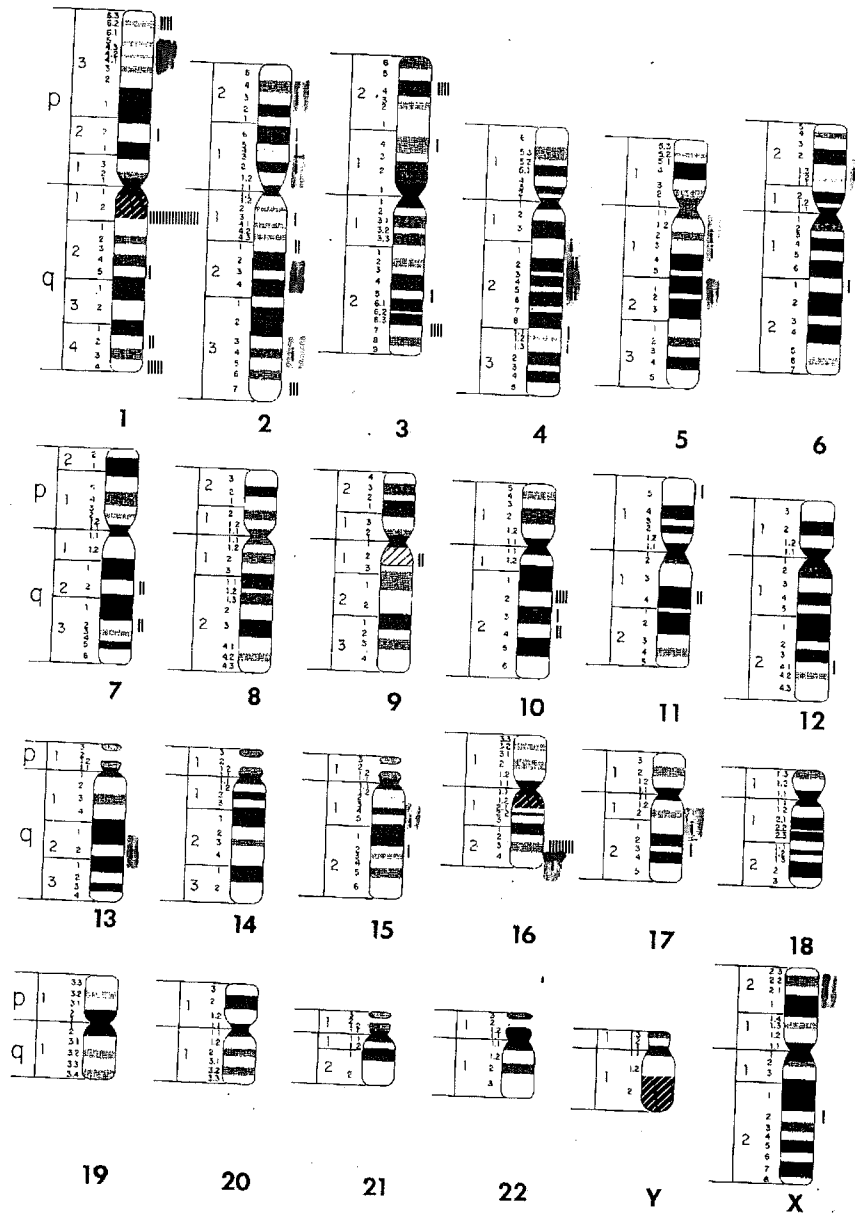


Figura 30. Diagrama del cariotipo humano haploide con distribución de las lesiones cromosómicas espontáneas observadas en vellosidades coriales coincidentes con lugares frágiles (I), y no coincidentes (II).

En esta figura podemos observar como el 47,5% (48/101) de las lesiones identificadas se localizan en 8 bandas. Una de estas bandas corresponde al cromosoma número 1, en la región 1q12-q21.1, en el que se han hallado 16 lesiones (15,8%) (Figura 31). La zona implicada abarca la heterocromatina constitutiva. La determinación exacta del punto resulta dificultosa debido a la descondensación que presenta esta zona en determinadas metafases, por ello se ha utilizado la descripción de la zona 1q12-q21.1 que abarca toda la zona heterocromática. En alguna ocasión observamos que una rotura en esta región originaba un fragmento con la delección y el acéntrico correspondiente en la misma metafase (Figura 32). Otras bandas cromosómicas frecuentemente afectadas por gaps o roturas han sido las pertenecientes a las bandas 16q23 (en 8 ocasiones) 1q44 (5 veces), 1p36, 3p24, 3q27, 10q22 (todas con 4 lesiones) y 2q37 (3 lesiones).

