

MOSAICISME CITOGENÈTIC DE VELLOSITATS CORIÒNIQUES EN MOSTRES PRENATALS I D'AVORTAMENTS

Esther Cuatrecasas i Capdevila

2012



MOSAICISME CITOGENÈTIC DE VELLOSTATS CORIÒNIQUES EN MOSTRES PRENATALS I D'AVORTAMENTS

Memòria presentada per Esther Cuatrecasas i Capdevila per a optar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, 2012

La Dra. Anna Soler i Casas facultatiu consultor del Servei de Bioquímica i Genètica Molecular de l'Hospital Clínic de Barcelona com a directora, i la Dra. Francesca Vidal i Domínguez catedràtica de biologia cel·lular del Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia com a Tutora,

CERTIFIQUEN

Que na Esther Cuatrecasas i Capdevila ha realitzat al laboratori Prenatal Genetics S.L., el treball de Tesi Doctoral titulat:

Mosaïcisme citogenètic de vellositats coriòniques en mostres prenatals i avortaments

I perquè consti, signen el present certificat

Dra. A. Soler i Casas

Dra. F. Vidal i Domínguez

Esther Cuatrecasas i Capdevila

Barcelona, 2012

Aquesta tesi us la dedico a vosaltres Xavi, Martí i Nora

ÍTACA

Quan surts per fer el viatge cap a Ítaca,
has de pregar que el camí sigui llarg,
ple d'aventures, ple de coneixences.

Els Lestrígons i els Cíclops,
l'aïrat Posidó, no te n'esfereixis:
són coses que en el teu camí no trobaràs,
no, mai, si el pensament se't manté alt, si una
emoció escollida
et toca l'esperit i el cos alhora.

Els Lestrígons i els Cíclops,
el feroç Posidó, mai no serà que els topis
si no els portes amb tu dins la teva ànima,
si no és la teva ànima que els adreça davant teu.

Has de pregar que el camí sigui llarg.
Que siguin moltes les matinades d'estiu
que, amb quina delectança, amb quina joia!
entraràs en un port que els teus ulls ignoraven;
que et puguis aturar en mercats fenicis i
comprar-hi les bones coses que s'hi exhibeixen,
corals i nacres, mabres i banussos
i delicats perfums de tota mena:
tanta abundor com puguis de perfums delicats;
que vagis a ciutats d'Egipte, a moltes,
per aprendre i aprendre dels que saben.

Sempre tingues al cor la idea d'Ítaca.
Has d'arribar-hi, és el teu destí.
Però no forcis gens la travessia.
Sempre tingues al cor la idea d'Ítaca.
Has d'arribar-hi, és el teu destí.
Però no forcis gens la travessia.
És preferible que duri molts anys
i que ja siguis vell quan fondegis a l'illa,
ric de tot el que hauràs guanyat fent el camí,
sense esperar que t'hagi de dar riqueses Ítaca.

Ítaca t'ha donat el bell viatge.
Sense ella no hauries pas sortit cap a fer-lo.
Res més no té que et pugui ja donar.
I si la trobes pobre, no és que Ítaca t'hagi enganyat.
Savi com bé t'has fet, amb tanta experiència,
ja hauràs pogut comprendre què volen dir les Ítaques.

Konstantinos Kavafis



AGRAÏMENTS

A:

Josep Egozcue, Anna Soler, Fanny Vidal, Xavier Peris, Martí Peris, Nora Peris, Imma Capdevila, Joan Cuatrecasas, Anna Cuatrecasas, Marta Cuatrecasas, Bet Cuatrecasas, Pili Romero, Carles Peris, Natxo Peris, Lluís Aguilera, Josep Queralt, Berta Navarro, Doris Marti, Adriana Farran, Agnès Prats, Agustí Serés, Albert Martinez, Ana Belil, Ana Ramos, Anna Motis, Avni Shah, Berta Clerch, Carles Garrido, Carme Marrugat, Carmeta Pares, Clara Kischner, Consol Vancells, Cristina Casado, Dolors Gutierrez, Eduard Juncosa, Elena Ballester, Eli Masip, Enric Roca, Eva Bargalló, Ferran Hernández, Ferran Pascual, Glòria Solà, Honest Estaran, Ignasi Garcia, Iolanda Bertran, Joan Gratacós, Joan Vaqué, John Wolstenholme, Jordi Loza, Jordi Pedemonte, Jordi Pedrals, Jordi Sala, Laura Arrieta, Laura Vila, Lilian Bermúdez, Llorenç Olivé, Lluís Armengol, Magalí Aragó, Maite Martin, Manel Torres, Mariona Soler, Mark Grossmann, Marta Masats, Matias Griful, Meritxell Torrens, Mini Roca, Mireia Aleu, Mireia Aragay, Miriam Cuatrecasas, Montse Pons, Natalia Maragall, Natalia Tinker, Noe Carricondo, Núria Sabartés, Ramon Lamarca, Rosa Martorell, Roger Pascual, Sergi Carreras, Sergi Montero, Silvano Claramunt, Sisco Fernández, Tere Escabias, Vicenç Català, Victor Cuatrecasas, Xavier Cuatrecasas, Xavier Morell...

.....i a totes aquelles persones que m'he anat creuant al llarg d'aquest temps d'estudi, moltes gràcies pel vostre recolzament i ajut.

Una abraçada

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ

OBJECTIUS

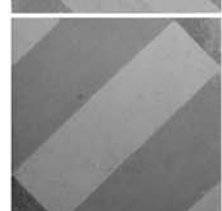
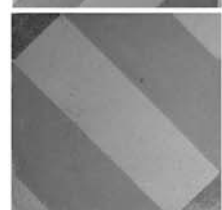
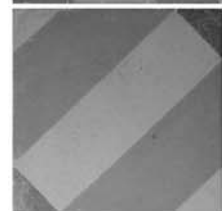
MATERIAL I MÈTODES

RESULTATS

DISCUSSIÓ

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAFIA



1.	INTRODUCCIÓ	25
1.1.	Desenvolupament embrionari de les vellositats coriòniques	26
1.1.1.	Primera setmana de gestació	26
1.1.2.	Segona setmana de gestació	29
1.1.3.	Tercera setmana de gestació i següents	33
1.2.	Estudis citogenètics en vellositats coriòniques de mostres prenatales	35
1.2.1.	Tècniques de cultiu de vellositats coriòniques	36
1.2.2.	Anomalies cromosòmiques en vellositats coriòniques prenatal.....	39
1.3.	Mosaicismes en vellositats coriòniques prenatales.....	40
1.3.1.	Mosaics generalitzats	43
1.3.2.	Mosaics confinats	44
1.3.2.1.	Origen mitòtic o meiótic dels mosaics confinats	44
1.3.2.2.	Classificació dels mosaics confinats: mosaics confinats a la placenta, mosaics vertaders fetals i mosaics confinats al fetus	47
1.3.2.3.	Embriogènesi dels mosaics confinats	51
1.3.2.4.	Mosaics confinats a la placenta	55
1.3.2.4.1.	Incidència dels mosaics confinats a la placenta	56
1.3.2.4.2.	Anomalies cromosòmiques dels mosaics confinats a la placenta.....	57
1.3.2.4.3.	Patrons de distribució en els llinatges cel·lulars dels parells cromosòmics	59
1.3.2.4.4.	Mosaics confinats a la placenta i disomies uniparentals	60
1.3.2.4.5.	Conseqüències en el desenvolupament de la gestació dels mosaics confinats a la placenta	64
1.3.3.	Mosaics rars: bessons reabsorbits, translocacions múltiples simultànies	67
1.3.3.1.	Quimera.....	67
1.3.3.2.	Bessons reabsorbits o <i>vanishing twin</i>	67
1.3.3.3.	Translocacions múltiples simultànies o <i>jumping translocation</i>	68
1.3.4.	Falsos cariotips en mosaic: limitacions tècniques, artefactes de cultiu i contaminacions maternes.....	69
1.3.5.	Concepte de discrepància fetoplacentaria	71

1.3.6	Diagnòstic fals positiu i fals negatiu.....	73
1.4.	Estudis citogenètics en vellositats coriòniques d'avortaments	76
1.4.1.	Tècniques de cultiu en mostres d'avortaments.....	77
1.4.2.	Anomalies cromosòmiques en vellositats coriòniques d'avortaments...	78
1.5.	Mosaicismes en vellositats coriòniques d'avortaments	82
1.5.1.	Mosaics generalitzats	83
1.5.2.	Mosaic confinats a la placenta en avortaments	83
2.	OBJECTIUS	87
3.	MATERIAL I MÈTODES.....	91
3.1.	Estudis citogenètics de mostres de vellositats coriòniques prenatals	92
3.1.1.	Setmanes de gestació i indicació mèdica per a l'estudi prenatal.....	92
3.1.2.	Obtenció i transport de la mostra.....	94
3.1.3.	Tècniques de cultiu cel·lular	94
3.1.3.1.	Cultiu curt	95
3.1.3.2.	Cultiu llarg.....	98
3.1.3.3.	Extensions.....	101
3.1.3.4.	Tinció dels portaobjectes.....	103
3.1.4.	Estudi citogenètic	103
3.1.5.	Interpretació del resultat citogenètic i estudis de seguiment	104
3.2.	Estudis citogenètics de mostres procedents d'avortaments	107
3.2.1.	Setmanes de gestació de mostres procedents d'avortaments	107
3.2.2.	Obtenció i transport de les mostres procedents d'avortaments	108
3.2.3.	Tècniques de cultiu cel·lular en mostres procedents d'avortaments ...	108
3.2.4.	Tècniques de cultiu de teixits fetals.....	109
4.	RESULTATS	113
4.1.	Mostres de vellositats coriòniques prenatals	113
4.1.1.	Rendiment de les tècniques de cultiu.....	113
4.1.2.	Resultats citogenètics	114
4.1.3.	Mosaïcisme en prenatal	116
4.1.3.1.	Mosaics generalitzat	119

4.1.3.2.	Mosaics confinats	119
4.1.3.3.	Mosaics rars.....	124
4.1.3.4.	Falsos cariotips en mosaic	126
4.1.3.5.	Mosaics indeterminats	128
4.1.4.	Falsos diagnòstics positius i negatius en mostres prenatales	128
4.2.	Mostres procedents d'avortaments	129
4.2.1.	Rendiment de les tècniques de cultiu.....	129
4.2.2.	Resultats citogenètics en avortaments.....	131
4.2.3.	Mosaïcisme en avortaments.....	134
4.2.3.1.	Mosaics confinats en avortaments	135
4.2.3.2.	Translocació múltiple simultània	138
4.2.3.3.	Falsos cariotips en mosaic en avortaments	138
4.2.3.4.	Mosaics indeterminats	138
4.2.4.	Falsos diagnòstics positius i negatius en avortaments	139
5.	DISCUSSIÓ	143
5.1.	Valoració de l'eficiència dels cultius cel·lulars	143
5.1.1.	Eficiència dels cultius en vellositats per a estudis prenatales.....	143
5.1.2.	Eficiència dels cultius en mostres procedents d'avortaments.....	144
5.1.3.	Comparació de l'eficiència dels cultius cel·lulars dels dos grups	147
5.2.	Resultats citogenètics	147
5.2.1.	Anomalies cromosòmiques en mostres prenatales.....	147
5.2.2.	Anomalies cromosòmiques en avortaments	149
5.2.3.	Comparació de les anomalies cromosòmiques entre els dos grups	151
5.3.	Mosaicismes cromosòmics	153
5.3.1.	Mosaics generalitzats	153
5.3.2.	Mosaics confinats	154
5.3.3.	Mosaics rars.....	158
5.3.4.	Falsos cariotips en mosaic	159
5.4.	Diagnòstics fals positiu i fals negatiu	162
5.5.	Noves estratègies en diagnòstic prenatal	164

6.	CONCLUSIONS	175
7.	BIBLIOGRAFIA.....	181
8.	ANNEXES	203
Annex I:	Definició de les indicacions per les quals es fa biòpsia de còrion	205
Annex II:	Llistat de totes les anomalies cromosòmiques en mostres prenatales ..	208
Annex III:	Descripció dels casos prenatales de cariotip en mosaic.....	210
Annex IV:	Llistat de totes les anomalies cromosòmiques en avortaments	222
Annex V:	Descripció dels casos d'avortaments de cariotip en mosaic.....	225

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ

OBJECTIUS

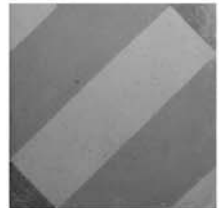
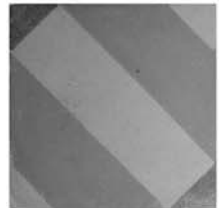
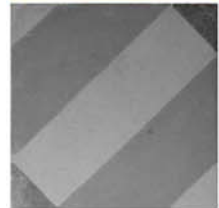
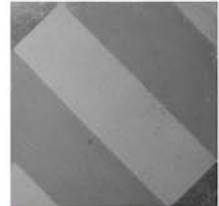
MATERIAL I MÈTODES

RESULTATS

DISCUSSIÓ

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAFIA



1. INTRODUCCIÓ

Les vellositats coriòniques, precursors del component fetal de la placenta, s'utilitzen com a teixit per a l'obtenció del cariotip fetal des dels anys vuitanta.

De fet, els primers de realitzar estudis citogenètics a partir de vellositats coriòniques van ser Hahnemann i Mohr l'any 1968, i des de llavors es va plantejar la utilització de mostres de còrion com a teixit per a realitzar estudis de diagnòstic prenatal. Però, de totes maneres, el gran impuls a aquesta idea no arriba fins als anys vuitanta, quan Simoni *et al.* (1983) posen a punt la tècnica de cultiu curt aprofitant l'elevat índex mitòtic de les cèl·lules del citotrofoblast presents en les vellositats coriòniques.

El *diagnòstic prenatal* és l'estudi dels defectes congènits *in utero*, i s'entén com a tal qualsevol de les accions diagnòstiques adreçades a conèixer un possible defecte congènit en el fetus (Carreras *et al.*, 1987). Per altra banda, per *avortament* entenem, segons l'Organització Mundial de la Salut (OMS), l'acte de parir prematurament abans que el fetus sigui viable. Aquesta definició inclou tant els avortament espontanis com els avortaments diferits, entenent com a tals aquelles gestacions en els quals entre la mort fetal espontània i l'expulsió del fetus passa un període de temps. El terme *avortament espontani* generalment es reserva per als casos en els quals aquesta interrupció succeeix abans de la 20a setmana de gestació, de manera que si esdevé després parlem ja de *mort perinatal* o de *fetus mort*.

S'entén per *interrupció legal de l'embaràs* (ILE) les interrupcions voluntàries que segons la legislació espanyola es poden induir al llarg de la gestació sota uns supòsits predefinits (Llei 2/2010, del 3 de març).

1.1 DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI DE LES VELLOSITATS CORIÒNIQUES

El desenvolupament gestacional s'estructura en tres períodes:

- període preembrionari (durant les 3 primeres setmanes) i que agrupa els estadis de mòrula, blastocist i embrió presomita,
- període embrionari (a partir de la setmana 3 i fins a la fi de la 8a setmana) quan esdevé l'organogènesi, i
- període fetal (de la 9a setmana fins al part), cicle caracteritzat principalment pel creixement i els canvis en les proporcions.

1.1.1 Primera setmana de gestació

Com a conseqüència de la fecundació, l'embrió inicia el seu desenvolupament mitjançant divisions mitòtiques. (Fig. 1.1)

Les cèl·lules de l'embrió primerenc (els *blastòmers*) són totipotents i no diferenciades i romanen així fins l'estadi de 8-cèl·lules que s'assoleix amb divisions mitòtiques consecutives. Una vegada se superen els primers cicles cel·lulars (16-32 cèl·lules) es produeix el primer fet diferencial que es detecta morfològicament, que es coneix com la *compactació de l'embrió* per formar la *mòrula*, i que succeeix entre el 3r i 4t dia de desenvolupament embrionari. (Fig. 1.1D).

La polaritat dels blastòmers s'aprecia a partir de l'estadi de 8-cèl·lules, de manera que les successives divisions cel·lulars generaran unes cèl·lules superficials i unes de més internes. Les cèl·lules més superficials formaran la *massa cel·lular externa* (MCE), *trophoderma* (TFE) o *trofoblast*, mentre que les cèl·lules situades més interiorment formaran la *massa cel·lular interna* (MCI). (Fig. 1.1E)

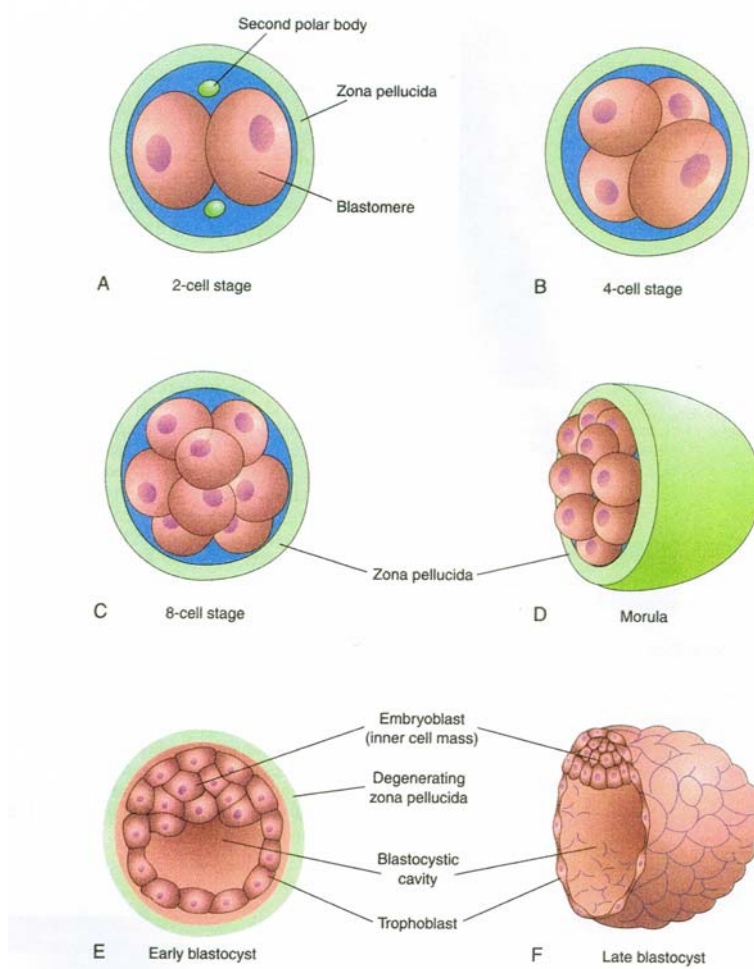


Fig. 1.1: Imatges de la divisió del zigot i la formació del blastocist. D'A a D, varis estadis de les divisions del zigot. El període de mòrula comença a 12-16 cèl·lules i acaba quan es forma el blastocist. E i F, seccions de blastocist (Moore *et al.*, 2009).

En l'estadi posterior, el de *blastocist*, i com a conseqüència de processos complexos de transport associats a reorganitzacions en les membranes plasmàtiques de les cèl·lules embrionàries, es forma una cavitat plena de líquid a l'interior de l'embrió (*cavitat blastocèlica*) que desplaça la MCI cap a un costat i deixa la TFE a la superfície embrionària. Del TFE es formaran la majoria de membranes extraembrionàries, mentre que de la MCI es formaran la totalitat dels teixits de l'embrió, i també teixits extraembrionaris com el sac vitel·lí, l'amni i el mesènquima extraembrionari de les vellositats coriòniques (Gardner *et al.*, 2012).

És en l'estadi de blastocist que es produeix l'eclosió. Aquest fet implica que l'embrió es desprèn de la zona pel·lúcida per posar-se en contacte amb l'endometri matern i implantar-s'hi (Fig. 1.2A). Del TFE es generarà citotrofoblast i sincitotrofoblast (Fig. 1.2B), i a partir de les cèl·lules de la MCI es formarà l'epiblast i l'hipoblast. De l'epiblast o embrioblast derivaran els teixits que formaran pròpiament el fetus i els que formaran la bossa amniòtica, i de l'hipoblast es formarà el sac vitel·lí i d'aquest el mesènquima o mesoderma extraembrionari i el mesoderma amniòtic.

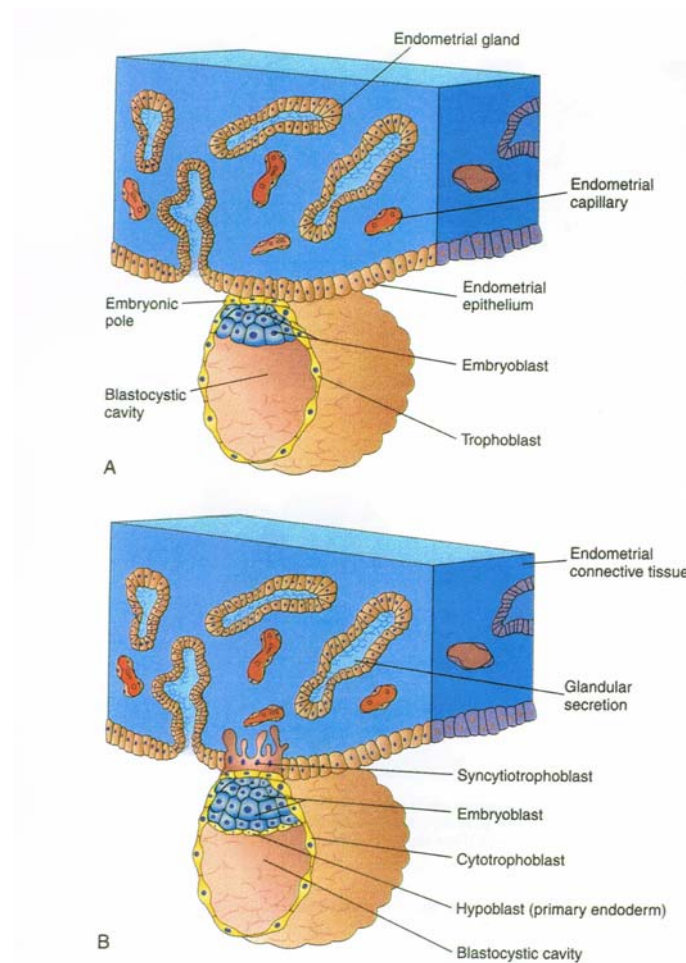


Fig. 1.2: Implantació del blastocist en l'endometri. A: el 6è dia, el trofoblast es fusiona amb l'endometri pel pol embrionari del blastocist. B: el 7è dia, el sincitiotrofoblast ha penetrat en l'endometri i ha començat a envair-lo (Moore *et al.*, 2009).

1.1.2 Segona setmana de gestació

En l'inici de la segona setmana de gestació, entre el 6è i el 8è dia de gestació, immediatament després de la implantació, el trofoblast pateix un procés de creixement accelerat i envaeix l'endometri matern. De les 64 cèl·lules que formen el blastocist primerenc, la majoria són del trofoblast, de manera que la MCI en té només unes 16, de les quals tan sols 4 formaran l'embrió pròpiament (Gardner *et al.*, 2012).

Aproximadament al mateix moment les cèl·lules del trofoblast es diferencien en dos altres teixits: *el citotrofoblast* i el *sincitrofoblast*. A la part més externa hi ha les cèl·lules del sincitrofoblast i a la més interna les del citotrofoblast. El sincitrofoblast és una massa cel·lular formada per la fusió de les membranes del citotrofoblast en proliferació, amb nombrosos nuclis dispersos, i situada en la part més externa de l'embrió. (Fig. 1.3B)

Entre l'11è i el 12è dia de desenvolupament embrionari sorgeix una nova població cel·lular anomenada *mesènquima* o *mesoderma extraembrionari* d'origen embrionari (hipoblast). (Fig. 1.3C)

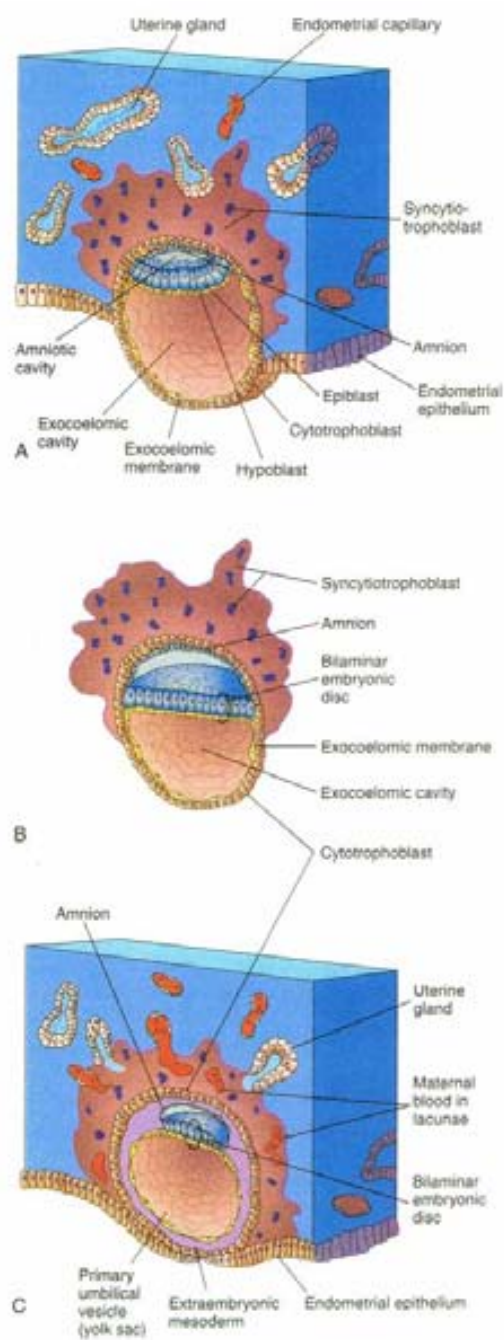


Fig. 1.3: Implantació del blastocist en l'endometri. A: el 8è dia, implantació parcial del blastocist a dins de l'endometri, on apareix a cavitat amniòtica. B: detall de la dimensió del sincicitrofoblast i localització només en el pol embrionari. C: el 9è dia apareixen les llacunes en el sincicitrofoblast (Moore *et al.*, 2009).

Els dies 13è i 14è, el trofoblast presenta unes prolongacions que penetren en l'endometri gràcies a un diàleg bioquímic entre les dues estructures. Es tracta de les *vellositats coriòniques primàries*, formades per una capa més externa de sincitiotrofoblast i una més interna de citotrofoblast. (Fig. 1.4 i Fig. 1.5)

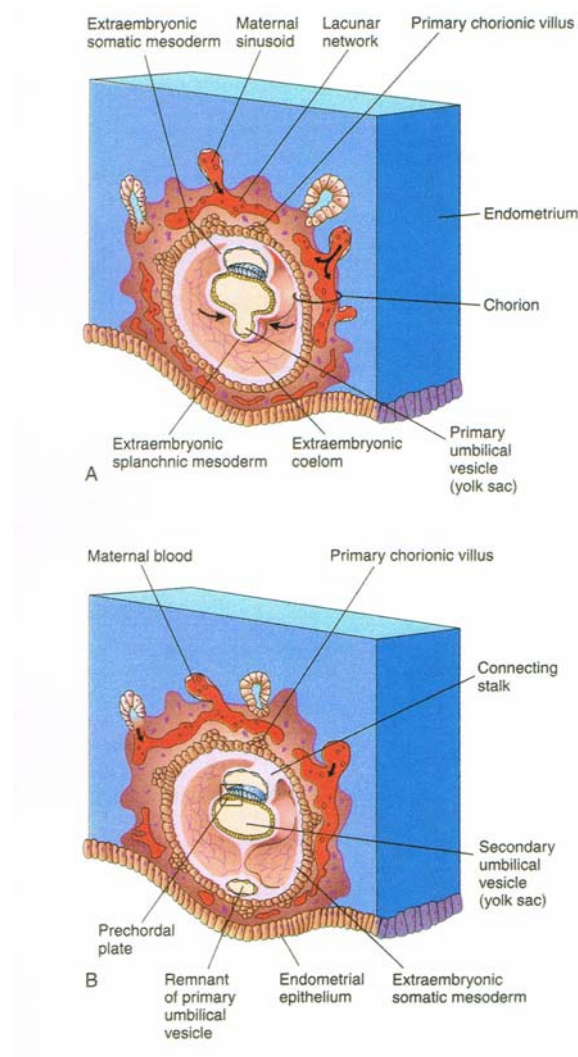


Fig. 1.4: Il·lustracions de seccions d'embrió humà implantat. A: el 13è dia. B: el 14è dia (Moore *et al.*, 2009).

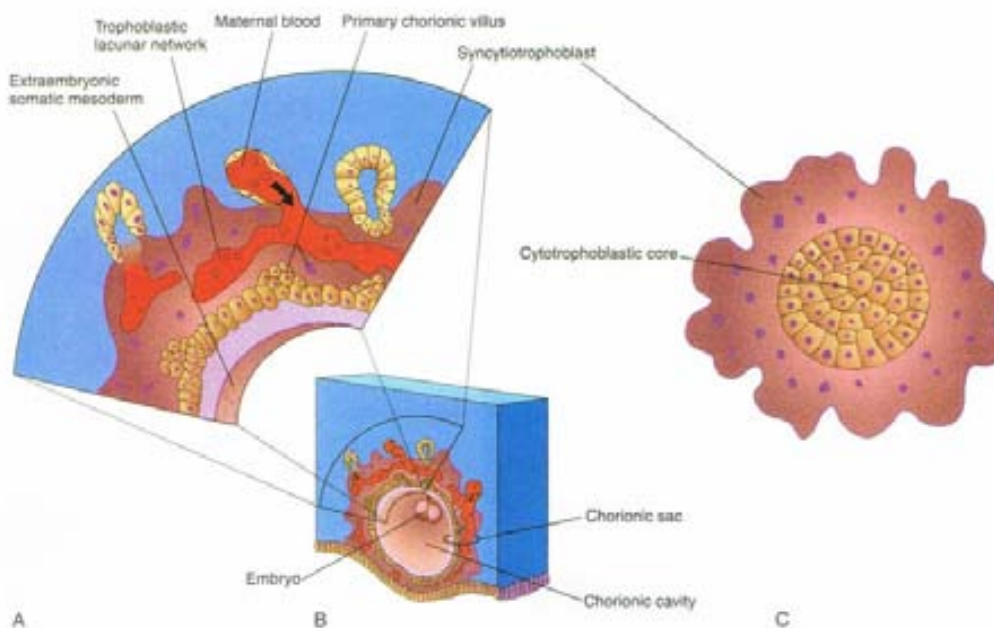


Fig. 1.5 A: Detall de la imatge amb l'inici de la formació de les vellositats primàries. B: embrió el 14è dia. C: Il·lustració d'una secció transversal de vellositats coriòniques primàries (Moore *et al.*, 2009).

Posteriorment, el mesoderma extraembrionari envairà les columnes de citotrofoblast formant les *vellositats coriòniques* secundàries.

1.1.3 Tercera setmana de gestació i següents

Entre el 15è i el 20è dia de gestació es desenvolupen vasos sanguinis a dins de les vellositats (*vellositats coriòniques terciàries*, Fig.1.6), que connectaran amb els vasos coriònics, els quals arribaran fins a la circulació embrionària a través dels vasos umbilicals. (Fig. 1.7)

El còrion, doncs, és la fusió del trofoblast i el mesènquima extraembrionari i té la missió de formar unes estructures, les *vellositats coriòniques*, que aproximïn la sang materna al fetus. De la 2a a la 8a setmanes de gestació, les vellositats van creixent i recobrint tot l'embrió. (Fig. 1.7)

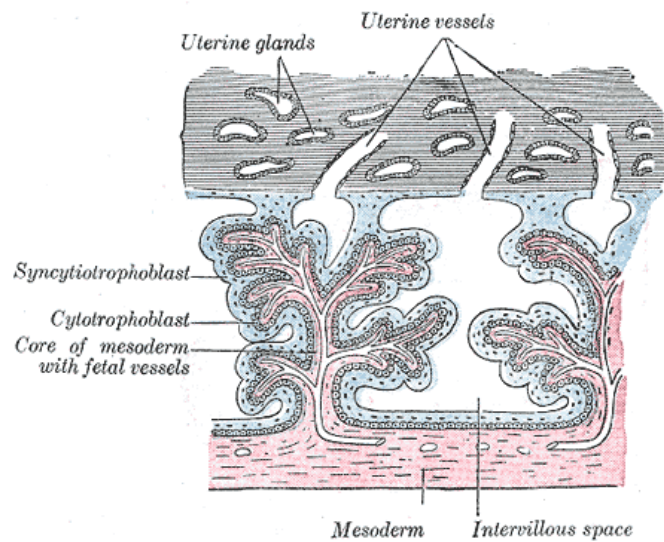


Fig. 1.6: Esquema de vellositat coriònica terciària (imatge extreta d'internet del llibre Grey's Anatomy)

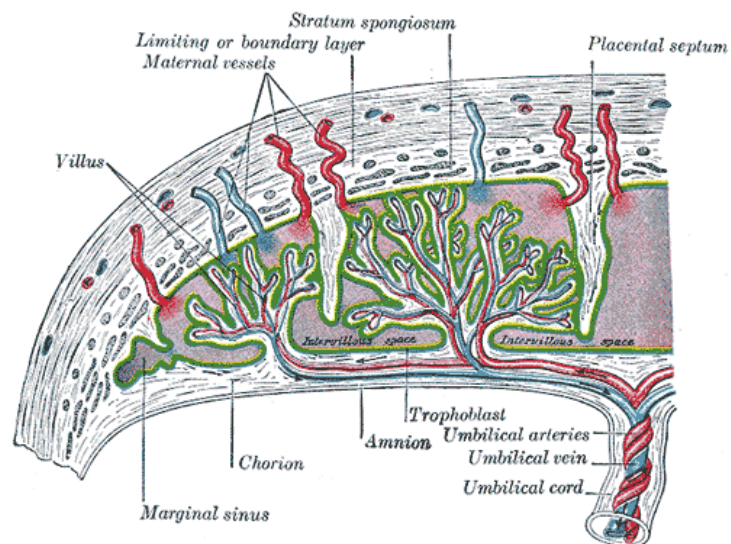


Fig. 1.7: Esquema del desenvolupament de la vellositat coriònica terciària (imatge extreta d'internet del llibre Grey's Anatomy)

A partir de la 8a setmana de gestació, tota la capa de vellositats coriòniques que envolta l'embrió es diferencia en dues zones: la zona del pol embrionari (la zona de la implantació) i la zona del pol vegetatiu. En el pol embrionari localitzem el *còrion frondós*, i en la zona del pol vegetatiu, es localitza el *còrion lleu*, que va degenerant fins a desaparèixer, perquè és el còrion frondós el que formarà finalment, amb la decídua basal, la *placenta*.

1.2 ESTUDIS CITOGENÈTICS EN VELLOSITATS CORIÒNIQUES DE MOSTRES PRENATALS

L'elevat índex mitòtic de les cèl·lules del citotrofoblast és la característica més destacada d'aquest teixit, de manera que podem obtenir un cariotip fetal en poc temps. Una altra característica important del teixit coriònic és que se'n pot realitzar dues tècniques de cultiu i obtenir així el cariotip fetal de cèl·lules de dos orígens extraembrionaris diferents a partir d'una mateixa mostra: d'una banda s'estudien les cèl·lules del citotrofoblast, que provenen del trofoblast; mentre que, de l'altra (cultiu de fibroblasts), s'estudien les cèl·lules del mesènquima extraembrionari, que provenen de la MCI.

Heaton *et al.* (1984) van demostrar que les cèl·lules citotrofoblàstiques tenen un cicle vital molt curt i que, per contra, les del mesènquima extraembrionari tenen un cicle vital molt llarg, fet que en permet el creixement en els cultius llargs.

Raabe *et al.* (1990), utilitzant la tècnica de condensació cromosòmica prematura, van observar que el citotrofoblast té una proliferació cel·lular major a les 9 setmanes de gestació, moment que seria idoni per fer estudis citogenètics. Però també hi havia el risc que la mateixa extracció de la mostra produís malformacions fetals en les extremitats si es feia molt aviat en la gestació (Firth *et al.*, 1991). Per aquest motiu, avui en dia la majoria de biòpsies de còrion es realitzen entre l'11a i la 13a setmana de gestació.

1.2.1 Tècniques de cultiu de vellositats coriòniques

La tècnica de cultiu curt més emprada avui en dia és la descrita per Simoni *et al.* l'any 1983. Amb aquesta tècnica es poden cariotipar les metafases que provenen del citotrofoblast. Per contra, per poder cariotipar les metafases que provenen del mesènquima extraembrionari s'ha de realitzar un cultiu primari (cultiu llarg).

El temps d'espera per al resultat citogenètic en el cultiu curt és de 24 a 72 hores, molt més breu que el del cultiu llarg, que és d'unes dues setmanes. Gràcies a la breu espera del resultat en els cultius curts, l'angoixa generada per la demora és menor.

El 1998, Los *et al.* van presentar els resultats de les seves primeres 3.499 mostres de vellositats coriòniques analitzades únicament amb cultiu curt, i la seva conclusió va ser que, per tal de millorar la qualitat del cariotip, de reduir el risc de falsos positius i d'eliminar el teòric risc dels falsos negatius, era necessari fer també i simultàniament el cultiu llarg.

Tres anys més tard, el mateix equip (Los *et al.*, 2001) van publicar un estudi comparatiu d'estudis citogenètics amb vellositats (utilitzant les dues tècniques de cultiu) i líquid amniòtic, i van concloure que els dos tipus de mostres fetals tenien el mateix percentatge d'èxit de resultat citogenètic, que al final s'obtenia el mateix nivell de bandes, i que el percentatge de mostres de les quals calia una confirmació del cariotip era semblant.

El rendiment de cada tècnica de cultiu depèn en gran mesura de les condicions de la mostra rebuda. En els següents casos, la mostra és considerada inadequada:

- *Mostra inadequada per la quantitat rebuda*, que són les mostres amb menys de 10 mg (Ledbetter *et al.*, 1992).

- *Mostra inadequada per la qualitat*, és a dir mostres de segon o tercer trimestre o bé mostres molt degradades (tipus morfològic III) (Cuatrecasas *et al.*, 2008).
- *Mostra inadequada per males condicions de transport o emmagatzematge* (Los *et al.*, 2001).
- *Mostra inadequada per contaminació*. Correspon als casos en què es produeix una contaminació del cultiu llarg per fongs, llevats o altres microorganismes. Si la contaminació sorgeix en un termini curt, s'atribueix a un origen extern, mentre que si la contaminació sorgeix al cap de més dies s'atribueix a un problema intern a l'hora de fer la manipulació de la mostra (*fallada tècnica de laboratori*).

A la següent taula s'observa el percentatge de no-creixement sense causa justificada per cada tècnica de cultiu en sèries de biòpsies de còrion consultades.

Taula 1.1: Percentatge de les mostres sense resultat citogenètic en sèries de vellositats per estudis prenatals.

		TIPUS DE CULTIU		
		CURT	LLARG	AMBDÓS*
Autors i any de publicació	n.	%	%	%
Ledbetter <i>et al.</i> , 1992	11.473	-	-	0,3
Teshima <i>et al.</i> , 1992	1.019	3,5	2,1	0,7
ACC, 1994	7.595	-	-	2,4
Míguez, 1996	1.112	1,5	-	-
Hahnemann <i>et al.</i> , 1997	62.865	-	-	1,9
Van den Berg <i>et al.</i> , 2000	1.838	0,3	1,4	0,5
Tze Kin <i>et al.</i> , 2005	1.355	-	0,07	-
Soler <i>et al.</i> , 2008	3.901	0,8	-	-

* ambdós: cultiu curt i cultiu llarg

La Guia de Protocols i Qualitat presentada per l'*European Cytogenetics Association* (ECA, 2012) aconsella que, per tal d'obtenir el cariotip fetal a partir de mostres de biòpsies de còrion, es facin els dos cultius a la mostra rebuda, i que només en els casos de poca quantitat de material es faci, preferiblement, el cultiu llarg.

Diversos autors (Crane *et al.*, 1988; ACC, 1994; Pittalis *et al.*, 1994; Saura *et al.*, 1998; Sikkema-Raddatz *et al.*, 2000; Grati *et al.*, 2006) corroboren la necessitat d'aplicar les dues tècniques de cultiu; el cultiu curt, per la seva rapidesa i perquè minimitza el risc de contaminació materna, i el cultiu llarg perquè és més fiable.

1.2.2 Anomalies cromosòmiques en vellositats coriòniques prenatals

El percentatge de les aneuploidies al llarg del desenvolupament fetal tendeix a disminuir: 30%-50% embrions, 10% fetus de primer trimestre, 5% morts perinatals, i 0,5% nounats. Per tant, es demostra una efectiva selecció natural contra les aneuploidies en els diferents estadis gestacionals (Gardner *et al.*, 2012).

A la Taula 1.2 s'observen diversos percentatges d'anomalies cromosòmiques en sèries de més de 1.000 mostres de vellositats coriòniques per a estudis prenatals de primer trimestre.

Taula 1.2: Percentatge d'alteracions cromosòmiques en sèries publicades amb més de 1.000 mostres

Autors i any de publicació	n.	%
Ledbetter <i>et al.</i> , 1992	11.473	3,4
ACC, 1994	7.595	6,7
Pittalis <i>et al.</i> , 1994	4.860	4,7
Míguez, 1996	1.112	3,6
Hahnemann <i>et al.</i> , 1997a	62.865	3,7
Van den Berg <i>et al.</i> , 2000	1.838	8,6
Brun <i>et al.</i> , 2003	10.741	5,4
Grati <i>et al.</i> , 2006	15.109	12,8
Soler <i>et al.</i> , 2008	3.901	8,5

La distribució de les anomalies dels estudis col·laboratius més grans que les descriuen es detalla a la Taula 1.3, on s'observa que les anomalies més freqüents són les aneuploidies comunes (dels cromosomes 13, 18 i 21) i després els mosaics i les anomalies estructurals equilibrades.

