

Tabla 43. Frecuencia y rango de metafases con descondensación de 1qh, 9qh, 16qh e Yqh en los 158 casos.

Regiones	Metafases con		Rango	
	descondensación	%	por caso	%
1qh	107/1965	5,4	0-5/10	0-50,0
9qh	177/1965	9,0	0-7/12	0-58,3
16qh	8/1965	0,4	0-2/5	0-40,0
Yqh+	9/1965	0,5	0-2/6	0-33,3
1+9qh	28/1965	1,4	0-3/12	0-25,0
1+16qh	5/1965	0,3	0-1/8	0-12,5
9+16qh	2/1965	0,1	0-1/07	0-14,3
9+Yqh	2/1965	0,1	0-1/11	1-9,1
1+9+16qh	1/1965	0,05	0-1/19	0-5,0

La frecuencia de metafases que presentan sólo descondensación 9qh ha sido la más alta (9,0%). Es decir, de las 1965 metafases que mostraban descondensación en alguna región, 177 metafases mostraron descondensación sólo en el cromosoma 9. La descondensación de sólo la región 1qh le sigue en frecuencia (5,4%); es decir, se encontraron 107 metafases con descondensación solo 1qh de las 1965 metafases que mostraban descondensación. Mucho menos frecuente es la descondensación 16qh (0,4%).

Los resultados respecto a la biòpsia de corion analizada muestran una variabilidad considerable en el porcentaje de metafases con descondensación, así como el tipo de cromosoma afectado por la misma. Para la región 1qh se han observado casos con ausencia de descondensación en todas las metafases analizadas y casos en los que un 50% de las metafases muestran dicha descondensación. El rango por biòpsia corial para la descondensación 9qh va desde cero hasta 58,3%, para la del 16qh de cero a 40% y para Yqh de cero a 33,3%.

Una metafase puede tener descondensación de dos o más regiones de heterocromatina. La combinación más frecuente es la descondensación de 1qh y 9qh en la misma metafase (1,4%). El rango por muestra varía entre cero y 25%. Le sigue en frecuencia la descondensación 1+16qh (0,3%) con un rango entre el cero y 12,5%. (Figura 35). Mucho menos frecuente es la descondensación 1+9+16qh (0,05%) con un rango que varía entre el cero y el 5%. Es de destacar que ocasionalmente se ha observado la homocigosis para la descondensación de 1qh, 9qh y 16qh (Figura 36).

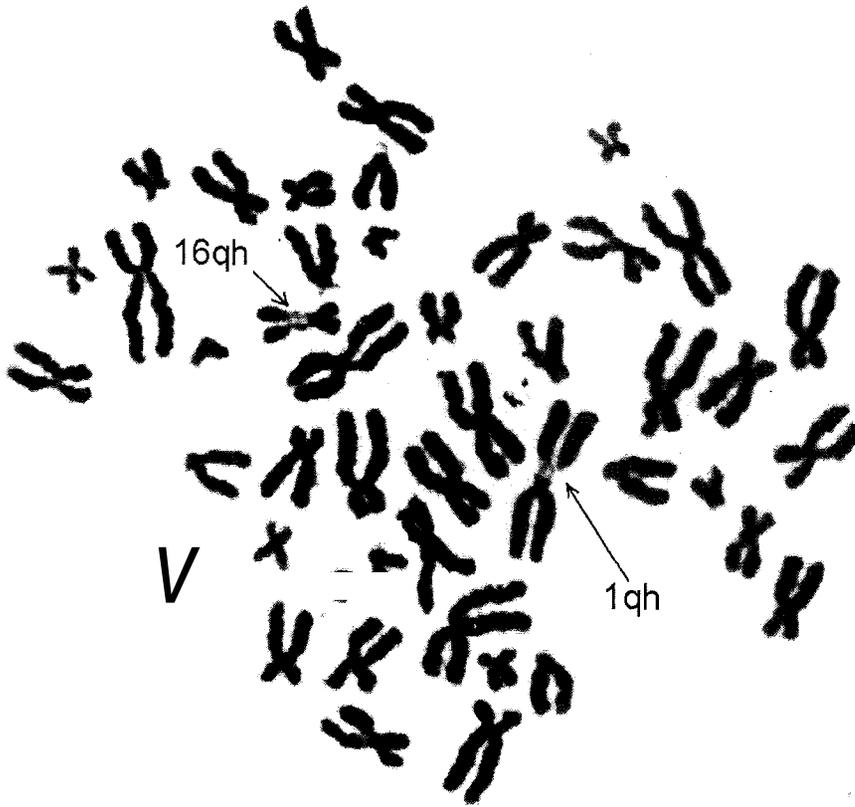


Figura 35. Metafase con descondensación 1qh y 16qh.

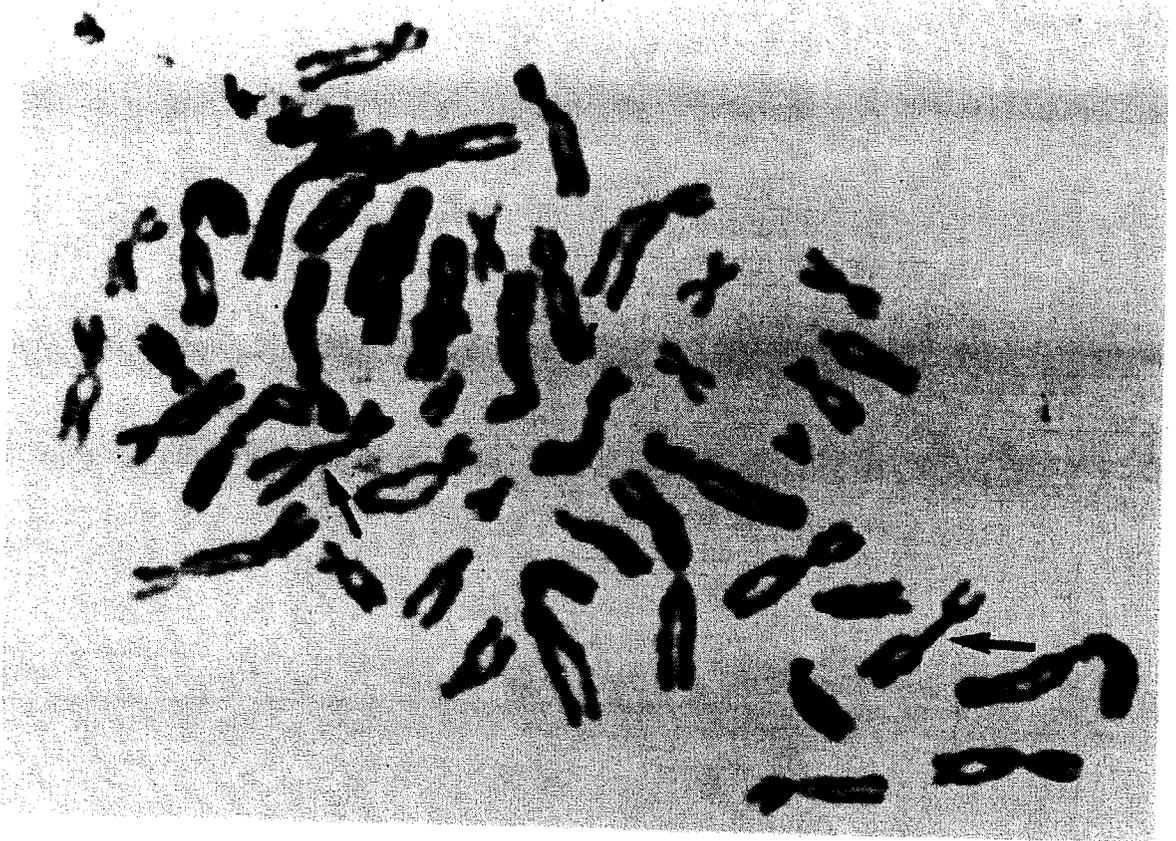


Figura 36. Homozigosis para la descondensación de 9qh

3.4.1 Posible influencia del medio de cultivo utilizado y de la edad gestacional

Con el fin de determinar si el medio de cultivo empleado y la edad de gestación podrían influir en la descondensación de la heterocromatina observada en vellosidades coriales hemos analizado estos dos aspectos por separado.

Respecto al **medio de cultivo empleado**, se observa una frecuencia de descondensación de la heterocromatina de 45,7%, 36,4% y 47,5% para los medios Chang, F-10, y RPMI-1640 respectivamente. Estos valores no muestran una diferencia estadísticamente significativa ($\chi^2=0,30$, $p>0,05$) (Tabla 44).

Tabla 44. Influencia del medio de cultivo en la expresión de la descondensación de la heterocromatina.

Medio de Cultivo	n	Casos con descondensación	%
Chang	105	48	45,7
F-10	11	4	36,4
RPMI-1640	223	106	47,5
Totales	339	158	46,6

Para estudiar el segundo parámetro se han realizado tres grupos de **edades gestacionales**, un grupo entre la 8 y 14 semana de gestación, otro entre 15 y 20, y el último con las de más de 20 semanas. Se observa que la frecuencia de casos con descondensación de la heterocromatina oscila entre el 41,7% del primer grupo (8-14 semanas) y el 85,7% del grupo de mayores de 20 semanas. Esta diferencia es estadísticamente significativa ($\chi^2=8,39$, $p<0,05$) (Tabla 45).

Tabla 45. Influencia de la semana de gestación en la expresión de la descondensación de la heterocromatina.

Semanas de gestación	n	Casos con descondensación	%
8-14	278	116	41,7
15-19	54	36	66,6
>20	7	6	85,7
Totales	339	158	46,6

4. DISCUSIÓN

4 DISCUSIÓN

4.1 Características generales de la serie estudiada.

4.1.1. Indicaciones diagnósticas.

En el presente estudio las indicaciones más frecuentes han sido la Ansiedad Materna(40,5%), la Edad Materna Avanzada (39,7%) y la Anomalía Génica Familiar (8,3%). Estas indicaciones son también las más frecuentes en la mayoría de las series (Tabla 46).

En todas la series aparece la **Edad Materna** como la indicación con mayor frecuencia (variando entre un 34,9% y un 92%). Esta frecuencia es muy superior al resto de indicaciones. En nuestro caso figura en segundo lugar a muy escasa distancia de la Ansiedad Materna.

Tabla 46. Frecuencia de indicaciones diagnósticas

Series	n	A	EM	HAA	ADN	ACP	AF
Stengel y col (1992)	5646	-	83,5	4,4	3,7	1,0	-
Chacravarty y col (1992)	3100	-	35,0	5,4	17,8	-	12,5
Smith y col (1992)	4330	2,3	34,9	23,0	11,5	5,4	1,8
Sachs y col (1992)	3500	-	73,8	14,8	-	4,2	-
Ramos y col (1992)	1117	20,8	55,7	11,9	6,4	10,8	-
Costa y col (1992)	700	-	92,0	4,7	0,8	1,1	-
Soler y col (1992)	1173	-	-	-	-	-	-
Salvador y col (1989)	1282	8,8	69,4	11,2	3,2	-	4,1
Presente estudio	1112	40,5	39,7	3,9	8,3	0,5	2,2

Abreviaturas: A: Ansiedad; EM: Edad Materna; HAA: Hijo anterior afecto; ADN: ADN; ACP: Anomalía Cromosómica Progenitores; AF: Antecedente Familiar.

La Ansiedad Materna sólo aparece en algunas series y todos los valores son sensiblemente más bajos que los del presente trabajo. En las series nacionales sólo la Fundación Jiménez Díaz de Madrid presenta un 20,8% (Ramos y col, 1992) y el Estudio Colaborativo Español un 8,8% (Salvador y col, 1989). En las series internacionales sólo figura esta indicación en los trabajos de Smith y col. (1992) con 2,3%.

La indicación **Hijo Anterior Afecto** figura en todas las series en tercer lugar excepto en la serie de Chakravarty y col. (1992) y en el presente trabajo. En nuestra serie es el cuarto en orden de frecuencia con un 3,9%.

El resto de indicaciones corresponden a casos con algún antecedente individual o familiar. Pertenecen a este grupo aquellas gestantes cuyos antecedentes familiares hacen pensar en una herencia autosómica (tanto dominante como recesiva) o ligada al sexo. Las frecuencias de cada una de ellas, de manera individual, son bajas, pero el número total de las mismas está en aumento debido a que los cuadros clínicos que las determinan son mejor conocidos. Estas enfermedades moleculares presentan una incidencia de una vez por cada cien recién nacidos vivos, y suponen un 8,5 de la mortalidad infantil. El alto porcentaje de riesgo obliga a realizar un diagnóstico prenatal.

En nuestro caso el estudio molecular por Anomalía Génica Familiar es el más frecuente, siendo la tercera indicación en frecuencia (8,3%). Este porcentaje es muy elevado respecto a otros autores :0,7% (Soler y col, 1992); 0,8% (Costa y col, 1992); 3,2% (Salvador y col, 1989) 3,7% (Stengel y col, 1992). Y similar al de otras series internacionales: 11,5% (Smith y col, 1992); 13,5% (Chakravarty y col, 1992). La alta incidencia observada en nuestra serie se debe a la colaboración con el equipo de Biología Molecular del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, que permite la realización del estudio citogenético además del estudio molecular, en base al riesgo potencial de aparición de una anomalía cromosómica en cualquier gestación.

El histograma de la Figura 37 muestra la frecuencia de diagnósticos realizados de todas las series respecto a la Edad Materna, Ansiedad y el resto de indicaciones. Estas últimas se han tratado como un bloque debido a que todas ellas presentan algún antecedente y a que, en conjunto, las frecuencias en relación a la Edad Materna y Ansiedad son relativamente bajas.

Dicha figura muestra claramente las variaciones de las indicaciones, posiblemente debidas al tipo de centro en el que se realizan.

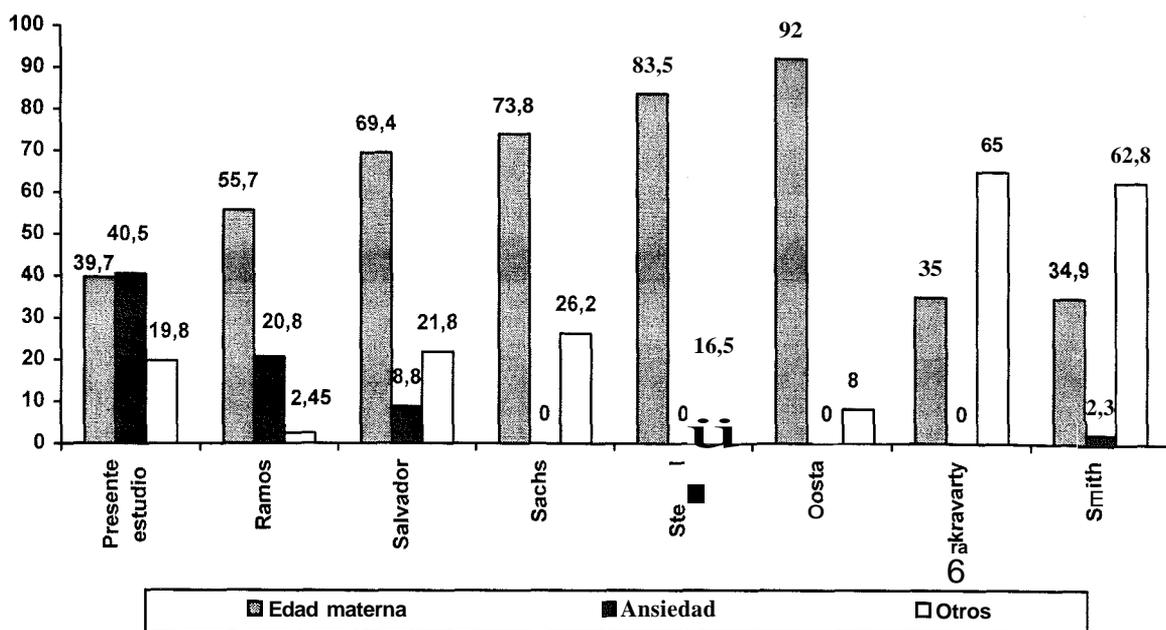


Figura 37. Frecuencia de las indicaciones para realizar una biòpsia de corion

Considerando las series españolas se observa que la frecuencia de la indicación Ansiedad es alta en los centros de iniciativa privada, nula en los centros públicos de la Seguridad Social y media en los centros que son combinación de ambos. Sin embargo, respecto a la Edad Materna, la frecuencia es mucho más alta en centros públicos (hasta un 92%) que en centros privados. Esto es debido básicamente a motivos de volumen asistencial y económicos. Los centros públicos consideran la Edad Materna como punto fundamental en que cifrar la inidicación del estudio, aceptando la frontera de los 35 años en la que el riesgo de trisomía 21 es 25 veces superior al de la población general. Sin embargo no debemos olvidar que no realizar diagnóstico prenatal a madres menores de 35 años supone aceptar el nacimiento de la mitad de recién nacidos con Síndrome de Down, con las consecuentes implicaciones familiares y sociales. En los últimos años, debido al mayor nivel de información, se ha observado un aumento de peticiones de diagnóstico prenatal de parejas no incluidas en la población de riesgo, pero que conocen el carácter esporádico de las malformaciones congénitas y de las cromosopatías en general. Estas parejas acuden a centros de iniciativa privada bajo la indicación Ansiedad. Ello explica la diferencia de frecuencias de las indicaciones en los centros públicos y privados.

4.1.2 Posible efecto de la metodología de extracción de vellosidades coriales en la evolución perinatal.

La evaluación del riesgo que tiene el procedimiento de la técnica de extracción de vellosidades coriales, ha sido ampliamente documentada particularmente en abortos espontáneos (Tabla 47).

Tabla 47 Extracción de vellosidades coriales y pérdida fetal.