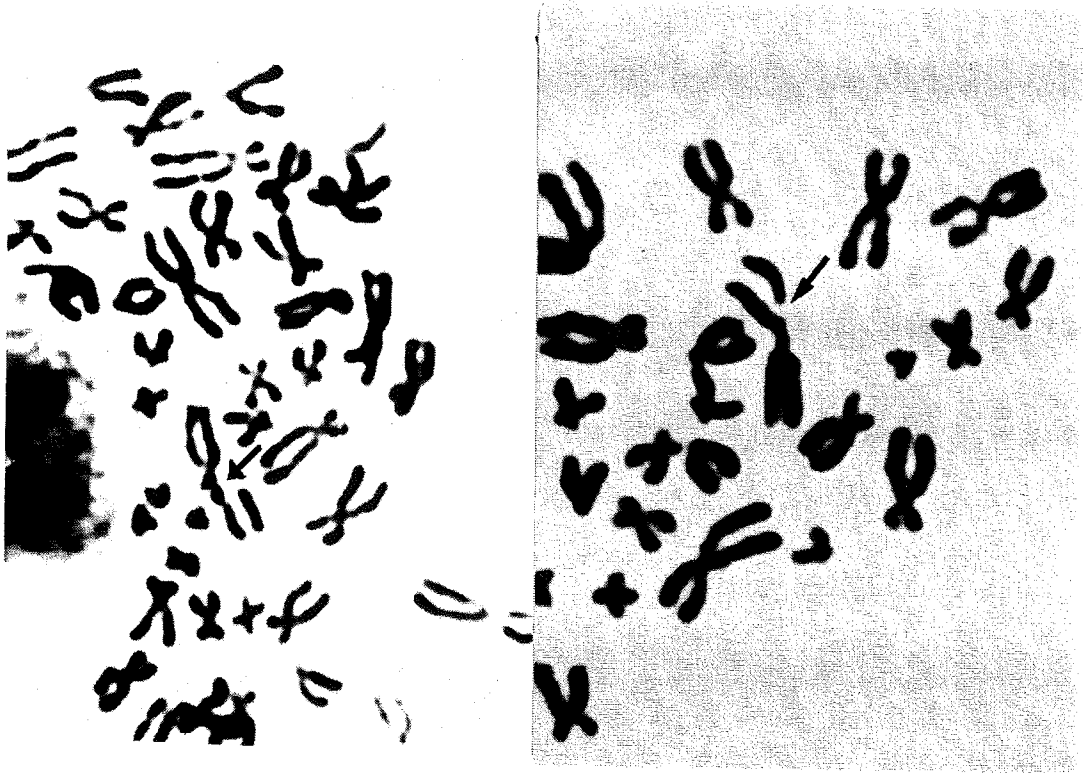


Figura 31. Metafases parciales mostrando lesiones cromosómicas en la región 1q12-q21.1