Taula 1.3: Freqüència de les alteracions cromosòmiques en vellositats per diagnòstic prenatal de les dues primeres sèries col·laboratives.

	Ledbetter <i>et al.</i> , 1992		ACC, 1994	
	n.	%	n.	%
TOTAL	11.473	4,65	7.595	6,25
Aneuploidies autosòmiques comunes		1,28		2,06
Aneuploidies autosòmiques no comunes		0,09		0,3
Aneuploidies cromosomes sexuals		0,34		0,4
Anomalies estructurals equilibrades		1,23		1,93
Anomalies estructurals desequilibrades		0,35		0.06
Poliploidies		0,09		0,07
Alteracions múltiples		0		0
Mosaics		1,27		1,43

1.3 MOSAICISMES EN VELLOSITATS CORIÒNIQUES PRENATALS

Un *mosaic* es defineix com la presència de dues o més línies cel·lulars diferents en un mateix individu. Es diferencia d'una *quimera* perquè, en el mosaic, les diverses línies cel·lulars provenen del mateix embrió, mentre que en la quimera provenen de dos o més embrions diferents.

Quan s'estudien diversos teixits fetals, en els casos en què s'observen diverses línies cel·lulars repartides en els diferents teixits, tècnicament també es consideren mosaics (Phillips *et al.*, 1996).

Segons Hahnemann *et al.* (1997a) un mosaic en les vellositats coriòniques es defineix com:

a) La presència d'almenys dues metafases amb idèntica anomalia cromosòmica coexistent amb una línia normal o amb una altra anomalia cromosòmica en el cultiu curt, en el cultiu llarg o en els dos, i

b) la presència d'una anomalia cromosòmica en línia pura en totes les metafases analitzades en el cultiu curt coexistent amb una línia diploide normal o amb una altra anomalia en línia pura en el cultiu llarg o viceversa.

En els cultius primaris poden originar-se *in vitro* noves línies cel·lulars que no són representatives del cariotip fetal, fet que ens pot fer confondre entre els mosaics d'origen *in vivo* i els d'origen *in vitro* (pseudomosaics).

En funció dels percentatges en què es trobin les línies cel·lulars divergents, classifiquem els mosaics en tres nivells, fet que a més a més ajudarà a interpretar el seu possible origen *in vitro* o *in vivo* (ISCN, 2009; Gardner *et al.*, 2012):

- Nivell I: només s'ha observat una metafase de la línia discordant. La majoria de vegades es tracta d'un artefacte de cultiu i per tant té un origen *in vitro*. Si és així, es considera un *pseudomosaic*.

- Nivell II: s'han observat dues o més metafases de la línia discordant en un mateix flascó o en una única colònia cel·lular, i no s'observa en altres cultius. Aquesta forma de mosaic, la majoria de les vegades, és també un pseudomosaic. Discernir entre un mosaic vertader (*in vivo*) o un artefacte del cultiu (*in vitro*) comporta analitzar més metafases d'altres cultius.

- Nivell III: s'ha observat més de dues metafases de la línia discordant en diferents cultius, fet que s'identifica com a mosaic vertader.

Perquè un mosaic citogenètic es consideri vertader quan es troba una monosomia s'ha de detectar la mateixa monosomia en tres metafases, però quan es detecta una trisomia només cal que s'observi en dues metafases (ISCN, 2009).

Els mosaics vertaders poden trobar-se repartits per tot l'individu (*mosaic generalitzat*) o bé localitzats en un teixit concret (*mosaic confinat*). Hi ha teixits que tenen més probabilitat de patir mosaics, per exemple les còrnies –un 70 % de les cèl·lules de les quals són mosaics–, o les cèl·lules del fetge –que són mosaics tetraploides (Plaja, 2006).

Els mosaics poden generar-se a partir de diversos errors en la divisió cel·lular o errors de segregació:

- No-disjunció: error en el repartiment dels cromosomes en anafase que genera una cèl·lula filla trisòmica i una altra monosòmica.
- Retard en l'anafase (*Anafase-lag*): en la divisió cel·lular es perd un cromosoma d'un parell concret. Si la cèl·lula mare és diploide resultarà una cèl·lula filla monosòmica i l'altra diploide com la mare; però, si la cèl·lula mare és trisòmica, obtindrem una cèl·lula filla diploide i l'altra trisòmica com la cèl·lula mare. En aquest segon cas es pot parlar de reparació o rescat de la trisomia, perquè es restableix una línia cel·lular normal a partir d'una cèl·lula trisòmica.
- duplicació postzigòtica d'un cromosoma: per un error postzigòtic en una de les divisions mitòtiques es duplica un cromosoma.
- reorganitzacions cromosòmiques per errors en la fase G2: isocromosoma d'origen postzigòtic (Riegel i Schienzel, 2005), deleció/duplicació d'un mateix fragment cromosòmic (Rodríguez-Revenga *et al.*, 2005), etc.

Com en les anomalies cromosòmiques, en general, la incidència de mosaïcisme també va disminuint a mesura que augmenten les setmanes de gestació: en vellositats d'avortaments de primer trimestre és 3,2%, en vellositats per a diagnòstic prenatal (de 10 a 12 setmanes) és un 1,1%, en amniocentesis precoces (de 12 a 14 setmanes de gestació) és un 0,5%, en amniocentesis estàndards (de 15 a 18 setmanes) és un 0,3% i en nounats un 0,1% (Míguez, 1996).

1.3.1 Mosaics generalitzat

Si l'error es produeix molt a l'inici del desenvolupament embrionari, abans de la formació del blastocist, i per tant afecta tant a les cèl·lules progenitores de la placenta (MCE) com a les de l'embrió (MCI), tindrem un *mosaic generalitzat*.

L'efecte clínic del mosaic generalitzat sobre el fenotip és molt difícil de predir i depèn de la distribució de les cèl·lules anòmales en els teixits fetals i de la proporció de cèl·lules normals i cèl·lules amb l'anomalia cromosòmica. Hi ha algunes anomalies que només poden trobar-se en mosaic, ja que la presència en no-mosaic és letal *in utero*, com succeeix en les trisomies dels cromosomes 8 i 9 (Plaja, 2006) o la tetrasomia 12p i la trisomia 20 (Morales *et al.*, 2010).

Quan observem un cariotip en mosaic en els dos estudis de les vellositats i també en els teixits fetals, llavors parlarem de mosaic generalitzat. El percentatge del mosaic pot ser diferent en cada cultiu.

Els percentatges de mosaïcisme generalitzat en vellositats coriòniques oscil·len entre un 0,01 % i un 0,28 %. (Taula 1.4)

Taula 1.4: Percentatge de resultats en mosaïcisme generalitzat en les diferents sèries consultades de vellositats per a estudis prenatals

		MOSAÏCISME GENERALITZAT
Autors i any de publicació	n.	%
Ledbetter <i>et al.</i> , 1992	11.473	0,28
*ACC, 1994	7.595	0,11
Pittalis <i>et al.</i> , 1994	4.860	0,2
Kalousek <i>et al.</i> , 1996	2.612	0,19
Phillips <i>et al.</i> , 1996	59.937	0,08
Hahnemann <i>et al.</i> , 1997a	62.895	0,01
Stetten <i>et al.</i> , 2004	4.000	0,1
Tze Kin <i>et al.</i> , 2005	1.355	0,22

* Inclòs en el treball de Phillips *et al.* (1996).

1.3.2 Mosaics confinats

Un mosaic es considera *confinat* quan està localitzat en un teixit concret i no generalitzat en tot l'individu. Gràcies als cultius cel·lulars és possible obtenir cariotips de llinatges cel·lulars específics i detectar-ne els mosaics confinats només en un llinatge específic.

1.3.2.1 Origen mitòtic o meiótic dels mosaics confinats

La distribució de les línies cel·lulars dels mosaics fetals dependrà del moment en què s'ha produït l'error cromosòmic, del llinatge cel·lular que ha afectat i del tipus d'error que l'ha originat.

Els mosaics confinats poden tenir dos orígens; poden ser d'origen mitòtic o somàtic quan l'error és postzigòtic, o bé poden ser d'origen meiòtic quan l'error inicial és prezigòtic.

En un embrió diploide la línia trisòmica es formarà per una duplicació mitòtica o per una no-disjunció postzigòtica. Si l'error és primerenc, és a dir abans de l'estadi de blastocist, estarà present en més teixits que no pas si l'error és més tardà (Gardner *et al.*, 2012).

Quan l'error mitòtic es produeix més enllà de l'estadi de blastocist pot afectar qualsevol cèl·lula, tant les del trofoblast com les de la MCI, encara que es produeix amb més facilitat en les cèl·lules del trofoblast perquè n'hi ha moltes més. A més, les cèl·lules del trofoblast es divideixen molt ràpidament, fet que les fa vulnerables a partir un error de segregació que generi una segona línia discordant. Si la no-disjunció en lloc d'afectar les cèl·lules del trofoblast afecta les de la MCI, pot afectar a més teixits embrionaris i serà tan greu com els errors d'origen meiòtic (Wolstenholme, 1996).

Un 20 % dels oòcits (Kalousek *et al.*, 2000) i un 4,5 % (Templado *et al.*, 2011) dels espermatozoides són aneuploides, com a conseqüència de meiosi anòmala. La fecundació amb aquests gàmetes comporta un zigot aneuploide, generalment trisòmic. Malgrat que moltes d'aquestes gestacions seran avortades espontàniament, algunes segueixen endavant.

Els mosaics confinats d'origen meiòtic impliquen dos errors consecutius, un primer error en els gàmetes i un posterior "rescat" de la trisomia en el zigot, que finalment originarà les dues línies cel·lulars diferents. (Fig. 1.8)

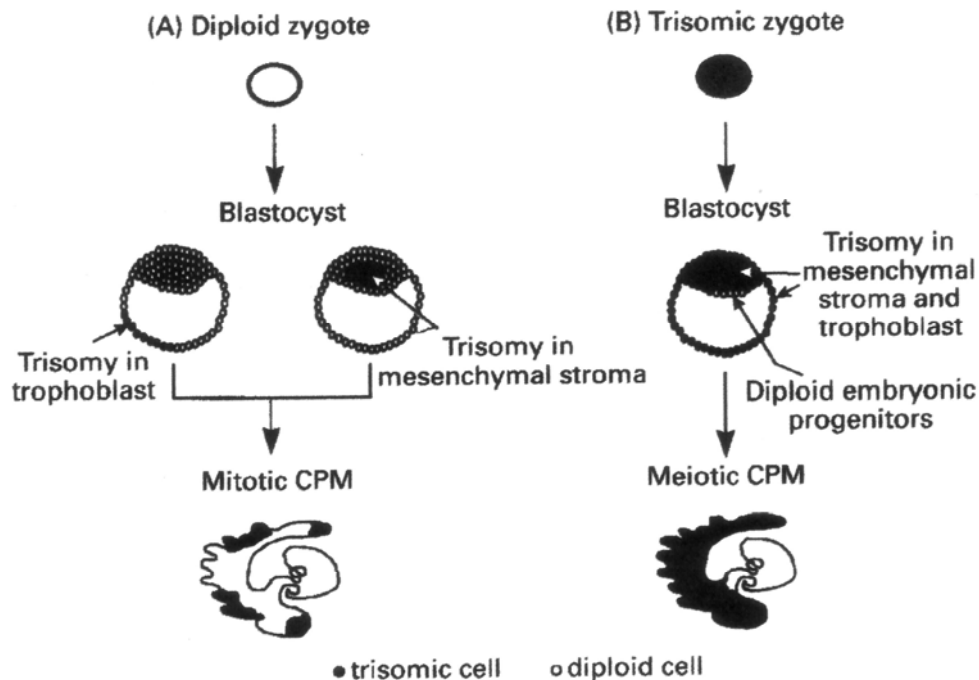


Fig. 1.8: Mecanismes de formació dels mosaics confinats a la placenta segons l'origen mitòtic o meiòtic (Lestou, *et al.* 1998).

Si la línia diploide rescatada es forma durant les primeres divisions postzigòtiques, la distribució de les dues línies pot ser més o menys uniforme, però si la línia diploide rescatada sorgeix en l'estadi de blastocist la distribució variarà segons si afecta les cèl·lules de la MCE o bé les de la MCI.

Així, si el rescat o correcció recau en la MCE obtindrem una placenta diploide o en mosaic i un embrió trisòmic, mentre que si recau en la MCI obtindrem una placenta trisòmica i un embrió mosaic o diploide.

Si el rescat o correcció es produeix en les cèl·lules de la MCI, és probable que es desencadeni un procés de bessons en el qual quedaran separades les cèl·lules patològiques no viables i les cèl·lules normals viables. El bessó aneuploide morirà prematurament i quedarà reabsorbit sense deixar rastre en la gestació, mentre que

el bessó diploide pot ser uniparental o biparental pel cromosoma afectat i serà trisòmic en la placenta (Kalousek, 2000).

Si el rescat es produeix en estadis encara més tardans, després de la formació del blastocist, els mosaics seran confinats en teixits específics, tant en el fetus com en la placenta.

1.3.2.2 Classificació dels mosaics confinats: mosaics confinats a la placenta, mosaics vertaders fetals i mosaics confinats al fetus

Com ja s'ha comentat anteriorment, els mosaics confinats estan localitzats en uns teixits concrets. Basant-nos en les tècniques de cultiu que usem, trobem tres possibles mosaics confinats: els confinats a la placenta (MCP), els confinats al fetus (MCF) i els mosaics vertaders fetals (MVF).

Els MCP van ser definits i classificats per primera vegada per Kalousek *et al.* (1983), i són els mosaics que es localitzen en els teixits extraembrionaris o placentaris. Els MCF són els casos en els quals l'anomalia cromosòmica està ubicada únicament al fetus i els MVF són aquells en què la línia cel·lular anòmala està localitzada al fetus i també, com a mínim, en un dels teixits extraembrionaris (Hahnemann *et al.*, 1997b).

Dels treballs consultats, els percentatges de mosaic confinat només els hem obtingut de les dues sèries que tenen en compte tant els MCP com els MVF i MCF. Són un 1,5 % de Hahnemann *et al.* (1997b) i un 1,8 % de Grati *et al.* (2006).

En mostres prenatales, el percentatge d'MCP és més alt que el d'MVF, segons els dos treballs consultats. (Taula 1.5)

Taula 1.5: Percentatges de mosaics confinats en estudis prenatal

		MC	MCP	MVF
Mostres analitzades	n.	%	%	%
Hahnemann <i>et al.</i> (1997b)	92.246	1,5	1,3	0,2
Grati <i>et al.</i> (2006)	15.109	1,8	1,5	0,3

MC: mosaic confinat; MCP: mosaic confinat a la placenta; MVF: mosaic vertader fetal.

Els MCP es classifiquen en tres tipus diferents: segons la seva distribució en els teixits placentaris:

- Tipus I: Anomalia cromosòmica (línia pura o en mosaic) localitzada en el trofoblast.
- Tipus II: Anomalia cromosòmica (línia pura o en mosaic) localitzada en l'estroma de les vellositats (mesènquima extraembrionari).
- Tipus III: Anomalia cromosòmica (línia pura o en mosaic) localitzada en els dos teixits, en el trofoblast i en el mesènquima.

Quan el mosaic s'observa en algun dels teixits extraembrionaris i també en teixit fetal (líquid amniòtic, sang fetal), sigui en línia pura o en mosaic, indicarà que es tracta d'un mosaic vertader fetal (MVF).

De MVF n'hi ha de tres tipus, segons la seva distribució en els teixits extraembrionaris i fetals (Hahnemann *et al.*, 1997b):

- Tipus IV: Anomalia cromosòmica (pura o en mosaic) localitzada en el trofoblast i en el teixit fetal.
- Tipus V: Anomalia cromosòmica (pura o en mosaic) localitzada en el mesènquima extraembrionari i en el teixit fetal.

- Tipus VI: Anomalia cromosòmica (pura o en mosaic) localitzada en els dos teixits extraembrionaris i en el fetal. L'anomalia cromosòmica, en línia pura o en mosaic, no pot ser la mateixa en els tres cultius. Si s'observés la mateixa anomalia en línia pura en els tres cultius estaríem parlant d'una anomalia cromosòmica regular, i si s'observés en mosaic en els tres cultius estaríem parlant d'un mosaic generalitzat.

Tenint en compte totes les possibilitats de mosaics confinats, l'any 1994 Pittalis *et al.* van fer-ne una primera classificació que analitzava els tres teixits: van observar 29 combinacions possibles. Tres anys més tard, Hahnemann *et al.* (1997a) van publicar una nova classificació que agrupa les combinacions anteriors més freqüents en 6 tipus: mosaics confinats a la placenta tipus I, II i III; i mosaics vertaders fetals tipus IV, V i VI. (Taula 1.6)

Taula 1.6: Classificació dels mosaics confinats

TIPUS	ORIGEN	CULTIU CURT	CULTIU LLARG	EMBRIÓ
I	MCP	anòmal*	normal	normal
II	MCP	normal	anòmal*	normal
III	MCP	anòmal*	anòmal*	normal
IV	MVF	anòmal*	normal	anòmal*
V	MVF	normal	anòmal*	anòmal*
VI#	MVF	anòmal*	anòmal*	anòmal*
	MCF	normal	normal	anòmal*

* El cariotip anòmal pot ser en mosaic o no.

El mosaic ha de ser present com a mínim en una de les tres línies cel·lulars.

MCP: mosaic confinat a la placenta / MVF: mosaic vertader fetal.

Els autors de l'estudi reconeixen que fer una classificació que abasti tots els possibles casos de mosaics confinats és molt difícil: així, per exemple, no és possible classificar els diversos casos en què el mosaic no és un mosaic confinat a la placenta sinó que s'observa entre diversos teixits pròpiament fetals, globalment inclosos en els mosaics confinats al fetus.

Grati *et al.* (2006) i Gardner *et al.* (2012) corroboren la classificació presentada per Hahnemann *et al.* (1997a). L'any 2011 Lebedev publicà una variació de la classificació anterior, modificant el tipus VI, i afegint els mosaics confinats al fetus com a tipus VII.

A la Taula 1.7 s'observen les freqüències dels 6 tipus de mosaics confinats segons els diversos treballs consultats. Prop d'un 90 % tenen un origen en mosaics confinats a la placenta, mentre que el 10 % restant són mosaics fetals vertaders.

Taula 1.7: Freqüències relatives dels tipus de mosaics confinats

	%	%	%	%	%	%
Tipus de mosaic	I	II	III	IV	V	VI
Wang <i>et al.</i> (1994)	37,6	45,4	17	-	-	-
Kalousek <i>et al.</i> (1996)	39,3	47	13,7	-	-	-
Hahnemann <i>et al.</i> (1997a)	48	25	16	0	4	7
Van den Berg <i>et al.</i> (2000)	55,5	36,2	8,3	-	-	-
Grati <i>et al.</i> (2006)	39,9	40,4	6,9	1	5,9	5,9

Kalousek *et al.* (1992) i Pittalis *et al.* (1992) descriuen els mosaics confinats al fetus (MCF) com aquells casos en els quals l'anomalia cromosòmica (en mosaic o no) només es localitza al fetus i els teixits placentaris són normals. Aquests MCF es generen en un moment del desenvolupament embrionari més tardà que els altres.

En el treball de Pindar *et al.* (1992) es descriu un cas d'MCF amb una trisomia del cromosoma 18 en un amostra prenatal. També hi ha un cas descrit per Kaulosek *et al.* (1992) d'una trisomia del 16 però en una mostra d'avortament que s'observa en mosaic al fetus però no al teixit extraembrionari, encara que s'ha de tenir en compte que només fan el cultiu llarg de les vellositats. Van den Berg *et al.* (2006) presenten una petita sèrie de 4 casos d'MCF publicats per altres autors: der(8), trisomia 21, i(21q) i i(13q), i dos casos més observat en el seu laboratori (deleció 5p13.3 i monosomia de l'X).

1.3.2.3 Embriogènesi dels mosaics confinats

La primera aproximació per entendre els mosaics confinats la van presentar Crane i Cheung (1998). Afirmava que en l'estadi *de mòrula* (els dies 4t o 5è de la postconcepció) les cèl·lules es diferencien en la massa cel·lular interna (MCI) i massa cel·lular externa (MCE). La MCI formarà diverses estructures extraembrionàries com el sac vitel·lí, l'amni i el mesoderma del còrion, i la MCE es limitarà a la formació de la placenta.

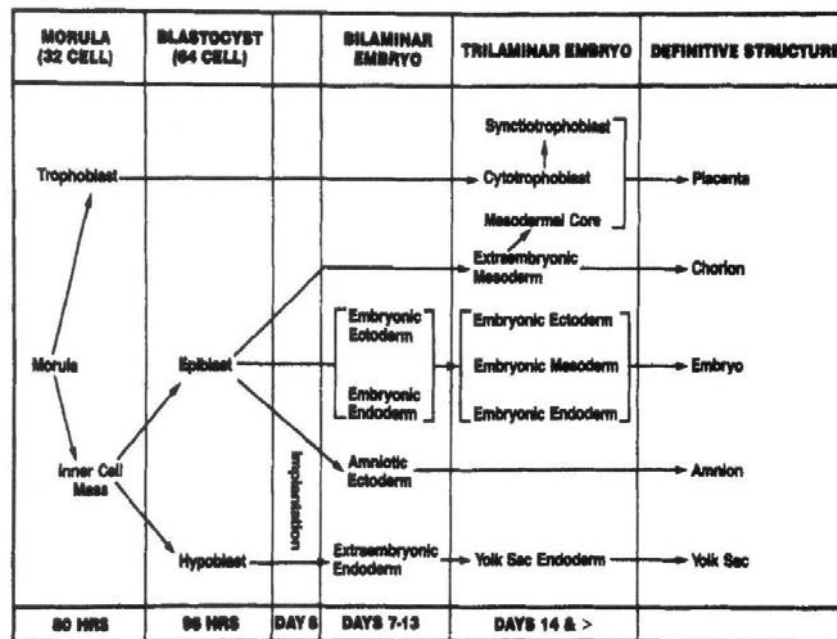


Fig. 1.9: Sinopsi del desenvolupament embrionari. Descriu l'origen de l'embrió, el citotrofoblast i el mesoderma extraembrionari (Crane i Cheung, 1998).

Segons aquest model de Crane i Cheung (1998), la massa cel·lular interna deriva d'una única cèl·lula totipotent de l'estadi inicial de 4 cèl·lules embrionàries. (Fig. 1.10 A). Però l'any 1993 Kennerknecht *et al.*, van publicar una modificació del model inicial, segons la qual diverses, i no només una cèl·lula totipotent, formarien la MCI. (Fig. 1.10 B)

Amb el model de Crane i Cheung (1988) era molt difícil explicar tots els possibles tipus de mosaics confinats, particularment quan es troba més d'una línia cel·lular en ambdós llinatges cel·lulars (derivats de la MCI i la MCE). En canvi, el model de Kennerknecht *et al.* (1993) permet la interpretació d'aquests mosaics més complexos, a través d'un mecanisme més senzill.

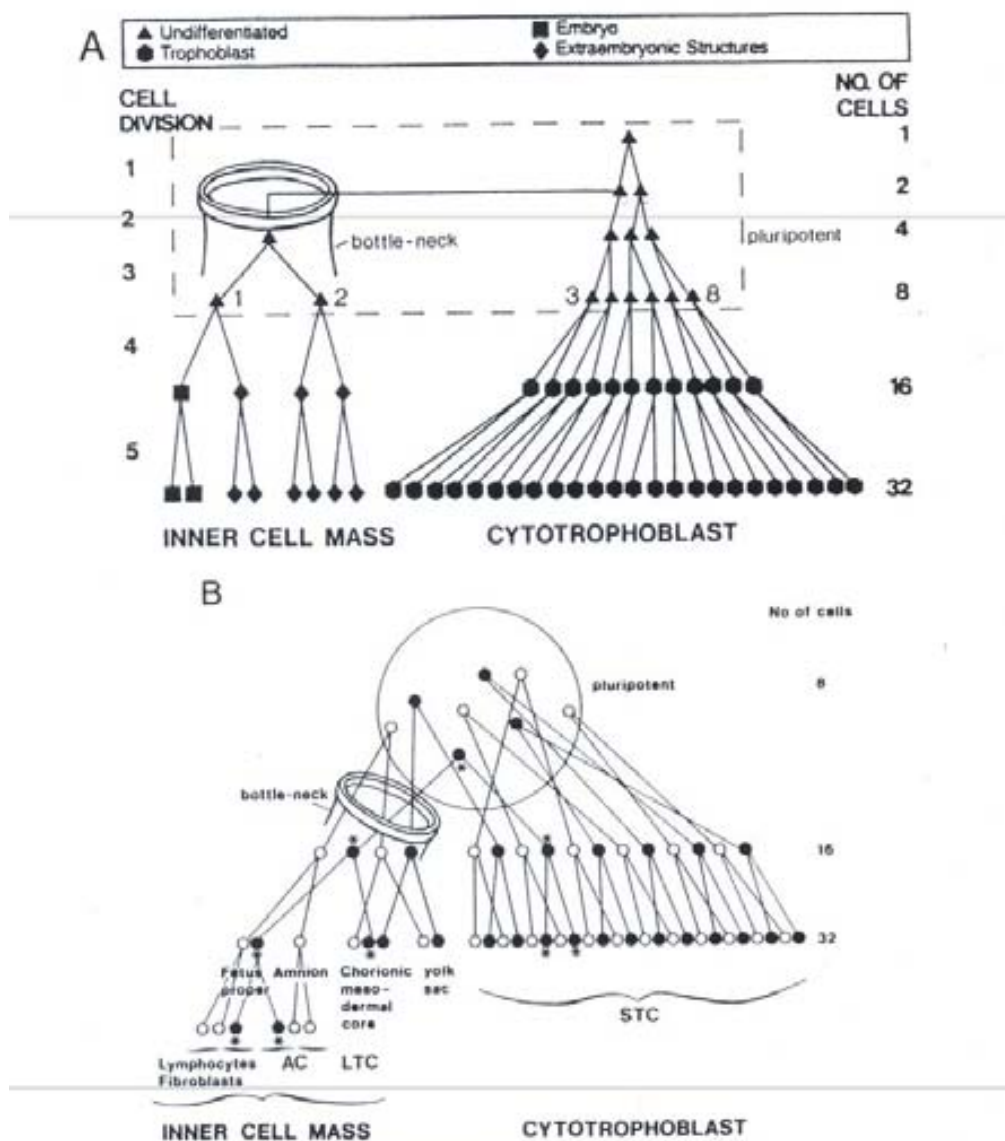


Figure 1. For interpretation see text. (A) is based on the original drawing by Crane and Cheung (1988) with the addition of a 'bottle-neck' and a dashed line around the pluripotent cells. AC=Amniocentesis; STC=short-term culture; LTC=long-term culture

Fig. 1.10 A: Esquema del model embrionari de Crane i Cheung (1988). B: Esquema del desenvolupament embrionari amb la variació que proposen Kennerknecht *et al.* (1993).

Gardner *et al.*, (2012) vinculen els diversos orígens descrits en el model de Bianchi *et al.* (1993) i les modificacions de Kennerknecht *et al.* (1993) i Robinson *et al.* (2002) (Fig.1.11) amb els tipus cel·lulars que s'analitzen en cada varietat d'estudis

citogenètics prenats. Així, mitjançant el cultiu curt analitzem les cèl·lules trofoblàstiques (ectoderma extraembrionari); en el cultiu llarg analitzem les cèl·lules del mesoderma extraembrionari; en el líquid amniòtic, les cèl·lules de l'ectoderma extraembrionari i de l'ectoderma o endoderma embrionari; i, finalment, mitjançant les biòpsies fetals s'analitzen les tres capes fetals: l'endoderma, el mesoderma i l'ectoderma embrionaris.

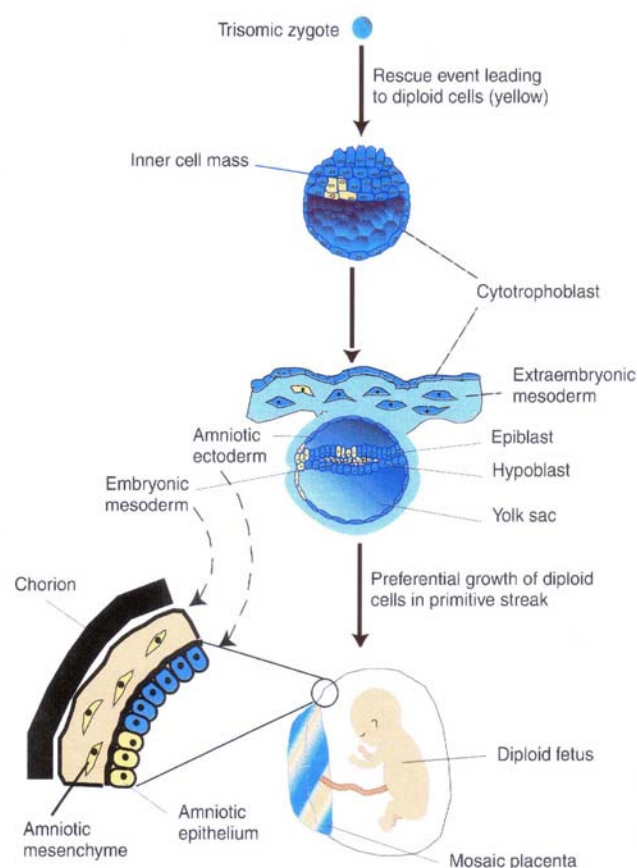


Fig. 1.11: Diagrama de la distribució i desenvolupament de les línies cel·lulars des de l'inici de la fecundació (Robinson *et al.*, 2002).

La gran diferència entre l'esquema inicial de Crane i Cheung de l'any 1988 i els de Robinson *et al.* (2002) i Gardner *et al.*, de l'any 2012 (Fig 1.12) és que el mesoderma

extraembrionari en el primer model prové de l'epiblast i en el segon prové de l'hipoblast. Fet rellevant ja que és el teixit que s'estudia amb el cultiu llarg de les vellositats.

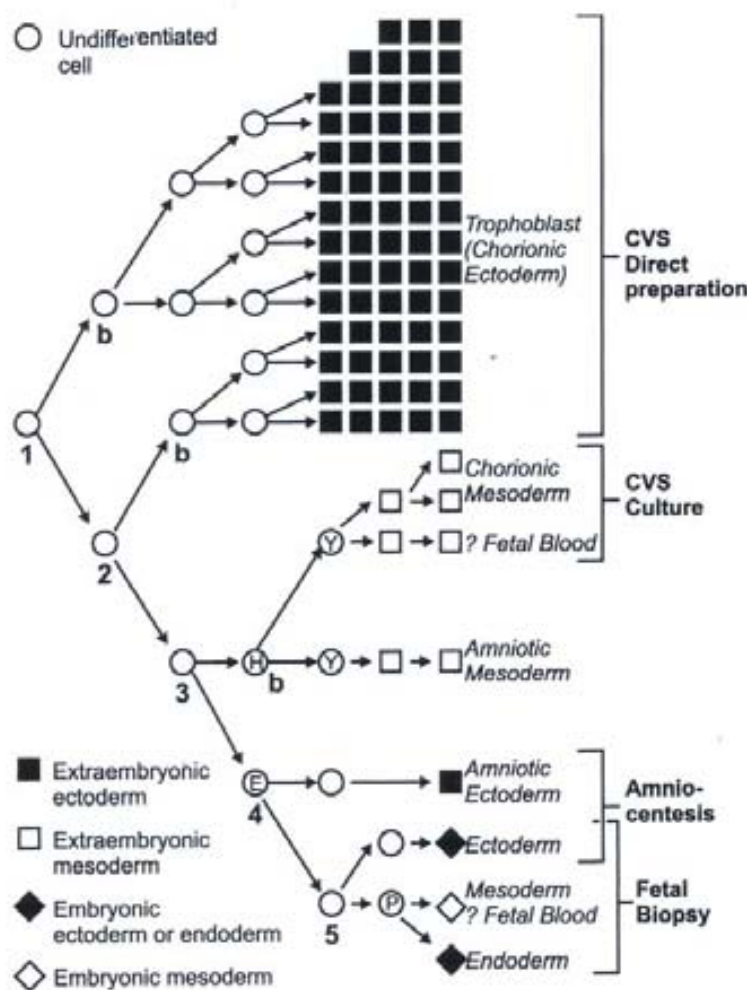


Figure 25-3. Diagram of cell lineages arising from differentiation in the very early conceptus. The fertilized egg (1) produces a trophoblast precursor (1b) and a totipotent stem cell (2) which in turn forms another trophoblast precursor (2b) and a stem cell (3) that produces the inner cell mass. The inner cell mass divides into stem cells for hypoblast (3b) and epiblast (4). The epiblast cell(s) (5) produce embryonic ectoderm and primitive streak, and the latter is the source of embryonic mesoderm and endoderm. The cell lineages sampled at various prenatal diagnostic procedures are indicated at right. E, epiblast; H, hypoblast; P, primitive streak; Y, yolk sac. (From Bianchi, D. W., Wilkins-Haug, L. E., Enders, A. C. and Hay, E. D. (1993), Origin of extra-embryonic mesoderm in experimental animals: relevance to chorionic mosaicism in humans. *Am. J. Med. Genet.* 46, 542-550, © 1993 Am. J. Med. Genet., courtesy D. W. Bianchi, and with the permission of Wiley-Liss, Inc., a subsidiary of John Wiley & Sons, Inc.) This construction is to be compared with that of Kennerknecht et al. (1993b), in which three postzygotic mitoses occur, before the cells begin to take on their tissue identities. Robinson et al. (2002) propose a further variation, with some cells of the embryonic mesoderm migrating into the (otherwise extraembryonic) mesodermal layer of the amnion.

Fig. 1.12: Diagrama de la distribució i desenvolupament de les línies cel·lulars des de l'inici de la fecundació (Gardner *et al.*, 2012).

1.3.2.4 Mosaic confinat a la placenta

La tècnica de cultiu curt és idònia pel primer trimestre de gestació, quan l'índex mitòtic de les cèl·lules del citotrofoblast és més alt. Es pot pensar que els MCP

només són presents al llarg del primer trimestre, però no és així: són presents al llarg de tota la gestació i poden observar-se en diferents estadis gestacionals. Tant és així que Kalousek *et al.* (2000) recomana guardar les placentes a terme, ja que són un registre històric de la gestació.

1.3.2.4.1 Incidència dels mosaics confinats a la placenta

La incidència dels MCP publicats oscil·len entre un 0,6 % (Wolstenholme *et al.*, 1996) a un 2,29 % (Van den Berg *et al.*, 2000). (Taula 1.8)

Taula 1.8: Incidència dels mosaics confinats a la placenta en vellositats per a estudis prenatals.

Autor i any de publicació	CURT	LLARG	n.	%
Pittalis <i>et al.</i> (1994)	sí	sí	4.860	1,3
Wang <i>et al.</i> (1994)	sí	sí	4.000	2,2
Wolstenholme <i>et al.</i> (1994)	sí	sí	11.755	0,6
Kalousek <i>et al.</i> (1996)	sí	sí	2.612	1,9
Hahnemann <i>et al.</i> (1997b)	sí	sí	92.246	1,3
Los <i>et al.</i> (1998a)	sí	sí	3.492	1,9
Farra <i>et al.</i> (2000)	sí	LA*	2.985	0,8
Van den Berg <i>et al.</i> (2000)	sí	sí	1.838	2,3
Brun <i>et al.</i> (2003)	sí	sí	10.741	0,9
Stetten <i>et al.</i> (2004)	sí	sí	4.000	0,8
Grati <i>et al.</i> (2006)	sí	sí	15.109	1,5

LA: Estudi citogenètic de líquid amniòtic.

En totes les mostres de les sèries consultades s'havia fet el cultiu curt i el cultiu llarg en paral·lel. Només en la sèrie de Farra *et al.* (2000) es va substituir el cultiu llarg per l'estudi cromosòmic de líquid amniòtic.

1.3.2.4.2 Anomalies cromosòmiques dels mosaics confinats a la placenta

A la Taula 1.9 s'observa que les anomalies cromosòmiques més freqüents en MCP són les aneuploidies autosòmiques no comunes (ni trisomia 13, 18 ni 21), seguides de les aneuploidies dels cromosomes sexuals.

El treball presentat per Phillips *et al.* (1996) inclou dades de 13 sèries presentades des del 1986 fins el 1994. De les 13 sèries, unes fan només cultiu curt, altres només el llarg i altres ambdós cultius en paral·lel. Les sèries que només fan un dels dos cultius, en els casos de mosaic analitzen cèl·lules del líquid amniòtic. També hi ha la sèrie de Golberg *et al.* (1997), en què només es fa cultiu llarg de la mostra, com a referència.

En aquestes dues publicacions, i en la de Grati *et al.* (2006) la distribució de les anomalies cromosòmiques coincideix en l'ordre.(Taula 1.9)

Taula 1.9: Distribució de les anomalies cromosòmiques en mosaics prenatals confinats a la placenta.

	Phillips <i>et al.</i> , 1996		Goldberg <i>et al.</i> , 1997		Grati <i>et al.</i> , 2006	
Anomalia	n.	%	n.	%	n.	%
Total de mostres confirmades	469	100	140	100	203	100
Aneuploidies autosòmiques comunes		16,8		19,2		15,8
Aneuploidies autosòmiques no comunes		40,1		32,1		35,9
Aneuploidies cromosomes sexuals		23,2		31,7		17,8
Anomalies estructurals		7,5		9,2		15,3
Poliploidies		6		1,4		6,8
Cromosomes marcadors		6,4		6,4		5,5
Alteracions múltiples		-		-		2,9

1.3.2.4.3 Patrons de distribució en els llinatges cel·lulars dels parells cromosòmics

És interessant observar que la distribució dels cromosomes en els MCP no és a l'atzar, sinó que, tal i com comenta Wolstenholme (1996), cada parell implicat té un patró de comportament i un origen concret preferents. Així per exemple, gairebé exclusivament s'observen trisomies del parell 3 en cultius curts i, per contra, es constaten trisomies del parell 2 en cultius llargs.

Lestou *et al.* l'any 1998 publiquen un quadre (Fig. 1.13) resumint les dades de la sèrie de Ledbetter *et al.* (1992) i de la de l'EUCROMIC de Hahnemann *et al.* (1997b), mostrant quines són les tendències de cada parell de cromosomes, i Toutain *et al.* l'any 2010a, publiquen la seva experiència en 13.809 casos. Els dos treballs tenen marcadament en comú que les trisomies 2 s'observen en MCP tipus II i que les trisomies 16 s'observen MCP tipus III.

	Chromosomes																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
CPM I			■				■	■	■				■		■			■		■	■	
CPM II		■			■		■	■	■			■	■					■			■	■
CPM III							■						■		■	■		■				

Negre: indica les trisomies que s'han observat en >10 %. Gris: les que s'han observat entre un 3 % i un 10 %.

Fig. 1.13: Distribució dels cromosomes implicats en els mosaics confinats a placenta de la sèrie (Lestou *et al.*, 1998).

Per altra banda Robinson *et al.* (1995, 1997, i 1999) intenta establir un patró de comportament per a cada parell de cromosomes respecte l'origen embrionari. Així per exemple, les trisomies dels cromosomes 2, 7 i 8 poden tenir un origen mitòtic o meiòtic, les dels cromosomes 10 i 12 generalment són d'origen mitòtic i les dels cromosomes 9, 13, 15, 16, 21 i 22 són d'origen meiòtic.

1.3.2.4.4 Mosaics confinats a la placenta i disomies uniparentals

Un dels problemes que es pot generar per la presència de mosaics d'origen meiòtic són les disomies uniparentals (DUP). Es van definir per primera vegada en el treball d'Engel *et al.* (1980) i es refereixen a la presència, en un individu fill, de dos cromosomes (d'un parell determinat) del mateix progenitor. Si els dos cromosomes que s'hereten del mateix progenitor són homòlegs parlem d'heterodisomia i si són dos cromosomes idèntics parlem d'isodisomia.