Series	Casos	Pérdida fetal	
		n	%
Rhoads y col., 1989	2248	45	2,0
Brambati y col, 1988	1159	71	6,1
Canadian Collaborative Group 1989	1191	26	2,2
Ward y col, 1988	163	43	26,3
Green y col. 1988	940	27	2,9
Wade y Young, 1989	714	29	4,1
Jahoda y col, 1989	1550	101	6,5
Clark y col, 1989	211	8	3,8
Shalev y col., 1994	356	10	2,9
Lunshof y col., 1995	1936	87	4,5
Presente estudio	100	2	2,0
Total	8276	352	4,3

En abortos espontáneos, se puede diferenciar claramente aquellos casos que son pérdidas fetales espontáneas y los fallecimientos fetales detectados "in útero" antes de las 28 semanas (abortos retenidos). Calcular la incidencia de pérdida fetal es muy complicado, ya que se ha demostrado (mediante control ecográfico) que del 2%-5% de gestaciones que entre la 2 y 12 semanas de gestación eran viables, en el siguiente control ecográfico, aproximadamente realizado entre la 18 y 20 semana, son abortos retenidos o han evolucionado como pérdidas fetales espontáneas antes de la 28 semana de gestación (Christiaens y Stoutenbeek, 1984; Wilson y col, 1984; Gilmore y McNay, 1985; Casner y col, 1987; Simpson y Bombard, 1987).

Además de esto, el cálculo de las frecuencias queda aumentado debido al incremento de pérdida fetal con la edad materna, que es precisamente el grupo de indicación de más alto riesgo de anomalías cromosómicas, y por tanto la indicación más frecuente para efectuar un

diagnóstico prenatal (Warburton y col, 1980; Wilson y col, 1984; Gilmore y Mcnay, 1985). Estas pérdidas fetales suelen ocurrir normalmente durante la 8 y 16 semanas y muy raramente después de la 16 semana (Simpson, 1990). Además, este periodo más frecuente en pérdidas fetales, abarca el tiempo de realización de las vellosidades coriales por lo que los cálculos de pérdida fetal debidos a la técnica de extracción, es necesario evaluarlos con mucho cuidado, por el posible aumento de las frecuencias debido a estos sucesos ajenos a la propia técnica.

La evolución fetal de 100 muestras coriales realizadas en nuestro estudio ha permitido observar una frecuencia de pérdida fetal de un 2%. Debido a que se presentaron dos casos con roturas prematuras de membranas, y a que en ambas gestaciones se practicó una interrupción del embarazo, debido a la inviabilidad fetal, ambas pérdidas fueron atribuidas a la técnica de extracción. Se ha observado, en una ocasión, un desprendimiento placentario en la semana 39, pero no es atribuible a la técnica debido al largo tiempo transcurrido entre la extracción de la muestra y el desprendimiento placentario. Así pues, nuestro porcentaje atribuible a la técnica es bajo (2%) y es comparable al obtenido por otras series después de eliminar el "background" de pérdidas debidas a otras causas; un 1,3% y 2,1% (Saura y col. 1991; Costa y col 1992) respectivamente. Se han publicado varias series en las que se demuestra la seguridad del proceso de extracción al minimizar los riesgos con la utilización del control ecográfico, mejora de la técnica de extracción y mayor experiencia del operador (Wara y col, 1988; Clark y col, 1989; Gustavi y col, 1989; Jahoda y col, 1989; Wade y Young, 1989; Shalev y col.1994; Lunshof y col.1995). Además de estos trabajos se han publicado dos Estudios Colaborativos en los que se compara la frecuencia de pérdidas fetales en extracciones de vellosidades coriales y en extracciones de líquido amniótico en medio-trimestre. El Estudio Colaborativo de Canadá (Canadian Collaborative CVS-Amniocentesis Clinical Trial Group, 1989), y el Colaborativo Americano (Rhoads, 1989) obtienen un aumento de pérdidas fetales post-biopsia superior en un 0,6%-0,8% respectivamente respecto a las pérdidas post-amniocentesis. Ambos porcentajes no suponen diferencias significativas. Estos datos sugieren que tanto la práctica de amniocentesis medio-trimestre como la de vellosidades coriales son técnicas seguras para la obtención de tejido fetal.

Recientemente Shalev y col. (1994), han realizado un estudio comparativo entre pérdidas fetales en vellosidades coriales, amniocentesis precoces y amniocentesis en medio-trimestre, encontrando el mayor riesgo de pérdida fetal en las amniocentesis precoces. El total de pérdidas fetales fue de 2,9% en vellosidades coriales, 3,2% en amniocentesis precoz y 0,9% en amniocentesis medio-trimestre. El riesgo de pérdida fetal en nuestra serie (2%) es sensiblemente inferior al de vellosidades coriales y amniocentesis precoz hallados en la serie de Shalev y col (1994). Respecto a la amniocentesis precoz, harán falta estudios de series más amplias para evaluar las frecuencias reales de pérdida fetal.

Respecto a nuestro estudio, es interesante resaltar que en el 100% de los casos se obtuvo un resultado citogenético. En tres ocasiones hubo una pérdida fetal. En dos ocasiones los cariotipos eran anómalos (47,XX+18 y 46,XY/47,XY+13), pudiendo haber evolucionado como pérdidas fetales, debido a su propia anomalía y no al procedimiento de extracción de muestra.

Todos los recién nacidos presentaron pesos considerados normales. Sólo en cuatro ocasiones han sido menores de 2500 gr., y en cinco ocasiones han sido superiores a 4000 gr. La técnica de extracción no afecta al peso de los recién nacidos. Esta observación es común en todas las series de los autores antes mencionados. Así mismo, no hubo complicaciones maternas que supusieran pérdidas fetales. En dos ocasiones hubo metrorragias en el primer trimestre, pero evolucionaron como partos naturales a término.

En algunos trabajos de biopsias coriales muy precoces, se han detectado anomalías fetales en las extremidades debido a la formación de bandas amnióticas que pueden interferir en el desarrollo fetal y producir la amputación de extremidades u otras anomalías (Smoleniec y James, 1991).

En nuestro caso, ningún recién nacido ha presentado anomalías en las extremidades. Sólo en cinco ocasiones se ha observado, por ultrasonidos, la formación de un hematoma subcoriónico postbiopsia. Los trabajos descritos con este tipo de anomalías siempre se refieren a extracciones realizadas antes de las nueve semanas de gestación. Ello es debido a que el índice mitótico en células de citotrofoblasto es mucho menor antes de las 9 semanas de gestación, por lo que para realizar un estudio citogenético, es necesaria una cantidad de muestra más abundante, lo que supone más inserciones, y por tanto se aumenta el riesgo de aborto y de complicaciones obstétricas. De hecho, los datos de todos los estudios mencionados, muestran que la pérdida fetal incrementa si también incrementa el número de inserciones. Así mismo, el número de inserciones decrece cuando aumenta la experiencia del operador.

4.2 Optimización de la técnica citogenética para el análisis de vellosidades coriales

La primera dificultad para el estudio citogenético de vellosidades coriales radica en la obtención de metafases en cantidad y calidad suficiente que permitan realizar un análisis seguro y fiable.

Esta dificultad, en el caso de cultivo directo o semidirecto, es debido a:

-El análisis de células con actividad mitótica espontánea procedentes del citotrofoblasto. Si bien las vellosidades coriales son un tejido fetal en desarrollo y la actividad mitótica en la zona del citotrofoblasto es alta, muchas veces el número de divisiones es reducido para poder hacer un estudio completo o para poder descartar un mosaicismo cromosómico.

-La utilización de un tiempo relativamente largo de colcemid para aumentar el número de divisiones observables. Este tiempo acorta considerablemente los cromosomas que muchas veces presentan las cromátides abiertas y rizadas dificultando así la posible detección de anomalías cromosómicas.

En el presente estudio se han tenido en cuenta cinco aspectos técnicos que han contribuido a mejorar el análisis de la muestra: Medio de transporte, Lavado de la muestra, Puesta en cultivo, Extracción del cultivo y Técnica de bandas cromosómicas. La metodología empleada se ha especificado en el apartado 2.2 y 2.3 de Material y Método.

Medio de transporte.

Las condiciones de esterilidad, la temperatura y el tiempo que transcurre desde la obtención del tejido hasta su procesado en el laboratorio repercute en la posterior viabilidad celular de la muestra.

En nuestro caso el medio de transporte es el RPMI-1640 y se ha observado que la adición de antibióticos al medio evita, en muchos casos, la contaminación de la muestra. Aún en el caso de contaminación por bacterias, como el cultivo es de 24-48 horas, pueden obtenerse divisiones lavando varias veces la muestra con solución salina de Hank's suplementada con antibióticos. El medio habitual de transporte de otros tejidos para cultivos primarios suele ser Suero Fisiológico. Silvestre (1991) sugiere la recogida de vellosidades coriales procedentes de abortos espontáneos, en Solución Salina de Hank's sin calcio ni magnesio. Otros tejidos como tumores sólidos requieren medios específicos de transporte; Berrozpe (1991) utiliza medio DMEM rico en glucosa, aminoácidos y otros componentes básicos necesarios para el mantenimiento de la muestra en condiciones idóneas hasta su procesado en el laboratorio.

En el caso de procesado de la muestra al día siguiente de su extracción, se observó una mejora importante al emplear medio de cultivo completo en el transporte.

Lavado de la muestra

Uno de los problemas importantes que presenta el estudio citogenético a partir de vellosidades coriales es la contaminación materna. Este inconveniente ha sido subsanado tras una buena separación entre vellosidades y decidua materna tal y como se ha descrito en el apartado 2.3.3.1. Esta mejora técnica ya había sido descrita con anterioridad por diferentes autores. (Simoni y col, 1983; Newport y col, 1986),

Puesta en cultivo

Dado que el diagnóstico prenatal tiene como objetivo primordial la obtención de un resultado citogenético rápido, la adaptación de la técnica propuesta por Simoni y col (1983) en nuestro laboratorio ha permitido obtener un resultado citogenético fiable en un 93% de los casos en 4 días. La cantidad y calidad de las divisiones mejora sensiblemente con muestras puestas en cultivo durante los primeros treinta minutos posteriores a la extracción.

Extracción del cultivo y obtención de preparaciones

Partiendo de las indicaciones descritas en la técnica por Simoni y col (1983) y modificados posteriormente por su equipo (Simoni y col 1985) hemos analizado paso por paso todo el proceso de extracción del cultivo llegando a la conclusión de que deben mantenerse con rigor todas las condiciones y los tiempos. Actualmente es una metodología ampliamente utilizada en diferentes laboratorios dedicados a Diagnóstico Prenatal (Nocera y col, 1989; Chudoba y col. 1989; Ledbetter y col, 1992; Ramos y col, 1992; Smith y col, 1994).

El proceso de extensión de las células disgregadas en el porta es un paso clave para la obtención de buena calidad de metafases. La extensión se realiza por tensión superficial, de manera que es importante una buena disgregación del tejido con ácido acético y una buena extensión a lo largo del porta. Esta se realiza moviendo manualmente la gota con cuidado, dejando secar parte de la preparación sobre la placa calefactora y volviendo a realizar la extensión.

Simoni y col (1985) propusieron un extensor mecánico para la realización de preparaciones cromosómicas que disminuye el número de metafases incompletas y de las morfológicamente no aptas para el estudio citogenético. El extensor consta de una placa calefactora regulable y de una platina móvil que desplaza el portaobjetos rítmicamente hacia delante y atrás, mientras que una pestaña fija arrastra y extiende el tejido. En nuestro caso

la utilización del extensor no mejoró las preparaciones hechas manualmente si se regulaba correctamente la cantidad de ácido acético, la extensión del mismo y el grado de evaporación.

Posteriormente, Simoni y col. (1990) introdujeron en su metodología la incorporación de unas gotas de Carnoy después de la disgregación celular. De esta manera se obtiene una mejor calidad de bandas cromosómicas. Esto es debido a que el ácido acético utilizado en la disgregación, altera las proteínas asociadas a los cromosomas dificultando la obtención de bandas cromosómicas de buena calidad. En nuestro caso hemos incorporado la modificación a la técnica obteniendo mejoras substanciales en la calidad de las extensiones.

Técnica de bandas cromosómicas

Previamente a la tinción, se realiza un análisis a microscopía de contraste de fases para tener una idea del número y calidad de metafases. Estas pueden presentar diferentes características. Benet y col (1986) observan que en las metafases que presentaban un aspecto negro o brillante se obtenía una mejor calidad en el patrón de bandas G. Este tipo de metafases son las que presentan a microscopía electrónica una gran preservación de la estructura cromatínica (Navarro y col, 1987).

Para la identificación de cromosomas en vellosidades coriales, la mayoría de autores utilizan bandas G. En algunos casos también se ha empleado bandas R (Flori y col, 1985) o bandas Q (Terzoli y col, 1986). La utilización de tripsina para la realización de bandas G es conocida y utilizada de manera estándar desde la propuesta de Seabright en 1971. En muchas ocasiones las bandas cromosómicas obtenidas con tripsina producen pérdidas del material cromosómico analizable debido a la fuerte digestión enzimática. Esto es debido a la dificultad de cortar el efecto de la misma, aunque según Gregson y Seabright (1985) puede conseguirse mediante el microscopio de contraste de fases.

En muestras de vellosidades coriales, debido al bajo número de metafases, a las características cromosómicas y a la importancia de un diagnóstico rápido, hemos conseguido una técnica de identificación cromosómica que no deteriora el material analizable y permite sacar la máxima información del número de divisiones obtenido en cada caso. Se ha propuesto una técnica secuencial Leishman-Wright (tinción uniforme-bandas G) alternativa que presenta numerosas ventajas sobre el tratamiento habitual. El proceso es el descrito en el apartado 2.4.3 de Material y Métodos.

La técnica secuencial permite que con la tinción uniforme el análisis de las preparaciones pueda iniciarse inmediatamente para detectar posibles anomalías que posteriormente serán identificadas mediante bandas G. De esta forma puede obtenerse una primera aproximación

al diagnóstico final tan pronto como se realizan las extensiones. Es decir, al segundo ida de la extracción ginecológica es posible avanzar un primer diagnóstico al descartar anomalías de tipo numérico, o anomalías estructurales que impliquen reorganizaciones severas. De esta manera se contribuye a la rapidez diagnóstica, esencial en el diagnóstico prenatal.

La limitación del número de metafases se supera al realizar este análisis previo con tinción uniforme y a la observación de las mismas divisiones con bandas G. La calidad de estas bandas, obtenidas con colorante Wrigth , es excelente.

Otra ventaja de esta metodología es que si el bandeado no es lo suficientemente bueno las preparaciones pueden ser desteñidas y tratadas de nuevo siguiendo este mismo procedimiento incrementando ligeramente los tiempos de incubación o tinción. Este proceso puede ser repetido de cuatro a cinco veces hasta obtener bandas bien definidas y sin peligro de pérdida de material debido a que no se produce degradación enzimática. De esta manera se contribuye a la seguridad en el diagnóstico.

Otra ventaja añadida a la técnica secuencial uniforme-bandas G es que permite detectar y determinar gaps y roturas, tipos de lesiones cromosómicas que no podrían ser detectadas en bandas G. De este modo se caracterizaran lesiones cromosómicas como las observadas en el Síndrome de Fragilidad del X y en los Síndromes de inestabilidad cromosómica (Ataxia telangiectasia, Síndrome de Bloom, Anemia de Fanconi) porque, como se sabe, para una óptima visualización de lesiones cromosómicas se requieren preparaciones teñidas con tinción uniforme.

4.3. Valoración del Rendimiento de la Técnica

El análisis citogenético de vellosidades coriales ha sido propuesto y aceptado como una técnica segura y fiable para el diagnóstico prenatal de cromosopatías en el primer trimestre de gestación. El estudio Colaborativo de Estados Unidos y Canadá muestra que el éxito diagnóstico de las vellosidades coriales es similar al obtenido mediante amniocentesis (98,2% y 95,5% respectivamente) (Canadian Collaborative CVS-Amniocentesis Clinical Trial Group, 1989).

Nuestros resultados muestran que el éxito en poder dar un resultado prenatal a partir de las vellosidades coriales que se reciben en nuestro centro es del 98,5%. Este valor es muy similar a la obtenida por otros centros que han analizado un número mayor de muestras, entre 4330-11473 (Ledbeter y col, 1992; Smith, 1992; Smith y col, 1994). Es de destacar que la serie de Ramos y col (1992) con un número de muestras equivalente al nuestro también obtienen un resultado similar (96,7%)(Tabla 48).

Tabla 48. Éxito diagnóstico en diferentes series

Autores	n	%
Jahoda y col. (1992)	3611	86,50
Salvador y col. (1989)	1282	88,00
Costa y col. (1992)	700	90,60
Ramos y col. (1992)	1117	96,75
Smith (1992)	4330	97,50
Chakravarty y col.(1992)	3100	98,60
Ledbetter y col. (1992)	11473	99,70
Smith y col (1994)	7595	97,60
Presente trabajo	1112	98,50

4.3.1 Factores que influyen en la obtención de diagnóstico citogenético

Aunque el éxito obtenido es elevado, se han analizado las posibles causas por las que no se ha obtenido resultado citogenético a partir de la primera muestra corial recibida (5,76%), con la intención de superar estos problemas y aumentar así la obtención de resultados citogenéticos en el primer intento. Entre los factores que parecen contribuir decisivamente al éxito, hemos analizado los de la cantidad y calidad de muestra, la edad gestacional, la edad materna y el medio de cultivo.

4.3.1.1 Cantidad y calidad de muestra

La cantidad de muestra se establece realizando una estimación del peso de las vellosidades coriales, mediante comparación con una serie fotográfica correspondiente a pesos escalonados (Ver Material y Método). Dado el alto grado de subjetividad de este sistema el peso siempre es aproximado. La obtención de poca cantidad de tejido corial es debido, generalmente, a problemas obstétricos durante la extracción de muestra y que al aumentar el número de punciones se aumenta también el riesgo de aborto.

Relacionando los casos en los que no se ha obtenido resultado citogenético con la cantidad de muestra extraída (Tabla 20) se observa que el porcentaje más elevado (2,25%), corresponde a muestras con <5mg. Este valor es inferior al de otras series publicadas que obtienen valores comprendidos entre 3% y 4,5% (Salvador y col, 1989; Ramos y col, 1992; Costa y col, 1992). Cuando la cantidad de muestra es >5mg. el porcentaje de no obtención

de resultados citogenéticos decrece sensiblemente y sigue decreciendo cuanto mayor es la cantidad de muestra. Sin embargo, debido a que se ha de correr un mínimo riesgo de problemas obstétricos, se debe efectuar el diagnóstico con la mínima cantidad de muestra que asegure el resultado citogenético. Nuestros datos confirman que la eficiencia de la técnica se pone claramente de manifiesto cuando la cantidad de la muestra está comprendida entre 5-15 mg.

Analizando la cantidad de muestra según la vía de extracción (Tabla 15), no se observan diferencias significativas entre la vía transabdominal y la vía transcervical.