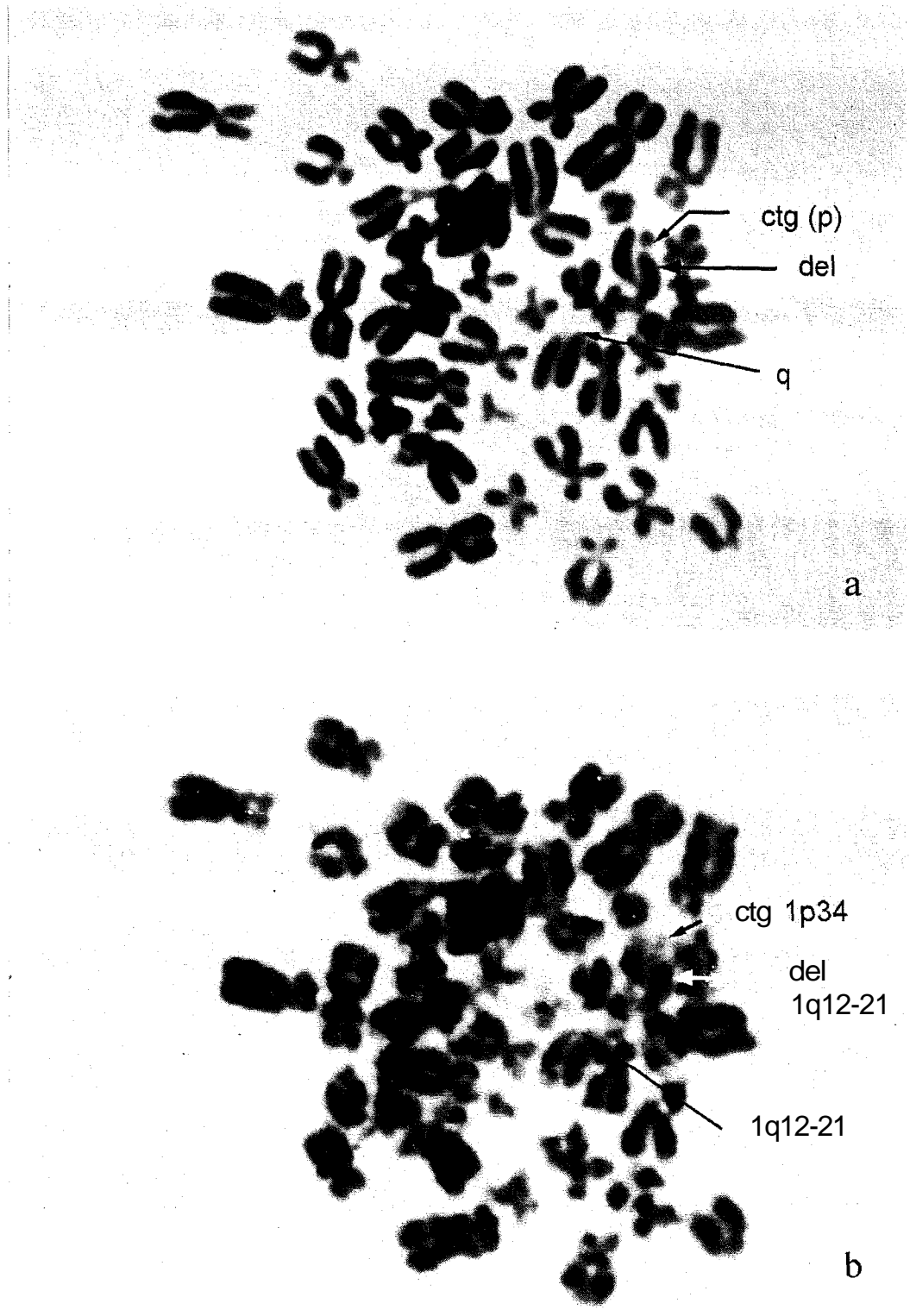


Figura 32. Metafase obtenida por tinción secuencial en la que podemos observar una rotura en la región 1q12-q21 que origina un cromosoma con la delección y el fragmento acéntrico correspondiente. También podemos ver en este mismo cromosoma la presencia de un gap de cromátide ctg en 1p34. a) Tinción uniforme. b) Bandas G.

3.4 Descondensación de la heterocromatina constitucional

Durante la realización del diagnóstico citogenético de las 1112 muestras, observamos una elevada frecuencia de descondensación espontánea de la heterocromatina constitutiva en determinados cromosomas (Pérez y col., 1991).

La descondensación de la cromatina mediante la técnica de tinción uniforme se muestra como una región más pálida y fina que el resto de la cromátide normal del cromosoma (Figura 33).

Para evaluar el porcentaje de descondensación, se han analizado al azar 339 muestras de vellosidades coriales. Se han estudiado un total de 5820 metafases con tinción uniforme. Se ha observado descondensación de la heterocromatina constitutiva en los cromosomas 1,9,16 e Y en 158 casos, es decir un 46,6% del total de las muestras (158/339). Sólo en una metafase se ha detectado descondensación en 15p (Figura 34).