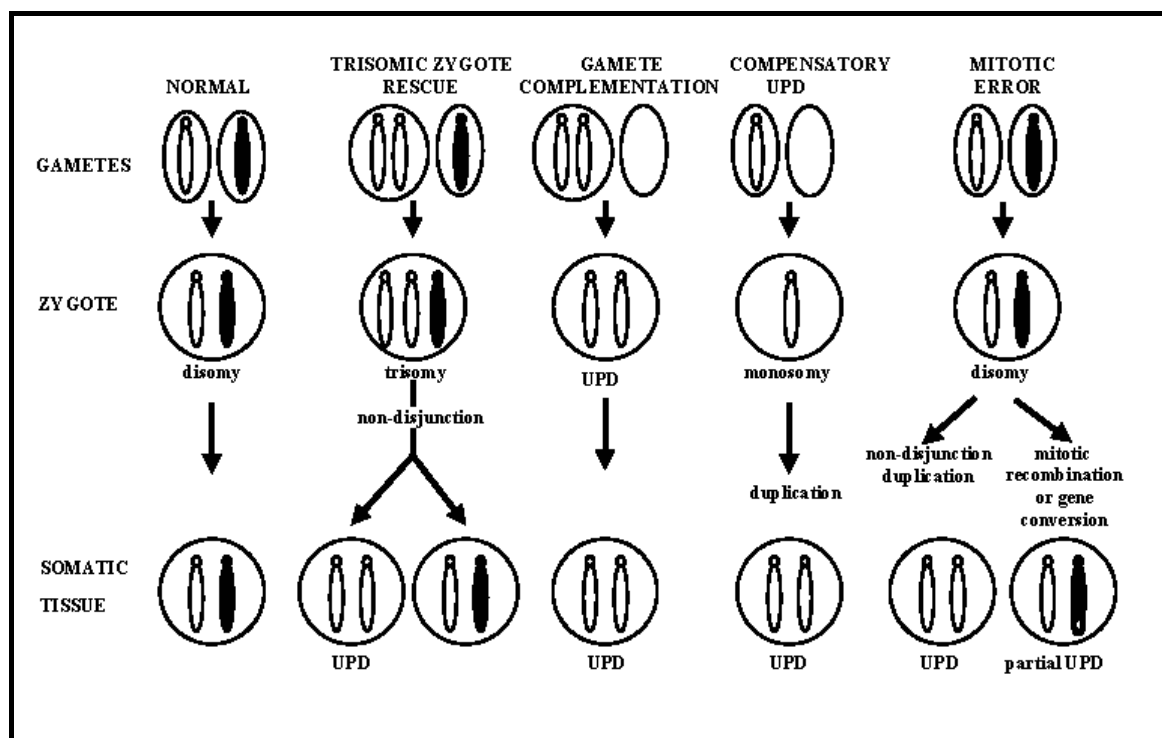


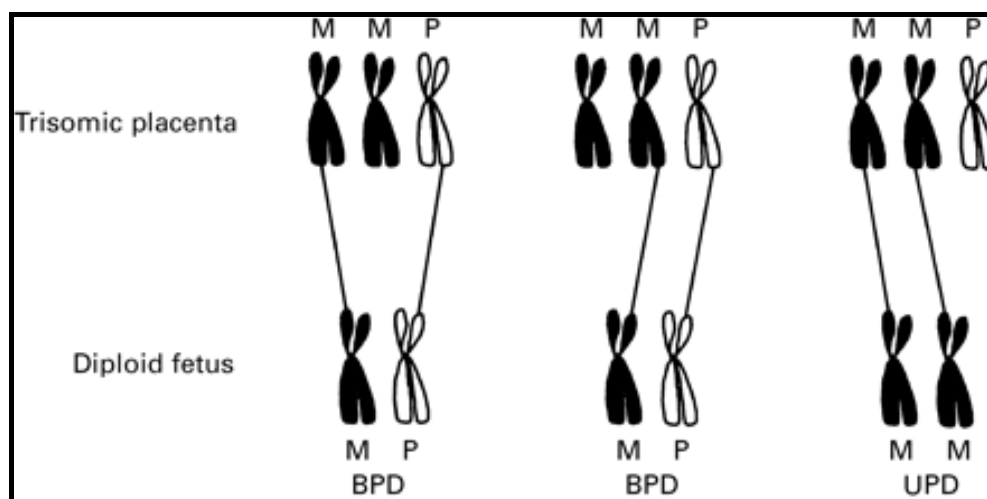
Fig. 1.14: Esquema dels mecanismes cel·lulars que poden formar disomies uniparentals.

Tal i com s'observa en la Fig.1.14, les disomies uniparentals es poden formar per diferents mecanismes:

- Per pèrdua trisòmica ("rescat trisòmic" o *trisomy rescue*). D'una cèl·lula trisòmica es perd el cromosoma que no està repetit, de manera que els dos cromosomes restants provenen del mateix progenitor. Generalment l'origen

de les trisomies és per una no-disjunció meiótica en un dels gàmetes parentals. Si l'error de segregació es produeix a meiosi I es pot generar una nova cèl·lula amb dos cromosomes homòlegs (heterodisomia) i si la no-disjunció succeeix a meiosi II llavors la nova cèl·lula tindrà dos cromosomes idèntics (isodisomia). Aquest mecanisme és el més comú en la formació de disomies. Quan es produeix, la probabilitat que les cèl·lules filles presentin disomia uniparental és un terç. (Fig. 1.15)

- Per complementació gamètica (*compensatory UPD*). Quan es fecunda un oòcit que té dues còpies d'un mateix cromosoma amb un espermatozoide que no té cap còpia del mateix parell de cromosomes o a la inversa.
- Per duplicació en monosomies ("rescat monosòmic", o *nullisomic gamet duplication*). Es duplica el cromosoma del parell monosòmic i per tant tindrem dos cromosomes que són idèntics. En aquests casos es produirà una isodisomia.



BPD: Disomia biparental; UPD: disomia uniparental

Fig. 1.15: Esquema de la segregació dels cromosomes i les disomies (Lestou *et al.*, 1998).

Tots aquests mecanismes impliquen dos errors consecutius. En el primer cas, en formar-se una trisomia que després es rescata ella mateixa; en el segon cas per la suma d'un error en l'oogènesi i un en l'espermatogènesi; i en el tercer i darrer cas, per la pèrdua d'un cromosoma i la seva posterior recuperació mitjançant la duplicació del cromosoma restant.

En gestacions trisòmiques, a causa d'un procés de correcció de l'anomalia, aquesta pot quedar localitzada només en el citotrofoblast i no en altres teixits fetals, donant lloc a mosaics confinats a la placenta amb possibles disomies uniparentals.

Segons el cromosoma que estigui implicat en la disomia, poden formar-se fetus amb defectes congènits si el cromosoma implicat té gens imprintats. També en el cas d'isodisomia pot haver-hi conseqüències fenotípiques amb la presència de gens recessius que poden manifestar-se amb un estat d'homozigosi. Per tant, les disomies uniparentals poden influir en el desenvolupament fetal tant si són per heterodisomia com per isodisomia. En els casos d'isodisomia la probabilitat de què els fills heretin gens recessius amb efectes severos o letals és molt més elevada.

La presència d'un MCP alerta d'una possible disomia uniparental, i un resultat citogenètic normal de LA no exclou que el fetus sigui efecte d'alguna DUP (Wolstenholme, 1996; Los *et al.*, 1998b; Soler *et al.*, 2008).

En els casos en què es produeix un rescat cromosòmic després d'un error de segregació d'origen meiótic hi ha un 33,3 % de possibilitats que es produeixi una *disomia uniparental*, és a dir, que el cromosoma rescatat no sigui el repetit. Per tant, tindrem una parella de cromosomes que provenen del mateix progenitor (Robinson *et al.*, 1995; Grati *et al.*, 2006). En la sèrie de Grati *et al.* (2006) d'un total de 15.109 casos estudiats de VC se'n van trobar 51 d'MCP que implicaven cromosomes subjectes a *imprinting*, en els quals van estudiar la possible disomia uniparental, que només es va confirmar en 1 cas, el qual representa l'1,96 %. Aquest baix percentatge probablement reflecteix que la majoria d'aquests MCP

eren d'origen mitòtic. Cox (2006) observa un 9,2 % de casos susceptibles de tenir una DUP, però tots aquests tenien també una herència biparental, per tant d'origen probablement mitòtic. Soler *et al.* (2008) troben 18 casos amb trisomia de cromosomes 7, 14 o 15, fan estudis de DUP i detecten un cas amb DUP 15mat. Toutain *et al.* (2010a), de sis casos d'MCP tipus II i susceptibles de DUP no en troben cap, però, entre els 13 casos d'MCP tipus III i susceptibles de DUP, observen un cas amb una isodisomia uniparental del cromosoma 15.

Els estudis realitzats de DUP posen de manifest que els casos en que s'observa disomia és quan l'origen és meiòtic, no s'ha observat cap cas amb l'origen somàtic (Robinson *et al.*, 1995).

Un dels avantatges de la realització d'ambdós cultius en paral·lel és la detecció dels mosaics confinats, els quals alerten de la possible presència d'aquestes disomies uniparentals.

Diversos autors recomanen fer un estudi de DUP en tots els casos en els quals s'observi prenatalment un mosaic o una translocació robertsoniana dels cromosomes que tenen gens imprintats amb significat clínic, com són els cromosomes 6, 7, 11, 14 i 15 (Berend *et al.*, 2000; Shaffer *et al.*, 2001; Cox, 2006; ECA, 2007). Encara que, Kotzot (2008) fent una revisió dels casos de DUP en diagnòstic prenatal, conclou que és recomanable fer estudis de DUP a nivell rutinari només en els casos en què es sospiti d'una DUP 14pat, una DUP 15mat i una DUP 15pat. Quan la disomia sigui pels cromosomes DUP 6pat i DUP 7mat, el test s'hauria de qüestionar perquè el significat clínic és incert. En els casos de DUP 11pat, DUP 14mat i DUP 16mat s'hauria de discutir cada cas. Per tots els altres cromosomes l'estudi de la disomia en l'estadi prenatal no estaria indicat.

Alguns cromosomes tenen gens imprintats involucrats en el desenvolupament i en les funcions de la placenta, els quals podrien contribuir a empitjorar les gestacions amb mosaics confinats a la placenta (Wolstenholme. *et al.*, 1994).

1.3.2.4.5 Conseqüències en el desenvolupament de la gestació dels mosaics confinats a la placenta

Clínicament, s'ha vist que els MCP estan associats a un ampli espectre de manifestacions que van des de gestacions amb desenvolupament normal fins a gestacions amb mort intrauterina. Diversos autors relacionen els MCP amb avortaments espontanis de primer trimestre, o amb pèrdues fetals de segon i tercer trimestre (Kalousek *et al.*, 1992; Wapner *et al.*, 1992; Roland *et al.*, 1994; Phillips *et al.*, 1996). D'altres, però, els relacionen amb una restricció de creixement intrauterí (Kalousek *et al.*, 1983, 1991 i 1996; Lestou *et al.*, 1998 i 2006; Stipolgev *et al.*, 2001; Grati *et al.*, 2005; Wilkings-Haug *et al.*, 2006; Robinson *et al.*, 2010), amb malformacions congènites (Los *et al.*, 1998b), o només amb variacions del pes en el naixement (Wolstenholme *et al.*, 1994; Leschot *et al.*, 1996; Yong *et al.*, 2009), o simplement amb una petita restricció del desenvolupament perinatal (Amor *et al.*, 2006; Miura *et al.*, 2006).

Els efectes clínics que tenen els mosaics confinats a la placenta depenen del tipus de mosaic i, per tant, de la distribució en els llinatges cel·lulars, també de l'origen embrionari, mitòtic o meiòtic, del percentatge de cèl·lules patològiques respecte de les normals, així com del parell de cromosomes que hi participa. Tots aquests factors interactuen a la vegada fent que el consell genètic sigui complex.

Segons Lestou *et al.* (1998) i Toutain *et al.* (2010a), es pot establir una petita relació entre el tipus de mosaic confinat a la placenta i les conseqüències clíniques:

- Tipus I: encara que freqüentment associats a desenvolupament fetals normals, s'han observat casos d'avortaments espontanis, restricció de creixement intrauterí, o de mort perinatal.
- Tipus II: es troben en gestacions normals i rarament estan relacionats amb restricció de creixement intrauterí o mort fetal.

- Tipus III: són els que tenen més casos relacionats amb restricció de creixement, baix pes al néixer i mort intrauterina.

Els mosaics d'origen mitòtic estan relacionats amb un baix percentatge de mosaïcisme, i com que generalment es localitzen en només un teixit (habitualment placenta), tenen menys probabilitat d'afectar el fenotip; per tant, s'espera que seran MCP tipus I o II. Podrien estar en més d'un teixit si la seva formació fos molt aviat (Robinson *et al.*, 1999). D'aquests tipus hi ha pocs casos descrits d'origen meiòtic.

Generalment els MCP d'origen meiòtic tenen més mal pronòstic que els d'origen mitòtic (Robinson *et al.*, 1995, 1997, 1999, 2010; Hahnemann i Vejerslev, 1997b; Miura *et al.*, 2006; Gardner *et al.*, 2012). Majoritàriament, dels errors meiòtics sorgeixen alts percentatges de mosaïcisme, i en funció del moment del desenvolupament embrionari en què es produeixi el "rescat" trisòmic, el mosaic pot estar present en més o menys teixits fetals. Per exemple, pot ser un mosaic generalitzat que afecti tant la placenta com l'embrió, com un mosaic confinat només a la placenta o només al fetus. L'efecte clínic d'aquests mosaics depèn, principalment, del moment gestacional en què s'ha produït el rescat i per tant dels llinatges cel·lulars que afecta. Ara bé, també pot estar lligat als possibles casos de disomia uniparental, en el supòsit que en el cromosoma hi hagi gens imprintats o gens recessius.

L'origen mitòtic o meiòtic de la trisomia i les conseqüències clíniques que hi estan relacionades també estan relacionades al parell de cromosomes implicats. Com ja s'ha comentat anteriorment hi ha un patró de comportament per a cada parell de cromosomes.

Algunes trisomies presenten diferències d'origen embrionari segons la mostra que s'analitza. El cas més clar és la trisomia 8, la qual s'observa que és somàtica en

mostres prenatales però que generalment és meiòtica en mostres d'avortaments (Robinson *et al.*, 1999).

Generalment, en els estudis prenatales només s'obté una mostra d'una única punció, i per tant, d'una única zona del còrion. Quan s'observa un elevat percentatge de la línia anòmala, seria lògic pensar que pot estar relacionat amb un origen meiòtic de l'error, i per tant, que es troba en tota la placenta en igual percentatge. Però no sempre és així, atès que la mostra prové d'una única zona.

Pot succeir que hi hagi un efecte de la distribució geogràfica del mosaic, de manera que es produeixi una no-disjunció tardana i que es localitzi la línia anòmala només en una zona concreta del còrion; pot ser que el mosaic sigui un pseudomosaic; o també pot ser que hi hagi presència de bessons reabsorbits, de manera que, si només s'extreu una mostra, aquesta pot provenir de la zona on es localitza el bessó mort que es reabsorbeix, i això alterarà el resultat de l'anàlisi (Wolstenholme *et al.*, 1994).

Per aquesta raó, és recomanable, en tots els casos en què s'ha observat un MCP, fer un seguiment de l'anomalia, analitzant mostres de diverses zones de la placenta postnatal (Kalousek *et al.*, 2000).

Ara bé, recentment, altres autors han observat que, amb els casos en què els marcadors ecogràfics ens fan sospitar de la presència d'una aneuploïdia fetal en un MCP, serà necessari fer més estudis per cercar-la, ja que els mosaics residuals de menys del 10 % també poden ser la causa dels efectes fenotípics adversos (Daniel *et al.*, 2004). Grati *et al.* (2005), després d'estudiar 12 gestacions amb restricció de creixement intrauterí, observen la presència de mosaïcisme residual a tres gestacions. En tots els casos, els estudis citogenètics de les mostres són normals. Detecten el mosaïcisme residual per tècniques de FISH i QF-PCR de l'ordre del 4,5 % al 9,2 % pels cromosomes 2, 7 i 14.

1.3.3 Mosaics rars: bessons reabsorbits, translocacions múltiples simultànies

En algunes ocasions un cariotip en mosaic no s'explica per un mosaic confinat o un mosaic generalitzat, sinó que respon a fenòmens naturals que es produeixen molt rarament. Alguns d'aquests fenòmens són les quimeres, els bessons reabsorbits i les translocacions múltiples simultànies (*jumping translocation*).

1.3.3.1 Quimera

Una *quimera* es defineix com la presència de dues línies cel·lulars que provenen de dos embrions diferents. Les quimeres més freqüents es produeixen per una transfusió fetofetal (síndrome de transfusió fetofetal) en una gestació múltiple monocorial, acostumen a afectar només el teixit sanguini i generalment es detecten per casualitat en individus normals. En altres casos la quimera es forma, presumiblement, per una fusió de dos embrions. Els efectes fenotípics que poden tenir les quimeres depenen de la constitució genètica, de la distribució i de la freqüència de les diverses línies cel·lulars (Plaja, 2006). Les quimeres són un fenomen rar en els humans.

1.3.3.2 Bessons reabsorbits o *vanishing twin*

Quan en una gestació múltiple un dels bessons mor en les primeres etapes de la gestació, queda retingut i adherit a la bossa amniòtica. Serà un *bessó reabsorbit*. En aquests casos es pot produir una barreja de les dues línies cel·lulars, fet que es detecta com un mosaic en els estudis citogenètics prenatals, encara que ecogràficament “només” s'observarà un sol embrió amb una sola bossa i una única placenta, quan en realitat es tracta d'una placenta bicorial fusionada (Tharapel *et al.*, 1989).

Tal i com comenten Wolstenholme *et al.* (1994), atès que només es fa la biòpsia coriònica d'una zona concreta de la placenta, si aquesta es fa sobre el bessó

reabsorbit pot generar un resultat cromosòmic en mosaic i emascarar el cariotip fetal real.

Altres autors, com Kalousek (2000) creuen que també pot originar-se el mecanisme de bessons reabsorbits quan es genera una nova línia cel·lular a partir d'un embrió diploide per mitjà de l'aïllament les cèl·lules anòmales de les normals en la massa cel·lular interna del blastocist.

Els casos en què s'observa un mosaic citogenètic amb una divergència dels cromosomes sexuals només poden explicar-se per aquest mecanisme.

1.3.3.3 Translocacions múltiples simultànies o *jumping translocation*

Les *translocacions múltiples simultànies* es defineixen com alteracions cromosòmiques on hi ha un cromosoma donador i múltiples cromosomes receptors. Va ser descrit per primer cop per Lejeune *et al.*, l'any 1979.

Inicialment es van descriure en síndromes constitucionals, però la majoria de casos publicats es refereixen a malalties hematològiques en les quals la presència d'aquestes translocacions agreuja el pronòstic (Aslan *et al.*, 2005). En vellositats coriòniques poden observar-se diverses alteracions en els diferents llinatges cel·lulars (Edwards *et al.*, 2008).

Els punts de ruptura del cromosoma receptor habitualment són zones riques en DNA repetitiu (punts fràgils comuns), com ara les regions telomèriques, subtelomèriques i les regions NORs, mentre que en el cromosoma donador els punts de ruptura se situen sobretot en les regions centromèriques i pericentromèriques (Levy *et al.*, 2000; Annable *et al.*, 2006; Edwards *et al.*, 2008; Reddy, 2010).

Edwards *et al.* (2008), revisant casos de translocacions múltiples simultànies en cromosomes no-acrocèntrics, van observar que el cromosoma 18 és el més freqüentment implicat.

1.3.4 Falsos cariotips en mosaic: limitacions tècniques, artefactes de cultiu i contaminacions maternes

Altres orígens que poden tenir els cariotips en mosaic són per limitacions tècniques, per artefactes dels cultius o per contaminacions maternes.

Una limitació tècnica del cultiu curt és la llargària reduïda dels cromosomes que s'obtenen, que generalment és d'unes 150 bjh (bandes per joc haploid) i que no permet observar algunes alteracions cromosòmiques que poden ser detectades posteriorment en el cultiu llarg. Obtindrem un resultat citogenètic fetal en mosaic per limitació tècnica.

D'altra banda, en els cultius cel·lulars de vegades es produeixen artefactes de cultiu que poden generar resultats citogenètics en mosaic, i que donarien lloc a cariotips falsos en mosaic. Així doncs, en el cultiu llarg de les vellositats poden generar-se noves línies cel·lulars a causa del cultiu *in vitro* (pseudomosaics). El creixement *in vitro* d'una colònia amb una anomalia cromosòmica sobrevinguda en el cultiu llarg pot ser l'origen d'un fals mosaic. Els cultius llargs tenen una certa tendència a donar lloc a variacions cromosòmiques, sobretot quan són lents (Wolstenholme *et al.*, 1994). Per aquesta raó, en la Guia de Protocols i Qualitat de l'*European Cytogenetics Association* (ECA, 2012) se suggereix de realitzar dos cultius llargs en paral·lel i així poder discernir entre un mosaic d'origen *in vivo* i un d'origen *in vitro*.

Un altre origen de cariotip en mosaic són les contaminacions maternes. Abans de dividir la mostra per fer el cultiu curt i el cultiu llarg, es fa una separació acurada de les restes de teixit matern i d'altres restes de teixit que no siguin vellositats.

En el cas del cultiu curt el risc que creixin cèl·lules maternes és pràcticament inexistent, ja que el temps de cultiu és molt curt i les cèl·lules maternes no tenen prou temps per dividir-se. El fet que no hi pugui haver contaminació amb cèl·lules maternes és, precisament, un dels avantatges d'aquest tipus de cultiu (Griffin *et al.*, 2007).

Per contra, en el cultiu llarg sí que existeix risc de contaminació amb cèl·lules maternes, perquè aquestes poden créixer barrejades amb les cèl·lules fetals durant el cultiu primari.

La presència de cèl·lules maternes només pot detectar-se en els casos en què hi hagi una divergència de cromosomes sexuals. Quan el fetus es femení, si en el cultiu llarg s'observa un mosaic amb una de les línies 46,XX, no és possible saber si és un mosaic real o una contaminació materna si no s'apliquen estudis moleculars.

Gràcies a l'experiència adquirida, avui en dia, el risc de contaminació materna en cultiu llarg és pràcticament inexistent. Així i tot, no és nul. En la Taula 1.10 es descriuen els percentatges que hem trobat en les sèries consultades.

Taula 1.10: Percentatge de contaminació materna en cultiu llarg en les diferents sèries consultades de vellositats per estudis prenatals

Tutors i anys de publicació	TIPUS DE CULTIU	n.	%
Ledbetter <i>et al.</i> , 1992	ambdós	11.473	1,8
ACC, 1994	ambdós	7.595	0,5
Van den Berg <i>et al.</i> , 2000	llarg	1.838	0,4
Sikkema–Raddatz <i>et al.</i> , 2000	llarg	1.958	3,6
Brun <i>et al.</i> , 2003	ambdós	10.741	3/0,91*

*selecció macroscòpica de 1990 a 1995 / selecció microscòpica de 1996 a 1999.

En el treball de Sikkema-Raddatz *et al.* (2000), amb un percentatge més elevat, els mateixos autors reconeixen que el seu valor sobresurt dels valors esperats, però no hi saben donar cap raó; i en el de Brun *et al.* (2003) aconseguixen fer baixar el percentatge de contaminació materna, modificant la tècnica de selecció de la mostra pel cultiu cel·lular.

1.3.5 Concepte de discrepàncies fetoplacentàries

El terme *discrepàncies fetoplacentàries* es refereix de manera general a tots els casos en els quals hi ha diferències entre el cariotip del fetus i el dels teixits placentaris, però Hahnemann (1997a) l'aplica només en els casos concrets en els quals el cariotip placentari, tant si és anòmal com normal, es troba en línia pura. Segons aquesta autora, les discrepàncies fetoplacentàries en “no mosaic” es donarien en aquestes situacions:

- a) Anomalia cromosòmica en línia pura en teixit placentari i un cariotip diferent (en mosaic o bé diploide normal) en cèl·lules del líquid amniòtic, del fetus o del nounat.
- b) Cariotip normal diploide en teixit placentari i un cariotip diferent (en mosaic o no) en cèl·lules del líquid amniòtic, del fetus o del nounat.

Però cal diferenciar clarament les *discrepàncies fetoplacentàries* dels cariotips en mosaics generalitzats o mosaics confinats. En la Taula 1.11 es detallen tots els possibles cariotips de les vellositats i el fetus i se'n descriuen les dues situacions segons Hahnemann *et al.*, 1997a.

Taula 1.11: Definició dels cariotips de les vellositats en mosaic o discrepàncies fetoplacentàries segons els resultats citogenètics de les vellositats i del fetus (Hahnemann *et al.*, 1997a)

CARIOTIP DE LES VELLOSITATS		CARIOTIP* FETAL	Definició del cariotip de les vellositats
CULTIU CURT	CULTIU LLARG	mosaic, línia pura o normal	mosaic (generalitzat o confinat)
mosaic	mosaic		
mosaic	línia pura		
mosaic	normal		
mosaic	sense resultat		
línia pura	mosaic		
normal	mosaic		
sense resultat	mosaic		
línia pura	línia pura anomalia diferent		
línia pura	normal		
normal	línia pura		
línia pura	línia pura	mosaic o normal	discrepàncies fetoplacentàries (no mosaic)
línia pura	sense resultat		
sense resultat	línia pura		
normal	normal	mosaic o línia pura	
normal	sense resultat		
sense resultat	normal		

* teixits embrionaris: cèl·lules del líquid amniòtic, sang fetal o restes fetals d'avortaments

Altres autors (Farra *et al.*, 2000) consideren les discrepàncies fetoplacentàries com discrepàncies entre el cariotip placentari i el cariotip fetal, encara que aquests cariotips poden ser en mosaic o en línia pura.

El concepte *discrepàncies fetoplacentàries* és per tant ambigu i està poc definit: cada autor l'adapta al seu treball.

1.3.6 Diagnòstic fals positiu i fals negatiu

Quan una alteració cromosòmica (en línia pura o en mosaic), s'ha observat en els teixits extraembrionaris però no en el fetus, es diu que el resultat citogenètic de les vellositats coriòniques és un diagnòstic potencialment *fals positiu*. Contràriament, si el cariotip del fetus és anòmal i el de les VC és normal (en tots dos cultius) es considera un diagnòstic potencialment *fals negatiu*.

Si el cariotip anòmal observat en els teixits placentaris no té un estudi citogenètic de seguiment del fetus, i el fenotip del nounat és normal, també es considera un fals positiu de VC; i si el nounat té un fenotip anòmal o malformacions congènites i únicament es disposa del cariotip d'un dels dos cultius placentaris, es considera no classificable o indeterminat (Hahnemann *et al.*, 1997a).

Pel fet d'emprar les dues tècniques de cultiu podem tenir diagnòstics falsos positius i negatius per cada una de les tècniques, i per ambdues tècniques conjuntament.

En els casos en què manca un dels dos cultius de les VC, si el cariotip estudiat és anòmal i el del fetus és normal, es considera un diagnòstic *fals positiu* per aquell cultiu, i si el cariotip d'un dels cultius és normal i el del fetus és anòmal es considera un diagnòstic *fals negatiu* pel cultiu emprat (Van den Berg *et al.*, 2006).

Diverses són les causes que originen diagnòstics falsos com els mosaics confinats, els rars i els mosaics falsos. N'hi ha altres que a causa de la seva raresa són molt poc freqüents, però prou importants perquè les tinguem en compte quan observem

resultats no coincidents entre el cariotip extraembrionari i el fetal. Algunes de les que hem observat publicades són:

- Doble punció d'un mateix bessó en gestacions múltiples (Poddighe *et al.*, 2005; Van den Berg *et al.*, 2006).
- Mosaic de baix percentatge o distribució de les línies cel·lulars no a l'atzar entre els compartiments fetals (Daniel *et al.*, 2004).
- No-disjunció postzigòtica o formació d'un isocromosoma d'origen postzigòtic de les cèl·lules de la massa cel·lular interna durant l'embriogènesi (Riegel i Schinzel, 2005).
- Situació en mosaic que no es detecta perquè no hi ha ben distribuïdes les dues línies i per atzar no s'ha agafat la mostra on es trobava la línia discordant o per un baix índex mitòtic de les vellositats (Van den Berg *et al.*, 2006).

En la Taula 1.12 s'observa el percentatge de falsos positius i falsos negatius de diverses series consultades, pel cultiu curt, pel cultiu llarg i per ambdós cultius.

Taula 1.12: Percentatge de diagnòstics potencialment fals positiu i fals negatiu en treballs consultats

	FALS POSITIU	FALS NEGATIU
Tècnica de cultiu, autors i any de publicació	%	%
<i>Cultiu curt</i>		
*Simoni <i>et al.</i> , 1983	0,1	0,01
*Ledbetter <i>et al.</i> , 1992	0,2	0,12
Pittallis <i>et al.</i> , 1994	0,8	0,08
#*Hahnemann <i>et al.</i> , 1997b	0,15	0,03
Kennerknecht <i>et al.</i> , 1998		0,0001
Farra <i>et al.</i> , 2000	0,8	0,06
#Grati <i>et al.</i> , 2006	0,5	0,07
Van den Berg <i>et al.</i> , 2006	-	0,4
Toutain <i>et al.</i> , 2010b	0,1	3 (0,03) \$
<i>Cultiu llarg</i>		
Ledbetter <i>et al.</i> , 1992	0,06	0
Pittallis <i>et al.</i> , 1994	0,31	0
#*Hahnemann <i>et al.</i> , 1997b	0,05	0
#Grati <i>et al.</i> , 2006	0,5	0,01
<i>Ambdós cultius</i>		
Pittallis <i>et al.</i> , 1994	0,16	0,02
#*Hahnemann <i>et al.</i> , 1997b	0,03	-
Kennerknecht <i>et al.</i> , 1998		0,0003
Brun <i>et al.</i> , 2003	0,03	0
#Grati <i>et al.</i> , 2006	0,09	-
Van den Berg <i>et al.</i> , 2006	0	0,08

* Inclosos en l'article de Kennerknecht *et al.*, 1998.

Valors calculats a partir dels resultats.

\$ Indicació marcador o defectes ecogràfics (altres indicacions).

És important observar que només el treball de Grati *et al.* (2006) descriu casos falsos negatius del cultiu llarg, i que hi ha només dos treballs que observen falsos negatius d'ambdós cultius.

1.4 ESTUDIS CITOGENÈTIS EN VELLOSTATS CORIÒNIQUES D'AVORTAMENTS

De tots els embarassos reconeguts, al voltant d'un 10 %-15 % acaben en avortament espontani, sobretot cap al final del primer trimestre. L'etiologia dels avortaments és diversa (factors endocrins, infeccions, factors immunològics), però la causa genètica i concretament les anomalies citogenètiques, en són una de les més importants amb una incidència que va més enllà del 50 % (Gardner *et al.*, 2012).

L'estudi citogenètic dels avortaments no només proporciona dades rellevants de cara al consell genètic sinó que ofereix la possibilitat d'analitzar la incidència, mecanismes de transmissió, tipus i efectes de les anomalies cromosòmiques (Silvestre, 1991).

Conèixer la causa de l'avortament redueix significativament l'angoixa en la parella i el sentiment de culpabilitat de l'embarassada després de patir la pèrdua. A més, permet realitzar un consell genètic acurat de cara a possibles noves gestacions, veure fins a quin punt hi ha una recurrència i si els progenitors són portadors d'alguna anomalia cromosòmica (Warburton *et al.*, 1987; Silvestre, 1991; Ribas, 2002).

Tan aviat com va ser possible obtenir un cariotip humà, es va descriure la primera anomalia cromosòmica en un avortament espontani (Penrose *et al.*, 1961). Posteriorment, als anys 60, Carr (1967) va realitzar els primers estudis cromosòmics

amb avortaments i va demostrar que les anomalies cromosòmiques poden ser la causa d'un alt percentatge dels avortaments espontanis.

Un bon mètode per estudiar les anomalies cromosòmiques en avortaments és emprar les vellositats coriòniques com a mostra fetal (Hassold *et al.*, 1980; Warburton *et al.*, 1987; Eiben *et al.*, 1990).

En els protocols descrits per Silvestre (1991) i Diego-Álvarez (2008), s'aconsella escollir les vellositats gràcies a la seva diferenciació morfològica, i al fet que paral·lelament permeten detectar els mosaics confinats a la placenta. Altres autors suggereixen analitzar mostres d'amni o del sac coriònic per tal de prevenir possibles contaminacions maternes, o també emprar altres tècniques diagnòstiques com la hibridació genòmica comparada (CGH), FISH o Arrays per no estan sotmeses a les limitacions dels cultius cel·lulars.

1.4.1 Tècniques de cultiu en mostres d'avortaments

Per tal d'estudiar d'una manera completa els avortaments, conjuntament amb els cultius curt i llarg de les vellositats coriòniques, s'analitza una mostra d'altres teixits fetals, de manera que, si observem un resultat citogenètic en mosaic, el resultat del tercer cultiu permet discernir si es tracta d'un mosaic generalitzat o bé d'un mosaic confinat.

Tal i com s'observarà més endavant a l'apartat de Material i Mètodes, les tècniques de cultiu utilitzades en aquestes mostres que provenen d'avortaments són idèntiques a les emprades en les mostres prenatales. L'única tècnica no emprada en el diagnòstic prenatal és l'estudi de les restes fetals.

El percentatge de no-creixement pels tres cultius només l'hem trobat en una sèrie, la de Khare *et al.* (2005).

Segons Hassold *et al.* (1980) el percentatge de no creixement varia per cada teixit emprat. En un estudi de 1.880 mostres observen un 10,7 % en general, un 11,3 %

en restes del fetus, un 7,5 % en cordó, i un 8,5 % en mostres de còrion (curt i llarg) i d'amni.

En les sèries recollides el percentatge del cultiu curt oscil·la entre el 8,6 % al 24% i el del cultiu llarg entre un 0 % i un 25 %. (Taula 1.13)

Els treballs de Sánchez *et al.* (1999), Ribas *et al.*, (2002), Khare *et al.* (2005), i Morales *et al.*, (2007) són a partir de mostres de VC obtingudes abans de l'expulsió.

Taula 1.13: Percentatge de no-creixement dels cultius en sèries d'avortaments

		TIPUS DE CULTIU		
		CURT	LLARG	RESTES FETALS
Autors i any de publicació	n.	%	%	%
Griffin <i>et al.</i> , 1997	691	24	18	-
Sánchez <i>et al.</i> , 1999	93	8,6	-	-
Ribas, 2002	139	12,3	24	-
Nagaishi <i>et al.</i> , 2004	423	-	14,7	-
Karaoguz <i>et al.</i> , 2005	134	-	6,7	-
Khare <i>et al.</i> , 2005	126	10	0	86,5
Morales <i>et al.</i> , 2007	116	11,2	-	-
Diego-Álvarez <i>et al.</i> , 2008	216	-	25	-

1.4.2 Anomalies cromosòmiques en vellositats coriòniques d'avortaments

Hassold *et al.* (1980) observen que el percentatge d'anomalies cromosòmiques disminueix amb mostres de formació més tardana. Així, en les restes del fetus (de formació més tardana), el percentatge d'anomalies és del 30 %, i en mostres de cordó, amni i vellositats (de formació més primària) és al voltant del 50 %.

En la mateixa línia, Eiben *et al.* (1990) van observar com el percentatge d'anomalies cromosòmiques en les diferents edats gestacionals dels avortaments espontanis va disminuint sobretot a partir de la 12a setmana. Així entre la 5a i la 7a setmana de gestació el percentatge és del 50 %; entre la 8a i la 9a és del 51,4 %; entre la 10a i la 11a, del 56 %; entre la 12a i la 13a setmana, del 50 %; entre la 14a i la 15a, es passa al 38,2 %; i en gestacions de més de 16 setmanes, al 22,9 %. Per tant, la majoria de les anomalies es detecten durant el primer trimestre de gestació.

Tal i com s'observa en la Taula 1.14, el percentatge d'anomalies cromosòmiques en avortaments oscil·la entre un 40% i un 80%, segons els treballs consultats.

Taula 1.14: Percentatge de les mostres amb alteracions cromosòmiques en vellositats d'avortaments dels treballs consultats, amb el període gestacional i les tècniques d'estudi emprades.

Autors i any de publicació	n.	TRIMESTRES	TÈCNIQUES D'ESTUDI	%
Eiben <i>et al.</i> , 1990	750	1r i 2n	cultiu curt	68
Warburton <i>et al.</i> , 1991	3.300	1r i 2n	ambdós	40
Sánchez <i>et al.</i> , 1999	93	1r	cultiu curt	62,3
Yusuf <i>et al.</i> , 2001	1.587	1r, 2n i 3r	cultiu llarg	43,5
Ribas, 2002	138	1r	ambdós	67,2
Nagaishi <i>et al.</i> , 2004	423	-	cultiu llarg	56,5
Morales <i>et al.</i> , 2007	116	1er	cultiu curt	80

Les anomalies cromosòmiques numèriques són les anomalies que s'observen amb més freqüència. Les aneuploidies no comunes són les anomalies cromosòmiques predominants, seguides per les poliploidies, les aneuploidies comunes i les dels

cromosomes sexuals, després els mosaics, i en darrer lloc les anomalies estructurals, i els casos de més d'una anomalia (Eiben *et al.*, 1990; Warburton *et al.*, 1991; Nagaishi *et al.*, 2004; Morales *et al.*, 2007), encara que en la sèrie de Morales *et al.* (2007) el percentatge de dobles anomalies és rellevant. (Taula 1.15)

Les trisomies més freqüents són les dels cromosomes 13, 15, 16, 18, 21 i 22. La resta de trisomies es presenta en percentatges molt menors, i no s'ha observat fins ara cap cas de trisomia del cromosoma 1, 11 i 19 en línia pura (Warburton *et al.*, 1991; Nagaishi *et al.*, 2004).

Taula 1.15: Freqüència de les alteracions cromosòmiques en vellositats procedents d'avortaments

	Eiben <i>et al.</i> , 1991		Warburton <i>et al.</i> , 1991		Nagaishi <i>et al.</i> , 2004		Morales <i>et al.</i> , 2007	
	n.	%	n.	%	n.	%	n.	%
TOTAL	380	100	1.312	100	196	100	85	100
Aneuploidies autosòmiques comunes		14,7		3		17,8		21,1
Aneuploidies autosòmiques no comunes		45,6		46,2		40,8		40
Aneuploidies cromosomes sexuals		10,6		17,5		12		9,5
Anomalies estructurals equilibrades		0		0,8		0		1,2
Anomalies estructurals desequilibrades		4,7		3,2		5,7		4,8
Poliploidies		21,6		21		16,4		11,7
Alteracions múltiples		2,8		2,6		4,7		11,7
Mosaic		_*		5,7		2,6		0

* Eiben *et al.* (1991) no diferencien les anomalies en línia pura o en mosaic.

Les anomalies cromosòmiques afecten al desenvolupament gestacional de diverses maneres. La monosomia (excepte la del cromosoma X) o els mosaics amb un percentatge de cèl·lules anòmales més alt són probablement letals abans que la mòrula es converteixi en blastocist. Així mateix, algunes trisomies són altament letals, com la trisomia 1 (Vicic *et al.*, 2008), la qual podria existir en petites

proporcions en embrions preimplantacionals, o la trisomia 17, amb una incidència del 12 % en embrions de 3 dies però només del 0,2 % en avortaments espontanis (Gardner *et al.*, 2012).

Les altres trisomies observades en l'estadi de blastocist són similars a les observades en avortaments de primer trimestre, que és quan es produeix un major efecte de la selecció. Així, les trisomies dels cromosomes 7, 8, 14, 15, 16 i 22 generalment s'avorten al llarg del primer trimestre, mentre que les trisomies dels cromosomes 4, 13 i 21 ho fan al llarg del segon trimestre. La trisomia del cromosoma 18 s'observa generalment entre l'11a i la 18a setmanes de gestació (Gardner *et al.*, 2012).

En avortaments tardans, més enllà de la 18a setmana, és freqüent trobar trisomies dels cromosomes 9, 13, 18, 21, monosomia del cromosoma X i triploidies, anomalies que serien més viables (Hassold *et al.*, 1980; Nagaishi *et al.*, 2004). Warburton *et al.* (1991) conclouen, però, que la relació entre l'anomalia i la setmana de l'expulsió de la gestació no està del tot clara, ja que pot succeir que, estant la gestació aturada, l'avortament quedi retingut i s'expulsi més tard (avortament diferit).

1.5 MOSAICISMES EN VELLOSITATS CORIÒNIQUES D'AVORTAMENTS

El percentatge de mosaïcisme en avortaments varia enormement en la literatura científica revisada: per exemple un 0 % (Be *et al.* (1997), Ljunger *et al.* (2005) i Morales *et al.* (2007)), un 2,6 % (Nagaishi *et al.*, 2004), un 5,7 % (Warburton *et al.*, 1991), un 14,3 % (Dejmek *et al.*, 1992), o fins a un 48,3 % (Vorsanova *et al.*, 2005). En aquest cas, els valors de mosaïcisme publicats són divergents perquè les tècniques de cultiu i les tècniques diagnòstiques emprades no són les mateixes. Nagaishi *et al.* (2004) utilitza només el cultiu llarg de les vellositats, i per tant no pot detectar totes les possibles discrepàncies fetoplacentàries, mentre que Vorsanova

et al. (2005) arriba al percentatge del 48,3 % utilitzant el FISH d'onze cromosomes, també només amb cultiu llarg.

1.5.1 Mosaics generalitzats

No hem trobat cap treball que diferenciï els mosaics generalitzats dels mosaics confinats. Es tracten els mosaics en un mateix paquet si és que no els inclouen a dins de les anomalies sense diferenciar-los de les línies pures.

1.5.2 Mosaics confinats a la placenta en avortaments

En els pocs treballs publicats que hem trobat que parlen d'MCP en avortaments, els percentatges de mosaics confinats a la placenta oscil·len entre un 0 % (Eiben *et al.*, 1991), i un 22,9 % (Kalousek *et al.*, 1992). En el treball d'Eiben *et al.* (1991) el percentatge d'anomalies no té en compte que sigui en línia pura o en mosaic; ara bé, sí que especifiquen que no troben cap cas de mosaic confinat. Griffin *et al.* (1997) només fan els dos estudis de les vellositats coriòniques i per aquesta raó no classifiquen els mosaics confinats.

És només al treball de Kalousek *et al.* (1992) que es detallen els diferents tipus d'MCP. Com es pot observar en la Taula 1.16, dels 9 mosaics confinats, en 3 no tenen estudis citogenètics del tercer cultiu, per tant no es pot discernir entre MCP i MVF, i s'observa un cas de mosaic confinat al fetus, és a dir, l'anomalia només es localitza en el fetus.

Taula 1.16: Percentatge dels tipus de mosaics confinats dels treballs consultats

		MCP	MCP	MCP	MCF
		tipus I	tipus II	tipus III	
TOTAL	n.	%	%	%	%
Kalousek <i>et al.</i> , 1992	6	50	33	0	17

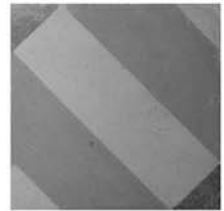
MCP: mosaic confinat a la placenta, MCF: mosaic confinat al fetus.

En la Taula 1.17 s'observa la distribució de les anomalies cromosòmiques presents en els mosaics confinats en avortaments de les series de Kalousek *et al.* (1992) i Griffin *et al.*, 1997. Observen un 63,7 % d'aneuploidies no comunes, un 27,3 % de poliploidies i un 9 % d'anomalies estructurals i que són totes desequilibrades .