Además de la cantidad se ha de tener en cuenta **la calidad morfológica** de la muestra recibida. Es importante realizar una selección de la zona de la vellosidad que presente una morfología óptima para obtener un resultado citogenético. Estudios realizados por nuestro equipo (Cuatrecasas, 1993) han puesto de manifiesto la existencia de una relación entre la morfología de las vellosidades coriales y su índice mitótico. Estos resultados han sido confirmados recientemente por Soler (1996). En muchas ocasiones aunque el tamaño de la muestra sea mínimo, si su calidad es buena, es decir, si la muestra presenta la morfología típica (aspecto digitiforme, capilar central y numerosos brotes) permitirá realizar un diagnóstico citogenético. Por el contrario cuando se obtienen muestras de un tamaño considerable, pero presentan vellosidades "planas" (sin brotes) y mal irrigadas (vacías), o cuando proceden del tronco, o regiones basal o media, estas muestras presentan un índice de división celular muy bajo (Kulischer, 1985), y aunque sean abundantes en cantidad presentan problemas en la obtención de resultado citogenético. En estos casos para aumentar el número de divisiones se debe realizar un cultivo largo de las vellosidades, obteniendo mitosis a partir de los fibroblastos que evolucionan de las células del mesénquima corial. En nuestro caso, al realizar cultivo semidirecto, se necesita disponer de la columna citotrofoblástica, con divisiones espontáneas, en perfecto estado; por ello es importante obtener y seleccionar las vellosidades con la morfología adecuada preservando las células de la columna citotrofoblástica durante el procesado.

Debido a estos aspectos una pauta importante para la obtención de un resultado citogenético en el primer intento es la valoración de la muestra bajo lupa. Si en el momento de la extracción es posible hacer una valoración de la calidad y cantidad de la muestra (con la paciente todavía en posición ginecológica para poder realizar una nueva punción) se consigue un aumento del éxito diagnóstico de la prueba, ya que en ese momento se decide si es necesario un nuevo intento de extracción de muestra, o por el contrario si se observa un tejido idóneo que permita el resultado, se evita una nueva punción.

Nuestros resultados evidencian un aumento del éxito diagnóstico por cantidad y calidad de muestra, a partir del momento en el que se incorporó el laboratorio al lugar de extracción y

observación de la muestra. De esta forma la muestra se analiza en el momento de la extracción y se minimiza el tiempo de transporte y su posterior procesado.

4.3.1.2 Edad gestacional

El éxito diagnóstico de la muestra en relación a la edad gestacional, está estrechamente ligado a los parámetros estudiados anteriormente: la cantidad y la calidad de la vellosidad biopsiada.

Análisis por semanas de gestación

En nuestro caso la mayoría de las muestras se han obtenido entre la 10 y 14 semana de gestación. Se han observado dos bloques bien diferenciados de no obtención de resultados citogenéticos, una en las semanas 8 y 9 y otro a partir de la semana 21 de gestación (Figura 38).

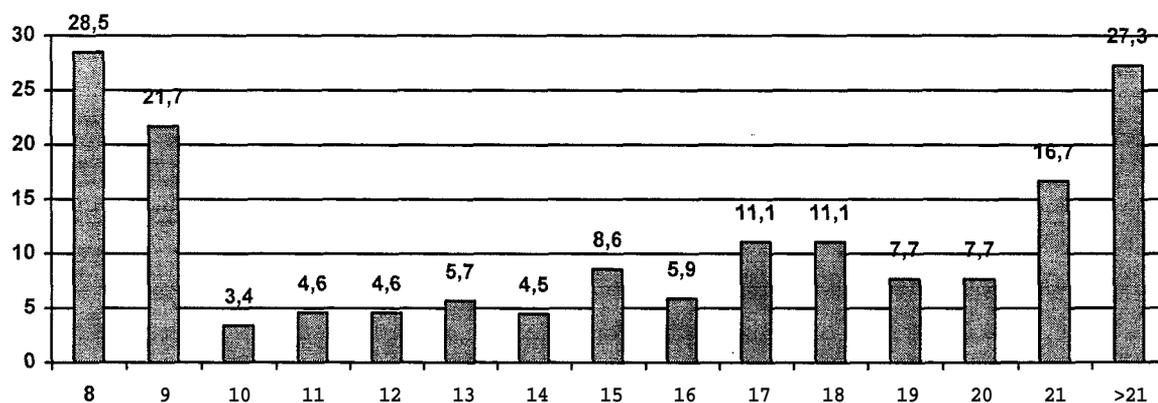


Figura 38. Frecuencia de casos sin diagnóstico citogenético en relación a la edad gestacional

El elevado porcentaje de fallos en las etapas tempranas (28,5% en la 8 semana y 21,7% en 9 semana de gestación) puede ser debido a que la cantidad de tejido biopsiable es más pequeña y el riesgo de pérdida fetal es muy elevado, por lo que aumenta la dificultad para obtener suficiente cantidad de muestra.

Por otra parte, en etapas avanzadas de gestación el corion deja de ser un tejido en expansión y el índice mitótico espontáneo disminuye. Esta sería la causa del porcentaje de fallos elevados en etapas de gestación muy avanzadas (27,3% a partir de la 21 semana de gestación). En este caso se podría obtener un porcentaje mayor de éxito si se realizara un cultivo largo ya que las células del mesodermo son viables en cualquier etapa del desarrollo embrionario. En algunas biopsias, aún siendo de semanas de gestación avanzadas, se pudo obtener resultado citogenético mediante cultivo de 24 horas, observándose un decrecimiento del número y calidad de las metafases, siendo por tanto más dificultoso obtener un resultado diagnóstico.

Nuestros resultados corroboran que la semanas 10 a 12 de gestación, incluso hasta la semana 14, son las idóneas para efectuar la extracción de vellosidades coriales ya que los porcentajes más bajos sin diagnóstico citogenético se localizan en la semana 10 de gestación (3,4%), seguida de las 11 y 12 semanas (ambas con 4,6%) y de la 13 y 14 semanas (5,7 y 4,5% respectivamente).

Análisis por trimestres de gestación

Analizando los casos de no obtención de resultados citogenéticos según los trimestres de gestación, se observa que en el primer trimestre (hasta la 12 semana de gestación) el porcentaje de fallos es del 5,0%, mientras que en el segundo y tercer trimestre es de 7,1%.

Tabla 49 Frecuencias de no obtención de resultados citogenéticos según los diferentes trimestres de gestación

Series	1º Trimestre		2º-3º Trimestre	
	n	%	n	%
Chodoba y col (1989)	221	9,9		
Brambati y col (1990)	2411	0,6		
Regan y col (1992)	300	1,3		
Stengel-Rutkowski y col (1992)	5646	5,1		
Presente estudio	736	5,0		
Bartels y col (1989)			116	12,0
Holzgreve y col (1989)			141	2,1
Horovitz y col (1989)			16	6,2
Horovitz y col (1989)			360	2,0
Presente estudio			376	7,1

Nuestros valores en relación a los obtenidos en otras series halladas en la bibliografía se muestran en la Tabla 49. La no obtención de resultados correspondientes al primer trimestre en nuestra serie es semejante a la de la serie más amplia publicada por Stengel-Rutkowski y col. (1992). El hecho de que los resultados de las otras series sean tan dispares, puede ser debido a la diferencia de criterios en las semana concreta a partir de la que se realizan las extracciones.

Cuando se habla del primer trimestre de gestación generalmente se acepta el límite inferior entre la 8 y 9 semanas. Algunos equipos de investigación han realizado análisis en muestras de 6-7 semanas de gestación (Brambati y col, 1992; Privitera y col, 1992). En nuestro equipo no se ha realizado ninguna extracción en estas semanas debido principalmente a la posibilidad de desencadenar problemas obstétricos y a que, como hemos visto anteriormente, el porcentaje de no obtención de resultado, aumenta en etapas de gestación tempranas (vellosidades inmaduras), por lo que para la obtención del diagnóstico es necesario realizar un cultivo largo. Ello significa un riesgo potencial de contaminación materna y de demora diagnóstica con lo que no se obtiene ninguna ventaja respecto a las vellosidades analizadas por cultivo directo a partir de la 9 semana de gestación. Dentro de estos periodos de gestación existen también otras posibilidades de diagnóstico en combinación con nuevas metodologías como puede ser el análisis de DNA o por técnicas de Hibridación "in situ". Pero este tipo de técnicas en sí mismas no poseen valor diagnóstico, por lo que es necesario complementarlas con un análisis del cariotipo. Por ello sólo podrían ser ofrecidas a parejas con un alto riesgo, por ejemplo aquellas con anomalías cromosómicas identificadas.

En cuanto a los resultados en el segundo trimestre, el número de muestras de las series es lógicamente inferior debido a que ya no son semanas idóneas para el análisis de vellosidades coriales. Los resultados, en este caso también son dispares, no se observa una mayor incidencia de fallos en relación al primer trimestre salvo en la serie de Bartels y col. (1989) y en nuestro estudio con unas frecuencias del 12 y el 7,1% respectivamente.

Se ha propuesto la amniocentesis precoz (10-15 semana de gestación) como una alternativa a las vellosidades coriales en el primer trimestre (Hanson y col, 1987; Garrison y col, 1988; Gogmilow y col, 1988; Elejalde y col, 1990; Nevin y col, 1990; Held y col, 1992; Lituania y col, 1992; Vacek y col, 1992). El análisis efectuado por Sachs y col. (1992) al comparar los resultados citogenéticos obtenidos en muestras de vellosidades coriales en el primer trimestre y los de amniocentesis precoces, muestran que el éxito diagnóstico es más alto en vellosidades coriales debido al bajo número de células en muestras precoces de líquido amniótico, a la menor cantidad de líquido extraíble, al aumento de riesgo de aborto espontáneo (1,2%-3%), y al tiempo de demora diagnóstica (21-26 días) frente a los 5 días de media en vellosidades coriales, perdiendo así la posibilidad de optar a un aborto selectivo en

el primer trimestre. Parece clara la ventaja de realizar una biòpsia corial cuando es necesario obtener un diagnóstico en el primer trimestre de gestación.

4.3.1.3 Edad materna

La distribución de casos con no obtención de diagnóstico citogenético, respecto a la edad materna (Tabla 22), se produce al azar; lo que confirma que la edad materna no es un factor que influya en la obtención de diagnóstico citogenético. Los trabajos de Costa y col (1992) tampoco observan ninguna relación entre la edad materna y la obtención de resultado citogenético.

4.3.1.4 Medio de cultivo

Se han realizado trabajos exhaustivos para definir los componentes esenciales involucrados en el crecimiento de células de mamíferos "in vitro" (Barnes y Sato, 1980). Se han descrito diferentes sustancias químicas como esteroides, hormonas peptídicas, transferrina, etc., que probablemente actúan como factores de crecimiento específicos (Dexter, 1983).

En muestras de vellosidades coriales está generalizado el uso de medio de cultivo suplementado con suero fetal y algunos sueros sintéticos (Blakemore y col, 1984; Simoni y col, 1985; Vekemans y col, 1986). Aunque algunos autores observan resultados contrarios. Terzoli y col (1985) observan un mayor número de metafases en medios con una concentración baja de suero; mientras que Simoni y col (1985) observan un aumento del número de mitosis con medio suplementado con suero. Otros autores como Therkelsen y col. (1985) y Romagnano y col. (1989) obtienen mejores resultados utilizando como medio de cultivo RPMI-1640 sin incorporación de suero.

En nuestro caso nos propusimos hacer una valoración del efecto de los diferentes medios y del suero sobre el porcentaje de éxito diagnóstico. Nuestros datos revelan que el medio ideal para la puesta en cultivo de las vellosidades coriales es el medio Chang sin incorporación de suero (Tabla 23). El 1,4% de casos no diagnosticados obtenido en este medio es sensiblemente inferior al observado en medio RPMI-1640 con 5% de suero fetal (6,2%). Las muestras cultivadas en medio F-10 con 5% de suero fetal muestran un 25% de casos sin diagnóstico, lo que motivó que este medio de cultivo se desestimara enseguida para diagnóstico prenatal (sólo se utilizó en 8 de las 1112 muestras).

Simoni y col (1984) estudiaron los efectos del medio RPMI-1640 (con suero) y el medio Chang (sin suero) en series de vellosidades coriales. Bajo lupa realizaron una separación de cantidades iguales de la misma muestra y la pusieron en cultivos paralelos en los dos medios diferentes. Con medio RPMI-1640 obtienen un 90% de resultados citogenéticos,

mientras que con medio Chang obtuvieron un 100%. Simultáneamente Teyssier (1984) obtiene conclusiones similares en el cultivo de células de médula ósea, las cuales al igual que las vellosidades coriales, tienen un número y calidad de metafases variable (a menudo baja); y propone la utilización del medio Chang para el cultivo de este tipo de células.

La eficacia del medio de cultivo Chang puede deberse a las características propias del medio. Es un medio semisintético (combinación de los medios de cultivo Ham F-12 y DMEM) suplementados con varios factores de crecimiento hormonales (transferrina, insulina triiodotironina, glucagon, hidrocortisona, testosterona, estradiol, progesterona, selenio) se obtiene un efecto positivo en el crecimiento de las células fetales "in vitro" (Chang 1982).

4.3.2 Obtención de diagnósticos mediante repetición de muestra

Los fallos de procesado se detectan en un tiempo relativamente corto (dos días desde la puesta en cultivo), ya que previamente a la tinción se realiza un examen a microscopía de contraste de fases para hacer una valoración aproximada de la cantidad de divisiones celulares. Esta rapidez en el seguimiento de la muestra permite una nueva extracción en la etapa idónea para la obtención de muestra de vellosidades coriales, o dependiendo de las características obstétricas, extraer una muestra de líquido amniótico o de sangre fetal.

En la Tabla 50 se muestran las frecuencias de los resultados citogenéticos obtenidos en nuestro estudio y el tipo de tejido utilizado. De las 1112 gestantes se tuvieron resultados citogenéticos en el primer intento en 1048 ocasiones, es decir, en un 94,3% (que denominamos éxito diagnóstico en el primer intento).

Tabla 50 Éxito diagnóstico en el presente trabajo

		Gestantes	muestras	no diagnóstico	diagnósticos	%
1º intento:	CVS	1112	1112	64	1048	94,3
2º intento:	CVS		34	-	34	-
	LA		12	-	12	-
	SF		1	-	1	-
Diagnósticos:						
Sólo en	CVS				1082	97,3
Total diagnósticos (CVS, LA, SF)		1112			1095	98,5

Los 64 casos en los que no se obtuvo resultado citogenético al primer intento (5,75% del total de muestras), determinaron la necesidad de una nueva extracción de muestra para obtener el cariotipo fetal. Únicamente no se obtuvo cariotipo fetal en diecisiete casos en los que no se realizó una nueva extracción por existir problemas obstétricos o ajenos al laboratorio. Todos los demás casos pudieron ser diagnosticados en una segunda extracción: de vellosidades coriales (34 casos), líquido amniótico (12 casos) y sangre fetal (1 caso). En todas las ocasiones se obtuvo resultado citogenético, lo que supone un éxito diagnóstico del 98,5%. Este valor está entre los rangos más altos de las series internacionales (Tabla 48).

Las vellosidades coriales permiten la obtención del diagnóstico prenatal en épocas muy tempranas de gestación; e incluso en el caso de fallo de procesado, la repetición de la extracción, bien de vellosidades coriales de nuevo o de cualquier otro tipo de tejido permite obtener un resultado rápido. Este hecho garantiza un resultado sin angustia para la madre en el caso de decidir una interrupción voluntaria del embarazo, siempre dentro del límite marcado por la ley (22 semanas de gestación).

4.4 Valoración del diagnóstico citogenético

Los resultados del presente estudio respecto al sexo, muestran que el 50,2% han sido varones y el 49,8% han sido hembras (Tabla 25). Estos resultados no difieren de lo esperado ya que la relación teórica (1:1), respecto a la distribución de sexos, se mantiene incluso en casos de manipulación de gametos en programas de fecundación "in vitro" (National Perinatal Statistics Unit, 1990).

4.4.1 Anomalías cromosómicas observadas

Los resultados de las diferentes series publicadas al respecto, oscilan entre el 3,4% de Sachs y col.(1992) y el 6,5% de Smith y col. (1994) (Tabla 51).

Tabla 51 Incidencia de anomalías cromosómicas

Series	n	%
Costa y col. (1992)	700	5,4
Ramos y col. (1992)	1000	3,7
Ledbetter y col (1992) *	11473	4,2
Sachs y col (1992)	3500	3,4
Smith y col (1992)	4330	5,2
Smith y col (1994) **	7595	6,5
Presente estudio	1112	4,0

* Estudio Colaborativo de los Estados Unidos.

**Estudio Colaborativo del Reino Unido. En esta serie está incluida la serie anterior publicada por el mismo autor en 1992.

El 4% de frecuencia de cromosomopatías obtenido en el presente estudio es similar a la de las series publicadas y muy cercano al 4,2% obtenido en la serie más larga, correspondiente al Estudio Colaborativo de Estados Unidos con 11473 muestras recopiladas de 11 centros (Ledbetter y col, 1992).

Una posible explicación de la elevada frecuencia de anomalías placentarias es el elevado índice mitótico en células de vellosidades coriales ya que este tejido fetal tiene un elevado número de divisiones celulares. Además, este tejido presenta un elevado porcentaje de mutación (Eiben y col, 1990) y como consecuencia pueden aparecer numerosas aneuploidías capaces de sobrevivir en el tejido placentario (tanto en mosaico como en no

mosaico). Este tema se discutirá más ampliamente en los apartados 4.4.1.2 (Mosaicos cromosómicos) y 4.4.1.3 (Discrepancias cromosómicas).

Anomalías cromosómicas respecto al sexo

En el presente estudio, del total de anomalías cromosómicas observadas en nuestra serie vemos que las mujeres presentan una frecuencia de 2,8% que es sensiblemente superior al 1,2% de los varones (En éstos las anomalías numéricas son un 0,8% y las estructurales un 0,5% y en cuanto a las mujeres son el 2,5% y 0,3% respectivamente (Tabla 25).

La frecuencia de anomalías cromosómicas en células germinales femeninas se ha observado también que es muy superior a las masculinas, 28% y 9,6% respectivamente (Pellestor, 1991). Existen además diferencias en cuanto a los tipos de anomalías encontradas. En espermatozoides son mayoritariamente estructurales mientras que en ovocitos son casi exclusivamente numéricas; aunque es posible que muchas anomalías estructurales en ovocitos pasen desapercibidas debido a las características de los cromosomas meióticos en metafase II y a su dificultad para el bandeo cromosómico. Estas diferencias no tienen una relación directa con el sexo del feto pero corroboran que la mayoría de las anomalías son de origen materno (Pellestor, 1991).