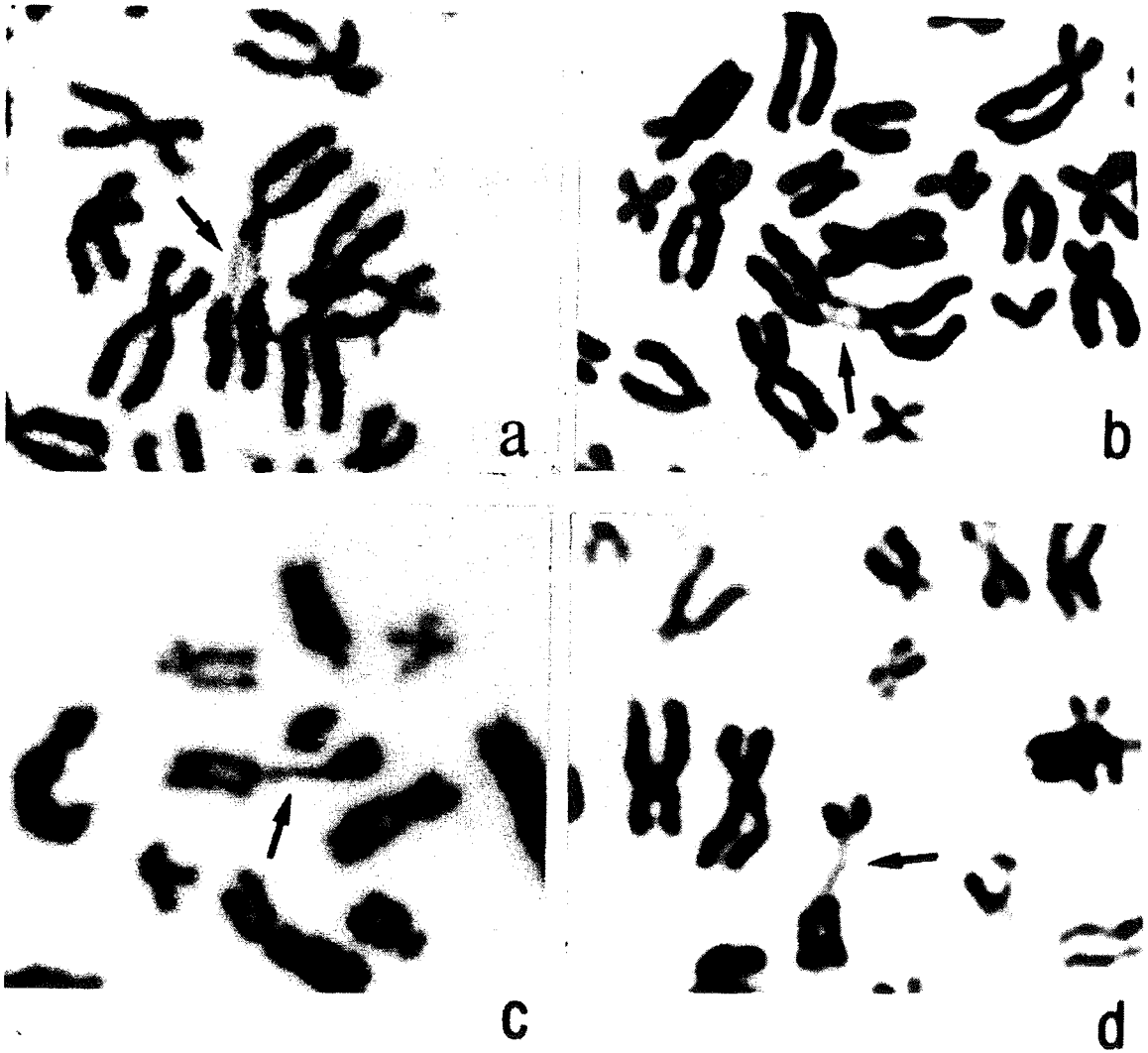


Figura 33. Descondensación de la heterocromatina constitutiva de los cromosomas 1 (a, b) y 9 (c, d).



Figura 34. Descondensación heterocromática de los cromosomas 9qh, 15ph e Yqh en la misma metafase.

Las regiones de heterocromatina constitutiva que descondensan en vellosidades coriales se muestran en la Tabla 42 La más frecuente es la descondensación de la heterocromatina 9qh (42,4%) seguida de la del cromosoma 1qh (22,2%), así como la de casos con descondensación en la misma metafase de la región 1qh y 9qh (22,2%).

Tabla 42. Frecuencia de descondensación de la heterocromatina constitutiva de 1qh, 9qh, 16qh o Yqh en muestras de tejido corial

Región	n	%
1qh	35	22,2
9qh	67	42,4
16qh	3	1,9
Yqh	2	1,3
1qh+9qh	35	22,2
1qh+16qh	3	1,9
1qh+Yqh	1	0,6
9qh+16qh	3	1,9
9qh+Yqh	1	0,6
1qh+9qh+16qh	4	2,5
1qh+9qh+Yqh	4	2,5
Total casos	158	100,0

Respecto a las metafases analizadas de muestras coriales que presentan descondensación de la heterocromatina, se observa que puede verse afectada una o más regiones en una misma metafase. La Tabla 43 muestra las frecuencias y rango de metafases con descondensación de las diferentes regiones heterocromáticas.