Taula 1.17: Percentatge d'anomalies en els MCP i tipus d'alteració cromosòmica observada en avortaments

Anomalia	Kalousek <i>et al.</i> , 1992		Griffin <i>et al.</i> , 1997	
	n.	%	n.	%
Total	9	100	4	100
Aneuploidies autosòmiques comunes	0	0	0	0
Aneuploidies autosòmiques no comunes	6	66,7	3	75
Aneuploidies cromosomes sexuals	0	0	0	0
Anomalies estructurals	0	0	1	25
Poliploidies	3	33,3	0	0
Cromosomes marcadors	0	0	0	0
Alteracions múltiples	0	0	0	0

ÍNDEX



INTRODUCCIÓ



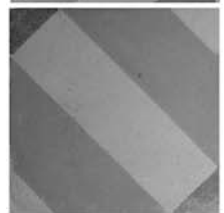
OBJECTIUS



MATERIAL I MÈTODES



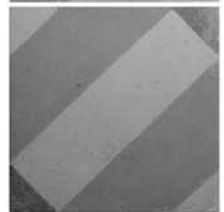
RESULTATS



DISCUSSIÓ



CONCLUSIONS



BIBLIOGRAFIA



2. OBJECTIUS

Ja fa més de 20 anys que les vellositats coriòniques s'usen en la pràctica diària de diagnòstic prenatal com a material a partir del qual podem detectar anomalies genètiques en la gestació.

En l'estudi citogenètic, es considera que s'ha observat un cariotip en mosaic quan es visualitzen dues o més línies cel·lulars. Aquests mosaics poden tenir un origen *in vitro*, generat pel propi cultiu cel·lular, o bé *in vivo*, quan l'individu estudiat té en la seva dotació genètica dues o més línies cel·lulars. La dificultat rau en distingir d'entre les diferents causes quines poden afectar el desenvolupament gestacional.

Rutinàriament, en l'estudi de les vellositats coriòniques poden utilitzar-se dos protocols, el cultiu-curt i el cultiu-llarg, cada un dels quals generarà un cariotip fetal a partir de línies cel·lulars d'origen distint. A partir de la utilització dels dos cultius en paral·lel es poden visualitzar específicament els mosaics confinats, que poden influir en el desenvolupament gestacional, i així es poden diferenciar d'altres tipus de mosaic.

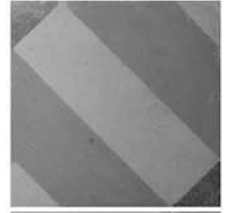
Hem centrat aquest treball en l'estudi dels cariotips en mosaic, tant de mostres prenatales, és a dir destinades al diagnòstic prenatal citogenètic, com de mostres procedents d'avortaments.

Determinar la causa d'avortament proporciona la informació necessària per establir el risc de recurrència de cara a les següents gestacions i ajuda a disminuir el grau d'angoixa de la parella. Per això, aconseguir el cariotip fetal d'un avortament és important, i les vellositats coriòniques són, en aquest cas, un bon material de partida.

Així doncs, els objectius que ens hem proposat són:

1. Comparar el rendiment de les tècniques de cultiu cel·lular curt i llarg, per a l'obtenció del cariotip fetal a partir de mostres procedents de biòpsies de còrion de gestacions en curs i d'avortaments espontanis.
2. Comparar les anomalies cromosòmiques detectades en mostres de vellositats coriòniques procedents de biòpsies de còrion per a diagnòstic prenatal amb les anomalies detectades en el grup de mostres procedents d'avortaments.
3. Analitzar les modalitats de cariotips en mosaic: els mosaics generalitzats, els mosaics confinats, els mosaics rars i els mosaics falsos, tant en les mostres prenatales com en les d'avortaments.

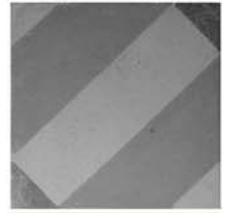
ÍNDEX



INTRODUCCIÓ



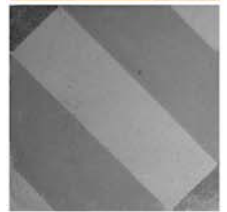
OBJECTIUS



MATERIAL I MÈTODES



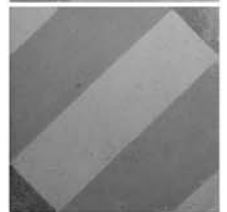
RESULTATS



DISCUSSIÓ



CONCLUSIONS



BIBLIOGRAFIA



3. MATERIAL I MÈTODES

S'ha rebut un total de 3.011 mostres de vellositats coriòniques (VC) al laboratori de Prenatal Genetics S.L. durant el període que va del gener de 1991 al desembre de 2010. Del total de les mostres rebudes, 2.460 corresponien a biòpsies de còrion per a diagnòstic prenatal obtingudes de gestacions en curs, i les 551 mostres restants corresponien a VC procedents d'avortaments.

Els estudis citogenètics s'han realitzat seguint els protocols establerts per la societat anglesa UKNEQAS (*United Kingdom National External Quality Assessment*), l'espanyola AEDP (*Asociación Española Diagnóstico Prenatal*) i l'europea ECA (*European Cytogeneticists Association*).

Consideracions prèvies i limitacions de l'estudi

En primer lloc cal aclarir que els resultats que s'analitzen en aquest treball tenen la idiosincràsia del laboratori Prenatal Genetics, és a dir, d'un laboratori privat. Per aquesta raó, en alguns casos observem que hi ha proves suplementàries, que probablement serien interessants a nivell científic però que no són imprescindibles per a un consell genètic, les quals no s'han realitzat, i que alguns dels resultats dels estudis de seguiment fets no s'han pogut contrastar amb els nostres, ja que s'han realitzat a altres laboratoris i no ha estat possible aconseguir-ne la informació.

Els resultats que s'analitzen provenen de diagnòstics citogenètics realitzats des de l'any 1991 fins al 2010. Per aquesta raó s'ha de tenir en compte que les primeres mostres del treball eren les usades en la posta a punt de les tècniques, i que dins l'estudi s'han inclòs totes les millores tècniques que s'han desenvolupant amb l'objectiu d'un guany en el rendiment tant econòmic com tècnic. És un estudi retrospectiu sense cap selecció dels casos.

Un altre fet rellevant és la diversitat dels centres de procedència de les mostres. S'han analitzat mostres provinents de centres públics, sotmesos a criteris de risc, i de centres privats en els quals la realització de la prova invasiva només depèn de la voluntat de la parella.

3.1 ESTUDIS CITOGENÈTICS DE MOSTRES DE VELLOSITATS CORIÒNIQUES PRENATALS

De les 2.460 mostres rebudes de VC per a estudis prenatals, un 4 % es va etiquetar com a *mostra inadequada*. Per tant, en total s'han cultivat 2.360 mostres.

3.1.1 Setmanes de gestació i indicació mèdica per a l'estudi prenatal

Les biòpsies de còrion per a estudis prenatals s'han extret entre les setmanes 10 i 14 de gestació però, com que en el 65 % dels casos rebuts no ens han subministrat informació de la setmana exacta de la intervenció, no presentem cap taula de distribució.

La dada *indicació mèdica* per la qual s'ha sol·licitat l'estudi prenatal ens ha estat facilitada en un 87,2 % de les mostres cultivades. En l'Annex I es fa una descripció de les indicacions. La distribució de les mostres segons la indicació mèdica es descriu en la Taula 3.1. El motiu més freqüent és l'*edat materna avançada* (36,4 %), seguida de l'*angoixa materna* (14,4 %) i dels casos amb *marcadors ecogràfics* (11,8 %).

Les causes per les quals es reben les mostres depenen de les peculiaritats de cada centre. A Catalunya, els centres adscrits al sistema de salut pública (CATSALUT) només poden fer biòpsies de còrion en les gestacions que tenen un risc elevat de tenir un fill afecte de defecte congènit. Oposadament, moltes parelles sense un risc objectiu però angoixades per aquesta possibilitat (indicació d'*angoixa materna*) se sotmeten a biòpsia de còrion en centres sanitaris privats.

Com ja hem comentat anteriorment, en el nostre cas, les mostres que presentem en aquest estudi provenen tant de centres d'extracció pública com privats. Per aquesta raó, la indicació *angoixa materna* és la segona causa de sol·licitud.

Taula 3.1. Distribució de les mostres segons la *indicació mèdica* de l'estudi citogenètic per a mostres de vellositats coriòniques

	n.	%
TOTAL de mostres rebudes	2.360	100
Edat materna avançada	864	36,6
Angoixa	339	14,4
Anomalies o Marcadors ecogràfics	279	11,8
Doble indicació	162	6,8
Gestació anterior amb cromosomopatia	135	5,8
Cribratge bioquímic de primer trimestre	117	4,8
Cribratge bioquímic de segon trimestre	90	3,8
Avortaments de repetició	14	0,7
Progenitor amb cromosomopatia	13	0,6
Triple indicació	13	0,6
Reproducció assistida	12	0,5
Altres estudis	10	0,4
Paràmetre bioquímic alterat	8	0,3
Confirmació	4	0,1
Sense dades	300	12,8

3.1.2 Obtenció i transport de les mostres

Les mostres de VC per a estudis prenatals s'han obtingut per via transabdominal o via transcervical sota control ecogràfic. Cada obstetra utilitza una via o altra segons la posició de la placenta, les setmanes de gestació i la seva pròpia experiència.

Les mostres es recullen en condicions d'esterilitat i s'introdueixen dins de tubs estèrils de 50 ml, als quals prèviament s'ha inserit el medi de transport.

El medi de transport es prepara amb el medi base (RPMI 1.640 o F-10), al qual s'afegeixen antibiòtics (penicil·lina G 10.000 IU/ml i estreptomicina 10 mg/ml) i que s'ha de mantenir a 4°C fins al moment de la seva utilització.

3.1.3 Tècniques de cultiu cel·lular

Segons els controls de qualitat externs (ACC, AEDP i ECA), en totes les mostres rebudes s'haurien de fer dos estudis diferents, que en el nostre cas són el cariotip del *cultiu curt* i el cariotip del *cultiu llarg*.

Les vellositats que nosaltres estudiem són vellositats terciàries i del còrion frondós.

Amb l'ajut d'una pipeta Pasteur, es trasllada la mostra del tub de transport a una placa de Petri de 35 mm, a la qual prèviament s'ha posat una solució salina sense Ca^{2+} ni Mg^{2+} (*Salt Solution HBSS*). Seguidament es realitza un dels passos més importants: la selecció fina de la mostra. Sota un microscopi estereoscòpic de llum epifocal a 10X, i amb l'ajut de dues agulles estèrils, se seleccionen les vellositats de la resta de material que no sigui fetal. Així se separa la decídua, els coàguls de sang, els filaments negres (petites artèries buides), la mucosa, etc.

Abans de posar a cultivar la mostra es fa una valoració de la quantitat de mostra aprofitable.

Un cop la mostra està neta de restes maternes i altres restes no aprofitables, es realitza la seva anàlisi i classificació morfològica seguint la classificació pròpia descrita per l'autora (Cuatrecasas, 1993).

Un cop seleccionades les vellositats es divideix la mostra en dues parts asimètriques: dues tercers parts es destinen al cultiu curt i l'altre terç es processa per al cultiu llarg.

Quan la quantitat de la mostra rebuda ha estat insuficient per fer ambdós cultius, a l'inici de la sèrie (anys 1991 a 1998) es va optar per fer només el cultiu curt, però posteriorment es va modificar la política del laboratori i es va passar a fer només el cultiu llarg, seguint les recomanacions de la ACC (2007). De totes maneres, en aquells casos en què hom té una sòlida sospita d'alteració cromosòmica, o quan es vol determinar el gènere embrionari abans d'un estudi molecular, o bé en els casos de progenitors portadors d'alteracions cromosòmiques estructurals, s'escull el cultiu curt per tal d'obtenir el resultat citogenètic en el lapse més curt (ECA, 2007).

3.1.3.1 Cultiu curt

Com que es tracta d'un cultiu directe, les metafases que s'analitzaran corresponen a cèl·lules que estiguin espontàniament en divisió.

Sobretot per al cultiu curt és important que el temps entre l'extracció i el cultiu de la mostra sigui el més curt possible.

Hi ha diverses modalitats de cultiu curt: cultiu curt directe (un cop neta la mostra es cultiva conjuntament amb l'agent antimitòtic) o bé cultiu curt semidirecte (la mostra es deixa cultivant durant un període de temps abans d'afegir l'agent antimitòtic), i cada laboratori de citogenètica aplica l'una o l'altra modalitat en funció de la pròpia rutina de treball.

Per a establir el cultiu curt de la mostra rebuda, el procediment a seguir és el descrit per Simoni *et al.* l'any 1983, amb petites variacions.

Un cop tenim la mostra seleccionada i dividida, cada vellositat es posa en una placa de Petri diferent amb 2 ml del medi de cultiu especial per a cultiu curt de còrion.

Per tant, de cada mostra hi poden haver diverses plaques en cultiu paral·lel que ens han de servir en la interpretació dels resultats discrepants.

El medi de cultiu RPMI-1640 es completa amb penicil·lina i estreptomicina (1 % de penicil·lina G 10.000 iu/ml i estreptomicina 10 mg/ml), L-glutamina (2 %), HEPES (10 µl) i sèrum boví fetal (5 %). La concentració de sèrum és més baixa que en altres tipus de cultius, ja que s'ha comprovat que així s'obté un millor rendiment (Terzoli *et al.*, 1985).

El cultiu *in vitro* es desenvolupa en una incubadora en condicions estàndards, és a dir, a 37°C, 5 % de CO₂ en aire i 95 % d'humitat relativa.

Durant el període comprès entre els anys 1992 i 1999, el temps de cultiu previ a afegir l'agent antimitòtic era de 21 hores i 50 minuts (temps descrit per Simoni *et al.*, 1983), però a partir de l'any 2000 aquest temps es va escurçar fins les 2 hores, ja que les nostres proves de control intern i millora de protocols així ens ho van permetre.

A la següent taula presentem els canvis més importants que s'han introduït en els nostres protocols al llarg dels anys.

Taula 3.2 Cronologia de les variacions metodològiques introduïdes al llarg del treball.

ANY	CANVIS DE METODOLOGIA
De 1991 a 1998	mostres amb <10 mg, només cultiu curt
A partir de 1999	mostres amb <10 mg, només cultiu llarg, i FISH al cultiu curt en casos d'indicació de risc molt elevat
De 1992 a 1999	temps de cultiu curt: 21 hores i 50 minuts
A partir de 2000	temps de cultiu curt: 2 hores
De 1991 a 1995	medi de cultiu pel cultiu llarg: Chang o Ultroser G*
A partir de 1996	medi de cultiu pel cultiu llarg: Amniomax
A partir de 2008	2 o 3 cultius llargs quan la quantitat de mostra ho permet

* Ultroser G: medi base Ham F10 o RPMI amb sèrum sintètic Ultroser G

Un cop finalitzat el període de cultiu *in vitro* s'afegeixen 0,5 ml d'agent antimetabòlic (Colcemid 1 μ /ml) per cada placa i es deixa actuar durant 50 min. a 37°C.

De les plaques de Petri s'extreu el medi de cultiu i s'afegeix l'hipotònic (citrats trisòdic a l'1 %) gota a gota, fins a un volum total de 2 ml. Llavors les plaques es tornen a incubar a 37°C durant 20 min.

A continuació s'extreu la meitat del volum de l'hipotònic i s'afegeix el fixador (àcid acètic: etanol en proporció 4:1) fins als 2 ml. Es deixa actuar durant 10 min. a 4°C.

Finalment s'extreu la mescla hipotònic-fixador i s'afegeix fixador nou i fresc que es deixa actuar durant 10 min. Aquest procés es repeteix encara dues vegades més.

El següent pas és preparar les mostres per a fer les extensions de material, tal i com es descriu a l'apartat 3.1.3.3.

En la figura 3.1. s'observa un cariotip procedent d'un cultiu curt de vellositats coriòniques d'una mostra prenatal.

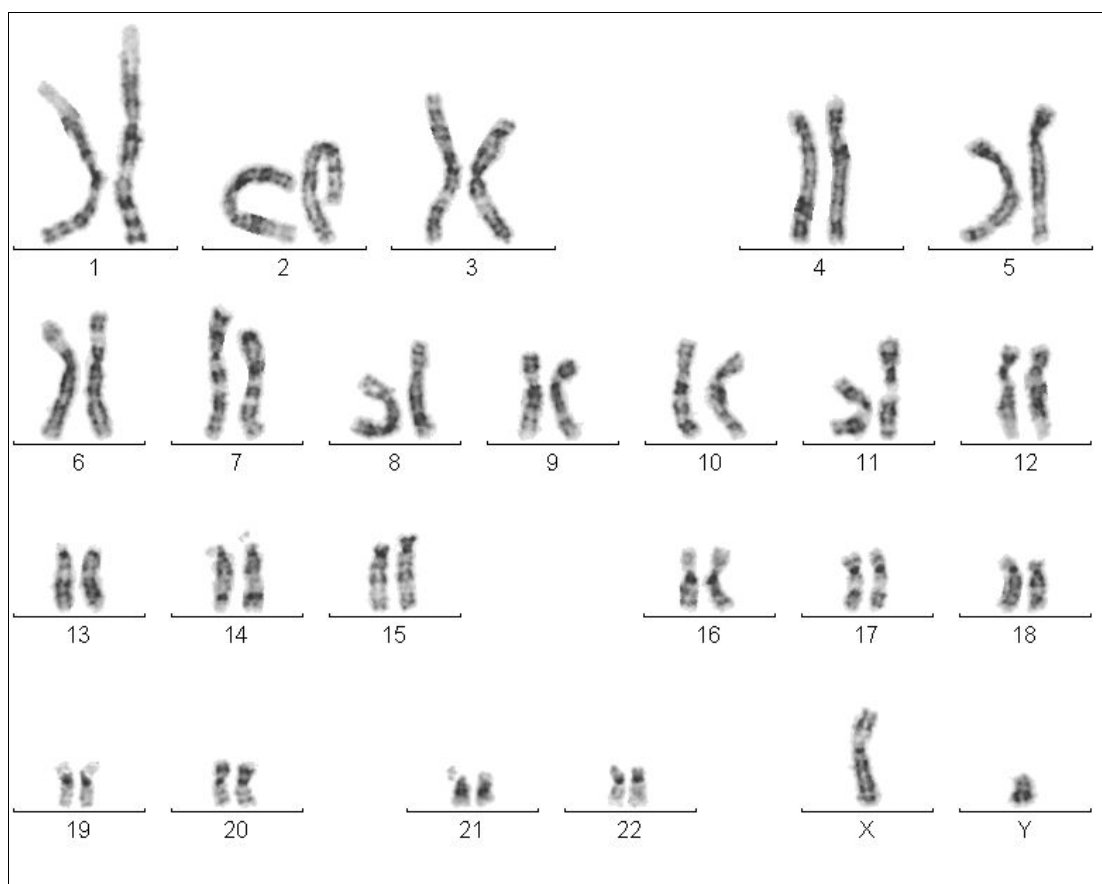


Fig. 3.1: Exemple de cariotip de cultiu curt de vellositats coriòniques prenatals.

3.1.3.2 Cultiu llarg

Per al cultiu llarg s'agafa la tercera part de la mostra neta i es disposa en una placa de Petri on, en sec i amb l'ajut d'un bisturí, es trosseja. Posteriorment la mostra ja fragmentada es trasllada, amb l'ajut d'una pipeta, en un flascó de 25 ml que conté 5 ml de medi.

Si la mostra és abundosa se'n fan dos cultius llargs paral·lels, encara que rutinàriament només se n'extreu un.

Es pot analitzar un únic cultiu llarg quan el resultat obtingut és diferent del cariotip matern, és a dir en els casos en què:

- El resultat indica gènere masculí.
- El resultat confirma una trisomia observada prèviament en el cultiu curt.
- Almenys un dels progenitors sigui portador d'una reorganització cromosòmica, i, si el fetus és femení, tingui una versió en desequilibri de la reorganització, o bé hagi heretat la reorganització procedent del pare.

A més a més, l'altre cultiu llarg també es farà servir en els casos en què:

- No s'obtingui resultat del cultiu curt.
- El resultat d'un cultiu indiqui gènere femení i no hi hagi un resultat consistent del cultiu curt.
- S'observi un mosaic no present en el cultiu curt, per tal de confirmar que no es tracta d'un pseudomosaic.
- S'observi una alteració cromosòmica que no sigui una trisomia detectada prèviament en el cultiu curt.

Encara que el medi més utilitzat per al cultiu llarg ha estat el medi Amniomax (GIBCO), les primeres mostres es van cultivar en medi Chang (IRVING) o en medi complet (medi base RPMI 1.640 amb L-glutamina, 10 % d' Ultroser G, 20 % de sèrum boví fetal i 1 % d'antibiòtics).

El cultiu llarg roman una setmana dins de l'incubadora en condicions estàndard, i, transcorregut aquest temps, es controla el creixement cel·lular en un microscopi invertit i es canvia per primera vegada el medi de cultiu. A partir d'aquí cada dos dies es canvia el medi, fins que es decideix que el creixement cel·lular ja és suficient.

Arribat aquest moment, s'afegeixen 0,2ml d'agent antimitòtic (Colcemid 1 μ /ml) que es deixen actuar durant 90min. a dins de l'incubadora en condicions de cultiu estàndard.

Per separar les cèl·lules del flascó s'empra tripsina-EDTA (GIBCO), que es deixa actuar durant 1min. a 37°C. Per neutralitzar l'efecte de la tripsina s'afegeixen 5ml de medi de cultiu nou.

A continuació es trasllada el material a un tub cònic i se centrifuga (8min. a 800g) per recollir el botó cel·lular. S'afegeix l'hipotònic (clorur potàsic 0,075M) gota a gota amb l'ajut d'un agitador fins a uns 10ml de volum final. Es deixa actuar durant 10min. a 37°C.

Abans de tornar a centrifugar, s'afegeix al tub, i gota a gota, 1ml de fixador Carnoid prerefredat a 4°C. És el que anomenem procés de *prefixació*.

A continuació es centrifuga la mostra, i seguidament es decanta el líquid i s'afegeix gota a gota fixador (a 4°C) fins a uns 8ml de volum final. Es centrifuga la mostra un altre cop, procés que es repeteix encara una vegada més.

En la figura 3.2 s'observa un cariotip procedent d'un cultiu llarg d'una mostra de vellositats coriòniques prenatales.

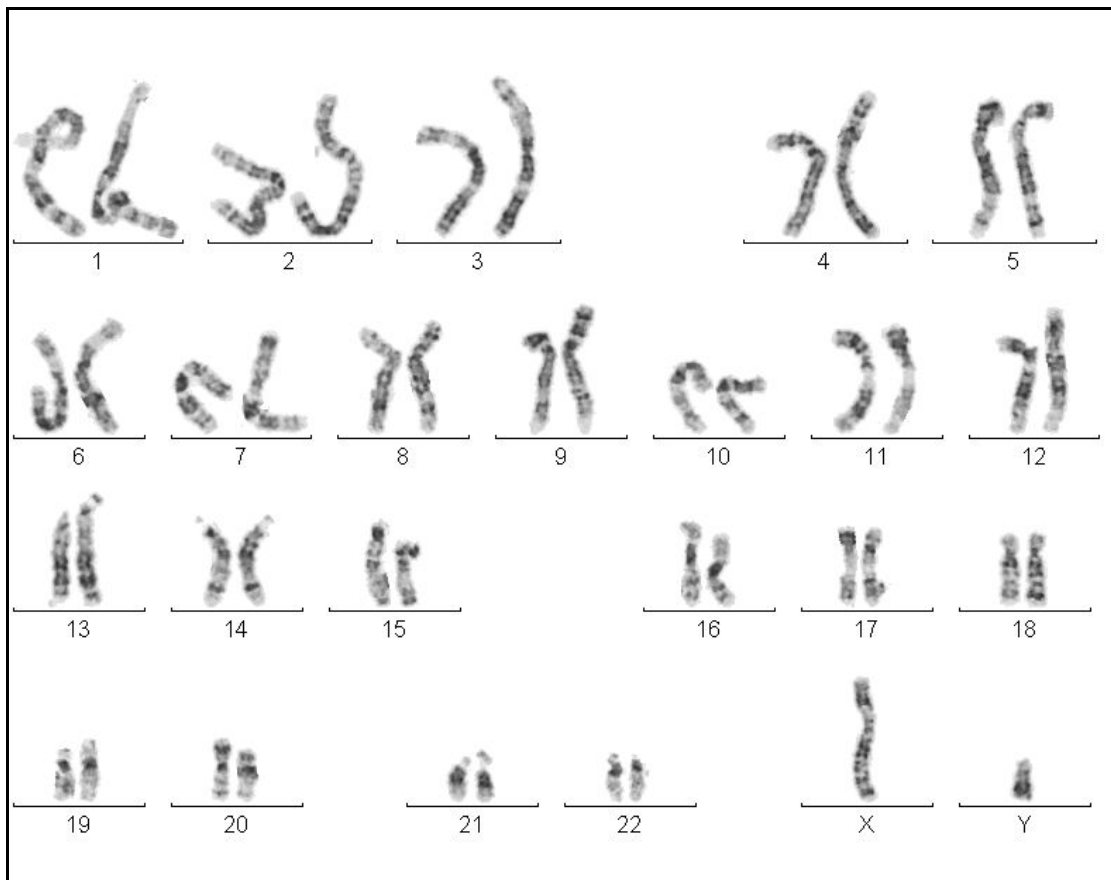


Fig. 3.2: Exemple de cariotip de cultiu llarg de vellositats coriòniques prenatals.

3.1.3.3 Extensions

Per tenir extensions de qualitat és necessari que les metafases quedin ben esteses i així poder comptar i identificar els cromosomes.

Per tal d'aconseguir que, al cultiu curt, les metafases quedin ben aïllades i separades de l'entramat del teixit, és necessari disgregar la vellositat abans de fer-ne les extensions, ja que les cèl·lules del citotrofoblast, que són les que es divideixen espontàniament en els cultius curts, es troben dins l'entramat del teixit.

Aquesta disgregació és de tipus químic i s'aconsegueix afegint a cada placa 0,5ml d'àcid acètic al 60 % durant 5min.

És necessari, i molt important, que els portaobjectes sobre els quals es faran les extensions estiguin ben nets i desengreixats, per això es guarden submergits en metanol a 4°C.

Aquests portaobjectes, apropiadament identificats, es posen en una placa escalfada a 60°C, i amb l'ajut d'una pipeta Pasteur de vidre es fan les extensions, fent gotejar el material biològic al damunt dels portaobjectes.

Els portaobjectes es deixen assecar durant 30min. a 60°C i es guarden a 37°C fins al dia següent.

De cada vellositat procedent del cultiu curt se'n fa dues extensions, i així, en el supòsit que observéssim un cariotip en mosaic, podríem identificar si la línia patològica és a tota la mostra o bé només en algunes vellositats. Per cada mostra es fan les extensions corresponents a dues o tres vellositats.

Pel que fa al cultiu llarg, també amb una pipeta Pasteur de vidre es fan les extensions fent gotejar el material biològic al damunt dels portaobjectes nets. Aquests es valoren en un microscopi invertit per tal de buscar-hi metafases i determinar quins són els millors portaobjectes; i modificar, si cal, les concentracions cel·lulars en funció de la densitat de metafases observada als portaobjectes.

De cada cultiu es fan quatre portaobjectes que s'assequen a temperatura ambient durant tota la nit.

D'ambdós cultius, curt i llarg, el material restant es col·loca en un tub de centrífuga amb fixador nou i es conserva a 4°C per si fos necessari fer altres estudis.

D'acord amb la legislació vigent els portaobjectes amb les extensions es guarden durant 5 anys (ECA, 2011) i el material de 4°C es guarda fins al final de la gestació.

3.1.3.4 Tinció dels portaobjectes

Els portaobjectes que es destinin a fer les bandes G s'envelleixen durant 90min. a 120°C. Posteriorment se submergeixen en un solució salina (2xSSC) durant 8min., i seguidament es netegen amb aigua i es tenyeixen amb colorant Wright (*tampó Sörensen*: colorant *Wright* en proporció 3:1; Yunis, 1988).

En alguns casos, com per exemple en els estudis de polimorfismes, cal realitzar l'estudi de bandes C (Summer, 1972) i/o de bandes Ag-NOR (Goodpasture *et al.*, 1975). Les bandes C marcaran les regions d'heterocromatina del centròmers de tots els cromosomes, els satèl·lits dels cromosomes acrocèntrics i les regions paracentromèriques dels cromosomes 1, 9, 16 i Y, mentre que les bandes Ag-NOR tenyeixen els peduncles de fixació dels satèl·lits en els cromosomes acrocèntrics.

3.1.4 Estudi citogenètic

Per a l'estudi citogenètic complet del cultiu curt es compten 20 metafases i se'n cariotipen 5. L'anàlisi cromosòmica es fa directament al microscopi o amb un programa de tractament d'imatges (IKAROS, Metasystems Co). Amb el comptatge de 20 metafases descartem mosaics amb més del 10 % de presència (Hook, 1977). El nivell de bandes que generalment s'adquireix és de 150bjh (bandes joc haploid).

Per a l'estudi citogenètic complet del cultiu llarg i de les restes fetals es compten 10 metafases per a cada cultiu, de les quals se'n cariotipen 3. El nivell de bandes que generalment s'adquireix és de 400 bjh.

Segons les Normatives que es segueixen es requereix un cert nivell de bandes en funció de la indicació per a la qual s'ha sol·licitat l'estudi. Així, per exemple, per als casos en què la indicació és *edat materna* es requereix un nivell de bandes mínim de 150 bjh, o pels casos de marcadors ecogràfics es requereix 400 bjh.

3.1.5 Interpretació del resultat citogenètic i estudis de seguiment

No totes les anomalies cromosòmiques observades en estudis de vellositats coriòniques tenen el mateix valor. Sikkema-Raddatz *et al.*, (2000) classifiquen les troballes citogenètiques en dos grups, pel que fa a la seva representativitat del cariotip fetal: troballes certes i troballes incertes.

En els casos en què s'observi una anomalia cromosòmica (sigui en línia pura o en mosaic) en els dos cultius cel·lulars, en alguns casos es recomanarà confirmar el cariotip en l'estudi d'un teixit d'origen fetal, excepte, si l'anomalia cromosòmica es confirma per les indicacions de *marcadors o anomalies ecogràfiques associades a l'anomalia* o bé de *progenitors amb cromosomopatia*.

Sobre aquesta recomanació hi ha algunes excepcions que cal tenir en compte: els cariotips en línia pura de la trisomia 21, les trisomies dels cromosomes sexuals en línia pura, les triploidies en línia pura, les anomalies estructurals en línia pura (Taula 3.3).

Seguint la mateixa idea, Schuring-Blom *et al.* (2002) observen 11 casos de falsos positius de trisomia 13 i 18, i suggereixen esperar sempre al resultat del cultiu llarg quan s'observen aquestes dues aneuploidies, si és que l'observació ecogràfica no confirma l'anomalia cromosòmica.

Smith *et al.* (1996), comenten el fet que és importantíssim tenir el resultat de les dues tècniques de cultiu quan es troba una anomalia cromosòmica.

Taula 3.3 Descripció de les anomalies considerades certes o incertes pel que fa a la representativitat del cariotip fetal

<u>TROBALLA CERTA (en ambdós cultius)</u> = no fer estudis de seguiment
Línia pura de trisomia 21
Línia pura de triploïdia
Línia pura de trisomia cromosomes sexuals
Línia pura d'anomalia estructural
Línia pura de cromosoma marcador amb marcadors o anomalies ecogràfiques associats
Línia pura de trisomia 13 + marcadors o anomalies ecogràfiques associats
Línia pura de trisomia 18 + marcadors o anomalies ecogràfiques associats
Línia pura de monosomia de l'X + marcadors o anomalies ecogràfiques associats
<u>TROBALLA INCERTA (en ambdós cultius)</u> = fer estudis de seguiment (estudi cromosòmic, FISH o UPD) en mostres de líquid amniòtic o sang fetal, cariotip dels pares, anàlisi ecogràfica exhaustiva, i si és possible confirmació de l'anomalia cromosòmica en avortament
Línia pura de trisomia 13 sense marcadors o anomalies ecogràfiques associats
Línia pura de trisomia 18 sense marcadors o anomalies ecogràfiques associats
Línia pura de monosomia de l'X sense marcadors o anomalies ecogràfiques associats
Línia pura de cromosoma marcador sense marcadors o anomalies ecogràfiques associats
Línia pura de totes les altres aneuploidies
Tots els mosaics numèrics i estructurals

Pels casos de tetraploidies seguim el protocol publicat per Noomen (2001).

Quan es detecta un mosaic de nivell I o II (pseudomosaic) és recomanable fer un comptatge més exhaustiu, tot i que no existeix encara un protocol de consens internacional, a diferència del l'íquid amniòtic (Hsu *et al.*, 2001). Quan es tracta

d'un mosaic tipus III, tant si és generalitzat com confinat, en funció de la indicació de l'estudi, del cromosoma implicat en l'alteració cromosòmica i/o del tipus d'anomalia, es recomana la confirmació de l'alteració cromosòmica amb l'estudi d'un altre teixit fetal (líquid amniòtic, sang fetal...).

El seguiment citogenètic de l'anomalia cromosòmica en les restes fetals dels ILE hauria de formar part del propi control intern del laboratori. De totes maneres, en la realitat diària, són pocs els casos en què aquesta norma es compleix, i la majoria de gestacions d'aquestes característiques s'avorten sense una confirmació de l'anomalia cromosòmica detectada.

En els casos en què s'ha detectat un mosaic confinat a placenta (MCP) en els estudis prenatals, Kalousek (2000) recomana després del naixement del fetus, analitzar la placenta a terme o bé algun altre teixit del nounat per fer-ne el seguiment citogenètic.

Una de les tècniques que s'ha realitzat com a complement dels estudis citogenètics és la hibridació fluorescent *in situ* (FISH), que ens permet, mitjançant la utilització de sondes de DNA marcades amb fluorescent, identificar fragments coneguts de DNA. Així per exemple, quan no s'obté algun resultat citogenètic es pot realitzar un estudi de FISH (sondes *Aneuvysion*, Vysis), i així analitzar en nuclis interfàsics les aneuploidies més comunes.

Els estudis de disomia uniparental (DUP) són necessaris en els casos en què s'ha observat un mosaic dels cromosomes 6, 7, 11, 14 i 15, en els casos de translocacions robertsonianes que participen dels cromosomes 14 o 15 i en els casos de cromosomes marcadors procedents dels cromosomes 7, 11, 14 i 15 (ECA, 2007).

3.2 ESTUDIS CITOGENÈTICS DE MOSTRES PROCEDENTS D'AVORTAMENTS

A Prenatal Genetics S.L. se segueix el protocol segons el qual per a cada gestació es sol·licita dues mostres: una mostra de teixit extraembrionari (placenta o vellositats coriòniques) i una altra de restes fetals o restes embrionàries, en tots els casos d'avortaments.

Durant el mateix període, del gener de 1991 al desembre de 2010, s'han obtingut 551 mostres corresponents a vellositats coriòniques obtingudes de gestacions interrompudes. D'aquestes, 41 es van descartar des de l'inici perquè es consideraven inadequades; per tant es van cultivar 510 casos.

En aquest grup de mostres s'inclouen les gestacions espontàniament interrompudes (de primer i segon trimestre). Quan no es rep informació de si és un ILE (Interrupció Legal de l'Embaràs) es considera que és espontània. No podem tenir informació de moltes de les mostres, ja que no ens arriba.

3.2.1 Setmanes de gestació de mostres procedents d'avortaments

Per a les mostres d'avortaments, l'única dada que se sol·licita és la de les *setmanes de gestació*. El rang de setmanes de gestació és, lògicament, molt més ampli que el de les mostres prenatales, i en el nostre estudi abraça des de la 6a fins a la 38a setmana de gestació, encara que més d'un 80 % dels casos rebuts provenen de gestacions de primer trimestre (Taula 3.4). En 182 mostres de les 510 cultivades no es va obtenir aquesta dada.

Taula 3.4 Distribució segons les setmanes de gestació de les mostres procedents d'avortaments cultivades

	n.	%
TOTAL de mostres cultivades	510	
TOTAL de mostres informades	328	100
de la 5a a la 9a setmana de gestació	192	58,9
de la 10a a la 14a	78	23,3
de la 15a a la 17a	23	7,2
més enllà de la 18a	35	10,6

3.2.2 Obtenció i transport de les mostres procedents d'avortaments

Les mostres procedents d'avortaments s'obtenen de fer una biòpsia abans de l'expulsió o bé recollint una mostra de les restes avortives expulsades. Aquesta informació no arriba al laboratori.

El sistema de transport i els tubs de transport emprats són els mateixos que per a les VC prenatales.

3.2.3 Tècniques de cultiu cel·lular en mostres procedents d'avortaments

En el nostre laboratori de cada cas d'avortament es realitzen tres cultius cel·lulars, dos de la mostra placentària i un de les restes embrionàries.

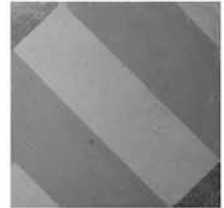
Les tècniques de cultiu curt i cultiu llarg són les mateixes que les de VC prenatales. En el cultiu curt, com que es tracta d'un cultiu directe, les metafases que s'analitzaran corresponen a cèl·lules que s'estiguin dividint en aquell moment, i per aquesta mateixa raó, en les mostres procedents d'avortaments, si la gestació ha estat molt temps interrompuda, el cultiu directe serà el que més se'n ressentirà.

3.2.4 Tècniques de cultiu de teixits fetals

Com ja s'ha comentat, amb les mostres d'avortaments es fa un tercer cultiu amb la mostra de restes fetals o embrionàries. Per a aquest, la quantitat de mostra que se sol·licita és d'un centímetre cúbic de teixit fetal.

El teixit fetal que s'utilitza varia segons cada cas. Si s'observa que la mostra és compatible amb el teixit embrionari s'usa aquesta part de la mostra, però en els casos en què no s'ha rebut teixit fetal s'agafa un fragment d'amni. La tècnica de cultiu que es fa servir és la mateixa tècnica del cultiu llarg de les vellositats.

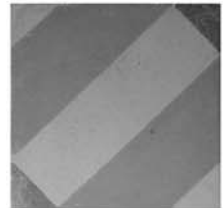
ÍNDEX



INTRODUCCIÓ



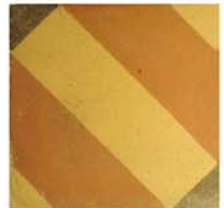
OBJECTIUS



MATERIAL I MÈTODES



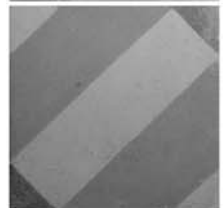
RESULTATS



DISCUSSIÓ



CONCLUSIONS



BIBLIOGRAFIA



4. RESULTATS

4.1 MOSTRES DE VELLOSITATS CORIÒNIQUES PRENATALS

4.1.1 Rendiment de les tècniques de cultiu

S'ha processat 2360 mostres de vellositats coriòniques procedents de biòpsies de còrion de primer trimestre.

Malgrat que la intenció és fer els dos cultius per a totes les mostres, això no sempre és possible. De les 2360 mostres de VC cultivades per a estudis prenatals, en 2149 es van poder realitzar els dos cultius, però en 211 només es van fer un els dos cultius (en 58 només el curt i en 153 només el llarg). Per tant, tal i com es mostra en la taula següent, es van fer un total de 2302 cultius llargs en total i 2207 cultius curts.

Taula 4.1: Descripció de mostres de vellositats coriòniques per a estudis prenatals segons el tipus de cultiu realitzat

DESCRIPCIÓ DELS CASOS CULTIVATS	n
total mostres cultivades	2360
cultius curts realitzats	2207
cultius llargs realitzats	2302

El percentatge de no creixement del cultiu curt és 1,9%, i el del llarg 1,6% (Taula 4.2). De totes aquestes mostres es va obtenir resultat citogenètic en el 99,9% dels

casos, perquè en tres mostres no va créixer cap dels dos cultius. De les 2360 mostres cultivades se'n van poder analitzar 2357.

Taula 4.2: Distribució de les mostres per tipus de cultiu i el seu rendiment

	n.	%	
TOTAL mostres processades	2360	100	
TOTAL mostres amb resultat	2357	99,9	
	n	no creixement	%
ambdós cultius	2149	3	0,1
cultiu curt	2207	43	1,9
cultiu llarg	2302	38	1,6

4.1.2 Resultats citogenètics

Es va obtenir un resultat citogenètic anòmal en el 10,6% de les 2357 mostres analitzades.

En la Taula 4.3 es desglossa el tipus d'anomalia cromosòmica observada, sent les anomalies més freqüents les aneuploidies comunes (dels cromosomes 13, 18 i 21) que representen un 5,3% del total de casos analitzats, i els casos en mosaic amb un 3,1%. En l'Annex II es descriuen en detall totes les anomalies cromosòmiques.

Taula 4.3: Anomalies cromosòmiques observades en mostres de vellositats coriòniques per a estudis prenatals

	n.	%
TOTAL mostres amb resultat	2357	
TOTAL mostres amb anomalies cromosòmiques	250	10,6
Aneuploidies autosòmiques comunes	127	5,3
Mosaics	74	3,1
Aneuploidies de cromosomes sexuals	23	0,9
Anomalies estructurals equilibrades	12	0,5
Anomalies estructurals desequilibrades	6	0,3
Aneuploidies autosòmiques no comunes	3	0,2
Poliploidies	3	0,2
Alteracions múltiples	2	0,1

De les 3 mostres amb aneuploïdia no comuna, en el cas de trisomia 2 i el de la 22 la indicació era compatible o congruent amb l'anomalia observada, doncs era *marcadors i anomalies ecogràfiques*, i en el cas de la trisomia 20 era *edat materna*. En aquest darrer es va fer un estudi citogenètic de seguiment, observant la trisomia 20 en línia pura en la mostra de líquid amniòtic i el cariotip en mosaic en mostres de sang fetal, cervell, pell i ronyó de l'avortament (Morales *et al.*, 2010).