En abortos espontáneos cromosómicamente normales, Silvestre (1991) y De Vita y col. (1993), encuentran la misma relación de varones que de mujeres, y en abortos de fetos con anomalías cromosómicas tampoco encuentran diferencias según el sexo. Sin embargo, Songster y col. (1992) encuentra, en abortos espontáneos con cariotipo anómalo, un mayor número de mujeres afectadas que de varones (17,5% y 10% respectivamente). La diferencia podría ser debida a contaminación materna pero Eiben y col. (1990), realizando el cariotipo de abortos espontáneos, mediante el análisis de vellosidades coriales, utilizando la técnica semidirecta, elimina la posibilidad de esta causa, persistiendo un mayor número de abortos hembras. Ello sugiere que la producción de un exceso de abortos femeninos debe ser intrínseca. Todo esto hace sospechar que pueden existir determinados mecanismos que, en estados muy primarios del desarrollo, actúan diferencialmente atendiendo al sexo, produciendo un exceso de abortos espontáneos 46,XX. Eiben y col. (1990), han sugerido la posibilidad de que se produce un error en la inactivación de uno de los cromosomas X; aunque no descartan la existencia de efectos maternos puros, e incluso que estas diferencias puedan estar relacionadas con el fenómeno de la impronta. Es necesario continuar estos estudios sobre la metilación del cromosoma X, para buscar las causas de esta selección respecto al sexo.

En los resultados del presente trabajo, tal como se ha indicado, hemos observado más anomalías en fetos hembras (2,8%) que en fetos varones (1,2%), coincidiendo con los observados por Miller y col. (1989) con un 2,4% y 1,2% respectivamente.

4.4.1.1 Típo y frecuencia de anomalías cromosómicas diagnosticadas

Para poder contrastar los datos obtenidos con los de otras series publicadas, en primer lugar se han analizado los resultados según los dos grandes grupos de anomalías cromosómicas: numéricas y estructurales. Estos dos grandes grupos se han ido subdividiendo hasta llegar a analizar al detalle cada una de las anomalías, contrastando los resultados con los de diferentes autores. Los datos que se comparan con los del presente estudio son los de dos series españolas, la de Costa y col (1992) y la de Ramos y col (1992); y los de dos Estudios Colaborativos, el de Estados Unidos con 11436 casos recopilados de 11 centros (Ledbetter y col, 1992) y el del Reino Unido con 7595 casos recogidos en 26 centros diferentes (Smith y col, 1994). Los resultados de todas las series en cuanto a los grandes grupos de anomalías cromosómicas se muestran en la Tabla 52.

Tabla 52. Frecuencias de anomalías cromosómicas

Series	n	Frecuencia de anomalías		
		numéricas	Estructurales	Mosaico
Costa y col, (1992)	700	3,2	1,9	0,3
Ramos y coi (1992)	1117	3,0	0,5	0,2
Ledbetter y col (1992)	11473	1,8	1,6	0,8
Smith y col (1994)	7595	2,9	2,4	1,2
Presente estudio	1112	2,2	0,8	1,1

En todas las series, las anomalías cromosómicas numéricas son las de mayor frecuencia. La frecuencia de nuestro estudio (2,2%) se encuentra dentro del intervalo de frecuencias hallado por los demás autores (1,8%-3,2%).

En cuanto a la frecuencia de las anomalías estructurales el 0,8% de nuestro estudio también está en el rango de frecuencias de las otras series (0,5%-2,4%).

Ocurre lo mismo con las frecuencias de anomalías cromosómicas en mosaico que hemos encontrado (1,1%), también se halla dentro del intervalo de frecuencias halladas en las otras series (0,2%-1,2%).

A tenor de los resultados expuestos hasta el momento, los datos del presente estudio no difieren de los hallados por otros autores.

Anomalías cromosómicas numéricas. La comparación de los diferentes tipos de anomalías numéricas reflejan datos muy similares en cuanto a las frecuencias de anomalías cromosómicas obtenidas en las series analizadas (Tabla 53). Las aneuploidías, son las anomalías cromosómicas más frecuentes en todos los tejidos analizados. La comparación de frecuencias entre los diferentes tejidos se trata en el apartado 4.4.1.1.1.

Aneuploidías autosómicas. Dentro del grupo de las anomalías cromosómicas numéricas, el subgrupo de las anomalías autosómicas, también en todas las series, ha sido el de mayor frecuencia. El 1,2% obtenido en nuestro estudio ha sido menor que el de los otros autores, si bien es el más aproximado al 1,4% de la serie más larga de Ledbetter y col. (1992).

La más frecuente de las trisomías autosómicas ha sido la trisomía 21, cuya frecuencia en las series oscila entre nuestro 0,5% y el 1,7% de Ramos y col. (1992). Cabe decir que en el presente estudio se han encontrado 3 trisomías 21 en mosaico, por lo que el 0,5% señalado supondría en realidad un 0,8%. Así pues, también nuestros resultados han confirmado que la trisomía 21 es la más frecuente de las anomalías.

La trisomía 18 es la siguiente en frecuencia en todas las series excepto en la de Costa y col. (1992), y el 0,3% de nuestra serie coincide con el de la serie más larga publicada por Ledbetter y col. (1992), como también coinciden en ambas series la frecuencia del 0,1% para la trisomía 13. Costa y col. (1992) y Smith y col. (1992) obtienen, para la trisomía 18, frecuencias de 0,3% y 0,2% respectivamente.

El resto de trisomías autosómicas, son las denominadas "raras" y tal como lo confirman las bajas frecuencias de las mismas en todas las series. Es de destacar que algunas de ellas (en nuestro caso la trisomía 2 y la trisomía 7) forman parte de las discrepancias entre tejido coriónico y tejido fetal (Ver apartado 4.4.1.3).

Aneuploidías sexuales. Siguiendo con el mismo grupo de anomalías numéricas, también en todas las series siguen en orden de frecuencia las anomalías del subgrupo denominado aneuploidías sexuales. El 0,8% de nuestro estudio es la frecuencia más alta, pero semejante a las observadas por Ramos y col. 1992 (0.7%) y por Costa y col. 1992 (0.6%) y muy inferior a la obtenida en los dos estudios colaborativos de Ledbetter y col. 1992 (0.3%) y de Smith y col. 1994 (0.45%). No obstante en nuestro estudio sólo hemos detectado la trisomía 47,XXY y con una frecuencia del 0,4% que coincide con Ramos y col. (1992), y la monosomía 45,X,

cuya frecuencia de 0,4% es muy superior a las de las demás series. No hemos detectado otras trisomías gonosómicas frecuentes en otras series, como 47,XYY, y 47,XXX.

Tabla 53. Tipo y Frecuencia de anomalías cromosómicas numéricas

Tipo de anomalías		Presente estudio	Costa y col. 1992	Ramos y col. 1992	Ledbetter y col. 1992	Smith y col. 1994
Aneuploidías autosómicas						
Trisomía	+21	0,5	1,6	1,7	1,9	1,4
	+18	0,3	0,2	0,5	0,3	0,5
	+13	0,1	0,3		0,1	0,2
(Raras)	+22	0,1			0,03	0,05
	+16				0,03	0,03
	+14				0,01	0,01
	+15	0,1	0,2			0,01
	+10		0,2			
	+9	0,1				0,01
	+7	0,1			0,02	0,01
	+3					0,01
Subtotal		1,2	2,4	2,3	1,4	2,3
Poliploidías						
Triploidías		0,1			0,08	0,08
Tetraploidías			0,2		0,01	0,03
Subtotal		0,1	0,2		0,09	0,11
Aneuploidías gonosómicas						
45,X		0,4		0,2	0,12	0,19
47,XXY		0,4	0,2	0,4	0,11	0,13
46,XYY			0,3		0,06	0,07
47,XXX			0,2	0,1	0,03	0,05
48,XXXX					0,01	
Subtotal		0,8	0,6	0,7	0,33	0,45
Otras numéricas						
47,XX+mar		0,1				
TOTAL NUMÉRICAS		2,2	3,2	3,0	1,8	2,9

Anomalías estructurales. Dentro de los tipos de anomalías pertenecientes a este grupo destacan por su frecuencia las anomalías cromosómicas equilibradas o balanceadas heredadas. Es de resaltar que estas anomalías son también las de mayor frecuencia absoluta en las series colaborativas de Ledbetter y col. (1992) y Smith y col. (1994) con un 1,2% y 1,9% respectivamente (Tabla 54).

Tabla 54. Tipo y Frecuencias de anomalías cromosómicas estructurales

Tipo de anomalías	Presente estudio	Costa y col. 1992	Ramos y col. 1992	Ledbetter y col. 1992	Smith y col. 1994
Balanceadas heredadas	0,5	1,0		1,2	1,9
Balanceadas de novo	0,1			0,1	
No Balanceadas heredadas	0,1			0,3	
No Balanceadas de novo	0,1	1,0	0,5	0,1	0,6
Total estructurales	0,8	1,9	0,5	1,6	2,4

La frecuencia observada en nuestro estudio para estas anomalías estructurales balanceadas heredadas (0,5%), es igual al obtenido para la trisomía 21, que es la anomalía generalmente más observada en todos los tejidos. La frecuencia del total de anomalías estructurales obtenidas en el presente estudio (0,8%), se encuentra dentro del intervalo obtenido en las otras series (0,5%-2,4%).

Mosaicos. Al igual que las frecuencias de las otras anomalías, también la frecuencia de anomalías cromosómicas en mosaico de nuestro estudio (1,1%) se encuentra dentro del intervalo (0,2%-1,2%) de las otras series (Tabla 55). Los mosaicos son objeto de un estudio específico en el apartado 4.4.1.2.

Tabla 55. Frecuencia de anomalías cromosómicas en mosaico

Tipo de anomalías	Presente estudio	Costa y col. 1992	Ramos y col. 1992	Ledbetter y col. 1992	Smith y col. 1994
Mosaicos	1,1	0,3	0,2	0,8	1,2

Como resumen podríamos decir que respecto a las anomalías obtenidas en el presente trabajo, las pequeñas diferencias entre los tipos de anomalías puede ser debido a los criterios de selección de la población para diagnóstico prenatal. Es interesante recordar que las series de Costa y col (1992) y Ramos y col (1992), pertenecen a centros públicos en los que la mayoría de pacientes, 92% y 55,7% respectivamente, pertenecen a gestantes mayores de 37 años (Tabla 46). De todos es conocida la relación existente entre edad materna y trisomías. Por otra parte, es interesante observar que los valores del presente estudio se acercan más a los de las series de los Estudios Colaborativos en los que el número de casos es mayor. Podemos afirmar que las frecuencias de anomalías cromosómicas obtenidas en el presente estudio se corresponden con las obtenidas por otros autores.

4.4.1.1.1 Tipo y frecuencia de anomalías cromosómicas en vellosidades coriales respecto a otros tejidos del proceso reproductivo.

Frecuencia de anomalías cromosómicas.

El índice de anomalías cromosómicas en vellosidades coriales (4%) es más alto que en recién nacidos: 0,63% (UNSCEAR, 1982), 0,62% (Hook, 1977), y 0,57% (Thompson, 1992) (Tabla 2). Por otra parte, otros estudios con recién nacidos, determinan frecuencias de anomalías más elevadas: 1,97% (Hausteen y col. 1982) y 2,02% (Nielsen y Col. 1982). Estos autores sugieren una subestima de anomalías cromosómicas estructurales en estos trabajos iniciales. Nielsen y col. (1982), comparando los resultados de su estudio con otro previo realizado en su laboratorio, (Nielsen y Gillensen, 1975), observaron un incremento en la detección de anomalías cromosómicas de 0,83% a 2,02%, principalmente de las anomalías estructurales: 0,41% a 1,42%.

Otro factor que puede enmascarar anomalías cromosómicas en recién nacidos es que muchas de las anomalías autosómicas pueden ser diagnosticadas, a nivel de fenotipo, en el momento de nacer; pero muchas anomalías sexuales, con la excepción del Síndrome de Turner, no son diagnosticadas hasta la pubertad. Las reorganizaciones balanceadas suelen ser raramente identificadas clínicamente. Normalmente aparecen cuando un miembro de la familia presenta problemas debido a una herencia no equilibrada de dicha reorganización, ya que pueden dar origen a trisomías o deleciones con un mal pronóstico para el individuo, presentando dismorfismos, deterioro del desarrollo mental y físico, abortos espontáneos, etc.

La diferencia de frecuencias entre el 4% de corion frente al 0,6% de recién nacidos, puede ser debida a que al realizar el diagnóstico prenatal con vellosidades coriales, en etapas tempranas de la gestación, se detectan anomalías cromosómicas que posteriormente

evolucionarán como abortos espontáneos. De ello se puede deducir que serán un número menor los fetos anómalos que llegarán a nacer.

De los recién nacidos vivos un 2% evolucionan como muertes perinatales. En la muerte perinatal el índice de anomalías cromosómicas es del 5%, índice muy superior al 0,6% de recién nacidos. Ello parece indicar que nacen fetos con anomalías viables "in útero" pero que son letales en los primeros días de vida.

La frecuencia de anomalías cromosómicas detectadas en amniocentesis precoz por Shalev y col.(1994) es de un 3,1%; y las encontradas por Eiben y col. (1994) es de 2,8%. Estas frecuencias son inferiores a las encontradas en vellosidades coriales. Es importante señalar que las series de amniocentesis precoz aún no son series muy largas y podrían no estar dando una idea real de la frecuencia de anomalías en este momento de la gestación.

Las frecuencias de anomalías encontradas en amniocentesis medio-trimestre (3,5% Hook, 1981) son ligeramente inferiores a las encontradas en vellosidades coriales. En muestras del presente estudio se han detectado en varias ocasiones trisomías (+15, +9, +22) y una triploidía; todas ellas, a los pocos días de ser diagnosticadas, evolucionaron como abortos espontáneos. Esto parece confirmar que ocurren abortos espontáneos de fetos con anomalías, las cuales se llegaron a detectar en vellosidades coriales, pero estas gestaciones no llegarán a las semanas en que se realiza la extracción de líquido amniótico.

Las frecuencias de anomalías cromosómicas en gametos son muy superiores a las frecuencias de anomalías cromosómicas halladas en vellosidades coriales. Los valores de las diferentes series de anomalías cromosómicas en espermatozoides humanos oscilan entre el 7% y el 15% (Rudak y col, 1978; Martin y col, 1983; Kamiguchi y Mikamo, 1986; Brandiff y col, 1988; Benet y col, 1988; Martin 1991; Mikamo y; Pellestor, 1991; Estop y col, 1991). En ovocitos los valores oscilan entre un 20% y un 35% (Martin y col, 1986; Veiga y col, 1987; Bongso y col, 1988; Pieters y col, 1989; Benkhelifa y col, 1990; Pellestor 1991; Kamiguchi y col, 1993) (Tabla. 4 y Tabla 5).

En el caso de que gametos con anomalías cromosómicas sean fecundados, cabe esperar un elevado número de gestaciones patológicas. De hecho un 70% de las concepciones se pierden en etapas muy tempranas del proceso reproductivo, antes de la implantación del embrión (Edwards, 1986). Así mismo un 90% de las pérdidas postimplantacionales se producen durante el primer trimestre de gestación, la mayoría antes de las 8 semanas de gestación (Boué y col, 1985). De esta manera el elevado número de posibles cromosomopatías queda mitigado debido a los abortos espontáneos de embriones no viables y solo se mantienen los compatibles con la vida "in útero".

Durante todo el proceso de gestación se producen abortos espontáneos. En estos la frecuencia de anomalías cromosómicas es del 50% (De Vita, 1993). Pero ocurre algo importante que confirma lo observado en otros tejidos y es que la incidencia de anomalías cromosómicas en abortos disminuye a medida que aumenta el tiempo de gestación (Boué y col, 1985).

Es interesante contrastar las frecuencias de anomalías cromosómicas halladas en vellosidades codales respecto a otros tejidos correspondientes a diferentes momentos del proceso reproductivo. De esta manera se analiza la evolución de las anomalías desde gametos hasta recién nacidos. Estas frecuencias determinan la incidencia, supervivencia y posible transmisión, de anomalías cromosómicas a la descendencia (Figura 39).

En cierta manera cabe sugerir que a lo largo de todo el proceso de gestación se produce cierta "selección natural" de embriones, manteniéndose la gestación en aquellos casos que la anomalía permite la vida "in útero".

En cuanto a los resultados obtenidos en el presente estudio, comprobamos que además de estar en concordancia con los de otras series, se corresponden con lo observado en la cadena del proceso reproductivo y que debido a que la extracción de vellosidades coriales se realiza en el primer trimestre de gestación, es posible encontrar un número mayor de anomalías cromosómicas que en otras etapas posteriores del desarrollo.

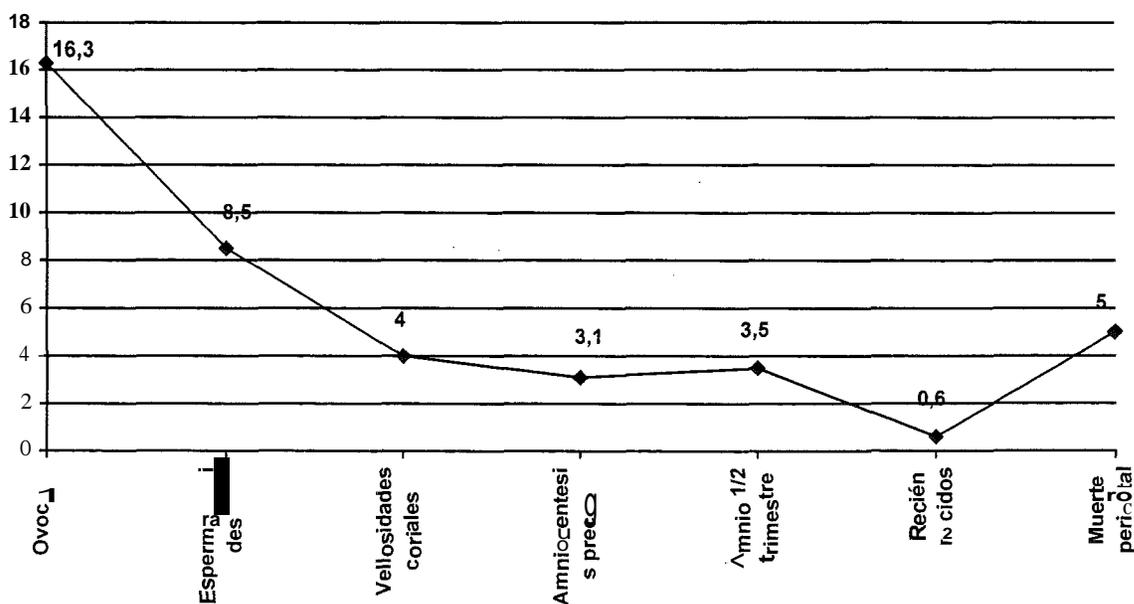


Figura 39. Frecuencias de Anomalías cromosómicas observadas de diferentes momentos del proceso reproductivo. Estas frecuencias corresponden a las siguientes publicaciones: para ovocitos (Kamiguchi y col, 1993); espermatozoides (Brandriff y col, 1994); recién nacidos y muerte perinatal (UNSCEAR, 1979); amniocentesis precoz (Shalev y col, 1994); amniocentesis medio-trimestre (Hook, 1981) y para vellosidades coriales (presente estudio).