De les 6 mostres amb anomalies estructurals desequilibrades, en 4 d'elles la indicació era *marcadors i anomalies ecogràfiques*, i en 2 no es disposava de la informació. En cap d'elles no es va fer cap estudi de seguiment.

En l'Annex III es fa una descripció detallada de totes els casos de cariotip en mosaic.

Respecte a les poliploidies, els casos observats en línia pura eren tots triploidies amb la indicació *marcadors i anomalies ecogràfiques*. Els únics casos que s'ha observat una tetraploïdia és en forma de mosaic (Annex III).

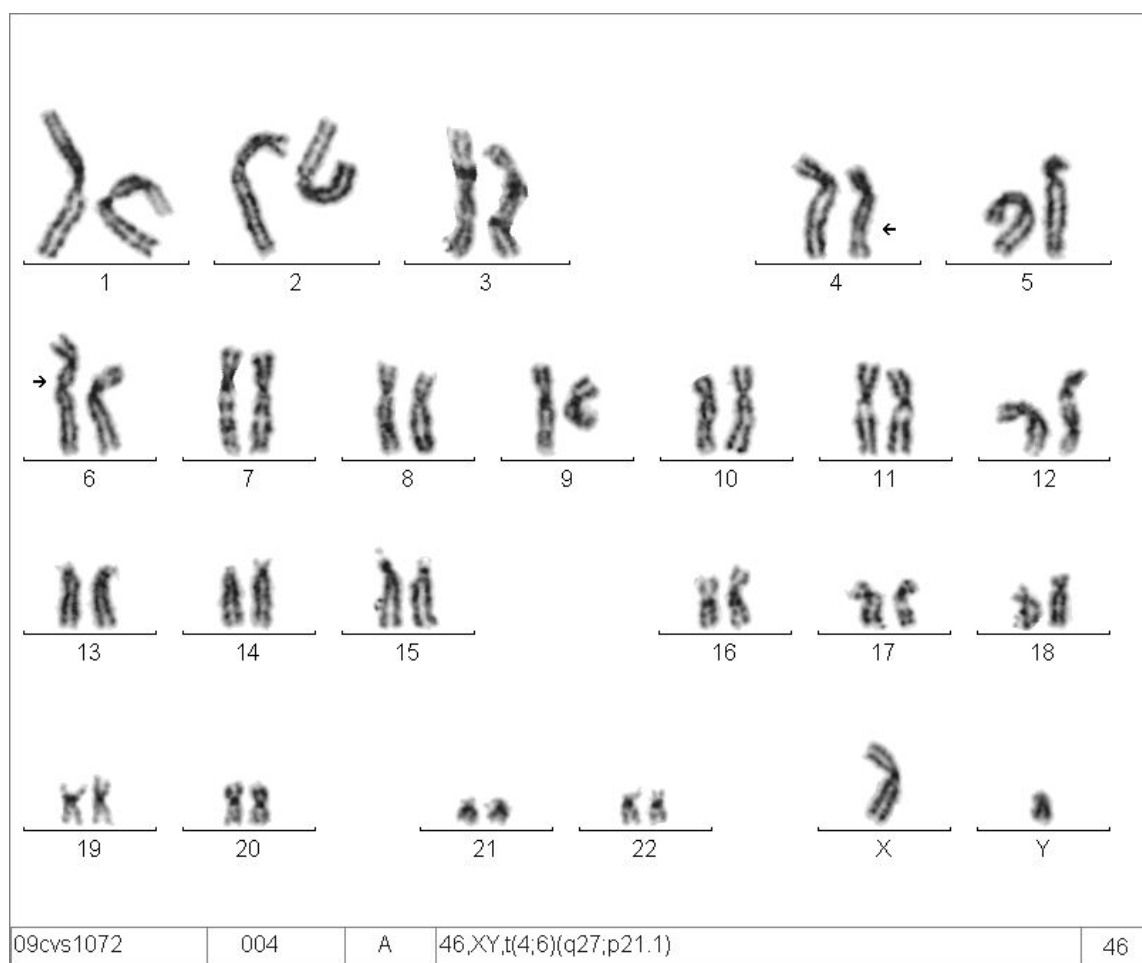


Fig. 4.1: Exemple de cariotip de vellositats coriòniques amb l'anomalia cromosòmica estructural t(4;6)(q27;p21.1)

4.1.3 Mosaïcisme en prenatal

Es considera un resultat citogenètic en mosaic, qualsevol cariotip en el qual s'observin dues o més línies cel·lulars diferents. Els casos en que s'ha observat una no coincidència entre el cariotip del cultiu curt i el del cultiu llarg tècnicament es

considera un resultat citogenètic fetal en mosaic (Phillips *et al.*, 1996), doncs són dues línies cel·lulars diferents en un mateix individu.

De les 250 mostres amb resultat citogenètic anòmal, en 74 (3,1%) el cariotip que s'obtingué era en mosaic (Annex III): 60 casos de mosaics confinats, 9 casos de falsos cariotips en mosaics (tres per una possible contaminació amb cèl·lules maternes, un per artefactes de cultiu i cinc per limitacions pròpies de la tècnica), 2 casos degut a mosaics rars (al fenomen de bessons reabsorbits), 2 casos de mosaics d'origen indeterminat per manca d'informació i 1 cas de mosaic generalitzat (Taula 4.4).

Taula 4.4: Descripció de les mostres amb resultat citogenètic en mosaic

	n.	%
TOTAL mostres amb resultat	2357	
TOTAL mostres amb resultat en mosaic	74	3,1
Mosaic generalitzat	1	0,1
Mosaic confinat	60	2,5
Mosaics rars	2	0,1
Falsos cariotips en mosaic	9	0,3
Mosaic indeterminat	2	0,1

En un cas particular (NHC: 23694) es va observar una nova línia cel·lular en el cultiu llarg que no s'havia detectat prèviament en el cultiu curt, una doble anomalia (una translocació recíproca en equilibri i una trisomia del cromosoma 2) i amb un percentatge de metafases anòmales petit. Atès a que les metafases anòmales s'observaven en tots els portaobjectes del cultiu i no es disposava d'un segon cultiu

llarg, es va recomanar realitzar una amniocentesi, resultant un cariotip normal. Per aquest cas hem considerat que l'origen del resultat citogenètic en mosaic és degut a un mosaic confinat a la placenta per observar-se la trisomia del cromosoma 2, tot i que, també hagués pogut considerar-se un fals mosaic per artefacte de cultiu. Semblant és el cas NHC: 24183 però per observar-se les metafases anòmales només en una regió única d'un dels portaobjectes, hem considerat que el cariotip en mosaic és degut a un artefacte del cultiu cel·lular. En aquell moment no es realitzaven dos cultius-llargs (Annex III).

Els casos NHC: 16149, 17767, 24200, i 30166 els hem considerat mosaic vertader fetal tipus VI malgrat que pel tipus de mosaic que es va observar, també podria tractar-se d'una contaminació materna (Annex III).

Els casos NHC:11695, 18891, 30959 i 31554 per manca d'informació els hem definit com a mosaics confinats inclassificables, malgrat que també s'haguessin pogut tractar com a mosaics causats per contaminació materna (Annex III).

En el supòsit en que el resultat del cultiu curt és anòmal i el del llarg és normal i no tenim l'estudi citogenètic de seguiment, hem suposat que el cariotip fetal és normal, tenint en compte el fenotip normal del fetus/nadó (NHC: 10111, 13630, 14463, 20737 i 23749).

En el supòsit en que els cariotips del cultiu curt i el del llarg són anòmals i no es té el cariotip de l'estudi de seguiment, però la indicació és *marcadors i anomalies ecogràfiques*, hem suposat que el cariotip fetal també és anòmal (NHC: 14825, 16149, 17767, 20879, 21852, 21893, 24200, 27621, 29350, 29859, i 30166).

Així mateix, hi ha 8 casos dels mosaics confinats que en el cultiu llarg s'ha observat cèl·lules 46,XX concomitant amb metafases amb anomalia cromosòmica i per ser el cariotip del cultiu curt XX i no tenir el resultat del tercer cultiu, no podem distingir entre mosaic confinat o contaminació materna.

4.1.3.1 Mosaics generalitzat

Només s'ha observat un cas de mosaic generalitzat, és a dir, un cas en el qual el cariotip dels tres estudis és en mosaic.

4.1.3.2 Mosaics confinats

En la Taula 4.5 es mostra la classificació dels 60 mosaics confinats; dotze casos de MCP tipus I, tretze de MCP tipus II, cinc de MCP tipus III, tres de MVF tipus V i catorze de MVF tipus VI. No s'ha observat cap cas de tipus IV. Tretze mostres amb mosaics confinats no es poden classificar (Annex III).

Seguint la classificació proposada per Hahnemann *et al.*, (1997a) observem que dos tercers parts dels casos amb mosaic confinat són confinats a la placenta i la resta són mosaics vertaders fetals.

Taula 4.5: Classificació de les mostres prenatales amb mosaic confinat

	n.	%
TOTAL mostres amb mosaic confinat classificables	47	100
Mosaic confinat a la placenta	30	63,8
<i>Tipus I</i>	12	25,5
<i>Tipus II</i>	13	27,6
<i>Tipus III</i>	5	10,7
Mosaic vertader fetal	17	36,2
<i>Tipus IV</i>	0	0
<i>Tipus V</i>	3	6,5
<i>Tipus VI</i>	14	29,7
Mosaic confinat al fetus	0	0

MCP = mosaic confinat a placenta; MVF = mosaic vertader fetal

Les anomalies més freqüents detectades en els mosaics confinats foren les aneuploidies autosòmiques no-comunes, seguides de les comunes i les poliploidies que són totes tetraploidies (Taula 4.6). Les úniques aneuploidies dels cromosomes sexuals observades són les monosomies de l'X i els casos amb un cromosoma marcador han estat els menys freqüents.

Taula 4.6: Distribució de les anomalies cromosòmiques detectades en els mosaics confinats prenatals

	n.	%
TOTAL de cariotips amb mosaic confinat	60	100
Aneuploidies autosòmiques no comunes	19	31,7
Aneuploidies autosòmiques comunes	15	25
Poliploidies	8	13,4
Alteracions múltiples	5	8,3
Anomalies estructurals	6	10
Aneuploidies de cromosomes sexuals	4	6,6
Cromosoma marcador	3	5

Quan observem les anomalies cromosòmiques per a cada tipus de mosaic confinat, observem que les aneuploidies no comunes són més freqüents en mosaic tipus I i II i les comunes en mosaics tipus VI. En la Taula 4.7 s'observa la distribució de les anomalies cromosòmiques pels diversos tipus de mosaics confinats i en la Taula 4.8 la distribució segons el parell cromosòmic implicat en les aneuploidies.

Taula 4.7 Distribució dels casos amb mosaic confinat segons l'anomalia cromosòmica i el tipus de MCP

	MCP I	MCP II	MCP III	MVF IV	MVF V	MVFVI
TOTAL	12	13	5	0	3	14
Aneuploidies comunes	1 (8,4%)	3(23,4%)	0	0	2 (66,7%)	8 (57,4%)
Aneuploidies no comunes	5 (41,6%)	7 (53,8%)	1 (20%)	0	0	1 (7,1%)
Aneuploidies cromosomes sexuals	0	2 (15,2%)	0	0	0	1 (7,1%)
Anomalies estructurals	2 (16,6%)	0	0	0	1 (33,3%)	1 (7,1%)
Poliploidies	2 (16,6%)	0	3 (60%)	0	0	1 (7,1%)
Marcador	1 (8,4%)	0	1 (20%)	0	0	1 (7,1%)
Alteracions múltiples	1 (8,4%)	1 (7,6%)	0	0	0	1 (7,1%)

Taula 4.8: Distribució dels casos amb mosaic confinat segons el parell cromosòmic implicat en les aneuploidies i el tipus de MCP

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	mar *	XO *	P *
MCP I							1	1		1	1					1					1				2
MCP II		2					2	2				1	1					1		1	1				2
MCP III							1																1		3
MVF IV																									
MVF V																		1			1				
MVF VI													1			1		2			4		1	1	1

* mar: cromosoma marcador; XO: monosomia del cromosoma X; p: poliploidia

En la Taula 4.9 es detalla la possibilitat que l'anomalia cromosòmica observada en el mosaic confinat sigui confirmada. Aquesta possibilitat és més alta quan l'anomalia s'observa en el citotrofoblast i mesènquima conjuntament (77,7 %), que si s'observa només en el mesènquima (18,75 %) o només en el citotrofoblast que és 0 %.

Taula 4.9: Possibilitat de confirmació de l'anomalia observada en el mosaic confinat segons el llinatge cel·lular on s'ha observat

NOMÉS CITOTROFOBLAST	MVF IV / MCP I + MVF IV = 0 / 12 = 0 %
NOMÉS MESÈNQUIMA	MVF V / MCP II + MVF V = 3 / 16 = 18,75 %
CITOTROFOBLAST I MESÈNQUIMA	MVF VI / MCP III + MVF VI = 14 / 18 = 77,7%

Dels 60 casos amb mosaic confinat 6 van ser susceptibles a tenir una disomia uniparental amb repercussió fenotípica, i tal i com està prescrit, es va recomanar a les parelles realitzar els estudis pertinents. Només en dos casos es va fer l'estudi de DUP sent el resultat d'herència biparental.

4.1.3.3 Mosaics rars

Un altre fenomen natural que pot generar un cariotip en mosaic és els bessons reabsorbits.

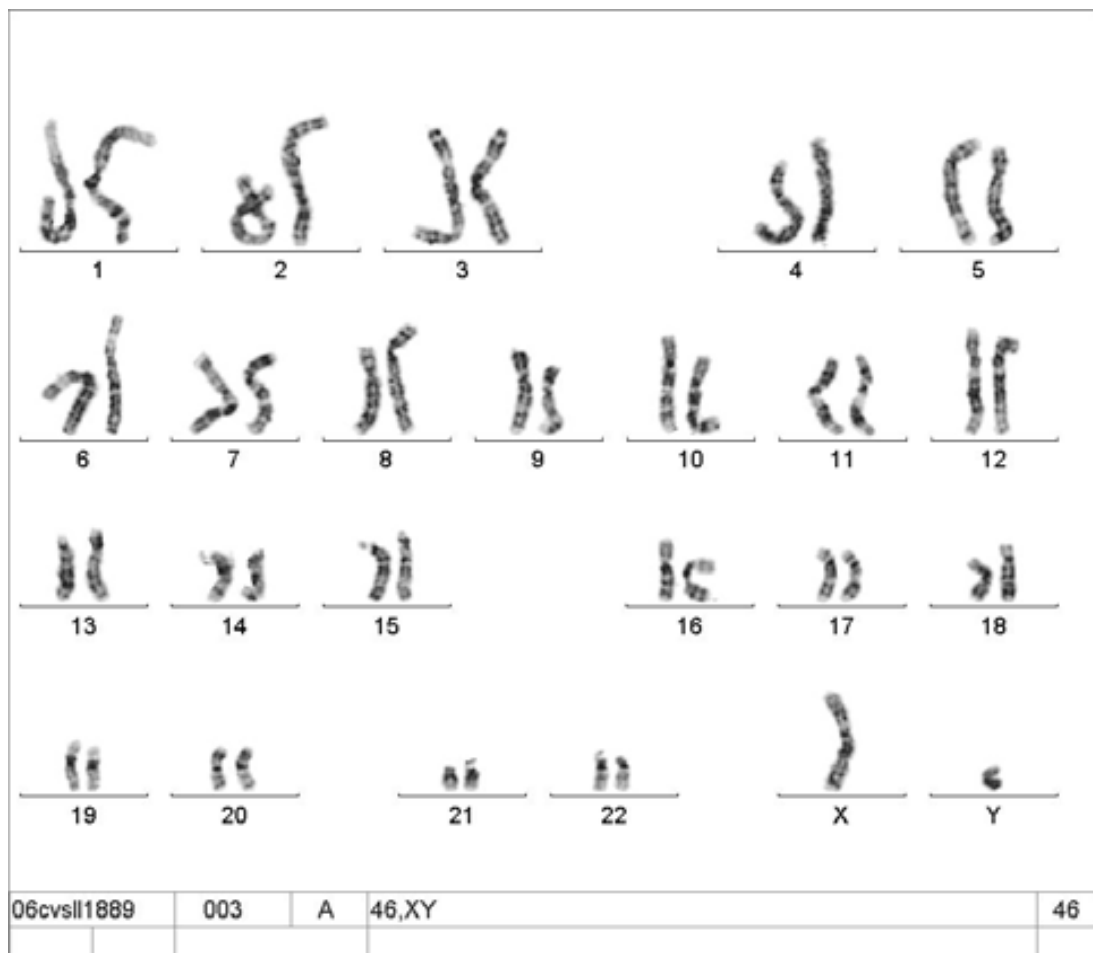
En el primer cas (NHC: 2881, Annex III) vam observar un cariotip 46,XX al curt i un resultat 46,XX/46,XY al llarg. Va ser un dels primers casos estudiats al laboratori. El resultat del FISH mostrava també el mosaic de cromosomes sexuals. Es va decidir posteriorment confirmar el cariotip fetal fent un estudi amb sang fetal, resultant ser finalment el fetus 46,XX.

La peculiaritat del segon cas (NHC: 22201, Annex III) va ésser que en el cultiu curt només es va observar el resultat citogenètic d'un bessó (47,XX,+13) i en el cultiu llarg només va observar-se el cariotip fetal de l'altre bessó, 46,XY (Fig. 4.2 A i B). I com que es tractava d'un fetus de gènere masculí no es podia considerar un cas de contaminació materna (Cuatrecasas *et al.*, 2007). Just després de rebre el resultat

del cultiu curt es va decidir interrompre la gestació, i sense esperar el resultat del cultiu llarg. No va ésser possible realitzar altres estudis citogenètics ni moleculars, ni fer un cariotip en sang dels pares ni un estudi de les restes fetals.

Després de donar a conèixer el cariotip en mosaic es van rebre les dades obstètriques, informant que es tractava d'una gestació múltiple derivada d'un tractament de reproducció humana assistida amb la implantació de dos embrions, un dels quals havia quedat reabsorbit després de les 6 setmanes.

A/



B/

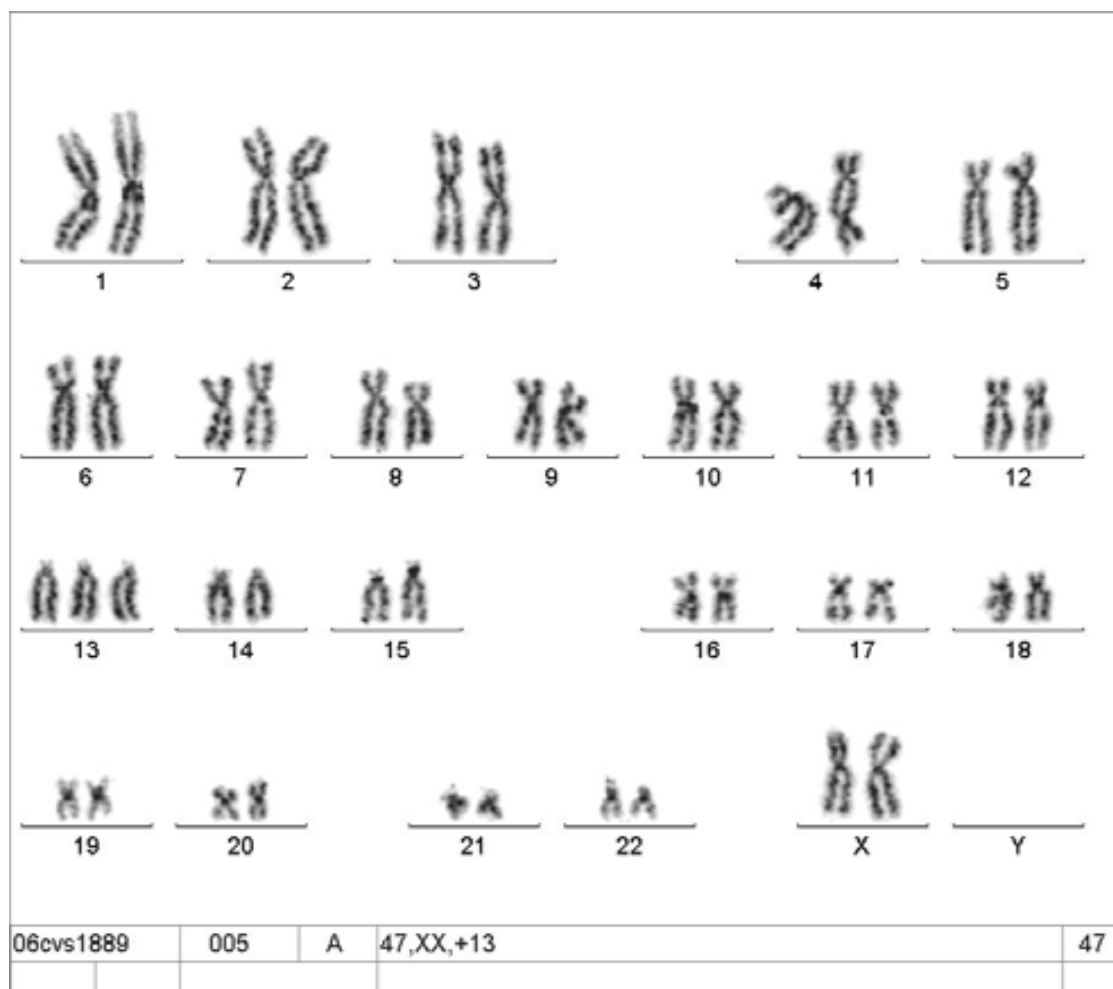


Fig. 4.2: A/ Cariotip del cultiu llarg dels bessó 1 i B/ cariotip del cultiu curt del bessó 2

4.1.3.4 Falsos cariotips en mosaics

A més dels mosaics generalitzats, dels confinats, i dels bessons reabsorbits, hi ha causes que poden generar altres cariotips en mosaic com les contaminacions maternes, els artefactes del cultiu cel·lular i les limitacions pròpies de la tècnica.

Tenim tres casos amb contaminació materna en el cultiu llarg. En un únic cas (NHC: 8648; Annex III) la contaminació materna va arribar a emascarar el cariotip fetal. Aquest cas va ser realitzat en els primers temps de l'estudi, període que es pot considerar de posta a punt de la tècnica, i es va confirmar la sospita de

contaminació emprant la tècnica de FISH amb les sondes dels cromosomes sexuals. En els dos altres casos es va observar cèl·lules maternes barrejades amb les cèl·lules fetals. És rellevant el cas NHC: 24926, en el qual les cèl·lules maternes contaminants tenien el cariotip 45,XX,der(14;21)(q10;q10) i el cariotip fetal era 46,XX.

En tots ells només es va poder fer un cultiu llarg de cada mostra.

En el cas NHC: 24183 es mostra un cas de pseudomosaic o cariotip en mosaic per artefacte de cultiu; es va observar una línia cel·lular (translocació recíproca en equilibri) en el cultiu llarg que no s'havia observat prèviament en el cultiu curt, i amb un percentatge de metafases amb anomalia cromosòmica petit (menys del 5%). Atès a que les metafases estaven localitzades en la mateixa zona del portaobjectes, i que no s'observaven en els altres portaobjectes de l'únic flascó que es va poder fer del cultiu llarg, es va interpretar que la nova línia cel·lular tenia un origen *in vitro*. En canvi el cas NHC: 23694 es va poder confirmar la sospita del pseudomosaic amb el cariotip de la sang del nounat, que va ser normal, i s'ha considerat MCP tipus II.

S'ha observat 5 casos en els quals el cariotip en mosaic podia ser degut a limitacions pròpies de la tècnica. En un cas (NHC 24055, Annex III), atesa la poca quantitat de metafases analitzades (5 metafases) i la baixa qualitat dels cromosomes obtinguts (menys de 150 bjh), no va detectar-se una trisomia del cromosoma 18 en el cultiu curt, que si que es va observar posteriorment en el cultiu llarg. En revisar les metafases del cultiu curt, es va confirmar la trisomia. En els casos NHC: 20400, 21971, 28221 i 31226, en el cultiu curt no van observar-se les anomalies estructurals observades en el cultiu llarg. Posteriorment, revisant el cultiu curt es va poder confirmar la seva presència.

4.1.3.5 Mosaics indeterminats

En dos casos, per manca d'informació, no va ésser possible determinat l'origen del cariotip en mosaic. En el cas NHC: 17080 (Annex III) es va observar cariotips coincidents entre el cultiu curt i el cultiu llarg, i per la manca de l'estudi de seguiment no podem saber si el cariotip observat era degut a un mosaic generalitzat o be a un mosaic vertader fetal tipus VI. En el cas NHC: 26498 per manca de cariotip del cultiu curt, de l'estudi de seguiment i de la indicació de l'estudi, no podem saber l'origen del cariotip en mosaic, com tampoc podem saber si el mosaic observat en el cultiu llarg era degut a una contaminació materna.

4.1.4 Falsos diagnòstics positius i negatius en mostres prenatales

De les mostres analitzades s'ha observat 20 casos amb el diagnòstic potencialment fals quan realitzem el cultiu curt, 16 casos amb el diagnòstic potencialment fals quan realitzem el cultiu llarg i 5 casos quan realitzem ambdós cultius en paral·lel (Taula 4.10).

Si analitzem la distribució dels casos segons els falsos positius i els falsos negatius, observem 33 casos de diagnòstics falsos positius, i 8 casos de diagnòstics falsos negatius.

Taula 4.10: Nombre i percentatges de diagnòstics falsos per a cada cultiu cel·lular

	mostres analitzades	diagnòstics falsos	
	n.	n.	%
Cultiu curt	2164	20	0,9
positiu		12	0,6
negatiu		8	0,3
Cultiu llarg	2264	16	0,7
positiu		16	0,7
negatiu		0	0
Ambdós cultius	2146	5	0,2
positiu		5	0,2
negatiu		0	0

4.2. MOSTRES PROCEDENTS D'AVORTAMENTS

4.2.1. Rendiment de les tècniques de cultiu

De les 551 mostres rebudes d'avortaments espontanis, 510 casos aportaven mostra placentària (vellositats coriòniques –VCAV-), i en 328 es disposava de mostra fetal (Taula 4.11).

De les 510 mostres cultivades, en 445 mostres de vellositats coriòniques es va poder realitzar els dos cultius, i en 65 només un d'ells (56 casos només el llarg i en les 9 restants només el curt).

Taula 4.11: Descripció de mostres d'avortaments segons tipus de teixit i tipus de cultiu

DESCRIPCIÓ DELS CASOS CULTIVATS	n.
total mostres de vellositats coriòniques cultivades	510
cultius curts realitzats	454
cultius llargs realitzats	501
casos amb mostra de vellositats i també de restes fetals	328

El percentatge de no creixement en el cultiu curt és del 44%, el del cultiu llarg és 16,5%, el d'ambdós cultius és 11,9% i el dels cultiu de les restes fetals és 24,3% (Taula 4.12).

Taula 4.12: Distribució de mostres d'avortaments segons tipus de cultiu i de creixement obtingut

	mostres cultivades	no creixement	
	n.	n.	%
ambdós cultius	445	53	11,9
cultiu curt de vellositats	454	200	44
cultiu llarg de vellositats	501	83	16,5
cultiu restes fetals	328	80	24,3

De les 510 mostres de vellositats corioniques cultivades s'ha obtingut algun resultat citogenètic en 450 mostres (88,2%).

4.2.2. Resultats citogenètics en avortaments

Quan analitzem els resultats obtinguts, en 249 el resultat citogenètic fou anòmal, fet que representa un 55,3% dels casos.

En la Taula 4.13. es desglossa el tipus d'anomalia cromosòmica observada, sent les aneuploidies autosòmiques no comunes les més freqüents, les quals representen un 18% del total de les anomalies, seguides de les aneuploidies comunes detectades, que representen un 10,4%. Els mosaics en són un 7,8%.

Taula 4.13: Distribució segons l'alteració cromosòmica de les vellositats coriòniques d'avortaments

	n.	%
TOTAL mostres amb resultat	450	
TOTAL mostres amb anomalies cromosòmiques	249	55,3
Aneuploidies autosòmiques no comunes	81	18
Aneuploidies autosòmiques comunes	47	10,4
Mosaics	35	7,8
Aneuploidies cromosomes sexuals	32	7,2
Poliploidies	23	5,1
Anomalies estructurals desequilibrades	16	3,5
Alteracions múltiples	14	3,1
Anomalies estructurals equilibrades	1	0,2

En l'Annex IV es fa una descripció detallada de les anomalies trobades en els avortaments i en l'Annex V de tots els casos de cariotip en mosaic. L'aneuploïdia més freqüent és la trisomia 21 seguida de les trisomies dels cromosomes 15, 16, 18, i 22. Dels 23 casos amb un cariotip amb poliploïdia, 21 eren triploidies i dos casos tetraploidies en línia pura. Només s'ha observat un cas de tetraploïdia en mosaic, un MCP tipus II (Annex V).

De les 249 mostres amb resultat citogenètic anòmal tenim la informació de les setmanes de gestació de només 145 mostres, de les quals més d'un 95% corresponen a avortaments de primer trimestre. En la Taula 4.14 s'observa la distribució de les mostres que hem rebut la informació de les setmanes de gestació.

Taula 4.14: Distribució de les mostres amb anomalia segons les setmanes de gestació

	n.	%
TOTAL de mostres amb la informació	164	100
De la 5a a la 9a	120	73,1
De la 10a a la 14a	37	22,7
De la 15a a la 17a	5	3
Més enllà de la 18a	2	1,2

Tal i com s'observa en la Taula 4.15, les aneuploidies autosòmiques comunes són les aneuploidies que s'observen en setmanes de gestació més avançades i tenen un rang més ampli (de primer i segon trimestre). La resta d'aneuploidies tenen l'aparició més precoç i el rang més estret, i sempre al llarg del primer trimestre.

Taula 4.15: Nombre de mostres, mitjana i rang de les setmanes de gestació de les vellositats coriòniques d'avortaments amb resultat citogenètic anòmal

	n.	mitjana setmanes de gestació	rang
TOTAL de mostres amb la informació	164		de 5 a 25
Anomalia estructural desequilibrada	10	14,5	de 7 a 22
Marcador	1	16	16
Mosaics	17	9,8	de 7 a 12
Poliploidies	19	9,3	de 7 a 25
Alteracions múltiples	13	8,7	de 5 a 16
47,XXY	1	17	17
45,X	21	9,8	de 7 a 13
Monosomies autosòmiques	1	8	8
Trisomia 2	1	5	5
Trisomia 6	2	9	9
Trisomia 7	2	7,5	de 7 a 8
Trisomia 9	4	7,8	de 6 a 9
Trisomia 10	2	5	5
Trisomia 12	1	9	9
Trisomia 13	5	14	de 8 a 22
Trisomia 14	4	8,5	de 7 a 9
Trisomia 15	10	7,7	de 7 a 9
Trisomia 16	14	7,6	de 5 a 11
Trisomia 18	6	13,7	de 8 a 22
Trisomia 20	1	9	9
Trisomia 21	19	13,9	de 8 a 20
Trisomia 22	10	7,8	de 6 a 11

4.2.3 Mosaïcisme en avortaments

De les 249 mostres amb anomalies cromosòmiques, en 35 casos el resultat citogenètic va ésser en mosaic (7,8%).

En la Taula 4.16 es fa la descripció dels 35 casos que s'ha obtingut un resultat citogenètic en mosaic i en l'Annex V es detallen els resultats dels seus tres estudis citogenètics.

Taula 4.16: Distribució de les mostres d'avortaments amb cariotip en mosaic

	n.	%
TOTAL mostres amb resultat	450	
TOTAL resultats en mosaic	35	7,8
Mosaic generalitzat	0	0
Mosaics confinats	17	3,8
Mosaics rars	1	0,2
Falsos cariotips en mosaic	1	0,2
Mosaic indeterminat	16	3,6

Com il·lustra la Taula anterior, en 17 casos es van observar mosaics confinats, en 16 casos l'origen del cariotip en mosaic és indeterminat per manca d'informació, en un cas es va observar un cariotip en mosaic rar (translocació múltiple simultània), i en un cas un cariotip en fals mosaic per contaminació materna.

4.2.3.1 Mosaics confinats en avortaments

De les 17 mostres amb resultat citogenètic per mosaic confinat, només és possible classificar-ne 9, ja que de la resta no es té resultat d'un dels tres cultius. La distribució s'observa en la Taula 4.17. En 5 (55,6%) casos el mosaic va ser confinat a la placenta, en 3 (33,3%) van ser mosaics vertader fetal, i 1 cas (11,1%) va ser degut a un mosaic confinat al fetus, amb l'anomalia observada només al cultiu de les restes fetals.

Taula 4.17: Distribució de les mostres de VCAV segons el tipus de mosaic confinat

	n.	%
TOTAL mostres amb mosaics confinats	9	100
Mosaic confinat a la placenta	5	55,6
Tipus I	0	0
Tipus II	3	33,4
Tipus III	2	22,2
Mosaic vertader fetal	3	33,3
Tipus IV	0	0
Tipus V	2	22,2
Tipus VI	1	11,1
Mosaic confinat al fetus	1	11,1

Dels mosaics confinats en mostres d'avortaments, les aneuploidies no comunes són les anomalies més freqüents, sent els cromosomes implicats el 12, 14, 16, i 22 (Taula 4.18). S'ha observat un cas amb una aneuploïdia comuna, tractant-se d'una trisomia del cromosoma 18 en un MVF tipus V, i una aneuploïdia sexual (45,X) sense poder-se classificar. Les anomalies estructurals són totes desequilibrades i no hem observat cap cas amb un cromosoma marcador.

Taula 4.18: Distribució de les anomalies cromosòmiques en els mosaics confinats en avortaments

	n.	%
TOTAL mostres amb mosaics confinats	17	100
Aneuploidies autosòmiques no comunes	9	53,2
Alteracions múltiples	3	17,6
Anomalies estructurals	2	11,8
Aneuploidies de cromosomes sexuals	1	5,8
Poliploidies	1	5,8
Aneuploidies autosòmiques comunes	1	5,8

La distribució que tenen les diverses aneuploidies segons el tipus de mosaic confinat son: en el MCP tipus II s'ha observat una trisomia 12, en el MCP tipus III un cas d'una trisomia 16 i un altre de 22, en el MVF tipus V una trisomia 14 i una 18 i en el MVF tipus VI una trisomia del cromosoma 4. La resta de d'aneuploidies no es pot saber de quin tipus de mosaic confinat és ja que li falta l'estudi del tercer cultiu; son considerades inclassificables.

De tots els casos amb aneuploïdia o poliploïdia, només en 7 tenim la informació completa dels diversos teixits cel·lulars, i per tant, només d'aquests casos en podem establir el tipus de mosaic confinat. En la Taula 4.19 s'observa la distribució d'aquest casos, especificant el parell de cromosomes implicat en l'anomalia i el tipus de mosaic confinat.

Taula 4.19: Distribució dels casos amb mosaic confinat segons el parell de cromosomes implicat en les aneuploidies i el tipus de MCP

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	mar *	X 0*	p*
MCP I																									
MCP II												1													1
MCP III																1						1			
MVF IV														1				1							
MVF V																									
MVF VI				1																					

* mar: cromosoma marcador; XO: monosomia del cromosoma X; p: poliploidia

4.2.3.2 Translocació múltiple simultània

En el cas NHC: 20411 es va observar un cas de translocació múltiple simultània sent un cromosoma del parell 18 el dador i els cromosomes 13 i 15 com a receptors (NHC: 20411, Annex V).

4.2.3.3 Falsos cariotips en mosaic en avortaments

En el cas NHC: 5779 (Annex V) les cèl·lules maternes del cultiu llarg i del cultiu de les restes fetals van arribar a emascarar la totalitat del cariotip fetal, obtenint per tant un cariotip fetal de fals mosaic per contaminació materna.

4.2.3.4 Mosaics indeterminats

En el grup de mostres d'avortaments s'ha observat 12 casos de mosaics indeterminats. Com en els casos prenatals, per manca d'informació i d'estudis

complementaris, no podem saber si els mosaics observats poden ser degut a contaminacions maternes.

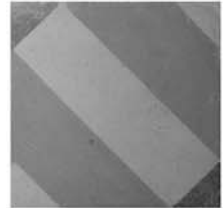
4.2.4 Falsos diagnòstics positius i negatius en avortaments

De les 450 mostres de VC d'avortaments analitzades s'ha observat 2 casos de falsos diagnòstics del cultiu curt, 3 casos del cultiu llarg i 3 casos d'ambdós cultius. Si analitzem els falsos positius i negatius, observem 5 casos de diagnòstics falsos positius i 3 casos de diagnòstics falsos negatius (Taula 4.20).

Taula 4.20: Nombre i percentatges de falsos diagnòstics per a cada cultiu cel·lular en mostres d'avortaments

	mostres analitzades	diagnòstics falsos	
	n.	n.	%
Cultiu curt	254	2	0,7
positiu		0	0
negatiu		2	0,7
Cultiu llarg	418	3	0,7
positiu		3	0,7
negatiu		0	0
Ambdós cultius	392	3	0,7
positiu		2	0,5
negatiu		1	0,2

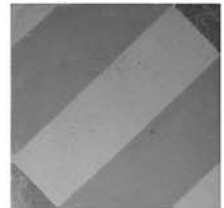
ÍNDEX



INTRODUCCIÓ



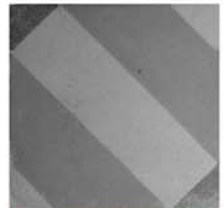
OBJECTIUS



MATERIAL I MÈTODES



RESULTATS



DISCUSSIÓ



CONCLUSIONS



BIBLIOGRAFIA



5. DISCUSSIÓ

5.1 VALORACIÓ DE L'EFICIÈNCIA DELS CULTIUS CEL·LULARS

El primer objectiu que ens vam plantejar va ser l'estudi de l'eficiència de la tècnica dels diversos cultius pels dos grups de mostres analitzades, mostres prenatales i mostres d'avortaments.

5.1.1 Eficiència dels cultius en vellositats per a estudis prenatales

D'aquest treball es desprèn que el percentatge de no-creixement cel·lular per a cada un dels dos tipus de cultiu (curt i llarg) és semblant (1,9 % i 1,6 %; Taula 4.2, Resultats, pàg. 100), i que si es fan tots dos cultius en paral·lel el percentatge dels casos sense resultat es redueix fins al 0,1 %, valors consonants amb els d'altres treballs publicats. (Taula 1.1, Introducció, pàg. 30)

En comparar els nostres resultats de no creixement per a cada tipus de cultiu amb els d'altres autors, es veu que els nostres són lleugerament més alts. L'èxit del creixement cel·lular, a més de l'experiència del laboratori, també depèn de les característiques de la mostra, és a dir, de la quantitat, la qualitat i el transport fins al laboratori. En la nostra sèrie, el 50 % dels casos sense creixement cel·lular provenen d'un mateix centre emissor. Si descartéssim aquestes mostres, el percentatge de no creixement del cultiu curt baixaria fins a un 1,2 % i el del llarg fins a un 1 %. Sospitem problemes de toxicitat ambiental o bé de transport inadequat com a responsables de l'elevat percentatge de cultius en els quals no es va obtenir metafases (evidentment es van fer alguns suggeriments per tal de solucionar el problema).

El present treball recull dades de mostres procedents de diversos centres emissors, fet que comporta una diversitat significativa en les condicions d'obtenció. Els

laboratoris amb els valors més baixos (Van den Berg *et al.*, 2000; Tze Kin *et al.*, 2005; Soler *et al.*, 2008) reben la majoria de les mostres d'un únic centre.

A mercè dels nostres resultats, podem dir que l'eficiència de les tècniques de cultiu de VC en diagnòstic prenatal és comparable als valors publicats per altres autors, i semblant als valors d'eficiència de cultiu de mostres de líquid amniòtic, de manera que la podem ratificar com una bona estratègia en diagnòstic prenatal.

Atès que el laboratori de diagnòstic prenatal té l'obligació d'obtenir la màxima informació genètica de cada mostra que rep, i atès que quan una embarassada se sotmet a una prova invasiva assumeix un risc d'avortament induït per la tècnica, creiem que l'estratègia més adequada és realitzar els dos cultius en paral·lel, per tal d'assegurar el resultat citogenètic.

En el supòsit que la quantitat de la mostra sigui molt petita, els protocols europeus de l'ECA (2012) suggereixen, segons la indicació, escollir entre un cultiu o altre. Una nova estratègia plantejada per a aquests casos és la descrita per Barranco *et al.* (2011), on es recomana realitzar un estudi de QF-PCR amb un petit fragment de mostra, de tal manera que, en un breu període de temps, es pogués obtenir el resultat si més no de les anomalies més freqüents.

5.1.2 Eficiència dels cultius en mostres procedents d'avortaments

Quan analitzem la incidència de no creixement dels tres cultius cel·lulars d'avortaments, observem que el que té més garanties de creixement és el cultiu llarg de les vellositats, seguit del cultiu de les restes fetals i, en darrer lloc, del cultiu curt. (Taula 4.10, Resultats, pàg. 113) El percentatge de no creixement del cultiu curt està directament relacionat amb l'estat de maceració de la mostra. Les mostres de les restes avortives sovint es troben tan degradades a causa del lapse transcorregut des de la mort fetal que el cultiu curt de les vellositats dels avortaments té menys possibilitats d'èxit. Les metafases que s'analitzen en el cultiu curt esdevenen de les divisions espontànies del citotrofoblast, teixit perifèric en les

protuberàncies de les vellositats i sensible a les variacions ambientals (toxicitats ambientals, maceració de la mostra...).