Tipo y frecuencias de anomalías cromosómicas en vellosidades coriales respecto a otros tejidos del proceso reproductivo

No todas las anomalías cromosómicas tienen la misma repercusión fenotípica. Existen tipos de anomalías de tal gravedad que ni siquiera son compatibles con un embarazo viable; los hay aún siendo alteraciones graves, son viables "in útero", quizás porque la madre puede compensar la deficiencia fetal, pero que serán letales al nacer o al poco tiempo de nacer y los hay que pueden ser compatibles con la vida aunque sea con diferentes grados de malformaciones físicas o psíquicas.

Para detectar los niveles de gravedad de las anomalías se han analizado las frecuencias de cada tipo de anomalía en cada uno de los tejidos que, como ya hemos visto, se corresponden con diferentes momentos del proceso reproductivo, desde el análisis de las células germinales, en cuya formación ya se producen gran número de anomalías.

Las aneuploidías en gametos son una causa de la reducida fertilidad y esterilidad, creando problemas reproductivos de considerable magnitud en la población humana (Fathalla, 1991). Se observan además aneuploidías en ovocitos secundarios obtenidos por fertilización "in vitro". En los artículos más recientes se han estudiado un total de 1882 ovocitos no fertilizados, encontrándose del 11%-46% de aneuploidías (Delhanty y Penketh, 1990; Macas y col, 1990; Benkhalifa y col, 1990; Martin y col, 1991; Pellestor, 1991; Kamiguchi y col, 1993) (Tabla 5).

Si los gametos con anomalías cromosómicas son fecundados, los portadores de anomalías numéricas (ovocitos sobre todo), puede comportar la formación de embriones con aneuploidías, la mayoría de las cuales no son viables. De ahí la diferencia de frecuencias de alteraciones cromosómicas numéricas entre ovocitos (11,4%) y las detectadas en vellosidades coriales (3,2%) (Tabla 56).

Tabla 56 Frecuencia de anomalías cromosómicas en vellosidades coriales y en gametos

Tipo de tejido	Frecuencia de anomalías		
	Numéricas	Estructurales	Totales
Ovocitos (Kamiguchi y col, 1993)*	11,4	4,9	16,3
Espermatozoides (Branfriffy col, 1994)*	1,6	6,9	8,5
Vellosidades coriales (Smith y col, 1994)**	3,9	2,6	6,5
Vellosidades coriales (presente estudio)	3,2	0,8	4,0

* Series más amplias publicadas hasta el momento.

**Estudio colaborativo del Reino Unido

De hecho, en abortos se han detectado anomalías numéricas para todos los cromosomas humanos excepto para el número 1 (Boué y col, 1985), aunque Watt y col. (1987), descubrió un embrión con trisomía 1 en estadio de 20 células en un programa de fecundación "in vitro".

Los datos que se comparan con los de vellosidades coriales del presente estudio, son los de UNSCEAR (1982) (Tabla 1) para los tejidos de abortos espontáneos, de nacidos vivos y muertes perinatales; los de anomalías numéricas en amniocentesis medio-trimestre son los de Hunter y col.(1987) y los de anomalías estructurales en líquido amniótico son los de Vejerslev y col. (1984). Es importante recordar que ha sido durante los años 80 cuando se han realizado los estudios más amplios sobre este tipo de tejidos. Para la amniocentesis precoz, técnica iniciada más recientemente, los datos son los de Eiben y col. (1994).

Trisomías autosómicas. De las anomalías cromosómicas numéricas en abortos las trisomías son las alteraciones más frecuentes (26,7%). Este valor es muy superior al de vellosidades coriales (1,2%); al líquido amniótico (0,8%) y al de nacidos vivos (0,14%) (Tabla 57).

Tabla 57. Frecuencia de trisomías autosómicas

Tipo de tejido	Frecuencia
Abortos espontáneos	26,7
Vellosidades coriales (presente estudio)	1,2
Amniocentesis precoz	1,2
Amniocentesis medio-trimestre	0,8
Nacidos vivos	0,1
Muerte perinatal	3,76

Las trisomías autosómicas suponen pues, la mayoría de las pérdidas embrionarias; es decir del total de anomalías numéricas en abortos un 53% es debido a las trisomías; que son las que se pueden detectar mediante diagnóstico prenatal.

Respecto a las muertes perinatales, las trisomías suponen un 75% del total de anomalías detectadas, lo que equivale al 3,17% del total de muertes perinatales. Este valor da idea de la importancia de las trisomías y de la incompatibilidad con la vida de muchas autosomopatías.

Tanto en recién nacidos como en vellosidades coriales, las trisomías autosómicas más frecuentes son la trisomía 21, la trisomía 18 y la trisomía 13. La trisomía 21 es la más

frecuente de las aneuploidías en recién nacidos (Tabla 1), y es la causa genética conocida más común de retraso mental en humanos. El ovocito es la célula del origen de la anomalía en la mayoría de los Síndromes de Down. Hay un alto incremento en la frecuencia de hiperhaploides con trisomía 21 en ovocitos y espermatozoides. Esta observación no es extensible a otros cromosomas (Martin y col, 1991). Ello sugiere una susceptibilidad específica de este cromosoma a la no-disyunción durante la gametogénesis femenina.

Recientes estudios en ovocitos y espermatozoides muestran que en la meiosis femenina la no-disyunción no se produce al azar, sino que hay un aumento de aneuploidías en los grupos cromosómicos G y D. Pellestor (1991) analiza un total de 13.975 complementos cromosómicos de espermatozoides humanos (obtenidos por fecundación interespecífica hámster-humano) y 1.897 de ovocitos (obtenidos de fecundación "in vitro") para determinar y comparar la distribución de no-disyunción en gametos masculinos y femeninos. Encuentra que los espermatozoides se caracterizan por un exceso de hipohaploidías y una distribución homogénea para todos los grupos cromosómicos. Observa también que los ovocitos maduros presentan un porcentaje equivalente de hipohaploidías e hiperhaploidías pero con una alta variabilidad en la distribución de la no-disyunción: en particular, hay un aumento de las aneuploidías en cromosomas de los grupos G y D. De todo ello deduce que la no-disyunción no es un evento al azar en la meiosis femenina y, consecuentemente que hay diferencias en los procesos meióticos masculino y femenino. Al no producirse al azar la no-disyunción en ovocitos, se favorece la formación de trisomías en los grupos G y D. De hecho estos datos se corroboran con lo observado en los tejidos analizados en diferentes momentos del proceso reproductivo, en todos estas trisomías son las anomalías de mayor frecuencia. Estos datos concuerdan con otras investigaciones sobre el origen parental de cromosoma extra en las trisomías. Debido a que la contribución de aneuploidías autosómicas es mayor en ovocitos que en espermatozoides, se ha sugerido una mayor contribución materna en la génesis de las concepciones aneuploides (Antonarakis y col 1991, 1992). Zaragoza y col. (1994), corrobora también el origen materno en la mayoría de las trisomías de los grupos G y D, debido a una no-disyunción en la meiosis I. También corroboran estos datos los estudios para el Síndrome de Down en el que el origen del cromosoma extra, en el 95% de los casos, es materno y solo en el 5% de los casos es de origen paterno. (Antonarakis SE and the Down Syndrome Collaborative Group, 1991).

En general, tanto en ovocitos como en espermatozoides las hipohaploidías son más frecuentes que las hiperhaploidías, y hasta el momento no se ha podido determinar que porcentaje de hipohaploidías son artefactos técnicos; aunque en espermatozoides se observa una pérdida mayor de cromosomas pequeños, lo que indica que puede deberse a la técnica de procesado (Martin y col, 1991). Asumiendo que la frecuencia de producción de monosomías y trisomías es equivalente, las monosomías se perderían, en fases muy primarias del desarrollo, antes de ser detectada clínicamente la gestación (Jacobs, 1992).

Este razonamiento explicaría que se hallen un mayor número de trisomías que de monosomías; y que no se observe ninguna monosomía en recién nacidos excepto la 45,X compatible con la vida en mosaico.

En abortos espontáneos el tipo de trisomías más frecuentes no coincide con las observadas en vellosidades coriales ni en recién nacidos. En abortos espontáneos, la trisomía 16 es la más frecuente con una incidencia del 32,3% (Figura 4). En algunas ocasiones, esta trisomía se ha observado en vellosidades coriales antes de producirse la muerte fetal. Es también una trisomía descrita en alteraciones confinadas a la placenta (Post y Nijhuis, 1992; Simoni y col, 1992; Fryburg y col, 1992; Kalousek y col, 1993). Por el contrario, en hiperhaploidías de espermatozoides y ovocitos, no se observa un exceso del cromosoma 16, como cabría esperar a tenor del alto número de trisomías 16 halladas en abortos espontáneos. La elevada frecuencia de trisomía 16 en abortos espontáneos, podría deberse a una selección diferencial durante el desarrollo embrionario más que a un aumento de no-disyunción afectando al cromosoma 16. Se puede afirmar, según estos resultados, que algunas anomalías, como la trisomía 16, pueden mantenerse durante un cierto tiempo en el desarrollo embrionario.

Para el resto de trisomías, en abortos espontáneos, las frecuencias decrecen. La trisomía 21 (9,4%); trisomías del grupo D (16,9%). y trisomía 18 (5,1%). Son valores elevados pero menores que en los otros tejidos. Esto quiere decir que algunas de estas gestaciones evolucionan como abortos, pero la mayoría es compatible con la vida intrauterina e incluso posteriormente. Estas trisomías pasarán a formar parte de las encontradas en recién nacidos y muertes perinatales.

Las trisomías 2,3,5,6,7,9,10,12,14,15,16 y 22, son raras y se supone que forman parte de las pérdidas preimplantacionales debido a problemas en la división celular. Algunas de ellas, observadas en vellosidades coriales, formarán parte de las discrepancias entre tejido corial y fetal.

Aneuploidías sexuales. La Tabla 58 muestra las frecuencias de aneuploidías sexuales respecto de abortos espontáneos, vellosidades coriales, recién nacidos y muertes perinatales.

Tabla 58. Tipo y Frecuencia de aneuploidías sexuales

Tipo de tejido	Frecuencia
Abortos espontáneos	9,4
Vellosidades coriales (presente estudio)	0,8
Amniocentesis precoz	0,7
Amniocentesis medio-trimestre	0,5
Nacidos vivos	0,2
Muerte perinatal	0,0

La incidencia en abortos espontáneos es del 9,4%, siendo la segunda anomalía cromosómica más frecuente detectada en abortos. La monosomía sexual 45,X supone el 18% respecto del total de anomalías encontradas en este tejido.

En vellosidades coriales la frecuencia de anomalías sexuales ha sido de un 0,8%, de ellos la mitad pertenece a individuos 45,X y la otra mitad a 47,XXY. La diferencia de frecuencia respecto a la de abortos, equivaldría al porcentaje de pérdidas a causa de este tipo de cromosomopatías. Las anomalías sexuales en abortos, son las segundas cromosomopattas más frecuentes, siendo la más hallada la 45,X. Algunas de ellas continúan el proceso evolutivo en mosaico. En recién nacidos, la frecuencia de este tipo de anomalías es del 0,24% (Nielsen y Wohlert, 1991), aunque hay que tener en cuenta que muchas anomalías sexuales no son diagnosticadas hasta la pubertad y pueden estar enmascarando frecuencias más elevadas. Así estudios en 34910 recién nacidos, realizados por Nielsen y Wohlert (1991) encuentran una incidencia del síndrome de Klinefelter de 1/576 niños (0,2%) más alta que la de estudios anteriores con 54749 casos de Dinamarca, Gran Bretaña, USA y Canadá (1/882) niños (0,1%) (Nielsen y Sillesen, 1975). Esto también ocurre para el síndrome de Turner: 1/1893 niños (10,05%) comparado con 1/2546 niños (0,04%) en los estudios previos. La diferencia puede ser debida al estudio más preciso realizado (se analizan más de 5 metafases por caso) y a contabilizar dichas anomalías en el caso de que se encuentren en mosaico.

Una observación interesante es que ninguna anomalía sexual es causa de muerte perinatal. Las anomalías de este tipo, que han evolucionado, pueden producir deterioros en el desarrollo físico e incluso mental, pero no son tan severas como para producir la muerte. Estas anomalías serían del tipo 47,XXY; 47,XYY; 47,XXX; 48,XXXX; etc.

Triploidías y tetraploidías. La elevada frecuencia de triploidías (8,2%) y tetraploidías (2,8%) en abortos espontáneos, refleja la baja compatibilidad de dichas anomalías con la vida "in útero" (Tabla 59).

Tabla 59. Frecuencia de triploidías y tetraploidías

Tipo de tejido	-----Frecuencia de anomalías-----	
	Triploidías	Tetraploidías
Abortos espontáneos	8,7	2,8
Vellosidades coriales (presente estudio)	0,1	0,0
Amniocentesis precoz	0,1	0,0
Amniocentesis medio-trimestre	0,0	0,0
Nacidos vivos	0,0	0,0
Muerte perinatal	0,0	0,0

De hecho no se han encontrado tetraploidías en ninguno de los otros tejidos, y sólo se ha encontrado una triploidía en vellosidades coriales, que evolucionó como aborto espontáneo a los pocos días; por tanto, es lógico que no se hayan encontrado triploidías ni tetraploidías en líquido amniótico, ni en recién nacidos, ni en muertes perinatales.

Anomalías estructurales. Las anomalías estructurales son mucho más frecuentes en abortos (2,1%) que en el resto de tejidos (Tabla 60).

Tabla 60. Frecuencia de Anomalías cromosómicas estructurales

Tipo de tejido	Frecuencia
Abortos espontáneos	2,1
Vellosidades coriales (presente estudio)	0,8
Amniocentesis precoz	0,9
Amniocentesis medio-trimestre	0,6
Nacidos vivos	0,3
Muertes perinatales	1,0

Respecto a abortos espontáneos, se ha observado un elevado número de pérdidas en el primer trimestre de gestación, debido a anomalías cromosómicas estructurales (Boué y col, 1985). La alta frecuencia de anomalías estructurales observadas en espermatozoides, podría explicar en gran medida estas pérdidas pre-implantacionales. La posible transmisión a la descendencia de anomalías estructurales desde gametos tiene importancia, debido a que un 10% de ellas son estables, pudiendo llegar a fases avanzadas del desarrollo.

Aunque los porcentajes de anomalías son calculados en gametos, las anomalías no tienen un origen artefactual ya que se han observado diferencias interindividuales que se mantienen a lo largo del tiempo (Martin y col. 1991). Tal y como cabe esperar en las anomalías estructurales detectadas en vellosidades coriales, la mayoría son balanceadas heredadas (0,5%), aunque un 0,1% son "de novo". Se encuentra la misma frecuencia (0,1%) para las anomalías no-balanceadas heredadas, y "de novo". Algunas de estas anomalías se mantienen hasta el nacimiento, pero la frecuencia del 1% de estas anomalías observadas en muertes perinatales, reflejan la incompatibilidad con la vida de las anomalías estructurales desequilibradas.

4.4.1.2 Mosaicos cromosómicos

Probablemente, en muchos individuos adultos, se podría encontrar un mosaico cromosómico al analizar células de sus diferentes tejidos. Sin embargo este mosaicismo no provocaría una anomalía constitucional y probablemente carecería de un efecto fenotípico o reproductivo. Se han encontrado mosaicos incluso de trisomías 21 y 18 en individuos clínicamente normales (Kohn y Shoart, 1987; Gersdorf y col, 1990). Recientemente Sarigol y Rogers (1994) han publicado el caso de una trisomía 18 en mosaico en sangre periférica en una niña de 13 años con inteligencia normal aunque con un pequeño retraso de crecimiento.

En el diagnóstico prenatal el problema se presenta cuando, detectada la existencia de una posible línea celular anómala, se pretende determinar el alcance del mosaico observado y su repercusión fenotípica. Además el problema se complica porque, aunque no se observen células anómalas en la muestra, no queda descartada la ausencia de mosaicismo en el feto.

Afortunadamente, la experiencia acumulada por la comunidad de citogenetistas clínicos demuestra que en los diagnósticos en los que no se ha observado una línea anómala, posteriormente no se ha encontrado fenotipo asociado a un mosaicismo cromosómico; aunque se han descrito algunas excepciones. (Hsu y Perlis, 1984; Worton y Stern, 1984; Bui y Lindsten, 1984; Ledbeter y col, 1990; Ledbeter y col, 1992).

En el presente trabajo el porcentaje de mosaicismo ha sido de un 1,1% del total de muestras analizadas (Tabla 26). Este porcentaje de mosaicismo es similar al 0,90% publicado por Chudoba y col. (1989) en una recopilación de 11956 muestras de diferentes autores, así como al 0,8% obtenido en otra amplia serie de 11473 muestras de Ledbeter y col. (1992). Por otra parte, este valor es sensiblemente superior al observado en las series españolas: 0,2% para la Fundación Jiménez Díaz de Madrid (Ramos y col, 1992) y 0,3% para Hospital Clínico de Barcelona (Costa y col, 1992) (Tabla 61). Todas las series descritas utilizan

cultivo semidirecto como en nuestro estudio. Las variaciones observadas respecto a las series españolas, pueden ser debidas a diferentes causas, como la metodología empleada, el número de muestras analizadas, y también al número de metafases analizadas en cada caso.

Tabla 61 Incidencia de mosaicos en seis series de vellosidades coriales. Todas utilizan cultivo semidirecto.

Series	muestras	% mosaicos
Nocera y col. (1989)	1387	0,65
Chudoba y col. (1989)	11956	0,90
Ledbeter y col (1992)	11473	0,80
Ramos y col. (1992)	1000	0,20
Costa y col. (1992)	700	0,30
Presente trabajo	1112	1,10

Se han encontrado valores más altos de mosaicismo en series en las que combinan el método semidirecto y el cultivo largo en cada muestra realizada. Boris y col. (1993), encuentran un 2,1% de mosaicismo en 2612 muestras consecutivas y Fryburg y col. (1993) encuentran un 2,3% en 1724 muestras. Estos resultados no son equiparables a los del presente estudio ya que en este siempre se ha realizado cultivo semidirecto y el tipo de mosaicismo detectado es tipo I (Tabla 7). La diferencia de frecuencias puede ser debida a que, en nuestro caso, faltaría añadir el mosaicismo detectado sólo en células del mesénquima, que son las células analizadas cuando se realiza un cultivo largo.

Respecto al tipo de anomalías en mosaico encontradas en nuestra serie (Tabla 27), es similar a la presentada por otros autores. Nocera y col. (1989) presentan 1387 muestras de vellosidades coriales analizadas según el método directo y encuentran 10 casos con anomalías en mosaico (0,65%) (Tabla 62).

Tabla 62 Comparación de los valores obtenidos de Anomalías en mosaico en la serie con 1387 muestras de Nocera y col.(1989) y el presente trabajo con 1112 muestras.

Anomalías	---Nocera y col.---		Presente trabajo.	
	n	%	n	%
Autosómicas	8	0,58	7	0,67
+2	1	0,07	1	0,10
+3	1	0,07	-	-
+7	3	0,22	2	0,19
+21	1	0,07	3	0,29
+mar.	-	-	1	0,10
46,inv (10)/ 47, inv (10) +20	1	0,07	-	-
92,XXXX/46XX	1	0,07	-	-
Gonosómicas	2	0,14	4	0,38
XX/x	2	0,14	3	0,29
XY/XXY	-	-	1	0,10
Total	10	0,65	11	1,1

En nuestro estudio se han hallado 11 casos de 1112 muestras analizadas (1,1%). En la serie de Nocera el porcentaje de mosaicos autosómicos es de 0,58% y del 0,14% en gonosómicas. En nuestro estudio es de 0,67% y 0,38%, respectivamente. Las variaciones más grandes las observamos respecto a las anomalías gonosómicas.

Es de destacar que la anomalía autosómica más frecuente en ambas series es la trisomía 7, y en las gonosómicas la monosomía del X.

Es importante comparar el porcentaje de mosaicismo en vellosidades coriales respecto a otros tejidos embrionarios diferentes y en recién nacidos (Tabla 63).

Tabla 63 Frecuencia de mosaïcismo en vellosidades coriales, líquido amniótico, abortos espontáneos y recién nacidos.

Tipo de muestra	%
Abortos espontáneos	3,20
Vellosidades coriales (presente estudio)	1,00
Amniocentesis precoz	0,50
Amniocentesis medio-trimestre	0,28
Recién nacidos	0,08

En series de Líquido Amniótico el mosaïcismo oscila entre el 0,10% (Bui y col., 1984) y el 0,27% (Worton y Stern, 1984). Dichas series analizaron un total de 118.835 muestras, y su valor medio de mosaïcismo es de un 0,19%. Los porcentajes pueden variar según la metodología de los diferentes laboratorios. Un estudio que intenta corregir esta posible desviación, analiza 15 colonias de cada muestra, de un total de 24.515 muestras y encuentra un porcentaje de mosaïcismo del 0,28% (Tichkind y Risch, 1990).

El diferente porcentaje observado en líquido amniótico frente a vellosidades coriales puede ser debido a que el estudio en vellosidades coriales se realiza en etapas más tempranas de la gestación que el líquido amniótico por lo que podría esperarse encontrar más embriones y fetos afectados de alguna cromosomopatía letal en etapas más tempranas de la gestación. Este hecho lo corrobora el 0,5% de mosaïcismo encontrado en amniocentesis precoces (realizadas entre la 12 y 14 semana de gestación) (Eiben y col., 1994), valor intermedio entre vellosidades coriales y amniocentesis de medio-trimestre (realizadas a partir de la 16 semana de gestación).

Es interesante recordar que un 50%-60% de los abortos espontáneos en el primer trimestre presenta alguna cromosomopatía (Kajii y col, 1980; Boué y col, 1985; Ohno y col, 1991). El porcentaje de mosaicos en abortos espontáneos es de 3,2% (Cresy, 1988). Este valor es superior al de muestras de vellosidades coriales y líquido amniótico. Ello puede deberse a que en el primer trimestre de gestación se produce un elevado número de abortos por lo que la gestación no llega a las semanas en las que se realiza la extracción para diagnóstico prenatal. No obstante, como la biòpsia corial se realiza en las primeras etapas de gestación, es posible que se detecten en este tejido mosaicos que luego evolucionarán hacia abortos. Ello podría explicar en parte, el elevado número de mosaicos observados en vellosidades coriales.

En recién nacidos el porcentaje de mosaicismo es el más bajo (0,08%-0,09%). Estos datos sugieren también que algunas anomalías en mosaico se van perdiendo durante las últimas semanas de gestación (Figura 40).

Algunos mosaicos, antes de que evolucionen como abortos espontáneos, son detectados en el momento de realizar el análisis de vellosidades coriales, un número menor son detectados en líquido amniótico, y sólo el 0,08% llegan a nacer.

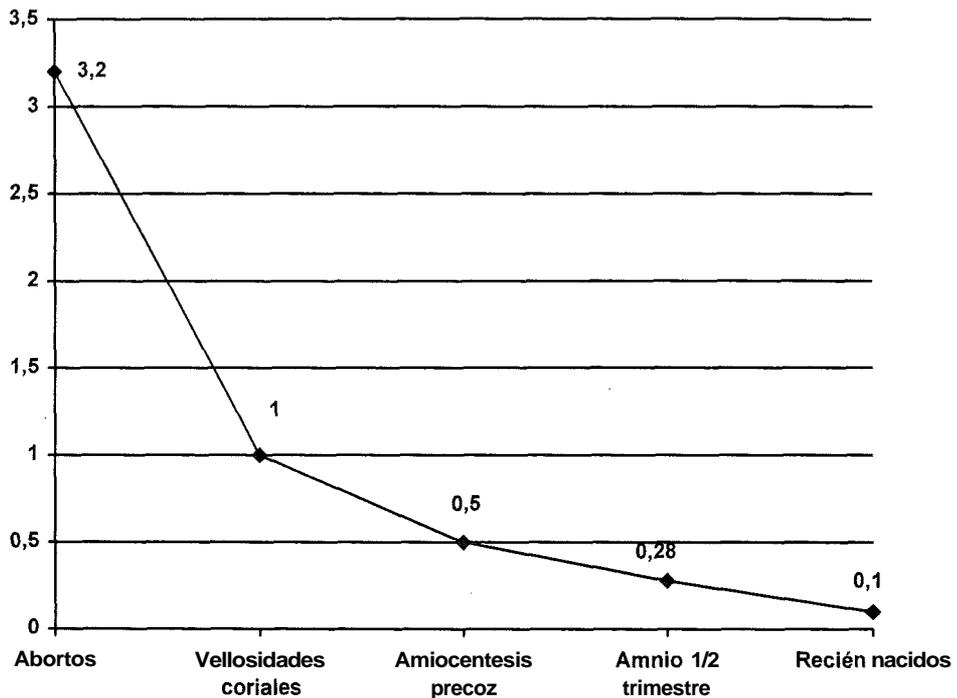


Figura 40. Frecuencia de mosaicismo en diferentes tejidos embrionarios y en recién nacidos

Las causas de la elevada frecuencia de mosaicismo placentario y la razón por la que se pueden producir un mayor número de errores en las divisiones de células de vellosidades coriales pueden ser su elevado índice mitótico y la mayor tolerancia de la presencia de este tipo de anomalía cromosómica en este tejido respecto a la viabilidad fetal. De hecho las vellosidades coriales, en desarrollo en el primer trimestre de gestación, tiene un elevado número de divisiones celulares. Mediante la técnica de condensación prematura de centrómeros, Raabe (1990) ha analizado la proliferación celular entre la 8 y 12 semanas de gestación. El índice de proliferación potencial encontrado en estas etapas varía entre un 18% y 73%. El índice de proliferación potencial del 73%, corresponde a células del

citotrofoblasto a las 9 semanas de gestación. Esta actividad proliferativa es específica de esta semana de gestación. Este incremento de la actividad proliferativa, a la 9ª semana de gestación, coincide con un incremento de la actividad de crecimiento del sincitiotrofoblasto (Kaufmann, 1981). Esto es debido a la actividad mitótica de las células de Langhams en el citotrofoblasto, que en su evolución se diferenciarán en la capa sincitial y en los brotes vellosos (Verlinsky y col, 1985).

Estos valores de proliferación celular son similares a los de otros tejidos con proliferación intensa como carcinomas sólidos y leucemias agudas; en estos tejidos se conoce que esta elevada proliferación celular incrementa el riesgo de una aneuploidía cromosómica, debido al error mitótico por no disyunción (Yunis, 1983). Parece pues que es factible pensar que este mecanismo puede ser el responsable del alto número de aberraciones cromosómicas en células de vellosidades coriales y en concreto del citotrofoblasto.

Además del elevado índice de mutación somática para la aparición de aneuploidías y/o de líneas aneuploides, hay que añadir que estas pueden encontrar en este tejido una mayor tolerancia y supervivencia que en el feto, permitiendo encontrar líneas cromosómicas anómalas sólo presentes en la placenta, es decir anomalías confinadas a la placenta. (Ver apartado 4.4.1.3, de Discrepancias cromosómicas).

Chudoba y col. (1989) analizando un total de 11956 muestras de vellosidades coriales encontraron un 1,1% de mosaicos; sólo 10 de los 132 detectados se confirmaron en tejido fetal (0,08%). Este resultado se corresponde con el encontrado, tal como hemos mencionado anteriormente, en recién nacidos (0,08% de mosaicismo). Así pues, los mosaicos confinados a la placenta podrían explicar en parte, el elevado número de mosaicos observados en vellosidades coriales frente al bajo porcentaje detectado en recién nacidos.

Requiere especial mención en nuestro estudio, un caso de trisomía 21 en el cual se pudo realizar un estudio del porcentaje de mosaicismo en diferentes tejidos. Mfguez y col. (1989). Los resultados citogenéticos se muestran en la Tabla 64.

Tabla 64 Resultados citogenéticos de mosaicismo para la trisomía 21

Tipo de tejido	Número de metafases analizadas			
	46,XY	%	47,XY,+21	%
Vellosidades coriales	17	73,2	6	26,8
Líquido Amniótico	18	45,0	26	55,0
Piel fetal (aborto)	2	8,0	37	92,0

Al encontrarse la anomalía en cada una de los tejidos analizados, se supone que el error mitótico se produjo en una etapa embrionaria muy temprana, antes de la migración celular para la evolución de los diferentes tejidos. Las diferencias encontradas en los porcentajes de células anómalas indican el diferente grado de mosaicismo dependiendo de la composición del tejido analizado. En este caso, la placenta muestra una menor afectación que los amniocitos y que la piel fetal, que prácticamente tiene el 100% de las células trisómicas. La observación de una anomalía en mosaico y la valoración del efecto fenotípico de la misma, es complejo debido a las características intrínsecas del mosaicismo celular.

4.4.1.3 Discrepancias cromosómicas

La discrepancia entre tejido extraembrionario y tejido fetal, es un problema en muestras de vellosidades coriales ampliamente tratado en la bibliografía y es el argumento más utilizado por los detractores de las biopsias de corion.

Cuando en la discrepancia el cariotipo en placenta es anómalo, frente a un complejo cromosómico normal en el feto, se considera un falso positivo. Si la condición es la contraria definiría un falso negativo.

Los resultados falsos negativos sólo se encuentran en cultivo directo (Jackson, 1987). Un posible mecanismo de origen de falsos negativos es la presencia de un gemelo dizigótico degenerado y no detectado (Reddy y col. 1991). Actualmente, no es posible determinar la presencia de este fenómeno en la reproducción humana.

En una misma muestra los resultados pueden variar dependiendo del método de cultivo utilizado: directo, semidirecto ó largo (Nisani y col, 1989). Esto es debido al diferente origen embrionario de las células analizadas. En el caso del cultivo largo las células que crecen, son células que están más próximas a la línea descendiente del embrión que las células analizadas en cultivo corto (Crane y Cheung, 1988). La incidencia de falso positivos con el método directo es dos veces más alto que el encontrado en células del cultivo largo; por ello, se considera un diagnóstico más fiable el realizado en cultivo largo. No obstante, el cultivo directo tiene otras ventajas ya que en él raramente se encuentra contaminación materna que constituye un gran problema en cultivos largos ya que puede incluso llegar a desvirtuar el resultado, y finalmente, hay que tener en cuenta en la valoración, la ventaja de la rapidez del diagnóstico en el cultivo directo.

La frecuencia de discrepancias en vellosidades coriales ha sido estudiada por diferentes autores. El conjunto de resultados da una frecuencia de discrepancia de falsos positivos del 1,1% (Costa y col, 1992); y de falsos negativos del 0,1 (Ledbetter y col, 1992). La Tabla 65

muestra los valores de discrepancias de diferentes series comparadas con los resultados del presente trabajo.

Tabla 65 Frecuencia de discrepancias en diferentes series de vellosidades coriales.

Series	Casos	Discrepancias		---Tipo Discrepancia---	
		%	Falsos +	Falsos -	
Ledbetter y col. (1992)	11473	0,3	0,2	0,1	
Ramos y col. (1992)	1000	1,0	1,0	-	
Costa y col. (1992)	700	1,1	1,1	-	
Woistenholme y col (1994)	11775	0,6	0,6	-	
Boris y col. (1994)	4000	0,8	0,8	-	
Presente estudio	1112	0,7	0,7	-	

Nuestro estudio obtiene una frecuencia de discrepancias del 0,7% del total de diagnósticos realizados. Este porcentaje es similar a otras series publicadas: 0,6% (Woistenholme y col, 1994); 0,7% (Stengel-Rutkowiski, 1987 y Mikkelsen y Aymé, 1987); 0,8% (Boris y col, 1994), 1% (Ramos y col, 1992; Costa y col.,1992 y Therkelson y col, 1988); 1,2% (Hogge y col, 1986). Así como el porcentaje de falsos positivos se encuentra en todas las series, los falsos negativos no aparecen en la mayoría de ellas, incluida la nuestra; ello puede ser debido al número reducido de muestras analizadas y al bajo porcentaje de aparición de falsos negativos, ya que la frecuencia de los mismos, calculada de cinco series con un total de 12000 muestras, es de 0,04% (Callen y col, 1988; Leschot y col, 1989; Miny y col, 1989; Simoni y col, 1990; Sachs y col, 1990).

El mosaicismo confinado a la placenta supone la principal fuente de discrepancias en células de vellosidades coriales. Este hecho se confirma en el presente trabajo ya que de las discrepancias observadas un 71,4% son mosaicos. Alian y col. (1995) analizan 125 placentas a término biopsiando varias zonas de las mismas para realizar un análisis citogenético y obtienen una frecuencia de mosaicismo confinado a la placenta de 4,8%. Este valor es sensiblemente superior a los encontrados en las series de la Tabla 65, incluido el nuestro. La similitud de las frecuencias obtenidas en las muestras de vellosidades coriales remitidas para diagnóstico prenatal, y la diferencia de las mismas al biopsiar diferentes zonas de la placenta a término, puede ser debida a que en el primer caso se extraigan muestras de una sola zona placentaria, pudiendo pasar desapercibidas posibles anomalías al biopsiar la zona de cariotipo diploide. Recientemente, Henderson y col. (1996) al realizar un estudio citogenético en 9 placentas de embarazos a término que habían sido diagnosticados prenatalmente como mosaicos confinados a la placenta (implicando

trisomías para los cromosomas 7, 9, 16, y X) encuentran que los mosaicos confinados a la placenta son a la vez específicos de este tejido y específico de una determinada zona del tejido, lo que pone de manifiesto la necesidad de analizar múltiples biopsias de placenta para conocer la evolución de un determinado mosaicismo confinado a la misma durante la gestación y su efecto sobre el feto.

Por otra parte, una baja frecuencia de mosaicismo en la 11-14 semana de gestación, puede ser superior en placentas a término, o aparecer el mosaico en semanas de gestación posteriores a las 11-14, (semanas óptimas para la extracción de vellosidades coriales para diagnóstico prenatal).

La edad materna y la edad gestacional son parámetros que pueden afectar a las frecuencias de discrepancias. Simoni y Fraccaro (1992) han encontrado una correlación positiva entre la edad materna y la presencia de mosaicismo confinado a la placenta. La Tabla 66 muestra estos datos comparados con el presente estudio.

Tabla 66 Comparación de los valores obtenidos de frecuencia de discrepancias respecto a la edad materna

	----Simoni y Fraccaro (1992)----			——Presente estudio——		
	casos	Discr.	%	casos	Discr.	%
<30	249	-	-	238	1	0,42
30-33	364	2	0,55	303	3	0,99
34-37	1198	12	1,00	348	3	0,86
38-41	1316	13	0,99	135	-	-
>41	273	3	1,10	24	-	-
Total	3400	30	0,88	1048	7	0,67

Simoni y Fraccaro (1992) analizando un total de 3400 muestras en grupos de edad materna creciente observan un incremento del mosaicismo respecto a este factor. En nuestro resultados la frecuencia de discrepancias se mantiene prácticamente homogénea a lo largo de los grupos de edades. Esta diferencia puede ser debida a que, en nuestro caso, las edades más avanzadas presentan un menor número de casos.

Por otra parte, los datos sobre discrepancias y edad gestacional (Tabla 31), muestran que no hay una relación directa entre los dos parámetros analizados. La edad gestacional no está relacionada con anomalías en la placenta. De hecho la no-disyunción mitótica puede producirse, según el modelo propuesto por Crane y Cheun (1988), al principio del desarrollo

embrionario y de esta manera afectará a un número mayor de células que se repartirán más homogéneamente en la placenta, o puede producirse la alteración posteriormente y quedar restringida a una zona menor de la placenta.