Al comparar els nostres resultats amb els d'altres autors (Taula 1.14, Introducció, pàg. 67) observem, sobretot, diferències atribuïbles a la variació en l'obtenció de les mostres. Sánchez *et al.* (1999), Ribas (2002), Khare *et al.* (2005) i Morales *et al.* (2007) tenen un percentatge més alt d'èxit de cultiu, ja que obtenen les mostres de biòpsies de còrion realitzades abans de l'expulsió. A més, en aquests quatre treballs les mostres provenen d'un únic centre emissor, amb idèntiques condicions d'emmagatzematge i de transport. Com en les mostres prenatales, en el nostre treball, les mostres provenen de diversos centres emissors i no hem tingut accés a informació sobre la tècnica emprada per a la seva obtenció, malgrat que, per l'aspecte macroscòpic, creiem que les mostres s'obtenen, en la majoria dels casos, de material biològic expulsat.

El percentatge de no creixement del cultiu llarg de les vellositats del nostre treball (16,5 %) està dins dels marges dels percentatges observats en els treballs consultats (del 0 % de Khare *et al.*, 2005, al 25 % de Diego-Álvarez *et al.*, 2008).

A Anglaterra, país amb una llarga experiència en estudis d'avortaments, en els casos en què hi ha mort fetal s'aconsella a la parella realitzar un cariotip fetal que, generalment, es fa mitjançant una amniocentesi o bé una biòpsia de còrion prenatal, o si no mitjançant una biòpsia de pell després de l'expulsió. Al treball presentat per Khare *et al.* (2005) es comparen els resultats citogenètics d'aquests tres teixits fetals i s'hi observa que el percentatge de no creixement de les mostres prenatales és d'un 10 % pel cultiu curt, d'un 0 % pel llarg i d'un 86,5 % pel tercer cultiu. Aquests autors atribueixen el baix èxit de creixement del cultiu fetal a una recol·lecció de la mostra poc apropiada, a una mala conservació de la mostra i als canvis fisiològics (maceració) que aquesta pateix durant el període transcorregut entre la interrupció de la gestació i l'extracció prenatal.

Davant la possibilitat de no resultat per manca de creixement cel·lular, alguns autors suggereixen l'aplicació de noves tecnologies a les quals no influencii l'estat fisiològic de la mostra: CGH (Lomax *et al.*, 2000; i Fritz *et al.*, 2001), FISH (Jobanputra V. *et al.*, 2002; Lebedev *et al.*, 2004 i Vorsanova *et al.*, 2005) i MLPA (Diego-Álvarez D. *et al.*, 2007). Amb tot, tal i com comenten Morales *et al.* (2007) i Shearer *et al.* (2011), aquestes tècniques són limitades i no permeten descobrir moltes de les anomalies que usualment s'observen en els avortaments.

Diego-Álvarez *et al.* (2008) proposa, per tal d'assegurar un resultat genètic a les parelles que han sofert un avortament, que una bona estratègia seria aplicar en primera instància estudis citogenètics de restes placentàries i fetals, i, si no s'obtingués cap cariotip, aplicar les altres tècniques diagnòstiques. El fet d'emprar tècniques que no depenen del cultiu cel·lular ni d'una gran quantitat de mostra permet assegurar un resultat genètic, malgrat que no permet obtenir el cariotip sencer.

Un altre factor que pot influir al fet de no obtenir un resultat citogenètic del cultiu curt és l'edat gestacional. Brun *et al.* (2003) exposen que l'índex mitòtic del citotrofoblast decreix amb les setmanes de gestació i que la tècnica usada és la idònia, sobretot, per a mostres de primer trimestre.

Els controls de qualitat externs recomanen que, en tots els casos en els quals es realitza una interrupció legal de l'embaràs per la detecció d'una anomalia cromosòmica en el fetus, es realitzi un estudi citogenètic de les restes fetals.

Aquesta pràctica no està massa extesa encara en el nostre país, perquè té un significatiu cost econòmic afegit, i són pocs els centres d'obstetrícia que tenen establert com a protocol sol·licitar aquesta mena d'estudis.

Així doncs, en els casos d'avortaments i per tal de poder assegurar un resultat genètic que detecti el màxim d'anomalies cromosòmiques, és recomanable realitzar el cariotip dels tres cultius cel·lulars.

5.1.3 Comparació de l'eficiència dels cultius cel·lulars dels dos grups

Com era d'esperar, els cultius de les mostres prenatales rendeixen més que els cultius de les mostres d'avortaments. A més, en els dos grups de mostres, la tècnica del cultiu curt és la que té menys eficiència (Taula 5.1), atès que les cèl·lules estan menys protegides de les variacions ambientals, mentre que les cèl·lules del mesènquima, que s'estudien en el cultiu llarg, estan més protegides perquè es localitzen dins l'estroma.

Taula 5.1: Percentatge de no creixement dels diferents cultius cel·lulars pels dos grups de mostres analitzades

	vellositats prenatales	vellositats d'avortaments
	%	%
ambdós cultius	0,1	11,9
cultiu curt de vellositats	1,9	44
cultiu llarg de vellositats	1,6	16,5

5.2 RESULTATS CITOGENÈTICS

El segon objectiu plantejat era l'anàlisi de les anomalies cromosòmiques detectades en cada grup de mostres.

5.2.1 Anomalies cromosòmiques en mostres prenatales

El percentatge d'anomalies cromosòmiques observades en els diversos treballs consultats oscil·len entre un 3,4 % de la sèrie de Ledbetter *et al.* (1992) i un 12,8 %

de la de Grati *et al.* (2006) (Taula 1.2, Introducció, pàg. 31), mentre que en el nostre cas és del 10,6 % (Taula 4.3, Resultats, pàg. 101).

La distribució dels resultats citogenètics coincideix amb els de les dues sèries més àmplies observades (Ledbetter *et al.*, 1992; i ACC, 1994), en què les anomalies cromosòmiques més freqüents són les aneuploidies comunes, seguides de les aneuploidies dels cromosomes sexuals, i de les anomalies estructurals. El percentatge d'anomalies cromosòmiques en mosaic és més elevat que el dels treballs consultats, ja que en el nostre treball hem considerat com a resultat en mosaic totes les modalitats de mosaïcisme esmentades.

Com més parelles de risc alt participen en la sèrie, més elevat ha de ser el percentatge d'anomalies cromosòmiques detectades (Soler *et al.*, 2008). Una altra manera de veure-ho és observant el nombre de casos que tenen la indicació *angoixa*: com més alt és aquest valor, més baix ha de ser el percentatge d'anomalies cromosòmiques. Així, en la sèrie de l'ACC (1997), el percentatge d'anomalies cromosòmiques és del 6,7 % i el de la indicació d'*angoixa* correspon "només" a un 1,3 % dels casos, mentre que en el treball de Míguez (2001) el percentatge d'anomalies és del 3,7 % i el de la indicació *angoixa* és d'un 40,5 %.

De totes maneres, aquestes dades són difícils de comparar, perquè els criteris de risc varien amb el temps. Per exemple, el paràmetre *edat materna* ha anat evolucionant al llarg dels anys, de manera que, a l'inici de la sèrie (anys noranta) es considerava una gestació d'alt risc quan l'embarassada tenia més de 35 anys, però a partir de la implantació del cribratge bioquímic de segon trimestre, des de l'any 2000, es va desplaçar aquest llindar fins als 38 anys, i ja a l'any 2009 a Catalunya, amb la implantació del cribratge bioquímic combinat o de primer trimestre, el supòsit d'*edat materna* desapareix. D'una manera semblant, el valor de tall per tal de considerar una parella de risc alt com a resultat del cribratge bioquímic és en l'actualitat d'1/250 en lloc d'1/270, com havia estat anteriorment.

Però no només el nombre, sinó també la distribució de les anomalies cromosòmiques depèn de les indicacions per les quals es realitzen. Per exemple les alteracions estructurals, en sèries com la de Ledbetter *et al.* (1992) o la del grup ACC (1994), tenen una presència més elevada que en el nostre treball. Les mostres de l'ACC provenen de centres públics d'Anglaterra, on les embarassades han de tenir un risc elevat per sotmetre's a una biòpsia de còrion, ja que en aquell país no és possible fer una biòpsia de còrion en la sanitat pública amb la indicació d'*angoixa*.

Com que no tots els treballs publicats descriuen les indicacions per les quals es fan els estudis citogenètics prenats, es fa difícil abordar-ho d'una manera més acurada.

Un altre factor relacionat amb la incidència i distribució de les anomalies cromosòmiques en VC són les tècniques de cultiu emprades. Si no es realitzen les dues tècniques de cultiu, una part dels mosaics confinats no es detectaran, i per tant el percentatge de mosaics i de retruc el nombre d'anomalies cromosòmiques serà més baix.

Podem concloure que el nombre d'anomalies cromosòmiques detectades és similar als valors dels treballs publicats i que, com en tots els treballs consultats, les anomalies cromosòmiques més freqüents són les aneuploidies comunes.

A més, alguns paràmetres com el supòsit pel qual es fa l'estudi i les tècniques de cultiu emprades poden aportar variacions en els resultats i la distribució de les anomalies cromosòmiques.

5.2.2 Anomalies cromosòmiques en avortaments

En avortaments, la incidència d'anomalies cromosòmiques oscil·la entre un 40 % (Warburton *et al.*, 1991) i un 80 % (Morales *et al.*, 2007) (Taula 1.15, Introducció, pàg. 68), que en el nostre cas és del 55,3 %. (Taula 4.11, Resultats, pàg. 114)

Les aneuploidies no comunes són les anomalies cromosòmiques més freqüents en aquesta mena de mostres, tant en la nostra sèrie com en les publicacions consultades. Per a la resta d'anomalies llur incidència canvia segons cada estudi, i aquestes diferències poden ser degudes, com en les mostres prenatales, a les tècniques de cultiu emprades. I com també s'observa en el grup de mostres prenatales, el percentatge d'anomalies cromosòmiques en mosaic és més elevat.

La incidència d'anomalies cromosòmiques en avortaments també està relacionada amb l'edat gestacional de les mostres. Els resultats presents en aquest estudi se sumen a les dades d'altres autors (Eiben *et al.*, 1990; i Gardner *et al.*, 2012), en què, a mesura que augmenten les setmanes de gestació, la possibilitat de trobar una anomalia cromosòmica és menor. (Taula 4.12, Resultats, pàg. 114)

Curiosament, l'edat gestacional en què es produeix l'avortament espontani està, també, estretament relacionada amb el tipus d'anomalia cromosòmica i el parell de cromosomes implicats. En el treball de Nagaishi *et al.* (2004) les trisomies dels cromosomes 7, 8, 14, 15, 16 i 22 s'observen més freqüentment durant el primer trimestre, la trisomia 18 s'observa en avortaments entre l'11a i la 18a setmanes de gestació, i els avortaments més tardans presenten trisomies dels cromosomes 9, 13, 18 i 21, monosomia de l'X, i també triploidies. Aquesta distribució també s'observa en els nostres resultats. (Taula 4.13, Resultats, pàg. 115)

És difícil establir una correlació absoluta entre les setmanes de gestació de l'avortament i el tipus d'anomalia que s'observa, ja que, tal i com suggereix Warburton *et al.* (1991), hi pot haver un retard de l'expulsió de la gestació si el fetus queda retingut. No obstant això, els treballs semblen coincidir en que les aneuploidies comunes i la monosomia de l'X, per ser les més viables, tenen un més llarg rang d'aparició i es poden detectar en gestacions amb més evolució.

Dels nostres resultats i de la bibliografia consultada es desprèn que les anomalies cromosòmiques són la causa d'interrupció de la gestació en més del 50 % dels casos

d'avortament, i que són les aneuploidies no comunes les anomalies cromosòmiques que més freqüentment es poden observar.

A mesura que augmenten les setmanes de gestació, el nombre d'anomalies cromosòmiques observades en els estudis citogenètics decreix verificant un procés de selecció. El rang de setmanes de gestació de les mostres en les quals s'ha observat una anomalia cromosòmica és més gran en les aneuploidies comunes que en les no comunes.

5.2.3 Comparació de les anomalies cromosòmiques entre els dos grups

La incidència d'anomalies cromosòmiques en avortaments és més alta (en concret del 55,3 % *versus* el 10,6 %), i quan detectem un resultat anòmal en una mostra de VC, tant si és d'una gestació en curs com d'una gestació interrompuda, el més probable és que aquesta sigui una aneuploïdia.

La distribució de les anomalies cromosòmiques entre el grup prenatal i el grup d'avortaments es mostra a la Taula 5.2. Com és d'esperar les anomalies no viables (aneuploidies no comunes, anomalies estructurals desequilibrades, les poliploidies i els casos amb alteracions múltiples) són més freqüents en les mostres d'avortaments que en les prenatales; mentre que les anomalies viables (les aneuploidies comunes, els mosaics i les anomalies estructurals equilibrades) són més freqüents en les mostres prenatales. Les aneuploidies dels cromosomes sexuals tenen percentatges semblants en els dos grups, excepte els casos de monosomia de l'X molt freqüent en avortaments espontanis (en el nostre treball 6 % en el grup prenatal i 12 % en el grup d'avortaments). D'alguna manera aquesta distribució ens indica la viabilitat de l'anomalia cromosòmica. Totes aquelles anomalies que generalment van associades a un fenotip més alterat són més freqüents en el grup d'avortaments i sobretot durant el primer trimestre.

El percentatge de mosaics observats en les mostres prenatales és més del doble en les mostres d'avortaments. Aquesta diferència podria explicar-se també perquè els

cultius d'avortaments són més difícils i el nombre de metafases analitzades generalment és menor; per tant, es fa més fàcil que s'escapin de la detecció (Phillips *et al.*, 1996).

Taula 5.2: Estudi comparatiu de la distribució d'alteracions cromosòmiques

	prenatal		avortament	
	n.	%	n.	%
TOTALS	250	100	249	100
Aneuploidies autosòmiques comunes	127	50,8	47	18,8
Aneuploidies autosòmiques no comunes	3	1,2	81	32,6
Aneuploidies en cromosomes sexuals	23	9,2	32	12,8
Anomalies estructurals equilibrades	12	4,8	1	0,4
Anomalies estructurals desequilibrades	6	2,4	16	6,4
Poliploidies	3	1,2	23	9,3
Alteracions múltiples	2	0,8	14	5,7
Mosaics	74	29,6	35	14

La presència majoritària de les anomalies estructurals equilibrades en el grup de mostres prenatals fa entendre que aquestes no són letals, malgrat que s'hagi descrit algun cas d'anomalia estructural equilibrada que ha provocat efectes clínics adversos (tot i que aquests podrien ser originats per una possible associació amb una disomia uniparental o bé per alguna mutació puntual) (Berend *et al.*, 2000).

5.3. MOSAICISMES CROMOSÒMICS

El tercer objectiu plantejat era analitzar les diverses modalitats de cariotips en mosaic, tant de vellositats procedents de gestacions en curs com de mostres d'avortaments.

Hem estudiat els cariotips en mosaic en quatre blocs diferents: els mosaics generalitzats, els mosaics confinats, els falsos cariotips en mosaic i els cariotips en mosaic rar (els bessons reabsorbits o les *jumping translocations*).

És essencial de cara a la interpretació clínica del cariotip fetal conèixer i distingir les diverses modalitats de mosaics de cara a un consell genètic posterior. Segons el seu origen, les conseqüències en el fenotip poden ser diverses.

El percentatge de mosaïcisme en el nostre treball és més elevat que el dels treballs consultats, perquè hem considerat com a cariotip en mosaic totes les diverses modalitats de mosaics. Ara bé, quan analitzem cada mena de mosaic per separat, el seu percentatge està en consonància amb els valors publicats.

De les publicacions consultades, són pocs els treballs que analitzin els mosaics en avortaments, i menys encara que els diferenciïn. El problema rau en el fet que són pocs els centres que facin l'estudi citogenètic complert (tres cultius).

5.3.1 Mosaics generalitzats

Perquè es consideri un mosaic com a *generalitzat*, en l'estudi citogenètic hem d'observar un cariotip en mosaic en els tres cultius, en el cultiu curt i el llarg de les vellositats i també en l'estudi del cultiu dels teixits fetals.

Els mosaics generalitzats sovint es generarien a l'inici del desenvolupament embrionari abans de l'estadi de mòrula, ja que les diverses línies cel·lulars del mosaic han de ser presents tant en els teixits que deriven de la MCI com de la MCE.

La freqüència dels mosaics generalitzats en les series observades és sempre molt baix, per sota del 0,3 %, i en el nostre treball també és així (0,1 %). I pel que fa a les mostres d'avortaments, el percentatge de mosaïcisme generalitzat és zero.

5.3.2 Mosaics confinats

Els mosaics confinats són aquells que estan localitzats en un teixit concret i que es diferencien dels generalitzats perquè no s'observen com a cariotips en mosaic a tots els teixits.

De les diverses modalitats de cariotips en mosaic que estem estudiant, els mosaics confinats són la més freqüent, tant en mostres prenatales com en avortaments. La incidència d'aquests en el nostre treball és lleugerament més alta que els valors observats en altres sèries (Ledbetter *et al.*, 1992; i ACC, 1994). Així mateix, la proporció entre MCP:MVF en el nostre estudi és de 2:1 i en els altres és de 5:1. Aquests resultats s'explicarien perquè en el nostre treball el nombre de mostres de tipus VI és molt més elevat que en les sèries consultades, ja que en aquest grup hem inclòs casos que podrien correspondre a contaminació materna però que no ho hem pogut comprovar per manca d'estudis moleculars.

Les anomalies cromosòmiques que s'observen en major grau en els mosaics confinats, tant en les mostres prenatales com en les mostres d'avortaments, són les aneuploidies autosòmiques. I també és així en la bibliografia consultada (Kalousek *et al.*, 1992; Phillips *et al.*, 1996; Golberg *et al.*, 1997; i Grati *et al.*, 2006).

Pel que fa a les anomalies cromosòmiques i el parell de cromosomes implicats en cada tipus de MCP, segueix unes pautes de distribució específiques relacionades amb la viabilitat de l'anomalia cromosòmica. Segons Wolstenholme (1996), Lestou *et al.* (1998) i Toutain *et al.* (2010) aquesta distribució no a l'atzar del parell de cromosomes es pot atribuir a una selecció a favor o en contra, o bé a una intolerància per unes cèl·lules en particular.

A més, també hi ha un patró de comportament del parell de cromosomes respecte de l'origen embrionari de l'aneuploïdia (Robinson *et al.* 1995, 1997 i 1999). Wolstenholme, l'any 1996, descriu una fórmula matemàtica per tal de poder calcular l'esperat nombre de casos amb anomalies d'origen somàtic o meiòtic.

A la Taula 5.3 es fa un resum dels possibles patrons de comportament dels parells de cromosomes implicats en les aneuploidies segons el llinatge cel·lulars on es localitzen més freqüentment (segons el tipus de MCP que són) i l'origen embrionari que tenen, comparant els resultats obtinguts en aquest estudi amb els d'altres sèries publicades de diagnòstics prenatals.

Taula. 5.3: Patrons de comportament de les trisomies: origen de formació i tipus de mosaic confinat

*	Robinson <i>et al.</i> 1995, 1997 i 1999	Wolstenholme, 1996	Lestou <i>et al.</i> , 1998	Grati <i>et al.</i> , 2006	Toutain <i>et al.</i> , 2010	Treball actual, 2012
2	MITÒTIC/MEIÒTIC	II	II	II	II>III	II
3		I	I	I		
7	MITÒTIC/MEIÒTIC	I = II	I = II	I = II	II>III	II
8	MITÒTIC/MEIÒTIC	II	I = II	I = II	III>II	II
9	MEIÒTIC	I = II	I = II	I = II	III>II	
10	MITÒTIC			I = II		I
12	MITÒTIC		II	I		II
13	MEIÒTIC		I>II>III	I=II=III		II
15	MEIÒTIC		III>I	I	II = III	
16	MEIÒTIC	III	III	I = II	III>>II	I = VI
18	MEIÒTIC		I=II=III	I=II>V=VI		VI>II
20			I>III	II = III		II
21	MEIÒTIC		I>II	II>V=I=VI		VI>I=II
22	MEIÒTIC	III	II	III	III>>II	

* parell de cromosomes

Les nostres dades coincideixen amb les dels autors consultats (Robinson *et al.* 1995, 1997, 1999; Wolstenholme, 1996; Lestou *et al.* 1998; i Toutain *et al.*, 2010) en la distribució de les trisomies 2, 7, 8, 12, 13, 18 i 21, i probablement la causa per la qual no se'ns confirmen la resta de dades és perquè la mostra és més petita.

És d'esperar que les anomalies d'origen mitòtic, com que són postzigòtiques, tinguin una influència en el desenvolupament gestacional més lleu que les que tenen un origen prezigòtic. Les d'origen postzigòtic afectaran a menys teixits fetals i com que es generen més tardanament afectaran un nombre de cèl·lules menor, i per tant seran de més bon pronòstic. Per contra, les anomalies d'origen meiótic, com que són més primerenques, poden afectar a més diversitat de teixits fetals i a un nombre de cèl·lules més gran, i per tant tindran més mal pronòstic.

És per tot això que en les gestacions en curs observem les aneuploidies no-comunes i no-viables preferentment en un dels dos teixits extraembrionaris (MCP tipus I o II) i les aneuploidies comunes i viables en els dos teixits extraembrionaris (MCP tipus III) o bé en els teixits fetals (MVF). Per contra, en les gestacions interrompudes, s'observa una tendència a localitzar les aneuploidies no-comunes en teixits fetals. No obstant això, seria necessari incrementar el nombre d'estudis d'avortaments amb mosaics confinats per tal de poder confirmar la tendència observada. Com ja s'ha comentat anteriorment només hem trobat un article en la bibliografia consultada que parla de mosaics confinats en avortaments (Kalousek *et al.*, 1992) amb un nombre de mostres també molt baix.

Observant les nostres dades i les de Hahnemann (1997b), Grati *et al.* (2006) i Holgado *et al.* (2011) de les aneuploidies comunes, la que més freqüentment observem com a MVF són la trisomia 21 i les aneuploidies dels cromosomes sexuals, ja que són les anomalies cromosòmiques més viables.

Així doncs, el pronòstic d'una gestació en curs amb un mosaic confinat depèn de varis factors interrelacionats, tals com l'anomalia cromosòmica, el parell de cromosomes implicat en l'anomalia, l'origen cel·lular de les noves línies, la seva distribució en els diversos llinatges cel·lulars, i el percentatge de cèl·lules de cada línia. Tots aquests factors actuen a la vegada fent complex i difícil l'assessorament genètic.

Una de les fonts d'informació més completes sobre el possible fenotip dels mosaics confinats és el lloc web de Robinson *et al.* (www.medgen.ubc.ca/robinsonlab/mosaic/specific.htm). En el recull de Wolstenholme *et al.* (2006) (www.ncl.ac.uk/cvs/) hi ha els treballs publicats des dels anys 1990 fins a mitjans del 2000, que especifiquen les tècniques de cultiu emprades, els estudis de seguiment utilitzats i la resolució final de la gestació.

5.3.3 Mosaics rars

Altres tipus de cariotips en mosaic s'originen per bessons reabsorbits i per casos de *jumping translocations*. Aquestes dues modalitats de cariotips en mosaic els hem titulat com a *mosaics rars* a causa de la seva baixa freqüència, no perquè siguin menys importants.

En la sèrie presentada per l'associació anglesa ACC (1996), de 7.595 casos de vellositats coriòniques, s'observen tres possibles casos de bessons reabsorbits; un cas amb resultat 46,XX en el cultiu curt i 46,XY en el cultiu llarg, i dos casos més amb resultat 46,XX en el cultiu curt i 46,XX/46,XY en el llarg, talment com el nostre primer cas descrit. Si el fetus XY s'hagués observat en el cultiu curt i el fetus XX en el llarg, aquests casos podrien ser confosos per una contaminació materna.

També pot donar-se la situació que en una de les línies cel·lulars s'observi un cariotip anòmal i en l'altra el cariotip sigui normal, com en el segon cas descrit i com en el presentat per Lewi *et al.* (2006).

Per poder detectar aquesta modalitat de mosaics és essencial la realització dels dos cultius cel·lulars curt i llarg en paral·lel, i posteriorment, si fos necessari, fer estudis moleculars per determinar el perfil genètic i distingir els diferents individus. Els marcadors moleculars seran idèntics si el mosaic ha aparegut a causa d'una mala segregació per no-disjunció, mentre que en el cas de bessons reabsorbits dizigòtics hi haurà menys d'un 25 % de possibilitats que els marcadors siguin idèntics (Reddy *et al.*, 1991).

Una altra modalitat de cariotip en mosaic són les translocacions múltiples simultànies o *jumping translocations*, en les quals s'observen diverses translocacions, que tenen en comú un cromosoma dador i diversos cromosomes receptors.

L'únic cas de *jumping translocation* que hem trobat és en una mostra d'avortament. Es tracta d'una translocació en la qual el cromosoma 18 és el dador amb els cromosomes 13 i 15 com a cromosomes receptors. En la revisió bibliogràfica hem observat que, dels cromosomes no acrocèntrics, és el parell 18 el cromosoma més freqüent que participa en aquestes reorganitzacions (Edwards *et al.*, 2008). A més, el cromosoma 18 té un nombre elevat de seqüències repetitives que poden ser susceptibles de reorganitzacions intra i intercromosòmiques (De Pater *et al.*, 2008).

Aquestes reorganitzacions, atesa la complexitat cromosòmica que generen, no són compatibles amb la vida i generalment només s'observen en avortaments (Dunn *et al.*, 2000) o bé en casos de neoplàsies. Tal i com suggereix Reddy (2010) quan s'observa una reorganització cromosòmica d'aquest tipus s'aconsella estudiar tants teixits fetals com es pugui, biòpsia de còrion (cultiu curt i llarg), amniocentesi i sang fetal. El consell genètic en aquests casos és complicat, l'efecte que les reorganitzacions poden exercir sobre la gestació són variades depenent del moment del desenvolupament en que s'han produït les translocacions, dels parells de cromosomes que participen i dels teixits fetals que ha afectat.

5.3.4 Falsos cariotips en mosaic

La contaminació de cèl·lules maternes, com ja s'ha comentat en la introducció, és un dels desavantatges que té el cultiu llarg o el cultiu de les restes fetals *versus* el cultiu curt. Ambdós provenen d'un cultiu primari. Per aquesta raó és aconsellable que el cultiu llarg vagi acompanyat d'un cultiu curt per tal de ratificar-ne el resultat. En el cultiu curt les cèl·lules maternes contaminants no tenen temps de

proliferar. Alguns autors com Barranco *et al* (2011) proposen substituir l'estudi del cultiu curt per la tècnica de QF-PCR. Aquesta tècnica permet la detecció de mostres amb contaminació materna sempre que es pugui comparar amb el perfil genètic matern. Cal recordar, però, que la tècnica de la QF-PCR és una tècnica dirigida i, per tant, menys informativa que el cariotip sencer. Així, en l'article de Barranco *et al* (2011) un 1,8 % de les anomalies cromosòmiques no es detecten per limitacions tècniques, de les quals un 1,2 % tenien conseqüències pel fetus.

El percentatge de contaminació materna en el nostre treball és baix, tant per les mostres prenatales com per les mostres procedents d'avortaments, i els resultats obtinguts estan en la línia dels publicats. Seria d'esperar que el percentatge fos més alt pel segon grup, ja que generalment aquestes mostres arriben al laboratori brutes i macerades, i són difícils de seleccionar.

Seguint l'estratègia proposada per la normativa de l'ECA (2012) per a la detecció de contaminacions maternes en cultius primaris, si la mostra ho permet es realitza més d'un cultiu llarg.

Quan comparem aquests resultats amb el percentatge de contaminació materna de mostres procedents de líquid amniòtic, observem que és semblant, perquè en una sèrie anterior realitzada en el mateix laboratori, de 3.588 mostres de líquid amniòtic, el percentatge de contaminació materna era d'un 0,4 % (Cuatrecasas *et al.*, 1996).

Atès que el risc de contaminació materna pel cultiu curt tant en les mostres prenatales com en les avortives és zero i que el risc de contaminació materna pel cultiu llarg és quasi inexistent, es conclou que la utilització de les dues tècniques en paral·lel minimitza per una banda el risc que es produeixi contaminació materna, i per altra banda, el risc que si s'ha produït passi desapercebuda.

Quant a la utilització de tècniques dirigides, la contaminació materna és un problema laboriós. Amb la tècnica de QF-PCR es pot detectar si es compara el DNA fetal amb el DNA matern. Amb la tècnica de CGH-Arrays en fetus masculí si la contaminació materna no és superior al 25-30% (lindar de visualització de mosaics) no es podria sospitar i amb Array de SNPs es podria intuir si es detecta un desbalanç en la dosi d'al·lels. Amb la tècnica de FISH si el fetus és masculí es podria sospitar fàcilment, i si és femení és impossible. En totes les tècniques és de gran ajuda saber el sexe fetal previ a l'estudi. Jobanputra *et al.* (2011) proposen un protocol per a les mostres d'avortaments per tal de detectar les possibles contaminacions maternes, quan s'estudien amb FISH. A més de ser un protocol laboriós, encareix significativament l'anàlisi genètica.

Una altra modalitat de cariotip en mosaic són els artefactes de cultiu a causa del creixement *in vitro* d'una nova línia cel·lular. Per tal de poder distingir entre un mosaic vertader i un pseudomosaic, l'ECA (2012) proposa, quan hi ha prou quantitat de mostra, realitzar dos cultius llargs en paral·lel.

La majoria de vegades, la nova línia cel·lular que es crea *in vitro* és amb una anomalia estructural (Wolstenholme *et al.*, 1994), tal i com s'observa en el nostre treball. El fet de realitzar les dues tècniques de cultiu en paral·lel ajuda a poder distingir aquesta modalitat de cariotip en mosaic d'origen *in vitro*.

Una altra modalitat són els cariotips en mosaic per limitacions de la tècnica. El fet que una anomalia cromosòmica no s'observi per limitacions tècniques pot donar un resultat fetal en mosaic.

A causa de la curta llargària dels cromosomes del cultiu curt, pot ser que algunes anomalies estructurals no s'observin. El fet de realitzar les dues tècniques de cultiu en paral·lel fa posar de manifest la discrepància i permet posteriorment fer una revisió del material analitzat.

Cada una de les tècniques que utilitzem té unes limitacions tècniques *per se*. Aquestes limitacions, que estan ben definides per l'ACC descriuen que els cromosomes que s'observen després d'un cultiu curt de vellositats coriòniques generalment tinguin un nivell de resolució d'unes 150 bjh (bandes joc haploid). Contràriament, els cromosomes que s'observen en el cultiu llarg acostumen a tenir la mateixa llargària que els cromosomes que s'obtenen dels cultius de líquid amniòtic, d'unes 400 bjh.

Si la llargària dels cromosomes obtinguts no arriba a la necessària i no es detecta cap anomalia cromosòmica, l'ECA (2012) recomana que es comentï en l'informe però sense encoratjar la parella de realitzar una altra prova invasiva.

5.4 DIAGNÒSTICS FALS POSITIU I FALS NEGATIU

El primer treball publicat que presentava el risc potencial d'un diagnòstic fals positiu o negatiu pel cultiu curt és el de Simoni *et al.* de l'any 1992, amb el risc de fals positiu de cultiu curt d'un 1/100 i el risc de fals negatiu d'un 0,05%. Aquests valors no han variat gaire des de llavors: en treballs publicats més recentment oscil·len entre un 0,1 % i un 0,8 % el fals positiu, i entre un 0,01 % i un 0,4 % el fals negatiu.

Pel cultiu llarg els valors en general són inferiors, pel fals positiu és de 0,05 % a 0,5 % i pel fals negatiu a la revisió bibliogràfica només hem trobat els dos casos descrits per Grati *et al.* (2006), ambdós de mosaic amb un cromosoma marcador extra.

Pels cultius llarg i curt en paral·lel, els valors encara baixen més: pel fals positiu varia entre el 0,03 % i el 0,16 % i pel fals negatiu, entre el 0,02 % i el 0,08 %.

El valor dels falsos positius en tots els procediments (cultiu curt, cultiu llarg i ambdós cultius) sempre és una mica més elevat que el dels falsos negatius, ja que

poden aparèixer a causa d'errors mitòtics, freqüents en teixits placentaris (sobretot en el trofoblast), i també per errors meiòtics. El rescat de l'anomalia pot ser tant en fetus com en placenta, encara que per a la gestació és més favorable que el fetus quedi amb el cariotip normal.

En canvi, és menys probable que es generin els falsos negatius, ja que impliquen dos errors consecutius: en primer lloc hi ha d'haver hagut un error meiòtic i en segon lloc s'ha d'haver produït un rescat de l'anomalia (error mitòtic).

En el nostre treball, malgrat que els resultats estan dins de tots els valors publicats, el percentatge de falsos positius del cultiu llarg és lleugerament més alt, ja que hem comptabilitzat tots els possibles casos de contaminació materna. També s'ha observat que el percentatge de falsos negatius del cultiu curt és dels més elevats en comparació amb els treballs publicats, a causa que hi hem sumat tots els casos de falsos cariotips en mosaic per limitacions tècniques. Aquest és un aspecte que no hem observat si s'ha contemplat en els articles consultats.

La realització d'ambdós cultius en paral·lel fa baixar el risc de resultat fals positiu i fals negatiu.

A la Taula 5.4 es relacionen els diversos tipus de mosaic confinat amb els possibles falsos diagnòstics positiu i negatiu.

Taula 5.4: Relació entre els mosaics confinats i els diagnòstics fals positiu o fals negatiu

Tipus	origen	cultiu curt	cultiu llarg	fetal	fals + / -
I	MCP	anòmal *	normal	normal	fals + cultiu curt
II	MCP	normal	anòmal *	normal	fals + cultiu llarg
III	MCP	anòmal *	anòmal *	normal	fals + ambdós
IV	MVF	anòmal *	normal	anòmal *	fals - cultiu llarg
V	MVF	normal	anòmal *	anòmal *	fals - cultiu curt
VI	MVF	anòmal *	anòmal *	anòmal *	anomalia
MCF	MCF	normal	normal	anòmal	fals - ambdós

*en mosaic o no

5.5 NOVES ESTRATÈGIES EN DIAGNÒSTIC PRENATAL

L'abaratiment de costos i l'aparició de noves tecnologies de laboratori estan comportant canvis estratègics en el diagnòstic prenatal. Des de l'inici dels anys 2000 alguns laboratoris han substituït el cariotip del cultiu curt per l'estudi de les aneuploidies comunes, emprant la tècnica de FISH o QF-PCR (Cirigliano *et al.*, 2002; Donaghue *et al.*, 2005; Waters *et al.*, 2007; Lau *et al.*, 2009; Holgado *et al.*, 2011). Si se substituís el cultiu curt per la QF-PCR, tal i com comenta Barranco *et al.* (2011), un percentatge de les anomalies amb significat clínic passarien desapercibudes.

D'altres proposen només fer rutinàriament el cultiu llarg i analitzar també el cultiu curt només en els casos de sospita de mosaic confinat (Toutain *et al.*, 2010b). Contràriament, altres autors (Soler *et al.*, 2008) proposen substituir el cultiu llarg per la QF-PCR i fer només el cariotip del cultiu curt. En aquests casos pot ser que no es detectin un 6 % dels mosaics generalitzats i a més es pot escapar algun cas amb una reorganització cromosòmica subtil (Toutain *et al.*, 2010b).

En l'àmbit prenatal, l'avantatge que aporta l'aplicació de la FISH o QF-PCR és la detecció de les cinc aneuploidies més freqüents en un molt breu període de temps. Per contra, la substitució d'un dels dos cultius per aquestes tècniques implicaria obtenir un resultat que no permetria detectar algunes anomalies ja que no es realitza el cariotip sencer:

- les anomalies en mosaic inferiors al 20 %,
- les anomalies estructurals,
- les anomalies en les quals estiguessin implicats un cromosoma dels parells no comuns, entre les quals es troben les anomalies més freqüents en els mosaics confiants i que ens donen un senyal d'alerta davant d'una possible DUP.
- tampoc permetria la detecció dels mosaics confinats, ja que es treballa sobre l'ADN total de la mostra i no es pot distingir els diversos llinatges cel·lulars.

En el nostre treball, un 70 % de les alteracions es podrien observar amb aquest nou enfocament, mentre que un 30 % no serien detectades. D'aquestes, un 2,5 % corresponen a alteracions estructurals desequilibrades, un 3,2 % a aneuploidies no comunes i cromosomes marcadors, quasi un 5 % a alteracions estructurals equilibrades (recíproques i robertsonianes), i quasi un 19 % a mosaics d'anomalies no detectables o de percentatges més baixos d'un 20 %.

Un dels avantatges de la detecció dels MCP és que és l'única via per a la detecció de les disomies uniparentals que tenen una estimació teòrica d'aparició del 33 % quan s'observa un fenomen de rescat o de recuperació de la trisomia, encara que, a la pràctica, els valors observats són de l'1,6 % (Grati *et al.*, 2006), del 5,5 % (Soler *et al.*, 2008) o del 7,6 % (Toutain *et al.*, 2010).

La detecció dels mosaics confinats comporta en alguns casos una certa incertesa diagnòstica, i, per tant, es requereix d'una amniocentesi per conèixer el cariotip fetal. Quan l'anomalia s'observa en forma de MCP tipus I, la probabilitat de

confirmació de l'anomalia és més baixa que si es detecta com a tipus II o com a tipus III (Grati *et al.*, 2006).

Serà necessari confirmar els cariotips en mosaic per discernir entre mosaics confinats només a la placenta o bé mosaics vertaders fetals. Majoritàriament s'utilitza líquid amniòtic o sang fetal per a aquest propòsit. En la sèrie de Grati *et al.* (2006) es van haver de fer estudis de líquid amniòtic per confirmar el mosaic en un 1,3 % dels casos i en el nostre treball en un 1,2 %. Toutain *et al.* (2010a), per tal de disminuir el nombre d'estudis de seguiment, suggereixen recomanar l'amniocentesi només en els casos de possible sospita de disomia uniparental dels cromosomes 7, 11, 14 i 15 i en els casos en què s'observi un mosaic d'aneuploidies comunes en absència de marcadors ecogràfics associats. Recordem que ells només fan cultiu llarg i que el curt se'l reserven per als casos de possible MCP.

En la següent taula es descriuen les situacions en què recomanem que es dugui a terme un estudi del líquid amniòtic quan en les vellositats s'ha observat una anomalia.

Taula 5.5: Estratègies suggerides per confirmar un resultat citogenètic en vellositats coriòniques

CULTIU CURT	CULTIU LLARG	ECOGRAFIA	SEGUIMENT
anomalia	normal	marcador o anomalia ecogràfica associades amb el cariotip anòmal	possible ILE, recomanar un estudi de seguiment de l'avortament
anomalia	normal	anomalia no relacionada amb el cariotip anòmal	cariotip de líquid amniòtic
anomalia d'autosomes	normal	normal	cariotip i disomia uniparental de líquid amniòtic en casos de cromosomes imprintats o si el cariotip del cultiu llarg és 46,XX per descartar contaminació materna que emmascari un cariotip anòmal
anomalia dels cromosomes sexuals	normal	normal	cariotip de líquid amniòtic (excepció de 45X/46,XY/ecografia normal nen)
normal	anomalia	normal	cariotip de líquid amniòtic (excepcions quan l'anomalia cromosòmica és molt probable artefacte de cultiu)
normal	anomalia	anomalia relacionada amb el cariotip anòmal	possible ILE, recomanar estudi de seguiment en l'avortament
normal	anomalia	anomalia no relacionada amb el cariotip anòmal	cariotip en líquid amniòtic. Si el cariotip en líquid amniòtic és normal i l'anomalia és en cromosomes imprintats plantejar estudi de disomia uniparental
anomalia certa*	anomalia certa	normal	possible ILE, recomanar un estudi de seguiment de l'avortament
anomalia* incerta	anomalia incerta	normal	cariotip en líquid amniòtic
			si el cariotip en líquid amniòtic és normal i l'anomalia és en cromosomes imprintats, plantejar un estudi de disomia uniparental
anomalia	anomalia	anomalia	possible ILE, recomanar un estudi de seguiment de l'avortament

*Definició d'anomalia certa i incerta en la Taula 3.3.

Darrerament s'estan proposant altres tècniques més específiques, CGH-Array, SNP-Array o plataformes dirigides com els BOBs, com a tècniques diagnòstiques en diagnòstic prenatal. Totes aquestes tenen el gran avantatge de fer presents guanys i pèrdues cromosòmiques molt petites (de menys de 10 Mb, microdelecions o microduplicacions) que amb el cariotip convencional no poden observar-se per limitació en la llargada i en les bandes dels cromosomes.

Aquestes noves tècniques, com les anteriors mencionades, tenen els inconvenients que no permeten detectar anomalies estructurals equilibrades, ni tampoc mosaics per sota del 25-30 %, ni moltes de les poliploidies, i tenen l'inconvenient afegit de detectar-se un nombre important de desequilibris genòmics de significat incert. En els casos d'anomalies estructurals desequilibrades que comporten un guany o una pèrdua petita de DNA, sí que podrien ser detectades, però la tècnica d'Arrays no explica com estan organitzats, informació cabdal per establir el risc de recurrència i facilitar un consell genètic precís.

L'observació de desequilibris genòmics incerts en diagnòstic prenatal, és un problema. Per a la seva confirmació és necessari estudiar els progenitors, la qual cosa endarrereix el diagnòstic final fent augmentar potencialment l'angoixa i encareix encara més els costos de l'estudi. A més, pel fet d'estar la gestació en curs, els estudis i les decisions s'han de prendre amb celeritat.