Es interesante hacer una observación de los **cromosomas** que aparecen más frecuentemente implicados en las discrepancias y mosaicos en vellosidades coriales. La Figura 41 muestra nuestros resultados junto a los publicados por Chudoba y col. (1989) recopilados de varias series, en los que la monosomía del cromosoma X, junto con la aparición de cromosomas marcadores, son las anomalías más frecuentes.

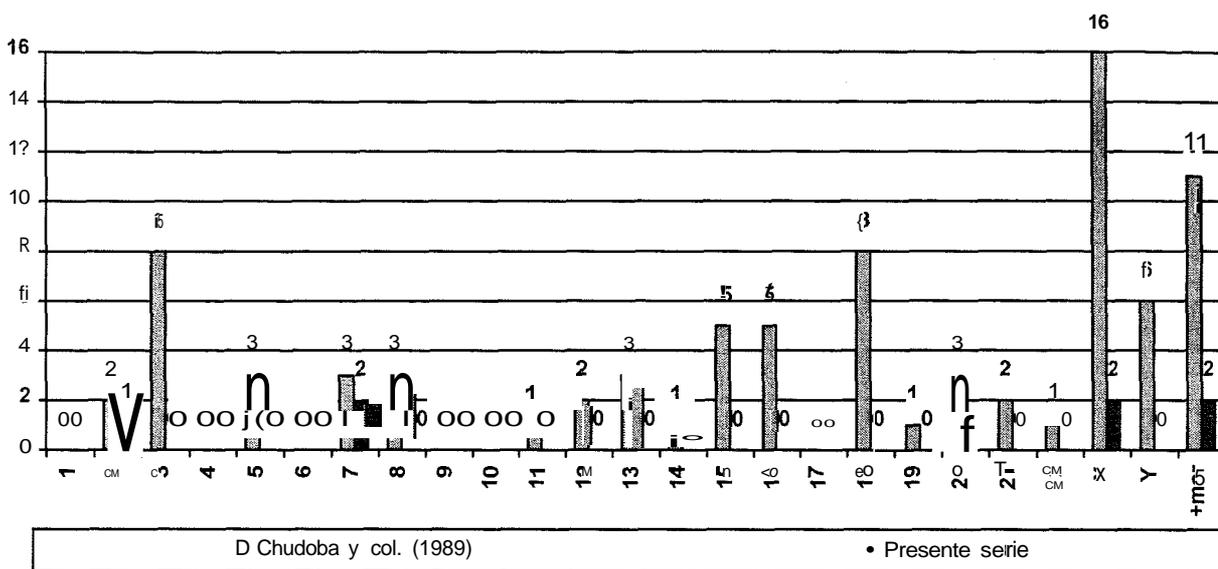


Figura 41. Frecuencia de cromosomas implicados en mosaicos y discrepancias con tejido fetal.

Nuestros datos concuerdan con los observados por Chudoba, ya que un 28,6% de las discrepancias son gonosómicas y todos los casos son de fetos 45,X (uno en mosaico y otro como anomalía completa). Así mismo, de las anomalías autosómicas (71,4%), un 40% pertenece a casos en los que aparece un cromosoma marcador. El resto de casos pertenecen a anomalías en mosaico que envuelven trisomías "raras" (46,XY/47,XY,+2 y 46,XX/47,XX,+7). No hemos encontrado implicados a los cromosomas 3 y 18 mientras que en la serie de Chudova obtienen frecuencias importantes. No obstante, posteriormente hemos encontrado ambos cromosomas implicados aunque no están incluidos en esta serie. Recientemente, en la serie de Boris y col. (1994), los cromosomas más frecuentemente implicados han sido 2,7,8,13 y cromosomas sexuales. Los resultados del presente estudio coinciden con los cromosomas 2 y 7, pero no con el 8 y el 13, que no aparecen en nuestra

serie ni en datos recopilados posteriormente en nuestro laboratorio después de los 1112 casos que abarcan el presente estudio.

La frecuencia de discrepancias cromosómicas ha sido también estudiada en relación a la hallada en líquido amniótico y en abortos espontáneos.

En líquido amniótico la frecuencia de discordancia es de 0,06%. Esto es, veinte veces menor que en vellosidades coriales (Worton and Stern, 1984). Esta diferencia en los porcentajes se debe básicamente al número de anomalías letales confinadas a la placenta y que son raramente observadas en recién nacidos. Así en nuestro caso hemos encontrado una trisomía 7 y una trisomía 2, en vellosidades coriales (Míguez y col, 1992). Anomalías encontradas también por Chudoba y col. (1989), Reddy y col. (1990), Fryburg y col. (1992) y Wolstenholme y col. (1994).

Hasta el momento, en recién nacidos sólo se ha descrito un caso de trisomía 7 no mosaico (Yunis, 1980) y en abortos espontáneos el porcentaje es de 4% para esta trisomía (Lauritsen, 1982). En el caso de la trisomía 2, no se ha descrito ningún caso en recién nacidos con la trisomía completa, y la incidencia en abortos espontáneos es de 4,9%, siendo una de las más frecuentes después de las trisomías: 16, 21, 22 y 15 (32,3%, 9,4% y 10,2% y 7,7% respectivamente).

Un dato importante a tener en cuenta, es que la trisomía 2, supone la causa más frecuente de pseudomosaicismo en cultivos de líquido amniótico (Hsu, 1980; Peakman y col, 1979; Summit y col, 1980; Hsu y Perlis, 1984). Curiosamente, la segunda causa de pseudomosaicismo es la trisomía 7. Parece probable que determinados cromosomas, por ejemplo el cromosoma 7, pueden tener cierta facilidad para la no disyunción.

Diferentes estudios han intentado conocer el efecto de las discrepancias cromosómicas en el **desarrollo fetal**. En el caso de afectar el mosaico al feto, se producirían abortos espontáneos y en el caso de quedar confinadas al trofoblasto, podrían mantener una gestación viable. Recientemente se ha sugerido la posibilidad de que una misma trisomía podría tener o no consecuencias en el **desarrollo fetal**, según el proceso de impronta (Simoni y Fraccaro, 1992; Simoni y Sirchia, 1994; Kalousek y Barrett, 1994; Wolstenholme y col. 1994; Robinson y col. 1995; Jones y col. 1995).

Es interesante estudiar los resultados de diferentes gestaciones con anomalías cromosómicas confinadas a la placenta. Es posible que estas gestaciones provinieran de un cigoto, originalmente normal, en el que se ha producido un error mitótico (Figura 42a), o bien otra posible explicación sería que a partir de una célula anómala (generalmente trisómica) se produjera la pérdida de uno de los cromosomas por pérdida de anafase o no-disyunción (Figura 42b,I-II). Esta última posibilidad ocurre en el 80% de los casos (Boué, 1992). Se han

observado pérdidas de cromosomas de gestaciones trisómicas en el citotrofoblasto para células viables de trisomía 13 y trisomía 18 (Kalousek, 1989).

Las gestaciones con la misma anomalía confinada a la placenta, puede tener diferentes consecuencias y evoluciones, en el desarrollo embrionario. Una explicación de este hecho, podría ser la existencia o no de una disomía uniparental. Hall (1990) propone la teoría de un feto inicialmente trisómico que pierde uno de los cromosomas por pérdida de anafase o no disyunción, pudiendo quedar en curso un embrión disómico con los dos cromosomas pertenecientes al mismo progenitor. De esta manera, teóricamente en un tercio de las gestaciones trisómicas, se podría producir una disomía uniparental en el par del cromosoma originalmente trisómico. En nuestra serie no hemos podido realizar el estudio para detectar posibles disomías uniparentales. Recientes trabajos han mostrado nacimientos de niños con disomía uniparental a partir de diagnósticos de trisomías confinadas a la placenta. Cuatro casos con trisomía 15 en vellosidades coriales fueron neonatos Prader-Villi, debidos a una disomía 15 materna (Casidy y col, 1992; Purvis-Smith y col, 1992; Christian y col, 1996). De hecho, el 25% de los Prader-Willi presentan una disomía uniparental (Christian y col., 1996). Entre un grupo de 9 casos con trisomía 16, Kalousek y col, (1993) demostraron una disomía materna en tres de cinco casos con crecimiento uterino retardado. Bennett y col. (1992), presentaron dos casos con trisomía 16, uno de los cuales presentaba una disomía uniparental. Whiteford y col. (1995) presentan un niño con crecimiento retardado y una cardiopatía congénita debido a una isodisomía uniparental del cromosoma 16 (detectada en vellosidades coriales como trisomía completa). Además, se han publicado casos de disomía uniparental para los cromosomas 9 (Wilkinson y col, 1996) y 10 (Jones y col, 1995).

De todo ello se deduce la importancia del análisis en vellosidades coriales (cultivo directo o semidirecto) en la detección de gestaciones de riesgo de una disomía uniparental, aunque el consejo genético en estos casos es delicado debido a la existencia de disomías uniparentales sin efecto fenotípico (Hoglund y col. 1994; Schinzel y col. 1994; Stallard y col. 1995; Papenhausen y col. 1995).

Un caso especial es el mosaico de 46,XX/47,XX+18 estudiado por Wirtz y col (1991). En su serie de 1547 muestras analizadas mediante cultivo corto, encuentran trece trisomías 18, de las cuales 3 en forma de mosaico no fueron confirmadas en el feto. Estos resultados indican que la trisomía 18, encontrada en preparaciones directas, necesita verificarse en el feto, ya que la línea patológica puede ser confinada al trofoblasto. Esto mismo puede ocurrir con la trisomía 13 (Kalousek, 1989).

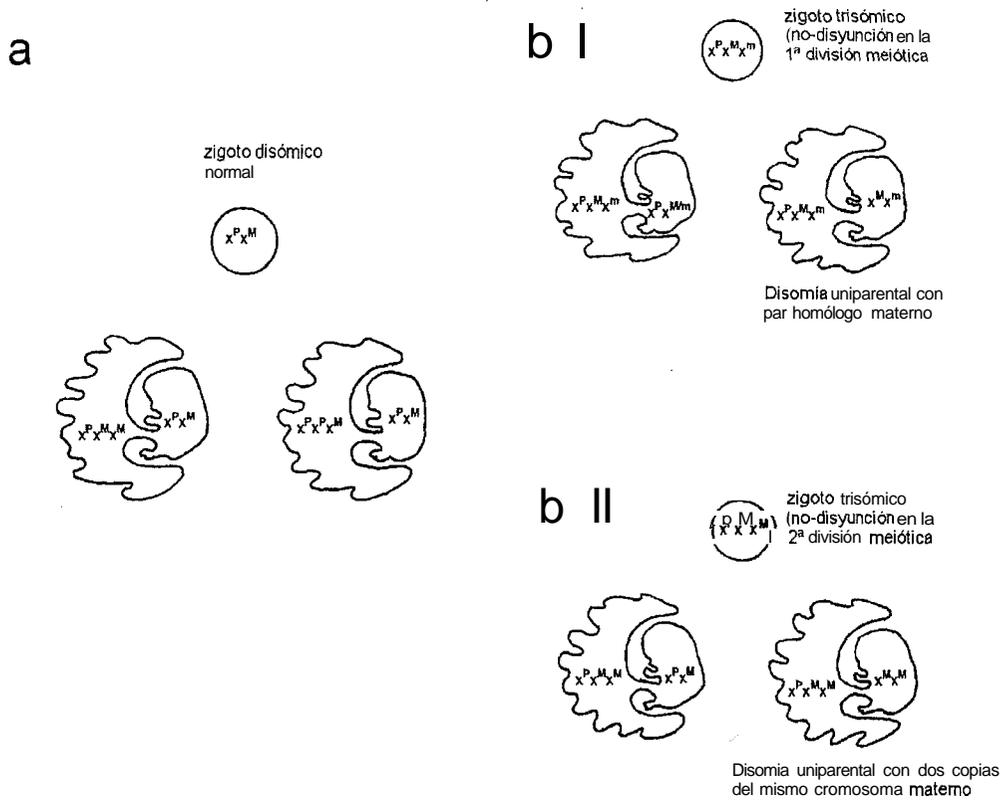


Figura 42. a) Posible mecanismo por el cual un cigoto normal podría originar un mosaico confinado a la placenta. Puede ocurrir una anafase larga en el momento que ya se han diferenciado las células placentales y las fetales. Se puede encontrar un efecto del imprinting diferente de acuerdo con el origen materno o paterno del cromosoma supernumerario. **M=Materno**; **P=Paterno**. b) Posible mecanismo por el cual un cigoto trisómico podría originar un mosaico confinado a la placenta. El cariotipo fetal podría ser "normalizado" por una pérdida fetal. Se podría encontrar una heterodisomía uniparental (I); o una isodisomía (II). (Simoni y Sirchia, 1994)

Como se ha dicho anteriormente, la mayoría de anomalías confinadas a la placenta, se presentan en mosaico. Es importante determinar si el mosaicismo confinado a la placenta afecta al feto. Ninguno de nuestros casos ha podido seguirse durante la gestación, pero la bibliografía muestra gestaciones con aneuploidías confinadas, compatibles con el desarrollo normal del feto. Otros casos muestran algún problema asociado, como muerte fetal intrauterina, complicaciones perinatales, y retardo del crecimiento intrauterino.

Respecto a la muerte fetal intrauterina y pérdida fetal, Hogge y col.(1986), publicaron una serie de abortos espontáneos en los que se encontró un 33% de casos con discordancia del cariotipo de la placenta y del feto. Más recientemente Breed y col.(1991), presentaron una serie de 2103 diagnósticos en muestras de vellosidades coriales, en dicha serie la frecuencia de discrepancia era de 1,2%. El 16,7% de estas discrepancias finalizaron como abortos espontáneos. Estos datos sugerían la existencia de una asociación entre mosaicismo placentario y pérdida fetal. Kalousek y col (1992), realizaron un estudio de 54 abortos espontáneos de los cuales 11 (20,4%) presentaban un mosaico confinado a la placenta, todos ellos dieron lugar a abortos en el primer trimestre de gestación. Recientemente, Wolstenholme y col. (1994) en una serie de 11775 muestras de vellosidades coriales, han encontrado un marcado incremento de abortos en los casos de mosaicismo confinado a la placenta. Todo esto sugiere que el mosaicismo confinado a la placenta, es más común que el observado en gestaciones viables y que una elevada proporción de complicaciones en la gestación pueden asociarse con él.

En cuanto a las complicaciones perinatales, también ha sido observada una asociación entre una alta morbilidad perinatal y el mosaicismo de vellosidades coriales. (Johnson y col, 1990).

Respecto al retardo de crecimiento intrauterino, diferentes autores han propuesto una asociación entre anomalías cromosómicas confinadas a la placenta y retraso del crecimiento intrauterino; posiblemente, los efectos del mosaicismo extraembrionario produzcan un efecto deletéreo en la función placentaria. (Kalousek y Dill, 1983, 1991, 1993; Simoni y Fraccaro, 1992; Post y Nijhuis, 1992; Wilkins-Haug y col, 1992; Fryburg y col. 1992; y Artan y col, 1995).

No obstante, algunas de estas aneuploidías son compatibles con el desarrollo normal del feto (Schwinger y col 1989). Se han descrito casos de: Trisomía 3 (Gueneri y col, 1989; Schulze y col, 1987); trisomía 7 (Delozier-Blanchet, 1988; Ledbetter y col, 1992); trisomía 9 (Appelman Z y col, 1991); trisomía 12 (Kalousek y col, 1987); trisomía 15 (Schulze y col, 1987); trisomía 16 (Callen y col, 1988; Sundberg y Smith-Jensen, 1991); trisomía 18 (Mikkelsen, 1985; Sachs y col, 1990; Leschot y col, 1990); todos ellos han sido detectados con el método directo. Tetraploidías (Callen y col, 1988; Ledbetter y col., 1990). 45,X

descrita por Hogge y col. (1985) detectada en cultivo largo y también descrita por Leschot y col. (1990) detectada en método directo.

A modo de resumen diremos que sobre discrepancias, se han publicado ejemplos concretos de placentas trisómicas en mosaico, e incluso en no mosaico, que presentaban un feto cariotípicamente normal. Entre ellos hay una marcada diferencia en los resultados finales. En algunos casos observan un crecimiento intrauterino retardado e incluso muerte fetal (Hashish y col, 1989; Williams y col, 1989; Reddy y col, 1990; Appelman y col, 1991;), mientras que otras gestaciones originan niños normales (Delozier-Blanchet y col, 1988; Tharapel y col, 1989; Miny y col, 1991). Para verificar estos datos es necesario continuar en el estudio de las gestaciones con líneas celulares trisómicas y diploides con técnicas moleculares y citogenéticas que permitirán profundizar sobre los posibles efectos de impronta genómica o del efecto de una disomía uniparental.

En un número menor de casos se producen trisomías no mosaico confinadas a la placenta (Dorfmann y col, 1992). En nuestro estudio se ha observado una placenta 45,X y una trisomía para un cromosoma marcador. En muestras realizadas posteriormente (no incluidas en las serie del presente trabajo) hemos observado una trisomía completa para el cromosoma 2 y para el cromosoma 7. La explicación de este fenómeno puede deberse a: a) Un problema de extracción de muestra en la que solo se extraiga la sección anómala de la vellosidad de una placenta en mosaico. b) Una placenta aneuploide no mosaico y un feto normal derivado de un embrión en mosaico y c) Un cigoto anormal que pierde uno de los cromosomas trisómicos resultando una placenta cariotípicamente anormal y un feto normal. En este último caso es posible que el cromosoma que se pierda deje los dos cromosomas heredados del mismo padre, resultando una disomía uniparental.

En cualquier caso, cuando se encuentra un mosaico o no mosaico confinado a la placenta, ha de hacerse un cuidadoso consejo genético, sabiendo que existe un alto riesgo de un resultado desfavorable en la gestación (retardo del crecimiento o muerte fetal) o la aparición de una disomía uniparental, en el caso de un feto diploide. Es importante hacer un seguimiento ecográfico exhaustivo y las pruebas moleculares y citogenéticas necesarias para descartar cualquier resultado desfavorable.

4.4.2 Factores que influyen en la aparición de anomalías cromosómicas

Se han analizado las anomalías respecto a los posibles factores implicados en la aparición de las mismas, como pueden ser las diferentes indicaciones para el diagnóstico prenatal: la edad gestacional, el medio de cultivo y, destacando entre ellas, la edad avanzada de la madre.