Les tecnologies que utilitzen el DNA total tenen el problema que no permeten diferenciar els diferents llinatges cel·lulars que s'estudien. En mostres de vellositats coriòniques això implica que no permeten diferenciar entre el DNA procedent de cèl·lules del trofoblast i el DNA procedent del mesènquima extraembrionari. Diversos autors han observat errors diagnòstics a causa d'aquesta limitació tècnica (Mann *et al.*, 2003; Allen *et al.*, 2006; Waters *et al.*, 2007; Lau *et al.*, 2009), i per aquesta causa, proposen variacions tècniques per poder diferenciar els dos DNA i així poder interpretar els mosaics confinats (Mann *et al.*, 2007; Holgado *et al.*, 2009;

Kooper *et al.*, 2009; Filges *et al.*, 2011; Toutain *et al.*, 2011). Curiosament, en altres teixits aquest inconvenient pot ser un avantatge, l'estudi del DNA total en sang permet observar anomalies cromosòmiques presents en llinatges cel·lulars no seleccionats en el cultiu cel·lular. Així, per exemple, Cheung *et al.* (2007) demostren com amb la tècnica dels Arrays poden observar-se mosaics presents en llinatges cel·lulars diferents dels limfòcits T, que són els que s'estimulen amb els mitògens, ja que en els estudis dels Arrays s'analitza el DNA total.

El procés d'implantació de noves tècniques diagnòstiques en genètica és costós, i llarg, però al mateix temps molt interessant. L'aplicació de les noves tecnologies en diagnòstic prenatal xoca amb el fet que l'individu que s'està estudiant està en gestació, fet que implica obtenir un diagnòstic molt curós i el més aviat possible ja que les conseqüències que se'n puguin esdevenir poden ser greus. Aquests fets s'han de valorar al moment d'aplicar les noves tecnologies i usar-les en substitució d'altres tècniques més clàssiques. No per ser tècniques estàndards vol dir que no siguin vàlides. Els estudis citogenètics i els estudis d'Arrays són dues tècniques molt bones i àmpliament complementàries de cara a poder donar un resultat genètic prenatal el més ampli, concís i ràpid possible.

Tal i com es comenta en el *Consenso para la Implementación de los Arrays (CGH y SNP-array) en la genética clínica* (2012), l'aplicació d'aquestes tècniques en diagnòstic prenatal s'imposarà en el futur en la pràctica diària. Ara bé, la discussió està en si els Arrays han de substituir el cariotip o no (Miller *et al.*, 2011; Novelli *et al.*, 2012), i si és millor una plataforma d'una casa comercial o no, o una que sigui dirigida o bé una d'alta resolució.

Els estudis de FISH aporten el fet que permeten analitzar nuclis interfàsics, és a dir cèl·lules que no estan en divisió, els quals en casos com els estudis de tetraploidies poden ésser de gran utilitat per diferenciar entre una anomalia vertadera o un artefacte del cultiu, quan s'analitza material no cultivat (Noomen *et al.*, 2001). A

més, possibiliten l'anàlisi d'un gran nombre de nuclis, ideal per fer recomptes o visualitzar un mosaic críptic, un cop es coneix el parell de cromosomes que es vol estudiar.

La QF-PCR es pot utilitzar en casos de sospita de bessons reabsorbits, en casos en què es vulgui conèixer la zigositat de la mostra, o en casos en què hi hagi molt poca mostra, i els Arrays de SNP poden ajudar a estudiar l'origen mitòtic o meiòtic de les anomalies cromosòmiques (Barranco *et al.*, 2011).

De l'experiència d'aquest treball es desprèn que la millor estratègia per analitzar les mostres de vellositats coriòniques en estudis citogenètics prenatals és realitzar els dos cultius en paral·lel. Un dels avantatges és poder distingir les diverses modalitats de mosaic, ajudant en la seva interpretació de cara a un consell genètic: distingir els casos que tenen un cariotip en mosaic per contaminació materna o detectar els casos en mosaic per mosaics confinats, així com diferenciar si una anomalia estructural és vertadera o bé és un artefacte del cultiu.

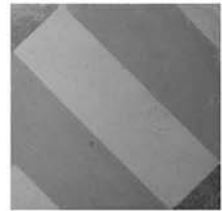
La utilització dels dos cultius en paral·lel permet, gràcies al cultiu curt, obtenir un primer cariotip fetal amb 24-48h després de l'extracció de la mostra i durant el primer trimestre de gestació, per tant, si s'ha de fer una interrupció legal de la gestació és menys traumàtic per l'embarassada i a més les tècniques d'interrupció poden ser menys agressives. A més, en el cultiu curt no hi pot haver contaminació materna, ja que les cèl·lules maternes no poden créixer durant el breu període de temps del cultiu. I gràcies al cultiu llarg, es pot obtenir un segon cariotip que permet confirmar el primer resultat i observar anomalies estructurals que potser no s'observarien per limitacions tècniques.

Tota embarassada que es sotmet a un procediment invasiu posa en risc la gestació i mereix rebre el màxim d'informació genètica possible. Si es coneix el cariotip durant el primer trimestre, encara que aquest pot tenir un resultat citogenètic inviable (és a dir que no arribés al segon trimestre), això permetria donar una

explicació a la gestant del perquè de l'avortament i facilitaria el consell genètic davant d'una futura gestació (Soler *et al.*, 2008).

Quant a les mostres d'avortaments, tenint en compte que els mosaics són una anomalia cromosòmica prou significativa en les gestacions interrompudes, hom creu necessari estudiar els tres teixits fetals (cultiu curt i llarg de les vellositats i cultiu de les altres restes fetals) per poder-los detectar. Conèixer l'anomalia cromosòmica que ha provocat la interrupció de la gestació és important de cara a una futura gestació i al consell genètic posterior. Les noves tecnologies són més útils per a aquest tipus de mostres en els casos en què no es pot obtenir un resultat citogenètic quan la mostra està altament macerada.

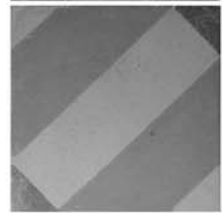
ÍNDEX



INTRODUCCIÓ



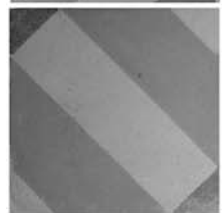
OBJECTIUS



MATERIAL I MÈTODES



RESULTATS



DISCUSSIÓ



CONCLUSIONS



BIBLIOGRAFIA



6. CONCLUSIONS

1. El rendiment del cultiu curt i del cultiu llarg de vellositats coriòniques de mostres prenatals és alt (98,1 % i 98,4 % respectivament) i comparable als valors observats en les publicacions. Ara bé, per assegurar un resultat citogenètic es recomana realitzar les dues tècniques en paral·lel, ja que l'eficàcia de l'estudi complet arriba fins a un 99,8 %.

2. Dels tres cultius realitzats en les mostres d'avortaments, el que té una rendibilitat més alta és el cultiu llarg de les vellositats coriòniques, seguit del cultiu de teixits fetals i en darrer lloc del cultiu curt de les vellositats. L'estratègia més eficient per assegurar un resultat citogenètic és realitzar les tres tècniques de cultiu en paral·lel.

3. El percentatge d'anomalies cromosòmiques observades en el grup de mostres prenatals està dins el rang dels valors observats en les sèries consultades. I, com en els treballs publicats, les anomalies cromosòmiques més freqüents en mostres de vellositats coriòniques d'estudis prenatals són les aneuploidies comunes.

4. Gairebé el 50 % dels avortaments estudiats presentaven anomalies cromosòmiques, essent les aneuploidies no comunes i les poliploidies les més freqüents.

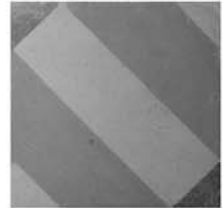
5. Si en l'estudi citogenètic de les vellositats en una mostra prenatal s'observa un mosaic confinat, el més probable és que sigui un mosaic confinat a la placenta de tipus I o II i que l'anomalia cromosòmica sigui una aneuploidia autosòmica no comuna.
6. Per contra, si la mostra prové d'un avortament el mosaic confinat pot ser tant confinat a la placenta com mosaic vertader fetal o confinat al fetus, i el més probable és que l'anomalia cromosòmica sigui també una aneuploidia autosòmica no comuna. No s'observen casos de MCP tipus I en mostres d'avortaments.
7. És necessari ampliar el nombre d'estudis citogenètics en mostres d'avortaments per tal de poder comprendre millor el comportament i l'efecte dels mosaics confinats en la gestació.
8. Els cromosomes implicats en les aneuploidies tenen un comportament que no és atzarós, sinó que cada parell cromosòmic segueix uns patrons de distribució característics.
9. La utilització del cultiu curt i el cultiu llarg en paral·lel té els següents avantatges:
 - poder distingir les diverses modalitats de mosaic de cara a un consell genètic posterior

- detectar els possibles casos de contaminació materna del cultiu llarg. El percentatge de contaminació materna és subtilment més elevat en mostres procedents d'avortaments que en mostres prenatales.
- detectar cariotips rars en mosaic originats per fenòmens com el vanishing twin o les jumping translocations.
- el fet de realitzar paral·lelament els dos cultius cel·lulars, i per tant d'obtenir dos resultats citogenètics de la mateixa mostra, permet la confirmació dels estudis i contribueix a la prevenció de possibles errors per diagnòstic equivocat o per limitacions tècniques.
- detectar les anomalies que poden fer sospitar de possibles disomies uniparentals amb repercussió clínica.

Els resultats obtinguts en el present estudi reforcen l'argument que actualment les noves tecnologies com la QF-PCR, FISH o Arrays s'han d'entendre encara com a tècniques complementàries a l'estudi citogenètic en vellositats coriòniques i no com a tècniques substitutives. Si s'utilitzen tècniques que només detecten les anomalies comunes (QF-PCR, FISH) no s'observaran anomalies en les quals hi estigui implicat un cromosoma dels parells no comuns, entre les quals es troben les anomalies que ens donen un senyal d'alerta davant d'una possible disomia uniparental. La substitució del cariotip per part de les noves tecnologies impediria detectar les anomalies en mosaic inferiors al 20 % i les anomalies estructurals

equilibrades. A més, la utilització de tècniques moleculars que treballen amb ADN total de la mostra no permet distingir els diversos llinatges cel·lulars, fet cabdal per a la identificació de mosaics confinats, i tot i que les tècniques d'Arrays detecten guanys i pèrdues de material al llarg de tot el genoma, no es visualitza la localització de les reorganitzacions, fet que és important de cara a la recurrència de l'anomalia i a un bon consell genètic.

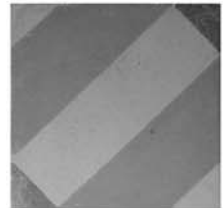
ÍNDEX



INTRODUCCIÓ



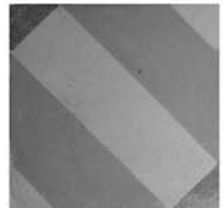
OBJECTIUS



MATERIAL I MÈTODES



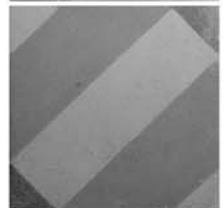
RESULTATS



DISCUSSIÓ



CONCLUSIONS



BIBLIOGRAFIA



7. BIBLIOGRAFIA

A

Allen S.K., Luharia A., Gould C.P., MacDonald F., Larkins S. i Davison E.V. (2006). *Rapid prenatal diagnosis of common trisomies: discordant results between QF-PCR analysis and karyotype analysis on long-term culture for a case of trisomy 18 detected in CVS*. Prenat Diagn 26:1160-7.

Amor D., Neo W.T., Waters E., Heussler H., Pertile M. i Halliday J. (2006). *Health and developmental outcome of children following prenatal diagnosis of confined placental mosaicism*. Prenat Diagn 26:443-6.

Annable K., Donnenfeld A.E., Fischer R.L. i Knops J. (2008). *Prenatal diagnosis of a jumping translocation*. Prenat Diagn 28:767-9.

Armengol LL., Nevado J., Serra-Juné C., Plaja A., Mediano C., García-Santiago F.A., García-Aragonés M., Villa O., Mansilla E., Preciado C., Fernández L., Moni M.A., García-Pérez L., Lapunzina P.D. i Pérez-Jurado L.A. (2012). *Clinical utility of chromosomal microarray analysis in invasive prenatal diagnosis*. Hum Genet 131:513-23.

Aslan H., Karaman B., Yildirim G., I Ceylan Y. (2005). *Prenatal diagnosis of jumping translocation involving chromosome 22 with ultrasonographic findings*. Prenat Diagn 25:1024-27.

Asociación Española Diagnóstico Prenatal (AEDP) (1996). *Normas y principios generales para los laboratorios de diagnóstico prenatal citogenético*. Prog Diagn Prenat 8:255-61.

Association of clinical cytogeneticists working party on chorionic villi in prenatal diagnosis (ACC) (1994). *Cytogenetic analysis of chorionic villi for prenatal diagnosis: an ACC collaborative study of U.K. data*. Prenat Diagn 14:363-79.

Association of clinical cytogeneticists (ACC). (2007). *Professional guidelines for clinical cytogenetics. Prenatal Diagnosis best practice guidelines: chorionic villus samples (CVS)*. V1.02.
(www.cytogenetics.org.uk/prof_standards/acc_prenatal_bp_dec2009_1.00.pdf)

B

Barranco L., Cirigliano V., Lloveras E., Ordonez E., Herrero M., Fernández D., Palau N., Canellas A., Costa M., Martín S., Mendoza J., Pérez E. i Plaja A. (2011). *Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa y cultivo largo: ¿el mejor método para el estudio citogenético de muestras de vellosidad corial?* Progr Diagn Prenat 22:86-91.

Be C., Velasquez P, i Youlton R. (1997). *Spontaneous abortion: cytogenetic study of 609 cases*. Rev Med Chil 125:317-22.

Berend S.A., Horwitz J., McCaskill C. i Shaffer L. (2000). *Identification of uniparental disomy following prenatal detection of robertsonian translocations and isochromosomes*. Am J Hum Genet 66:1783-7.

Bianchi B., Wilking-Haug L.E., Enders A.C. i Hay E.D. (1993). *Origin of extraembryonic mesoderm in experimental animals: Relevance to chorionic mosaicism in humans*. Am J Med Genet 46:542-50.

Brun J.L., Manione R., Gangbo F., Guyon F., Taine L., Roux D., Maugney-Laulom B., Horovitz J i Saura R (2003). *Feasibility, accuracy and safety of chorionic villus sampling: a report of 10741 cases*. Prenat Diagn 23:295-301.

C

Carr D.H. (1971). *Chromosomal studies selected spontaneous abortions polyploidy in man*. J Med Genet 8:164-74.

Carreras J. M. (1987). *Diagnóstico prenatal*. Ed. Salvat. Barcelona. ISBN: 84-345-2786-3.

Cheung S.W., Shaw C.A., Scott D.A., Patel A., Sahoo T., Bacino C.A., Pursley A., Li J., Erickson R., Gropman A.L., Millar D.T., Seashore M.R., Summers A.M., Stanliewiz P., Craig Chinault A., Lupski J.R., Beaudet A.L., i Sutton R. (2007). *Microarray-based CGH detects chromosomal mosaicism not revealed by conventional cytogenetics*. Am J Med Genet Part A 143A:1679-86.

Cigudosa J.C. i Lapunzina P. (2012). *Consenso para la Implementación de los Arrays (CGH-SNP-arrays) en la Genética Clínica*. Instituto Roche. ISBN: 978-84-15010-13-5

Cirigliano V., Voglino G., Ordoñez E., Marongiu A., Cañadas M.P., Ejarque M., Rueda L., Lloveras E., Fuster C. i Adinolfi M. (2009). *Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR, results of 9 years of clinical experience*. Prenat Diagn 29:40-9.

Cox A.E. (2004). *Chromosomal mosaicism and uniparental disomy in prenatal diagnosis: clinical implications for genetic counselling*. Master of Science. University of Pittsburgh.

Crane J.P. i Cheung S.W. (1988). *An embryogenic model to explain cytogenetic inconsistencies observed in chorionic villus versus fetal tissue*. Prenat Diagn 8:119-29.

Cuatrecasas E. (1993). *Estudi morfològic i citogenètic de vellositats coriòniques humanes*. Màster en Biologia cel·lular. Universitat Autònoma de Barcelona.

Cuatrecasas E., Català V., Acevedo M.J., Crespo M. i Serés A. (1996). *Contaminación materna en líquido amniótico detectada mediante citogenética e hibridación in situ*. Progr Diagn Prenat 8:244-8.

Cuatrecasas E., Garrido C., Vila L., Català V. i Serés A. (2007). *A CVS chimera: short- and long-term cultures*. Chromo Research 15:1-1000P.

Cuatrecasas E., Míguez L. i Perez M.M. (2008). *Estudio de la morfología y del índice mitótico de vellosidades coriales en diagnóstico prenatal*. Progr Diagn Trat Prenat. 20:2-9.

D

Daniel A., Wu Z., Darmanian A., Malafiej P., Tembe V., Peters G., Kennedy C. i Adès L. (2004). *Issues arising from the prenatal diagnosis of some rare trisomy mosaics - the importance of cryptic fetal mosaicism*. Prenat Diagn 24:524-36.

De Pater J.M., Smeets D.F.C.M. i Scheres J.M.J.M. (2003). *Unique mosaicism of structural chromosomal rearrangement: Is chromosome 18 preferentially involved?* Am J Med Genet 119A:26-31.

Dejmek J., Vojtassak J., i Malova J. (1992). *Cytogenetic analysis of 1508 spontaneous abortions originating from south Slovakia*. Eur J Gynecol Reprod Biol 46:129-36.

- Diego-Álvarez D., Rodríguez de Alba M., Cardero-Merlo R., Diaz-Recasens J., Ayuso C., Ramos C., i Lorda Sánchez I. (2007). *MLPA as a screening method of aneuploidy and unbalanced chromosomal rearrangements in spontaneous miscarriages*. Prenat Diagn 27:765-71.
- Diego-Álvarez D. i Lorda-Sánchez I. (2008). *Protocolo recomendado para el estudio cromosómico de abortos espontáneos: abordaje citogenética y molecular*. Prog Diag Trat Prenat 20:167-74.
- Donaghue C., Man K., Docherty Z. i Ogilvie C.M. (2005). *Detection of mosaicism for primary trisomies in prenatal sample by QF-PCR and karyotype analysis*. Prenat Diagn 25:65-72.
- Dunn L.B., Hirschhorn K. i Kardon N. (2000). *Jumping translocation in spontaneous abortions*. Cytogenet Cell Genet 88:25-9.

E

- Edwards S. i Waters J.J. (2008). *Prenatal diagnosis of monosomy 18p involving a jumping translocation*. Prenat Diagn 28:764-6.
- Eiben B., Bartels I., Bähr-Porsch S., Borgmann S., Gatz G., Gellert G., Goebel R., Hammans W., Hentemann M., Osmers R., Rauskolb R. i Hansmann I. (1990). *Cytogenetics analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation methods of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage*. Am J Hum Genet 47:656-63.
- Engel E. (1980). *A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect, isodisomy*. Am J Med Genet 6:137-43.

European Collaborative Research on Mosaicism in CVS (EUCROMIC) (1999). *Trisomy 15 CPM: probable origins, pregnancy outcome and risk of fetal UPD*. Prenat Diagn 19:29-35.

European Cytogeneticists Association (ECA) (2012). *Cytogenetic Guidelines and Quality Assurance*. ECA Newsletter 29:7-25.

F

Farra C., Giudicelli B., Pellisier M.C., Philip N. i Piquet C. (2000). *Fetoplacental chromosomal discrepancy*. Prenat Diagn 20:190-3.

Filges I., Kang A, Klug V., Wenzel F., Heinimann K., Tercantil S. i Miny P. (2011). *aCGH on chorionic villi mirrors the complexity of fetoplacental mosaicism in prenatal diagnosis*. Prenat Diagn 31:473-8.

Firth H.V., Boyd P.A., Chamberlain P., Mackenzie I.Z., Lindenbaum R.H. i Huson S.M. (1991). *Severe limb abnormalities after chorion villus sampling at 56-66 days' gestation*. Lancet 337:762-3.

Fritz B., Hallermann C., Olert J., Fuchs B., Bruns M., Asalan M., Schmidt S., Coerdts W., Müntefering H., i Rehder H. (2001). *Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridisation (CGH) - Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions*. E J Hum Genet 9:539-47.

G

Gardner R.J.M., Sutherland G.R. i Shaffer L. (2012). *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling* (4 edition). Oxford Univ Press, New York. ISBN: 978-0-19-537533-6

- Goldberg J.D. i Wohlferd M.M. (1997). *Incidence and outcome of chromosomal mosaicism found at the time of chorionic villus sampling*. Am J Obstet Gynecol 176:1349-53.
- Goodpasture C. i Bloom S.E. (1975). *Visualization of nuclear organiser regions in mammalian chromosomes using silver-staining*. Chromosoma 53:37-50.
- Grati F.R., Miozzzo M., Cassani B., Rossella F., Abjntonazzo P., Gentilin B., Sirchia S.M., Mori L., Rigano S., Bulfamante G., Cetin I. i Simoni G. (2005). *Fetal and placental chromosomal mosaicism revealed by QF-PCR in severe IUGR pregnancies*. Placenta 26:10-8.
- Grati F.R., Grimi B., Frascoli G., di Meco A.M., Liuti R., Milani S., Trotta A., Dulcetti F., Grosso E., Miozzo M., Maggi F. i Simoni G. (2006). *Confirmation of mosaicism and uniparental disomy in amniocytes, after detection of mosaic chromosome abnormalities in chorionic villi*. E J Hum Genet 14:282-8.
- Greenwold N. i Jauniaux E. (2002) *Collection of villous tissue under ultrasound guidance to improve the cytogenetic study of early pregnancy failure*. Hum Reprod 17:452-6.
- Griffin D.J.K., Millie E.A., Redline R.W., Hassold T.J. i Zaragoza M.V. (1997). *Cytogenetic analysis of spontaneous abortions: comparision of techniques and assessment of the incidence of confined placental mosaicism*. Am J Med Genet 72:297-301.

H

- Hahnemann N. i Mohr J. (1968). *Genetic diagnosis in the embryo by means of biopsy from extra-embryonic membrane*. Bull Eur Soc Hum Genet 2:23–9.

- Hahnemann J.M. i Vejerslev L.O. (1997a). *Accuracy of cytogenetic findings on chorionic villus samplig (CVS) - diagnostic consequences of CVS mosaicism and non-mosaic discepancy in centres contributing to EUCROMIC 1986-1992*. Prenat Diagn 17:801-20.
- Hahnemann J.M. i Vejerslev L.O. (1997b). *European Collaborative Research on Mosaicism in CVS (EUCROMIC) - Fetal and extrafetal cell lineages in 192 gestations with CVS mosaicism involving single autosomal trisomy*. Am J Med Genet 70: 179-87.
- Hassold T., Chen J.N., Funkhouser T., Jooss T., Manuel B., Matsuura J., Matsuyama A., Wilson C., Yamane J.A., Jacobs P.A. (1980). *A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions*. Ann Hum Genet 44:151-78.
- Holgado E., Holgado B., Liddle S., Ballard T., i Levett L. (2009). *A novel method for extracting DNA from chorionic villus samples for use in CVS-PCR, which ensures complete villus dissociation*. Prenat Diagn 29:113-19.
- Holgado E., Liddle S., Ballard T. i Levett L. (2011). *Incidence of placental mosaicism leading to discrepant results between QF-PCR and karyotyping in 22.825 chorionic villus samples*. Prenat Diagn 31:1029-38.
- Hook E.B. (1977). *Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95%, and 99% confidence limits and comments on use*. Am J Hum Genet 29:94-7.
- Hsu L.Y., i Benn P.A. (1999) *Revised guidelines for the diagnosis of mosaicism in amniocytes*. Prenat Diagn 19: 1081-1082

I

International Society of Cytogenetics Nomenclature (ISCN) (2009). *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Mitelman F. (Ed.) S. Karger, Basel. ISBN: 978-3-8055-8985-7.

J

Jobanputra V., Sobrino A., Kinney A., Kline J., Warburton D. (2002). *Multiplex interphase FISH as a screen for common aneuploidies in spontaneous abortions*. Hum Reprod 17:1166-70.

Jobanputra V., Esteves C., Sobrino A., Brown S., Kline J. i Warturton D. (2011). *Using FISH to increase the yield and accuracy of karyotypes from spontaneous abortion specimens*. Prenat Diagn 31:755-59.

K

Kalousek D.K. i Dill F.J. (1983). *Chromosomal mosaicism confined to the placenta in human conceptions*. Science 221:665-7.

Kalousek D.K., Howard-Peebles P.N., Olson S.B., Barrett I.J., Dorfmann A., Black S.H., Schulman J.D. i Wilson R.D. (1991). *Confirmation of CVS mosaicism in term placentae and high frequency of intrauterine growth retardation association with confined placental mosaicism*. Prenat Diagn 11:743-50.

Kalousek D.R., Barrett I.J. i Gärtner A.B. (1992). *Spontaneous abortion and confined chromosomal mosaicism*. Hum Genet 88:642-6.

Kalousek D.R. i Vekemans M. (1996). *Confined placental mosaicism*. J Med Genet 33 529-33.

- Kalousek D.R. (2000). *Pathogenesis of chromosomal mosaicism and its effect on early human development*. Am J Med Genet 91:39-45.
- Karaoguz M.Y., Nas T., Konaç E., Ince D., Pala E. i Menevse S. (2005). *Is cytogenetic diagnosis of 46,XX karyotype spontaneous abortion specimens erroneous? Fluorescence in situ hybridization as a confirmatory technique*. J Obstetric Gynaecol Res 31:508-13.
- Kennerknecht I., Vogel W. i Mehner K. (1993). *A modified model to explain embryonic / extraembryonic chromosomal inconsistencies*. Prenat Diagn 13:1156-9.
- Kennerknecht I., Barbi G., Djalali M., Mehnert K., Schneider M., Terinde R. i Vogel W. (1998). *False-negative findings in chorionic villus sampling. An experimental approach and review of the literature*. Prenat Diagn 18:1276-82.
- Khare M., Howarth E., Sadler J., Healey K. i Konje J.C. (2005). *A comparison of prenatal versus postnatal karyotyping for the investigation of intrauterine fetal death after the first trimester of pregnancy*. Prenat Diagn 25:1192-5.
- Kooper A.J.A., Fass B.H.W., Feuth T., Creemers J.W.T., Zondervan H.H., Boekkooi P.F., Quartero R.W.P., Rijnders R.J.P., Van der Burgt I., Van Kessels A.G. i Smits A.P.T. (2009). *Detection of chromosome aneuploidies in chorionic villus samples by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*. J Mol Diagn 1:17-24.
- Kotzot D. (2008). *Prenatal testing for uniparental disomy: indications and clinical relevance*. Ultrasound Obstet Gynecol 31:100-5.

L

- Lau E.T., Tang L., Wong C., Hang L.Y., Ghosh A., Leung W.C., Sin W.K., Lau T.K., Kung Y.Y. i Tang H.Y. (2009). *Assessing discrepant findings between QF-PCR on*

- uncultured prenatal samples and karyotyping on long-term culture. Prenat Diagn* 29:151-5.
- Lebedev I.N. i Nazarenko S.A. (2001). *Tissue-specific placental mosaicism for autosomal trisomies in human spontaneous abortuses: mechanisms of formation and phenotypical effects. Rus J Genet* 11:1224-37.
- Lebedev I.N., Ostroverkhova N.V., Nikitina T.V., Sukhanova N.N., Nazarenko S.A. (2004). *Features of chromosomal abnormalities in spontaneous abortion cell culture failures detected by interphase FISH analysis. E J Hum Genet* 12:513-20.
- Lebedev I.N. (2011). *Mosaic aneuploidy in early fetal losses. Cytogenet Genome Res* 133:169-83.
- Ledbetter D.H., Zachary J.M., Simpson J.L., Glbus M.S., Pergament E., Jackson L., Mahoney M.J., Desnick R.J., Schulman J., Copeland K.L., Verlinsky Y., Yang-Feng T., Schonberg S.A., Babu A., Tharapel A., Dorfmann A., Lubs H.A., Rhoads G.G., Fowler S.E. i De la Cruz F. (1992). *Cytogenetic results from the U.S. collaborative study on CVS. Prenat Diagn* 12:317-45.
- Leschot N.J., Schuring-Blom G.H., Van Prooijen-Knegt A.C., Verjaal M., Hansson K., Wolf H., Kanhai H.H.H., Van Vugt J.M.G., i Christiaens C.M.L. (1996). *The outcome of pregnancies with confined placental chromosome mosaicism in cytotrophoblast cells. Prenat Diagn* 16:705-12.
- Lestou V.S. i Kalousek D.R. (1998). *Confined placental mosaicism and intrauterine fetal growth. Arch Dis Child Fetal Neonata* 79:223-6.
- Leujene J., Maunoury C., Prieur M. i Van den Akker J. (1979). *Translocation sauteuse (5q;15q), (8q;15q), (12q;15q). Ann Genet* 22:210-3.

- Levy B., Dunn T.M., Hirschhorn K., Kardon N. (2000). *Jumping translocation in spontaneous abortions*. Cytogenet Cell Genet 88:25-9.
- Lewi L., Blickstein I., Van Schoubroeck D., Gloning K.P., Casteels M., Brandenburg H., Fryns J.P., Deprest J. (2006). *Clinical Report: Diagnosis and management of heterokaryotypic monochorionic twins*. Am J Med Genet Part A 140a:272-5.
- Liehr T. (2009). *Small marker chromosomes*. www.med.uni-jena.de/fish/sSMC/OOSTART.htm
- Ljunger E., Chattingius S., Lundin C., i Anneren G. (2005) *Chromosomal anomalies in first-trimester miscarriages*. Acta Obstet Gynecol Scand 84:1107.
- Los F.J., Van den Berg C., Van Opstal D., Normen P., Braat A.P.G., Galjaard R.J.H., Pijpers L., Cohen-Overbeek T.E., Wildschut H. i Brandenburg H. (1998a). *Abnormal karyotypes in semi-direct chorionic villus preparations of women with different cytogenetic risk*. Prenat Diagn 18:1023-40.
- Los F.J., Van Opstal D., Van en Berg C., Braat A.P.G., Verhoef S., Vessby-Van Swaay E., Van den Ouweland A.M.W., i Halley D.J.J. (1998b). *Uniparental disomy with and without confined placental mosaicism: a model for trisomic zygote rescue*. Prenat Diagn 18:659-68.
- Los F.J., Van den Berg C., Wildschut H.I.J., Brandenburg H., Den Hollander N.S., Schoonderwaldt E.M., Pijpers L., Galjaard R.J. i Van Opstal D. (2001). *The diagnostic performance of cytogenetic investigation in amniotic fluid cells and chorionic villi*. Prenat Diagn 21:1150-8.
- Lomax B., Tang S., Deparovic E., Phillips D., Hillard E., Thomson T. i Kalousek D. (2000). *Comparative genomic hybridization in combination with flow cytometry improves results of cytogenetic analysis of spontaneous abortions*. Am J Hum Genet 66:1516-21.

M

- Mann K., Kabba M., Donaghue C., Hills A. i Ogilvie C. (2007). *Analysis of a chromosomally mosaic placenta to assess the cell populations in dissociated chorionic villi: implications for QF-PCR aneuploidy testing*. Prenat Diagn 27:287-9.
- Míguez L. (1996). *Estudio citogenético en vellosidades coriales*. Tesi doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Miller D.T., Adam M.P., Aradhya S., Biescker L.G., Brothman A.R., Carter N.P., Church D.M., Crolla J.A., Eichler E.E., Epstein C.J., Faucett W.A., FEUE L., Friedman J.M., Hamosh A., Jackson L., Kaminsky E.B., Kok K., Krantz I.D., Kuhn R.M., Lee C., Ostell J.M., Rosenberg C., Scherer S.W., Spinner N.B., Stavropoulos D.J., Tepperberg J.H., Thorland E.C., Vermeesch J.R., Waggoner D.J., Watson M.S., Martin C.L. i Ledbetter D.H. (2010). *Consensus statement: chromosomal microarrays is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies*. A J Hum Genet 86:749-64.
- Miura K., Yoshiura K., Miura S., Kondoh. T., Harada N., Yamasaki K., Fujimoto Y., Yamasaki Y., Tanigawa T., Kitajima Y., Shimada T., Yoshida A., Nakayama D., Tagawa M., Yoshimura S., Wagstaff J., Jinno Y., Ishimaru T., Niikawa N. i , Masuzaki H. (2006). *Clinical outcome of infants with confined placental mosaicism and intrauterine growth restriction of unknown cause*. Am J Med Genet A 140A:1827-33.
- Moore K.L. (2009). *Essentials of Human Embryology*. Ed. Blackwell scientific publications. B.C. Decker Inc. Toronto. Philadelphia

Morales C., Sánchez A., Bruguera J., Margarit E., Borrell A., Borobio V., i Soler A., (2007). *Cytogenetic study of spontaneous abortions using semi-direct analysis of chorionic villi samples detects the broadest spectrum of chromosome abnormalities*. Am J Med Genet 146A:66-70.

Morales C., Cuatrecasas E., Mademont-Soler I., Clusellas N., Peruga E., Català V., Garrido C., Milà M., Soler A., i Sánchez A. (2010). *Non-mosaic trisomy 20 of paternal origin in chorionic villus and amniotic fluid also detected in fetal blood and other tissues*. Eur J Med Genet 53:197-200.

N

Nagaishi M., Yakamamoto T., Linuma K., Shimomura K., Berend S.A., i Knops J. (2004). *Chromosome abnormalities identified in 347 spontaneous abortions collected in Japan*. J Obstet Gynecol Res 3:237-41.

Noomen P., Van der Berg C., De Ruyter J., Van Opstal D., i Los F.J. (2001). *Prevalence of tetraploid metaphases in semidirect and cultured chorionic villi*. Fetal Diagn Ther 16:129-132.

Novelli A., Grati F.A., Ballarti L., Bernardini L., Bizzoco D., camurri L., Casalone R., Cardarelli L., Cavalli P., Ciccone R., Clementi M., Dalpra L., Gentile M., Gelli G., Grammatico P., Malacarne M., Nardone A.M., Pecile V., Simoni G., Zuffardi O., i Giardino D. (2012). *Microarray application in prenatal diagnosis: a position statement from the cytogenetics working group of the Italian Society of Human Genetics (SIGU), November 2011*. Ultrasound Obstet Gynecol 39:384-388.

P

-
- Penrose L.S. i Delhanty J.D.A. (1961). *Triploid cell cultures from a macerated foetus*. Lancet 1:1261-2.
- Phillips O.P., Tharapel A.T., Lerner J.L. Park V.M., Wachtel S.S. i Shulman L.P. (1996). *Risk of fetal mosaicism when placental mosaicism is diagnosed by chorionic villus sampling*. Am J Obstet Gynecol 174:850-5.
- Pindar L., Whitehouse M. i Ocraft K. (1992). *A rare case of a false-negative finding in both direct and culture of chorionic villus sample*. Prenat Diagn 12:525-7.
- Pittalis M.C., Dalpra L., Torricelli F., Rizzo N., Noceras G., Cariatì E., Santarini L., Tibiletti M.G., Agosti S., Bovicelli L. i Forabosco A. (1994). *The predictive value of cytogenetic diagnosis after CVS based on 4860 cases with both direct and culture methods*. Prenat Diagn 14:267-78.
- Plaja A. (2006). *Interpretación y expresión clínica de mosaicos cromosómicos*. Prog Diagn Trat Prenat 18:122-7.
- Poddighe P., Becht-Noordermeer C. i Mancini P. (2005). *A rare case of mosaic 5p deletion*. Chromosome Res 13 (Suppl.1) Abstract: 1.19-P 25.

R

-
- Raabe G. i Miller K. (1990). *Cell proliferation in chorionic villi at different gestational ages, as analyzed by premature chromosome condensation*. Cytogenet Cell Genet 54:127-31.
- Reddy K.S., Petersen M.B., Antonarakis S.E. i Blakemore K.J. (1991) *The vanishing twin: an explanation for discordance between chorionic villus karyotype and fetal phenotype*. Prenat Diagn 11:679-84.

- Reddy K.S. (2010) *The conundrum of a jumping translocation (JT) in CVS twins and review of JT*. Am J Med Genet Part A 152A:2924-2936.
- Riegel M. i Schinzel A. (2006). *Postzygotic isochromosome formation as a cause of false negative results from chorionic villus chromosome examination*. Prenat Diagn 26: 221-5.
- Ribas I. (2002). *Estudi morfològic i citogenètic de vellositats corials procedents d'avortaments espontanis*. TESI. Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Robinson W.P., Binert F., Bernasconi F., Lorda-Sanchez I., Werder E.A., i Schinzel A.A. (1995). *Molecular studies of chromosomal mosaicism: relative frequency of chromosome gain or loss and possible role of cell selection*. Am J Hum Genet 56:444-51.
- Robinson W.P., Barrett I.J., Telenius A., Bernasconi F., Wilson R.D., Best R.G., Howard-Peebles P.N., Langlois S. i Kalousek K. D. (1997). *Meiotic origin of trisomy in confined placental mosaicism is correlated with presence of fetal uniparental disomy, high levels of trisomy in trophoblast, and increase risk of fetal intrauterine growth restriction*. Am J Hum Genet 60:917-27.
- Robinson W.P., Bernasconi F., Lau A., i Mc Fadden D.E. (1999). *Frequency of meiotic trisomy depends on involved chromosome and mode of ascertainment*. Am J Med Genet 84:34-42.
- Robinson W.P., McFadden D.E., Barrett I.J., Kuchinka B., Peñaherrera M.S., Bruyere H., Best R.G., Pedreira D.A.L., Langlois S. i Kalousek D. (2002). *Origin of amnion and implications for evaluation of the fetal genotype in cases of mosaicism*. Prenat Diagn 22:1076-85.

Robinson W.P. (2009). *Chromosome mosaicism*.

www.medgen.ubc.ca/robinsonlab/mosaic/specific.htm

Robinson W.P., Peñaherrera M.S., Jiang R., Avila L., Sloan J., McFadden D.E., Langlois S. i Von dadelszen P. (2010). *Assessing the role of placental trisomy in preeclampsia and intrauterine growth restriction*. Prenat Diagn 30:1-3.

Rodríguez-Revenga L., Badenas C., Madrigal I., Sánchez A., Soler A., Carrió A., Milà M. (2005). *46,XY,18q+/46,XY,18q- mosaicism in a fragile X prenatal diagnosis*. Prenat Diagn 25:448-50.

Roland B., Lynch L., Berkowitz G. i Zinberg R. (1994). *Confined placental mosaicism in CVS and pregnancy outcome*. Prenat Diagn 14:589-93.

S

Sánchez J.M., Franzi L., Collia F., De Diaz S.L., Panal M., i Dubner M. (1999). *Cytogenetic study of spontaneous abortions by transabdominal villus sampling and direct analysis of villi*. Prenat Diagn 19:601-3.

Saura R., Roux D., Maugey-Laulon B., Taine L., Wen Z.Q., Vergnaud A. i Horovitz J. (1998). *False-negative results of trisomy 21 on direct analysis on chorionic villus sampling*. Prenat Diagn 18:862-9.

Schuring-Blom G.H., Boer K., Kneqt A.C., Verjaal M. i Leschot N.J. (2002). *Trisomy 13 or 18 (mosaicism) in first trimester cytotrophoblast cells: false-positive results in 11 out of 51 cases*. E J Obstet Gynecol 101:161-8.

Shaffer L.G., Agan N., Goldberg J.D. i Ledbetter D.H. (2001). *American college of medical genetics statement on diagnostic testing for uniparental disomy*. Genet in Medicine 3:206-11.

- Shearer B.M., Thorland E.C., Carlson A.W., Jalal S.M. i Ketterling R.P (2011). *Reflex fluorescent in situ hybridization testing for unsuccessful product of conception cultures: a retrospective analysis of 5555 samples attempted by conventional cytogenetics and fluorescent in situ hybridization*. Genet Med 13:545-52.
- Sikema-Raddatz B., Bouman K., Verschuuren-Bemelmans C.C., Stoepker M., Mantingh A., Beekhuis J.R. i de Jong B. (2000). *Four years' cytogenetic experience with the culture of chorionic villi*. Prenat Diagn 20:950-5.
- Silvestre E. (1991). Estudi citogenètic i morfològic de vellositat corials procedents d'avortaments espontanis. Màster en Biologia Humana. Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona
- Simoni G., Brambati B., Danesino C., Rossella F., Terzoli G. L., Ferrari M. i Fraccaro M. (1983). *Efficient direct chromosome analyses and enzyme determinations from chorionic villi samples in the first trimester of pregnancy*. Hum Genet 63:349-57.
- Simoni G. i Fraccaro M. (1992). *Does confined placental mosaicism affect the fetus?* Hum Reprod 7:139-40.
- Simoni G. i Sirchia M. (1994). *Confined placental mosaicism*. Prenat Diagn 14:1185-9.
- Smith K., Lowther G., Maher E., Hourihan T., Wilkinson T., Wolsentholme J. (1999). *The predictive value of findings of the common aneuploidies trisomies 13, 18 and 21, and numerical sex chromosome abnormalities at CVS: Experience from the ACC U.K. collaborative study*. Prenat Diagn 19: 817-26.

- Soler A., Morales C., Badenas C., Rodríguez-Revenga L., Carrió A., Margarit E., Costa D., Borrell A., Goncé A., Milà M. i Sánchez A. (2008). *A retrospective and theoretc al evaluation of rapid methods for detecting chromosome abnormalities and their implications on genetic counseling based on a series of 3868 CVS diagnoses*. Fetal Diagn Ther 23:118-23.
- Stetten G., Escallon C.S., South S.T., McMichael J.L., Saul D.O. i Blakemore K.J. (2004). *Reevaluating confined placental mosaicism*. Am J Med Genet 131A:232-9.
- Stipolgev F., Latin V., Kos M., Miskovic B. i Kurjak A. (2001). *Correlation of confined placental mosaicism with fetal intrauterine growth retardation*. Fetal Diagn Ther 16:4-9.
- Summer A.T. (1972). *A simple technique for demostrating centromeric heterocromatin*. Exptl Cell Res 75:304.

T

- Templado C., Vidal F., i Estop A. (2011). *Aneuploidy in human spermatozoa*. Cytogenet Genom Res 133:2-4.
- Teshima I.E. Kalousek D.K., Vekemans M.J.J., Markovic V., Cox D.M., Dallaire L., Gagne R., Lin J.C.C., Ray M., Sergovich F.R., Uchida I.A., Wang H. i Tomkins D.J. (1992). *Chromosome mosaicism in CVS and amniocentesis samples*. Prenat Diagn 12:443-66.
- Tharapel A.T., Elias S., Shulman L.P., Seely L., Emerson D.S. i Simpson J.L. (1989). *Reabsorbed co-twin as an explanation for discrepant chorionic villus results: non-mosaic 47,XX,+16 in villi (direct and culture) with normal (46,XX) amniotic fluid and neonatal blood*. Prenat Diagn 9:467-72.

Toutain J., Labeau-Gaüzere C., Barnetche T., Horovitz J. i Saura R. (2010a). *Confined placental mosaicism and pregnancy outcome: a distinction needs to be between type 2 and type 3*. Prenat Diagn 30:1155-64.

Toutain J., Epiney M., Begorre M., Dessuant H., Vandenbossche F., Horovitz J. i Saura R. (2010b). *First-trimester prenatal diagnosis performed on pregnant women with fetal ultrasound abnormalities: the reliability of interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) on mesenchymal core for the main aneuploidies*. Eu J Obstet Gynecol Reprod Biol 149:143-6.

Toutain J., Soler G., Horovitz J. i Saura R (2011). *Prenatal diagnosis on chorionic villi using molecular techniques should be performed from mesenchymal core rather than from direct villi*. Prenat Diagn 31:1111-1112.

Tze Kin L., Tak Yeung L., Tak Yuen F., Lin Eai C., Sahota D.S. i Tse Ngong L. (2005). *Outcome of 1355 consecutive transabdominal chorionic villus samplings in 1351 patients*. Chi Med J 118:1675-81.

V

Van den Berg C., Van Opstal D., Brandenburg H., Wildschut H. I. J., den Hollander N. S., Pijpers L, Galjaard R. J. H. i Los F. J. (2000). *Accuracy of abnormal karyotypes after the analysis of both short- and long-term culture of chorionic villi*. Prenat Diagn 20:956-69.

Van den Berg C., Van Opstal D., Polak-Knook J. i Galjaard R.J. (2006). *(Potential) false-negative diagnoses in chorionic villi and a review of the literature*. Prenat Diagn 26:401-8.

Vicic A, Roje D., Strinic T. i Stipoljev F. (2008). *Trisomy 1 in an early pregnancy failure*. Am J Med Genet A 164A:2439-2441.

Vorsanova S.G., Kolotii A.D., Iourov I.Y., Monakhov V.V., Kirillova E.A., Soloviev I.V. i Yurov Y.B. (2005). *Evidence for high frequency of chromosomal mosaicism in spontaneous abortions revealed by interphase FISH analysis*. J Histochem Cytochem 53:375-80.

W

Wang B.T., Peng W., Cheng K-T., Chiu S-F., Ho W., Khan Y., Wittman M. i Williams III J. (1994). *Chorionic villus sampling: laboratory experience with 4000 consecutive cases*. Am J Med Gene 53:307-16.

Wapner R.J., Simpson J.I., Golbus M.S., Zachary J.M., Ledbetter D.H., Desnick R.J., Fowler S.E., Jackson L.G., Lubs H., Mahony R.J., Pergament E., Rhoads G.G., Shulman J.D. i de la Cruz F. (1992). *Chorionic mosaicism: association with fetal loss but not with adverse perinatal outcome*. Prenat Diagn 12:347-55.

Warburton D., Kline J., Stein Z., Hutzler M., Chin A. Hassold T. (1987). *Does the karyotype of a spontaneous abortion predict the karyotype of a subsequent abortion? - Evidence from 273 women with two karyotyped spontaneous abortions*. Am J Hum Genet 41:465-83.

Warburton D., Byrne B. i Canki N. (1991). *Chromosome anomalies and prenatal development: an atlas*. Ed. Oxford University Press. New York. Oxford. ISBN: 0-19-505145-9.

Waters J.J., Mann K., Grimsley L., Ogilvie C.M., Donaghue C., Staples L., Hills A., Adams T. i Wilson C. (2007). *Complete discrepancy between QF-PCR analysis of*

uncultured villi and karyotyping of cultured cells in the prenatal diagnosis of trisomy 21 in three CVS. Prenat Diagn 27:332-9.

Wilkins-Haug L., Quade B. i Morton C.C. (2006). *Confined placental mosaicism as a risk factor among newborns with fetal growth restriction.* Prenat Diagn 26:428-32.

Wolstenholme J., Rooney D.E. i Davison E.V. (1994). *Confined placental mosaicism, IUGR, and adverse pregnancy outcome: a controlled retrospective U.K. collaborative survey.* Prenat Diagn 14:345-61.

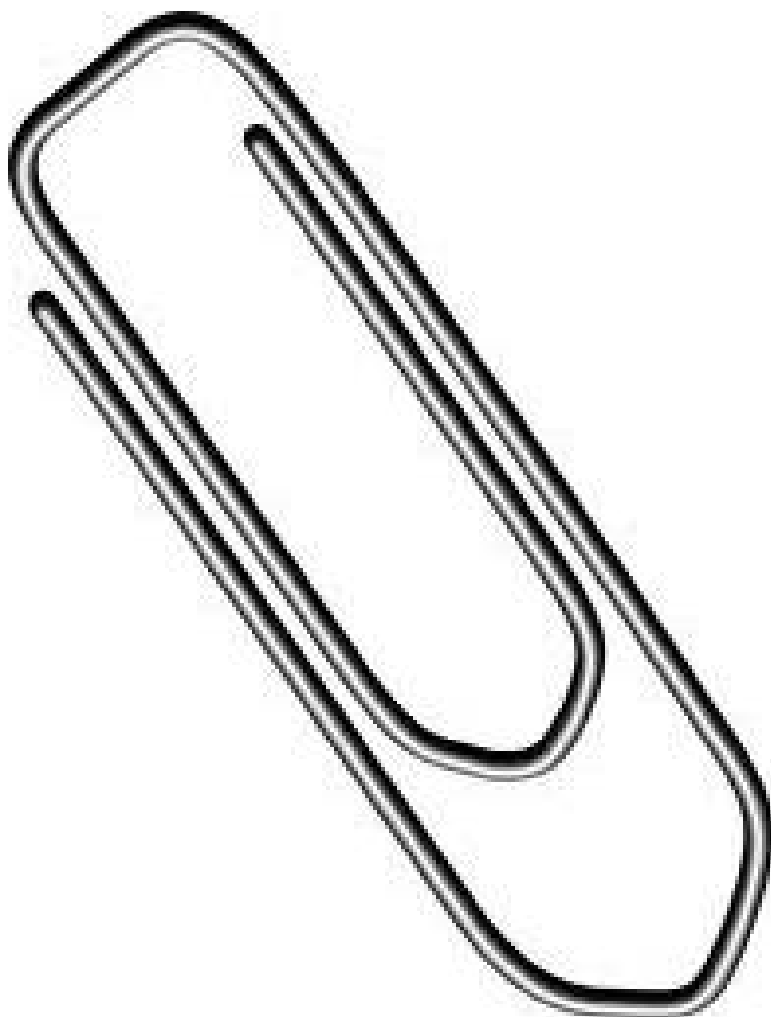
Wolstenholme J. (1996). *Confined placental mosaicism for trisomies 2, 3, 7, 8, 9, 16 and 22: their incidence, likely origins, and mechanisms for cell lineage compartmentalization.* Prenat Diagn 16:511-24.

Wolstenholme J., Emsile J.B. i Connors S. (2006). *Association of clinical cytogeneticists chorionic villus sampling database 1987-2000.* Prenat Diagn 26:420-7.

Y

Yong P.J., Von Dadelszen P., Mc Fadden D.E., Barrett I.J., Kalousek D.K i Robinson W.P. (2009). *Placental weight in pregnancies with trisomy confined to the placenta.* J Obstet Gynaecol Can 31:605-10.

Yusuf R.Z. i Naeem R. (2001). *Cytogenetic studies of spontaneous miscarriages: a seven year study to compare significance of primary vs. secondary culture methods for assessment of fetal karyotype yield and maternal cell contamination.* Early Pregna V:121-31



ANNEXES

ANNEX I

Definició de les indicacions mèdiques per les quals es fa biòpsia de còrion

Altres estudis: Se saben antecedents d'anomalies gèniques (no cromosòmiques) i cal material fetal per realitzar estudis moleculars.

Angoixa: La gestació no presenta un risc elevat de patir una alteració cromosòmica i malgrat això els progenitors desitgen un estudi prenatal.

Avortaments de repetició: S'han patit dos o més avortaments espontanis.

Cribratge bioquímic de segon trimestre: Quan el valor resultant de l'estudi bioquímic indica un risc de tenir un fill amb la síndrome de Down superior a 1/270, i se suggereix a la parella que es realitzi un estudi prenatal citogenètic.

Cribratge bioquímic de primer trimestre (cribratge combinat bioquímic i ecogràfic de primer trimestre): L'any 2009 s'implanta definitivament a nivell nacional el cribratge combinat. Es recomana fer una prova diagnòstica invasiva quan el valor del risc de tenir un fill amb a síndrome de Down és superior a 1/250.

Encara que aquest procediment no s'implanta fins el gener del 2009, anys abans alguns obstetres ja el practicaven.

Confirmació: Generalment es tracta de biòpsies de còrion de segon trimestre, quan s'ha observat una alteració cromosòmica en un procés invasiu anterior i es vol confirmar si hi és en un altre teixit.

Doble indicació: Gestacions que tenen dues de les indicacions de risc elevat.

Edat materna avançada: La mare té més de 35 anys. A finals dels anys noranta, en implantar-se l'estudi del cribratge bioquímic de segon trimestre a nivell nacional, la indicació d'Edat Materna Avançada es traslladà fins als 38 anys, i posteriorment al 2009 aquesta indicació gairebé desapareix, ja que queda incorporada dins el càlcul de risc del cribratge combinat de primer trimestre.

Gestació anterior amb cromosomopatia: S'ha detectat una alteració cromosòmica en una gestació anterior. Tant pot ser que hagi acabat amb una Interrupció Legal de l'Embaràs (ILE) perquè s'ha fet un estudi citogenètic prenatal, com que s'hagi fet un cariotip i la gestació hagi continuat el seu curs fins al final.

Marcadors i anomalies ecogràfiques: En el control ecogràfic del primer o segon trimestre s'ha observat marcadors ecogràfics (plec nucal engruixit, os nasal absent o hipoplàsic, ductus venós revertit, regurgitació tricuspidea, quists de plexos coroidals...) o anomalies fetals relacionades amb cromosomopaties. (S'entén per marcadors els signes ecogràfics que es troben amb més freqüència quan el fetus té una anomalia cromosòmica).

Paràmetres bioquímics alterats: S'ha realitzat un estudi bioquímic i algun dels paràmetres es mostra alterat.

Progenitor amb cromosomopatia: Un dels dos progenitors és portador d'una alteració cromosòmica.

Reproducció assistida: Alguns estudis indiquen un augment de les anomalies en els cromosomes sexuals en determinats casos de reproducció humana assistida.

Triple indicació: Gestacions que tenen tres de les indicacions de risc elevat.

ANNEX II:**Llistat de totes les anomalies cromosòmiques en mostres prenatals**

	n.	%
TOTAL d'anomalies	250	100
Aneuploidies autosòmiques	130	52
Aneuploidies autosòmiques comunes	127	50,8
47,+13	8	
47,+18	44	
47,+21	75	
Aneuploidies autosòmiques no comunes	3	1,2
47,+2	1	
47,+20	1	
47,+22	1	
Aneuploidies de cromosomes sexuals	23	9,2
45,X	15	
47,XXX	3	
47,XXY	5	
Anomalies estructurals	18	7,2
Anomalies estructurals equilibrades	12	4,8
45,der(13;14)(q10;q10)	3	
45,der(13;14)(q10;q10)pat	1	
46,inv(7)(p15q34)	1	
46,t(3;5)(p25;q31)	1	
46,t(4;6)(q25;p11.2)	1	

46,t(6;12)(q22;q24.3)pat	2	
46,t(7;10)(p13;p13)	1	
46,t(8;11)(q27;p21.1)mat	1	
46,t(11;20)(q23;p13)mat	1	
Anomalies estructurals desequilibrades	6	2,4
46,XY,der(4)t(4;?)(q31.3;?)	1	
46,add(6)(q27)	1	
47,+i(9)(p10)	1	
46,der(9)t(9;20)(p24;q13.1)pat	1	
46,+13,der(13;14)(q10;q10)	1	
46,i(21)(q10)	1	
Poliploidies	3	1,2
69,XXX o 69,XXY	3	
Alteracions múltiples	2	0,8
46,X,+15	1	
70,XXX,+2	1	
Mosaics	74	29,6

ANNEX III: DESCRIPCIÓ DELS CASOS PRENATALS DE CARIOTIP EN MOSAIC

TIPUS	ORIGEN	CULTIU CURT	CULTIU LLARG	RESTES FETALS	FALS + / -
I	MCP	anòmal *	normal	normal	fals + cultiu curt
II	MCP	normal	anòmal *	normal	fals + cultiu llarg
III	MCP	anòmal *	anòmal *	normal	fals + ambdós
IV	MVF	anòmal *	normal	anòmal *	fals - cultiu llarg
V	MVF	normal	anòmal *	anòmal *	fals - cultiu curt
VI	MVF	anòmal *	anòmal *	anòmal *	anomalia
MCF	MCF	normal	normal	anòmal	fals - ambdós

	NHC	RESULTAT DEL CULTIU CURT	RESULTAT DEL CULTIU LLARG	INDICACIÓ I SEGUIMENT	ORIGEN DEL RESULTAT CITOGÈNIC AMB MOSAIC	FALS + vs. FALS -
1	12448	47,XX,+mar[8]/46,XX[22]	47,XX,+mar[11]/46,XX[8]	Indicació: angoixa Amniocentesi: 47,XX,+mar[32]/46,XX[6] Fenotip normal	Mosaic generalitzat	
1	8648	46,XY	CG: 46,XX FISH: nuc ish(DXZ1,DYZ3)x1[40]/(DXZ1)x2 [65]	Indicació: edat materna Fenotip masculí sense malformacions	FALS MOSAIC per contaminació materna	Fals + cultiu llarg
2	24926	46,XX	45,XX,der(14;21)(q10;q10)mat[10] /46,XX[10]	Indicació: progenitor afectat d'una cromosomopatia	FALS MOSAIC per contaminació materna	Fals + cultiu llarg

				Sang mare: 45,XX,der(14;21)(q10;q10)		
3	25690	46,XY	46,XX[47]/46,XY[3]	Indicació: edat materna	FALS MOSAIC per contaminació materna	Fals + cultiu llarg
1	20400	47,XY,+18	47,XY,t(9;15)(q32;p11.2),+18	Indicació: edat materna + marcadors i anomalies ecogràfiques Sang mare: 46,XX Sang pare: 46,XY ILE, sense estudi citogenètic	FALS MOSAIC per limitacions pròpies de la tècnica	FALS - cultiu curt
2	21971	46,XY	46,XY,inv(10)(q11.2q24.1)pat	Indicació: angoixa Sang mare: 46,XX Sang pare: 46,XY,inv(10)(q11.2q24.1)	FALS MOSAIC per limitacions pròpies de la tècnica	FALS - cultiu curt
3	24055	46,XX[5]	47,XX,+18	Indicació: marcadors i anomalies ecogràfiques ILE, sense estudi citogenètic	FALS MOSAIC per limitacions pròpies de la tècnica	FALS - cultiu curt
4	28221	46,XY	46,XY,inv(10)(q11.2q24.1)mat	Indicació: edat materna Sang mare: 46,XX,inv(10)(q11.2q24.1) Sang pare: 46,XY	FALS MOSAIC per limitacions pròpies de la tècnica	FALS - cultiu curt
5	31226	46,XX	46,XX,t(6;15)(q15;q11.2)	Indicació: cribratge bioquímic Amniocentesi: 46,XX.ish t(6;15)(SNRPN+,PML+;D15Z1+,SNRPN-,PML-)	FALS MOSAIC per limitacions pròpies de la tècnica	FALS - cultiu curt
1	24183	46,XY	46,XY,t(5;17)[7]/46,XY[106]	Indicació: Avortaments de repetició. Sang pares normal Sang nounat: 46,XY	FALS MOSAIC per artefacte de cultiu	FALS + cultiu llarg
1	02881	46,XX	46,XX[94]/46,XY[6]	Indicació: angoixa	BESSÓ REABSORBIT	

			FISH: nuc ish(DXZ1,DYZ3)x1[8]/(DXZ1)x2[300]	Sang fetal: 46,XX		
2	22201	47,XX,+13	46,XY	Indicació: edat materna i reproducció assistida ILE, sense estudi citogenètic	BESSÓ REABSORBIT	
1	10111	47,XX,+i(2p)[6]/46,XX[106]	46,XX	Indicació: cribratge bioquímic Seguiment ecogràfic, fenotip sense malformacions. Cariotip fetal suposadament sense anomalies cromosòmiques	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus I	FALS + cultiu curt
2	13630	47,XX,+11[10]/46,XX[43] FISH: nuc ish(D11Z1,CCND1)x3[28/88]	46,XX UPD(11):Normal	Indicació: angoixa Seguiment ecogràfic, fenotip sense malformacions. Cariotip fetal suposadament sense anomalies cromosòmiques	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus I	FALS + cultiu curt
3	14463	47,XX,+10[9]/46,XX[41]	46,XX	Indicació: edat materna Seguiment ecogràfic, fenotip sense malformacions. Cariotip fetal suposadament sense anomalies cromosòmiques	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus I	FALS + cultiu curt
4	19423	51,XX,+2,+7,+10,+13,+20	46,XX	Indicació: edat materna Amniocentesi: 46,XX	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus I	FALS + cultiu curt
5	20737	92,XXYY	46,XY	Indicació: edat materna Seguiment ecogràfic, fenotip sense malformacions. Cariotip fetal suposadament sense anomalies cromosòmiques	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus I	FALS + cultiu curt
6	21058	47,XX,+mar[4]/46,XX[56]	46,XX	Indicació: sense dades Seguiment ecogràfic, fenotip sense	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA	FALS + cultiu curt

				malformacions Sang nounat: 46,XX	Tipus I	
7	21259	47,XX,+7	46,XX	Indicació: sense dades Amniocentesi: 46,XX UPD(7):Normal	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus I	FALS + cultiu curt
8	21399	fetus 1: 47,XX,+21[36]/46,XX[14] fetus 2: 46,XX	fetus 1: 46,XX fetus 2: 46,XX	Indicació: edat materna Amniocentesi: 46,XX (fetus 1) i 46,XX (fetus 2)	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus I	FALS + cultiu curt
9	22829	46,XY,add(1)(p36)	46,XY	Indicació: edat materna Amniocentesi: 46,XY	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus I	FALS + cultiu curt
10	23749	47,XY,+16	46,XY	Indicació: angoixa Seguiment ecogràfic, fenotip sense malformacions. Cariotip fetal suposadament sense anomalies cromosòmiques	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus I	FALS + cultiu curt
11	25704	47,XY,+8[8]/46,XY[23]	46,XY	Indicació: angoixa Amniocentesi: 46,XY	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus I	FALS + cultiu curt
12	28995	92,XXYY	46,XY	Indicació: cribratge bioquímic Amniocentesi: 46,XY	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus I	FALS + cultiu curt
1	13889	46,XX	47,XX,+13[10]/46,XX[19]	Indicació: sense dades Amniocentesi: 46,XX	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus II	FALS + cultiu llarg
2	14358	46,XX	47,XX,+8[10]/46,XX[35]	Indicació: edat materna	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA	FALS + cultiu llarg

				Amniocentesi: 46,XX	Tipus II	
3	14962	46,XY	47,XY,+8[7]/46,XY[20]	Indicació: marcadors i anomalies ecogràfiques Amniocentesi: 46,XY	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus II	FALS + cultiu llarg
4	15173	46,XX	45,X	Indicació: marcadors i anomalies ecogràfiques Sang nounat: 46,XX	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus II	FALS + cultiu llarg
5	20338	46,XY	47,XY,+20	Indicació: marcadors i anomalies ecogràfiques Amniocentesi: 46,XY	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus II	FALS + cultiu llarg
6	20792	46,XX	47,XX,+7[25]/46,XX[30]	Indicació: angoixa Amniocentesi: 46,XX	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus II	FALS + cultiu llarg
7	22340	46,XY	47,XY,+7[3]/46,XY[10]	Indicació: sense dades Amniocentesi: 46,XY UPD(7): biparental	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus II	FALS + cultiu llarg
8	22697	46,XY FISH: nuc ish(DXZ1,DYZ3)x1	45,X[14]/46,XY[16]	Indicació: sense dades Amniocentesi: FISH: nuc ish(DXZ1,DYZ3)x1	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus II	FALS + cultiu llarg
9	23694	46,XY	47,XY,+2,t(10;17)(q11.2;q23)[9]/46,XY[41]	Indicació: edat materna Amniocentesi: 46,XY No tenim informació de la sang dels pares	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus II o bé FALS MOSAIC per pseudomosaïcisme	FALS + cultiu llarg
10	26018	46,XX	47,XX,+2[11]/46,XX[33]	Indicació: edat materna	MOSAIC CONFINAT A LA	FALS + cultiu

				Amniocentesi: 46,XX	PLACENTA Tipus II	llarg
11	27743	46,XY	47,XY,+18[17]/46,XY[55]	Indicació: edat materna Amniocentesi: 46,XY	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus II	FALS + cultiu llarg
12	29168	46,XY	47,XY,+12[22]/46,XY[19]	Indicació: gestació anterior afecte de cromosomopatia Amniocentesi: 46,XY FISH:nuc ish 12cen(D12Z3)x2	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus II	FALS + cultiu llarg
13	31960	46,XX	47,XX,+21	Indicació: cribratge bioquímic Amniocentesi: 46,XX FISH: nuc ish 21q22.3(D21S59,D21S341,D21S342)x 2	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus II	FALS + cultiu llarg
1	20524	92,XXYY[36]/46,XY[38]	92,XXYY[21]/46,XY[19]	Indicació: cribratge bioquímic Amniocentesi: 46,XY	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus III	FALS + ambdós cultius
2	21176	92,XXYY[80]/46,XY[3]	92,XXYY[4]/92,XXYY,del(7)(p10)[8]/46 ,XY[58]	Indicació: angoixa Amniocentesi: 46,XY	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus III	FALS + ambdós cultius
3	14612	92,XXXX	92,XXXX[7]/46,XX[70]	Indicació: edat materna i cribratge bioquímic Amniocentesi: 46,XX	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus III o bé CONTAMINACIÓ MATERNA	FALS + ambdós cultius
4	29964	47,XX,+7	47,XX,+7[4]/46,XX[54]	Indicació: sense dades	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA	FALS + ambdós

				Amniocentesi: 46,XX FISH: nuc ish(D7Z1)x2 UPD: s'ofereix UPD però és descartada per la parella	Tipus III	cultius
5	25846	47,XY,+mar1[10]/48,XY,+2mar2[10]	47,XY,+mar1[1]/46,XY[49]	Indicació: cribratge bioquímic Amniocentesi: 46,XY	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus III	FALS + ambdós cultius
1	3043	46,XX	47,XX,+i(5)(p10)[14]/46,XX[4]	Indicació: edat materna Amniocentesi: 47,XX,+i(5)(p10)[14]/46,XX[4] Sang fetal: 46,XX ILE, sense estudi citogenètic.	MOSAIC VERTADER FETAL Tipus V	FALS – cultiu curt
2	24854	46,XX	47,XX,+21	Indicació: cribratge bioquímic Amniocentesi: 47,XX,+21 ILE, sense estudi citogenètic	MOSAIC VERTADER FETAL Tipus V	FALS – cultiu curt
3	29938	46,XY	47,XY,+18	Indicació: marcadors i anomalies ecogràfiques Cariotip fetal suposadament amb anomalia cromosòmica en línia pura o en mosaic ILE, sense estudi citogenètic	MOSAIC VERTADER FETAL Tipus V	FALS – cultiu curt
1	14825	47,XX,+18	47,XX,+18[8]/46,XX[7]	Indicació: marcadors i anomalies ecogràfiques ILE, sense estudi citogenètic Cariotip fetal suposadament amb anomalia cromosòmica en línia pura o en mosaic	MOSAIC VERTADER FETAL Tipus VI o bé CONTAMINACIÓ MATERNA	ANOMALIA
2	15757	48,XY,+3,+21[48]/48,XY,+13,+21[14]	47,XY,+21	Indicació: cribratge bioquímic	MOSAIC VERTADER FETAL	ANOMALIA

				Amniocentesi: 47,XY,+21	Tipus VI	
3	16149	47,XX,+21	47,XX,+21[7]/46,XX[3]	Indicació: marcadors i anomalies ecogràfiques ILE, sense estudi citogenètic. Cariotip fetal suposadament amb anomalia cromosòmica en línia pura o en mosaic	MOSAIC VERTADER FETAL Tipus VI o bé CONTAMINACIÓ MATERNA	ANOMALIA
4	17767	45,X	45,X[6]/46,XX[4]	Indicació: marcadors i anomalies ecogràfiques ILE, sense estudi citogenètic Cariotip fetal suposadament amb anomalia cromosòmica en línia pura o en mosaic	MOSAIC VERTADER FETAL Tipus VI o bé CONTAMINACIÓ MATERNA	ANOMALIA
5	20879	47,XY,+21[36]/46,XY[4]	47,XY,+21	Indicació: marcadors i anomalies ecogràfiques ILE, sense estudi citogenètic Cariotip fetal suposadament amb anomalia cromosòmica en línia pura o en mosaic	MOSAIC VERTADER FETAL Tipus VI	ANOMALIA
6	21852	47,XX,+21[18]/46,XX[4]	47,XX,+21	Indicació: sense dades ILE, sense estudi citogenètic. Cariotip fetal suposadament amb anomalia cromosòmica en línia pura o en mosaic	MOSAIC VERTADER FETAL Tipus VI	ANOMALIA
7	21893	47,XY,+22,t(6;11)(q23;q13)[31]pat/ 46,XY,t(6;11)(q23;q13)[7]pat	46,XY,t(6;11)(q23.1;q13.3)pat	Indicació: edat materna + progenitor afectat d'una cromosomopatia Seguiment ecogràfic. Fenotip sense malformacions. Cariotip fetal suposadament equilibrat	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus VI (per anomalia heretada)	ANOMALIA

8	23487	47,XY,+mar	47,XY,+mar[8]/46,XY[18]	Indicació: edat Materna Amniocentesi: 47,XY,+mar[38]/46,XY[8] Sang fetal: 47,XY,+mar[60]/46,XY[40]	MOSAIC VERTADER FETAL Tipus VI	ANOMALIA
9	24200	47,XX,+16	47,XX,+16[1]/46,XX[49]	Indicació: marcadors i anomalies ecogràfiques ILE, sense estudi citogenètic Cariotip fetal suposadament amb anomalia cromosòmica en línia pura o en mosaic	MOSAIC VERTADER FETAL Tipus VI o bé CONTAMINACIÓ MATERNA	ANOMALIA
10	27621	47,XY,+13[6]/46,XY[4]	47,XY,+13	Indicació: marcadors i anomalies ecogràfiques ILE, sense estudi citogenètic Cariotip fetal suposadament amb anomalia cromosòmica en línia pura o en mosaic	MOSAIC VERTADER FETAL Tipus VI	ANOMALIA
11	29032	92,XXXX	92,XXXX[7]/46,XX[47]	Indicació: edat materna Amniocentesi: 92,XXXX[8]/46,XX[92] Fenotip normal	MOSAIC VERTADER FETAL Tipus VI o bé CONTAMINACIÓ MATERNA	ANOMALIA
12	29350	47,XX,+21[27]/46,XX[3]	47,XX,+21	Indicació: marcadors i anomalies ecogràfiques ILE, sense estudi citogenètic Cariotip fetal suposadament amb anomalia cromosòmica en línia pura o en mosaic	MOSAIC VERTADER FETAL Tipus VI	ANOMALIA
13	29859	46,XY,add(22)(p11.2)[18]/46,XY[3]	45,XY,der(15;22)(q10;q10)[59]/46,XY[38]	Indicació: marcadors i anomalies ecogràfiques	MOSAIC VERTADER FETAL Tipus VI	ANOMALIA

				ILE, sense estudi citogenètic Cariotip fetal suposadament amb anomalia cromosòmica en línia pura o en mosaic		
14	30166	47,XX,+18	47,XX,+18[9]/46,XX[28]	Indicació: marcadors i anomalies ecogràfiques ILE, sense estudi citogenètic Cariotip fetal suposadament amb anomalia cromosòmica en línia pura o en mosaic	MOSAIC VERTADER FETAL Tipus VI o bé CONTAMINACIÓ MATERNA	ANOMALIA
1	11695	47,XX,+18 FISH: nuc ish(D18Z1)x3	46,XX FISH: nuc ish(D18Z1)x2	Indicació: edat materna ILE, sense estudi citogenètic	MOSAIC CONFINAT INCLASSIFICABLE o bé CONTAMINACIÓ MATERNA	Indeterminat
2	16655	47,XY,+7[5]/46,XY[15]	46,XY	Indicació: marcadors i anomalies ecogràfiques Avortament espontani, sense estudi citogenètic	MOSAIC CONFINAT INCLASSIFICABLE	Indeterminat
3	18275	46,XY	47,XY,+7[5]/46,XY[15]	Indicació: sense dades Avortament espontani, sense estudi citogenètic	MOSAIC CONFINAT INCLASSIFICABLE	Indeterminat
4	18891	92,XXXX	92,XXXX[27]/46,XX[286]	Indicació: marcadors i anomalies ecogràfiques ILE, sense estudi citogenètic	MOSAIC CONFINAT INCLASSIFICABLE o bé CONTAMINACIÓ MATERNA	Indeterminat
5	21634	46,XX,der(15)t(11;15)(q10;q10)[15]/46,XX[5]	46,XX	Indicació: marcadors i anomalies ecogràfiques ILE, sense estudi citogenètic	MOSAIC CONFINAT INCLASSIFICABLE	Indeterminat

6	22159	47,XX,+21	48,XX,+18,+21	Indicació: marcadors i anomalies ecogràfiques ILE, sense estudi citogenètic	MOSAIC CONFINAT INCLASSIFICABLE	Indeterminat
7	22765	46,XY	47,XY,+9,der(9)t(9;14)(q10;q22),der(14)t(9;14)(q10;q22) FISH: ish t(9;14)(wcp9+;wcp4+),ish del subtel 9p(305J-T7x4)	Indicació: marcadors i anomalies ecogràfiques Avortament espontani, sense estudi citogenètic	MOSAIC CONFINAT INCLASSIFICABLE	Indeterminat
8	29607	47,XX,+7[4]/46,XX[20]	46,XX	Indicació: marcadors i anomalies ecogràfiques No hi ha seguiment	MOSAIC CONFINAT INCLASSIFICABLE	Indeterminat
9	29990	47,XY,+7[5]/46,XY[39]	46,XY	Indicació: marcadors i anomalies ecogràfiques No hi ha seguiment	MOSAIC CONFINAT INCLASSIFICABLE	Indeterminat
10	30080	47,XY,+3[6]/46,XY[24]	46,XY	Indicació: cribratge bioquímic No hi ha seguiment	MOSAIC CONFINAT INCLASSIFICABLE	Indeterminat
11	30646	No creixement cel·lular FISH: nuc ish(D18Z1x2,DXZ1x1),(RB1,D21S59, D21S341,D21S342)x2[50/75]	45,X[11]/46,XX[7]	Indicació: avortament de repetició No hi ha seguiment	MOSAIC CONFINAT INCLASSIFICABLE	Indeterminat
12	30958	47,XX,+21	47,XX,+21[6]/46,XX[4]	Indicació: edat materna No hi ha seguiment	MOSAIC CONFINAT INCLASSIFICABLE o bé CONTAMINACIÓ MATERNA	Indeterminat
13	31554	92,XXXX	92,XXXX[2]/46,XX[48]	Indicació: cribratge bioquímic Fenotip normal	MOSAIC CONFINAT INCLASSIFICABLE o bé CONTAMINACIÓ MATERNA	Indeterminat

1	17080	45,X[8]/46,X,+mar[48] fetus 1 45,X[40]/46,X,+mar[2] fetus 2	45,X[60]/46,X,+mar[16] fetus 1 45,X[14]/46,X,+mar[36] fetus 2	Indicació: marcadors i anomalies ecogràfiques ILE, sense estudi citogenètic	MOSAIC INDETERMINAT	Indeterminat
2	26498	No creixement cel·lular FISH: nuc ish(D18Z1,DXZ1)x2,(RB1,D21S59,D2 1S341,D21S342)x2	47,XX,+22[8]/46,XX[7]	Indicació: sense dades No hi ha seguiment	MOSAIC INDETERMINAT o bé CONTAMINACIÓ MATERNA	Indeterminat

Glossari: MCP: mosaic confinat a la placenta; ILE: Interrupció legal de l'embaràs; FISH:hibridació *in situ* fluorescent

ANNEX IV:**Llistat de totes les anomalies cromosòmiques en avortaments**

	n.	%
TOTAL d'anomalies	249	100
Aneuploidies autosòmiques	128	51,4
Aneuploidies autosòmiques no comunes	81	32,6
45,-21	1	
47,+2	2	
47,+6	2	
47,+7	4	
47,+8	2	
47,+9	4	
47,+10	2	
47,+12	6	
47,+14	7	
47,+15	15	
47,+16	23	
47,+20	2	
47,+22	11	
Aneuploidies autosòmiques comunes	47	18,8
47,+13	9	
47,+18	13	
47,+21	25	
Aneuploidies de cromosomes sexuals	32	12,8

45,X	30	
47,XXY	2	
Poliploidies	23	9,4
69,XXX o 69,XXY	21	
92,XXXX o 92,XXYY	2	
Anomalies estructurals	17	6,8
Anomalies estructurals desequilibrades	16	6,4
46,der(4)t(4;10)(q35;q11.2)pat	1	
46,add(4)(p15.3)	1	
47,+i(9)(p10)	1	
46,der(9)	1	
46,+der(11)t(11;22)(q23;q11.2),-22	1	
46,+13,der(13;14)(q10;q10)	1	
46,der(13;14)(q10;q10),+14	5	
46,+14,der(14;14)(q10;q10)	1	
46,i(18p)	1	
46,der(14;21)(q10;q10),+21	1	
46,i(21)(q10)	1	
47,+mar	1	
Anomalies estructurals equilibrades	1	0,4
45,der(13;14)(q10;q10)	1	
Alteracions múltiples	14	5,6
46,X,+8	1	
46,X,+13	1	
46,X,+mar	1	

47,-15,der(15;15)(q10;q10),+16,+21	1	
47,+16,der(20)t(20;?)	1	
47,t(10;13)(p15;q22),+15	1	
48,+2,+21	2	
48,XXX,+8	1	
48,XXX,+18	1	
68,XXX,-1	1	
68,XXY,-18	1	
70,XXX,+16	1	
91,XXXX,-6	1	
Mosaics	35	14

ANNEX V: DESCRIPCIÓ DELS CASOS D'AVORTAMENTS DE CARIOTIP EN MOSAIC

TIPUS	ORIGEN	CULTIU CURT	CULTIU LLARG	RESTES FETALS	FALS + / -
I	MCP	anòmal *	normal	normal	fals + cultiu curt
II	MCP	normal	anòmal *	normal	fals + cultiu llarg
III	MCP	anòmal *	anòmal *	normal	fals + ambdós
IV	MVF	anòmal *	normal	anòmal *	fals - cultiu llarg
V	MVF	normal	anòmal *	anòmal *	fals - cultiu curt
VI	MVF	anòmal *	anòmal *	anòmal *	anomalia
MCF	MCF	normal	normal	anòmal	fals - ambdós

	NHC	CULTIU CURT	CULTIU LLARG	ALTRES RESTES FETALS	ORIGEN DEL RESULTAT CITOGENÈTIC EN MOSAIC	FALS + vs. FALS -
1	5779	47,XY,+mar	46,XX	46,XX	FALS MOSAIC per contaminació materna	
1	20411	46,XX,del(18p11.2)[16]/46,XX,r(13)(p11.2q32),der(18)t(13;18)(q32;p11.2)[36]/45,XX,-13,add(18)(p11.2)[4].ish t(13;18)(13qter+;wcp18+,D18Z1+)	45,XX,der(15;18)t(15;18)(p11.2;p11.2). ish t(15;18)(D15Z1+,SNRPN+;wcp18+,D18Z1+)	45,XX,der(15;18)t(15;18)(p11.2;p11.2). ish t(15;18)(D15Z1+,SNRPN+;wcp18+,D18Z1+)	TRANSLOCACIONS MÚLTIPLES SIMULTÀNIES	

1	15815	46,XX	92,XXXX	46,XX	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus II	FALS + cultiu llarg
2	18854	46,XX	47,XX,+12[14]/46,XX[12]	46,XX	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus II	FALS + cultiu llarg
3	28089	46,XX	47,XX,+der(11)add(11)(p15)[10]/46,XX [30]	46,XX	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus II	FALS + cultiu llarg
1	20662	47,XY,+22	47,XY,+22	46,XY	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus III	FALS + ambdós cultius
2	13672	47,XY,+16	47,XY,+16	46,XY	MOSAIC CONFINAT A LA PLACENTA Tipus III	FALS + ambdós cultius
1	14802	46,XX	47,XX,+14	47,XX,+14	MOSAIC VERTADER FETAL Tipus V	Fals – cultiu curt
2	7749	46,XY	47,XY,+18	47,XY,+18	MOSAIC VERTADER FETAL Tipus V	Fals – cultiu curt
1	12367	47,XX,+4	47,XX,+4	47,XX,+4[3]/47,XX,+12[12]	MOSAIC VERTADER FETAL Tipus VI	ANOMALIA
1	18096	46,XY	46,XY	45,X	MOSAIC CONFINAT AL FETUS	Fals – ambdós cultius
1	12087	45,X	46,X,+mar	Mostra no rebuda	MOSAIC CONFINAT INCLASSIFICABLE	
2	14738	47,XX,+16,del(16q?)	47,XX,+16	No creixement cel·lular	MOSAIC CONFINAT INCLASSIFICABLE	
3	16861	46,XX,t(1;?)(p36.3;?)	46,XX,der(1)t(1;6)(p36.3;q13)	Mostra no rebuda	MOSAIC CONFINAT INCLASSIFICABLE	
4	23081	47,XX,+21	47,XX,+12	Mostra no rebuda	MOSAIC CONFINAT INCLASSIFICABLE	

5	18733	46,XX	45,X	Mostra no rebuda	MOSAIC CONFINAT INCLASSIFICABLE	
6	27880	46,XY	47,XY,+14[10]/46,XY[7]	Mostra no rebuda	MOSAIC CONFINAT INCLASSIFICABLE	
7	27505	46,XY	47,XY,+15[47]/46,XY[3]	Mostra no rebuda	MOSAIC CONFINAT INCLASSIFICABLE	
8	24386	46,XY	47,XY,+3	Mostra no rebuda	MOSAIC CONFINAT INCLASSIFICABLE	
1	5225	Mostra no adequada	69,XXX	69,XXX[9]/46,XX[9]	ORIGEN INDETERMINAT o bé CONTAMINACIÓ MATERNA	
2	10681	No creixement cel·lular	92,XXXX	46,XX	ORIGEN INDETERMINAT o bé CONTAMINACIÓ MATERNA	
3	13865	No creixement cel·lular	46,XX	47,XX,+3[4]/46,XX[5]	ORIGEN INDETERMINAT o bé CONTAMINACIÓ MATERNA	
4	14444	No creixement cel·lular	45,X[8]/46,XX[4]	45,X	ORIGEN INDETERMINAT o bé CONTAMINACIÓ MATERNA	
5	17956	No creixement cel·lular	46,XX	47,XX,+21	ORIGEN INDETERMINAT o bé CONTAMINACIÓ MATERNA	
6	31412	No creixement cel·lular	47,XX,+12[5]/46,XX[6]	Mostra no rebuda	ORIGEN INDEERMINAT o bé CONTAMINACIÓ MATERNA	

7	6022	Mostra no correcta	46,XX/69,XXX/92,XXXX	Mostra no rebuda	ORIGEN INDETERMINAT	
8	17636	No creixement cel·lular	46,XX,t(X,1)(q26;q25)[2] /46,XX[20]	Mostra no rebuda	ORIGEN INDETERMINAT o bé CONTAMINACIÓ MATERNA	
9	12093	No creixement cel·lular	45,X[7]/46,XY[23]	45,X[5]/46,XY[32]	ORIGEN INDETERMINAT	
10	15194	Mostra no correcte	47,XX,+20[5]/46,XX[5]	Mostra no rebuda	ORIGEN INDETERMINAT o bé CONTAMINACIÓ MATERNA	
11	18164	No creixement cel·lular	47,XX,+22[2]/46,XX[18]	Mostra no rebuda	ORIGEN INDETERMINAT o bé CONTAMINACIÓ MATERNA	
12	19164	Mostra no rebuda	45,X[12]/46,XX[41]	No creixement cel·lular	ORIGEN INDETERMINAT o bé CONTAMINACIÓ MATERNA	
13	20801	Mostra no rebuda	45,X[110]/46,X,+mar[13]/46,XY[3]	No creixement cel·lular	ORIGEN INDETERMINAT	
14	3778	No creixement cel·lular	46,XX[3]/46,XY[9]	Mostra no rebuda	ORIGEN INDETERMINAT o bé CONTAMINACIÓ MATERNA	
15	25943	No creixement cel·lular	47,XY,+16[7]/46,XY[13]	Mostra no rebuda	ORIGEN INDETERMINAT	
16	28664	46,XX	No creixement cel·lular	45,X[10]/46,XX[2]	ORIGEN INDETERMINAT o bé CONTAMINACIÓ MATERNA	