4.4.2.1 Indicación diagnóstica

Las anomalías cromosómicas observadas en relación a la indicación diagnóstica por la que se ha realizado la biopsia coríal en el presente estudio (Apartado 3.2.3.1), se comparan con los datos de otras series publicadas en las que se especifica esta relación (Tabla 67).

Tabla 67. Frecuencia de anomalías cromosómicas respecto a la indicación diagnóstica

Indicación	presente	Sachs	Ramos
	estudio	y col. (1992)	y col. (1992)
Progenitores portadores de anomalía crom.	40,0	5,4	10,8
Edad Materna avanzada	4,3	2,4	4,7
Hijo anterior afecto	4,9	2,3	2,7
Anomalía Génica familiar	2,3	12,8	6,4
Anomalía ecográfica previa	19,0	16,7	1,3
Ansiedad	2,4	-	1,4

Los valores obtenidos en las diferentes series son muy variables entre sí. Ello puede ser debido al diferente número de casos remitidos para cada indicación y al tipo de centro que realiza el diagnóstico (público o privado). Tenemos un claro ejemplo en la **indicación ansiedad** en la que nosotros encontramos un 2,4% de anomalías cromosómicas, mientras que en algunas series, como se puede observar en el apartado 4.1.1, no contemplan esta indicación; pero es obvio que en el análisis de población general se pueden llegar a detectar alteraciones cromosómicas que pasarían desapercibidas. Un valor de anomalías del 2,4% es lo suficientemente importante como para no desestimar este tipo de indicación. La serie de Ramos y col. (1992) muestra un 1,4% para esta indicación, mientras que la serie de Sachs y col (1992) es una de las que no contempla dicha indicación.

La indicación con mayor frecuencia de anomalías en nuestro estudio es la de progenitores portadores de anomalía cromosómica (40%). De los 5 casos recogidos con esta indicación, dos han sido anómalos. También es la indicación diagnóstica de mayor frecuencia de anomalías cromosómicas en Ramos y col. (1992) con un 10,4%, mientras que en la serie de Sachs y col. (1992) ocupa el cuarto lugar con un 5,4%.

La indicación de anomalía ecográfica previa, segundo lugar en nuestra serie, presenta una alta incidencia de anomalías cromosómicas del 19%, similar a la obtenida por Sachs y col. (1992) del 16,7% muy superior a la de Ramos y col. (1993) con un 1,3%.

Las indicaciones de hijo previo afecto de una anomalía cromosómica y la de edad materna avanzada presentan frecuencias de anomalías cromosómicas similares de un 4,9% y 4,3% respectivamente, al igual que los valores obtenidos por Sachs y col. (1992) que obtienen un 2,3% y 2,4%.

La anomalía génica familiar, ha sido para nosotros la de menor frecuencia (2,3%), mientras que en la serie de Sachs y col. (1992) es la segunda en frecuencia (12,8%), ocupando en dicha serie la primera posición en cuanto a frecuencia la indicación de anomalía ecográfica previa con un 16,7%.

Ello sugiere que las diferencias de frecuencias entre las series, también puede deberse a que en algunos centros se realiza el diagnóstico prenatal con una fuerte incidencia de indicaciones específicas, mientras que en otros, como en nuestro caso, se realiza el diagnóstico prenatal a una población en la que caben una mayor diversidad de indicaciones, como hemos podido observar con la indicación de ansiedad materna, que casi no aparece en otras series y es frecuente en la nuestra.

La comparación de resultados en vellosidades coriales y los de **líquido amniótico** se muestra en la Tabla 68. Los datos del líquido amniótico pertenecen al Estudio Colaborativo Italiano (Simoni y col, 1982).

Analizando los valores obtenidos en vellosidades coriales y en líquido amniótico en progenitores portadores de una anomalía cromosómica, los porcentajes de anomalía son similares y sensiblemente altos (40,0% y 47,4%); la incidencia de anomalías cromosómicas según la edad materna se duplica en vellosidades coriales respecto a líquido amniótico. La tercera frecuencia en vellosidades coriales es la de hijo previo afecto de anomalía cromosómica (4,9%) que ha sido sensiblemente superior al 0,94% encontrado en líquido amniótico (Tabla 68).

Tabla 68. Anomalías cromosómicas respecto a la indicación, en vellosidades coriales y líquido amniótico.

Indicación	% CVS (Presente estudio)	% Líquido amniótico (Simoni y col, 1982)
Progenitores portadores de anomalía cromosómica	40,4	47,4
Edad Materna avanzada	4,3	2,3
Hijo anterior afecto	4,9	0,9
Anomalía génica familiar	2,3	-
Anomalía ecográfica previa	19,0	-
Ansiedad	2,4	-
Otras	-	0,5

A continuación, analizaremos las indicaciones en orden de frecuencia de anomalías cromosómicas encontradas (Tabla 32). La edad materna debido a su importancia, se tratará en un apartado específico.

Anomalía cromosómica en progenitores.

Los portadores de translocaciones y de ciertas inversiones, tienen un alto riesgo de tener anomalías cromosómicas en la descendencia (Funderburk y col. 1977; Bricarelli y col, 1989; Connor y col, 1993, Muller y col, 1994). En nuestra serie se ha encontrado un 40,4% de alteraciones cromosómicas en vellosidades coriales cuando uno de los progenitores es portador de una translocación o inversión equilibrada. Este alto porcentaje confirma que la transmisión de la información hereditaria en muchos casos es descompensada, de ahí, el elevado porcentaje de anomalías encontradas. De los 5 casos en los que se realizó el diagnóstico prenatal por esta indicación, en dos se encontraron anomalías cromosómicas: una anomalía estructural no balanceada heredada vía materna: 46,XY,inv(18) (p 11q11) y una aneuploidía sexual en mosaico: 45,X/46,XY.

En cuanto al primer caso, la inversión del cromosoma 18 ha sido detectada en la madre debido a la existencia de un hijo anterior afecto de Síndrome de Edwards. Cuando la portadora de la inversión es la madre, por lo que el valor del riesgo de producirse una anomalía es del 7,5% (frente al 4% en caso de ser el padre el portador) (Boué y Gallano, 1984). El riesgo aumenta en un 10-15% cuando el segmento involucrado pertenece a la parte distal del cromosoma.

El segundo caso, 45,X/46,XY, fue referido para diagnóstico prenatal por existir un progenitor (padre) con una anomalía estructural equilibrada: t(13;14). A las 12 semanas de gestación se extrajeron vellosidades coriales cuyo análisis detectó un feto 45,X/46,XY. La observación de esta anomalía no es usual debido a que la anomalía cromosómica en mosaico no "depende" del tipo de reorganización estructural parental. En cualquier caso, si el resultado hubiera producido un individuo portador de la translocación, el riesgo de un resultado no balanceado en estos casos es bajo (1%-2%) (Daniel y col, 1989). No obstante, siempre se ha de ofrecer diagnóstico prenatal a estas parejas.

Se ha encontrado una cierta relación entre trisomía 21 y padres portadores de t(13;14). Hamerton (1975), estudió 24 familias con una translocación robertsoniana D/D, observando en la descendencia 170 niños con trisomía 13. Esta incidencia de 0,67%, contrastó con la de 0,005%-0,02% para la población general. Así mismo, Ludnsteen y col. (1974), estudiaron 10 casos con translocación D/D y trisomía 21. Fernhoff y col. (1976), estudiaron 4 familias con translocación 13/14, en dos de las cuales aparecen casos con trisomía 21, y en las otras,

dos abortos de repetición. Pereira y col (1992), describen otra familia con translocación 13/14 y descendencia con síndrome de Down. Estos datos apoyan la tesis de Brandriff y col. (1986), que postulan que una translocación (en su caso recíproca heterocigota) puede predisponer a la producción de gametos aneuploides de un cromosoma no incluido en la translocación, debido a la existencia, durante la meiosis, de un "efecto inter cromosómico" por cierta interferencia entre los cromosomas tránslocados y los acrocéntricos.

Otro punto de vista sobre la asociación entre translocaciones D/D y aneuploidías es la de Warburton (1985); Uchida y Freeman (1986), Couzin y col. (1987); Mikkelsen y col. (1989); Martin y col. (1990,1991), que opinan que dicha asociación es fortuita. Recientemente Schinzel y col. (1992), realizan un estudio del origen del cromosoma extra 21, mediante determinación de polimorfismos de DNA en familias en las que uno de los padres era portador de una translocación balanceada o de una inversión pericéntrica. La reorganización balanceada, en dos familias fue heredada vía materna; y en cinco por vía paterna, mientras que el cromosoma adicional, en todas las ocasiones, fue heredado de la madre. Estos resultados descartarían la posibilidad de un "efecto inter cromosómico".

No obstante la diferencia de opiniones, los estudios de Schinzel y col. (1992) coincidirían con lo observado en el presente estudio, ya que nuestra anomalía 45,X/46,XY es un mosaico, producido por una no-disyunción postzigótica, totalmente independiente de cualquier efecto inter cromosómico durante la meiosis.

Exposición a radiación

Las dos anomalías observadas en el presente estudio para la indicación exposición a radiación (47,XX,+18 y 47,XX,+9), coinciden en que el padre se había sometido a radiaciones ionizantes a dosis terapéuticas (5 y 3 años antes de la gestación). Es posible que las espermatogonias quedaran dañadas con posibilidad de formar células aneuploides, con el consiguiente riesgo de producción de anomalías, tal y como habían propuesto hace años Uchida y col. (1968).

Estudios más recientes realizados en espermatozoides humanos (utilizando la técnica de fusión con ovocitos de hámster) para determinar el daño cromosómico en individuos sometidos a quimioterapia evidencian un incremento de anomalías cromosómicas en gametos. Martin y col (1986) analizando muestras de pacientes sometidos a radiación testicular observan un incremento en el número de anomalías numéricas y estructurales después de 36 meses del tratamiento. Más recientemente, Brandriff y col (1994) analizando el efecto de la quimio y radioterapia (de 3-20 años después) en espermatozoides de pacientes con la enfermedad de Hodgkin encuentran un incremento estadísticamente significativo de hiperhaploidías. Estos resultados podrían explicar los dos casos observados

en nuestro estudio ya que las radiaciones recibidas por los padres podrían haber producido aneuploidías en espermatozoides que después hubieran fecundado un óvulo normal dando lugar a un feto trisómico.

Consanguinidad

En nuestro caso, la consanguinidad es la tercera indicación que presenta anomalías cromosómicas, pero hay que valorar el número de casos referidos para esta indicación (4), de los cuales sólo uno (25%), presentaba una anomalía cromosómica que ha resultado ser una trisomía 21 en mosaico (46,XY/47,XY+21).

Penrose en 1961, especuló sobre la posibilidad de una cierta relación entre la tendencia a la aparición de trisomías 21 en parejas consanguíneas; pero esta teoría no ha podido confirmarse en los trabajos realizados por Devoto y col, (1985), en los que el porcentaje de hijos con Síndrome de Down en parejas consanguíneas no es significativamente superior que en los casos control, ni en los estudios epidemiológicos del síndrome de Down en España (Salvador y col. 1989). Así pues, parece posible que en general la consanguinidad no produzca ningún incremento en la incidencia de anomalías cromosómicas (al menos numéricas).

Sin embargo para descartar esta posibilidad de cierta tendencia a la no-disyunción debida a la consanguinidad, se necesitará realizar estudios más amplios.

Anomalía ecográfica previa

En el presente trabajo se ha detectado un porcentaje muy elevado (19%) de anomalías cromosómicas para esta indicación. Ello puede ser debido al tipo de centro ya que en él se realizan ecografías de Nivel III, y las pacientes vienen dirigidas, en muchos casos porque, durante el control rutinario de la gestación, se ha detectado o se sospecha alguna anomalía. Así pues, nuestra serie para esta indicación, no está tomada al azar, sino que viene específicamente "dirigida", con lo que es posible que produzca variaciones en el porcentaje de anomalías cromosómicas al resto de las indicaciones para diagnóstico prenatal. También podría influir de manera importante la experiencia del ecografista.

Abortos de repetición

La existencia de abortos de repetición, suele ser una indicación clara para que se realice un diagnóstico prenatal. La incidencia de alteraciones cromosómicas en estos casos es 10 veces superior a la de la población general. La frecuencia de cromosomopatías en parejas con abortos de repetición varía entre el 4% y el 10%. Galán y col. (1991), han determinado

que la frecuencia de translocaciones en uno de los progenitores en casos de parejas con fallos reproductivos es de un 6%. El gran número de anomalías cromosómicas detectadas en parejas con historial de abortos de repetición, afecta a reorganizaciones estructurales balanceadas.

Existen pocos trabajos publicados al respecto, en los que aparezcan anomalías de tipo numérico. Siempre se trata de anomalías cromosómicas sexuales puesto que son las únicas que en algún caso el portador tiene ciertas posibilidades de reproducirse (47,XXX; 47,XYY, etc.) (Kajii y Ferrier, 1978; Husslein y col, 1982; Pantzary col, 1984).

En nuestra serie, de los 9 casos con esta indicación diagnóstica, sólo observamos un caso con una anomalía numérica en mosaico (46,XY/47,XXY). El cariotipo de los progenitores era normal. Así pues, deben existir otras causas independientemente de las cromosómicas implicadas en la aparición de abortos de repetición, como por ejemplo problemas de índole ginecológico. De todos modos es necesario ofrecer un estudio citogenético a las parejas con antecedentes obstétricos de abortos de repetición, ya que como hemos indicado la frecuencia de alteraciones es mayor a la de la población general.

Hijo anterior afecto

En nuestra serie, de los 41 casos referidos por esta indicación, sólo se han encontrado dos casos con anomalías cromosómicas numéricas: (47,XXY y 46,XX/47,XX+mar), lo que supone una frecuencia de un 4,9%. No se ha podido realizar ni el seguimiento de la evolución de las gestantes, ni del cariotipo de los progenitores.

Stene y col. (1984), estudiaron el riesgo de recurrencia de aberraciones cromosómicas en 2890 casos de amniocentesis, encontrando que después del nacimiento de un niño con una cromosomopatía, el riesgo de recurrencia de una aberración cromosómica a las 16 semanas de gestación, es del 1%-2%. Mikkelsen y Stene (1979) estimaron que el riesgo de recurrencia de la trisomía 21 es del 1% en líquido amniótico, mientras que en vellosidades coriales, la estimación es del 2,7%. Este valor más elevado en vellosidades coriales, también encontrado en nuestro estudio, probablemente es el reflejo de una edad gestacional temprana, ya que un gran número de fetos con trisomías, abortarán espontáneamente antes de la 16 semanas de gestación.

4.4.2.2 Edad materna

En la mayoría de las series publicadas, la edad materna es la principal indicación para la realización de diagnóstico prenatal en vellosidades coriales (Tabla 46).

Se considera que a partir de los 35 años aumenta el riesgo de cromosomopatías. La frontera de edad que determinan los diferentes países para la realización de diagnóstico prenatal es variable. En la mayoría de los casos se considera a partir de los 35 años, si bien en algunos países consideran la de 34 y otros 37 o 38 años. Generalmente la limitación de la edad suele depender del número de mujeres gestantes mayores de 35 años, y las posibilidades de cada país, y en algunos casos las de los propios centros, para asumir el volumen asistencial. Existen también consideraciones de tipo ético: se valora el riesgo de aborto debido a la técnica de extracción y el riesgo de aparición de una cromosomopatía, con el fin de reducir el número de posibilidades de abortos de fetos cromosómicamente normales.

El riesgo de una cromosomopatía en el feto incrementa con la avanzada edad materna. Penrose (1933) y Jenkins (1933), ya en estas fechas, demostraron por separado la estrecha relación del síndrome de Down y la edad materna. Nuestros datos coinciden con estas observaciones (Tabla 34 y 35).

La Tabla 34 muestra que las gestantes mayores de 35 años presentan una incidencia de anomalías de un 4,3%, frente al 2,4% de las gestantes menores de esta edad. En este caso se analizan sólo las pacientes referidas por edad, es decir, se han eliminado todas las otras indicaciones diagnósticas (como observación de una anomalía ecográfica, progenitores portadores de una reorganización cromosómica equilibrada, etc.). De esta manera se contrastan pacientes con edad "avanzada" y pacientes menores de 35 años que en nuestro estudio están referidas con la indicación de ansiedad materna. En estos casos de ansiedad, la frecuencia de anomalías cromosómicas es del 2,4%. Hemos de señalar al respecto que esta frecuencia sigue siendo considerable y sugiere que es lo suficientemente importante como para no desestimar la realización de diagnóstico prenatal a mujeres menores de 35 años. Como se ha indicado en el apartado 4.1.1 algunas series no contemplan este grupo de indicación. Desestimar este grupo de población supone aceptar no diagnosticar el 24% de las anomalías observadas en el presente estudio. Respecto al análisis de la frecuencia de anomalías en relación a la edad materna (incluyendo todas las indicaciones diagnósticas), la frecuencia de >35 años (4,3%) se mantiene mientras que aumenta la de <35 años (3,8%).

En la Tabla 69 se comparan las anomalías cromosómicas observadas en vellosidades coriales en los casos de indicación materna, según la edad de la madre con las obtenidas por Mikelsen (1987). La comparación de ambas series año a año, muestra valores variables, posiblemente debidos al número de casos referidos en cada año, pero lo realmente importante en ambas series es la tendencia a incrementar las anomalías cromosómicas a medida que aumenta la edad materna. En la Figura 43 se refleja, en conjuntos de tres años, el progresivo aumento de frecuencia de anomalías cromosómicas en vellosidades coriales cuando la edades maternas son superiores a los 35 años. Este aumento de anomalías

respecto a la edad materna también se ha observado en series de recién nacidos (Little y col, 1995).

Tabla 69. Anomalías cromosómicas en vellosidades coriales respecto a la Edad Materna.

Edad	Mikelsen (1987)			Presente estudio		
	Casos	n	%	Casos	n	%
35	933	10	1,07	118	2	1,7
36	951	14	1,47	93	6	6,5
37	978	24	2,45	73	-	-
38	912	31	3,34	45	2	4,4
39	748	23	3,07	39	1	2,6
40	488	17	3,48	28	2	7,1
41	385	24	6,23	23	2	8,7
42	200	16	8,00	15	2	13,3
43	128	9	2,03	5	-	-
44	63	7	11,11	4	2	50,00

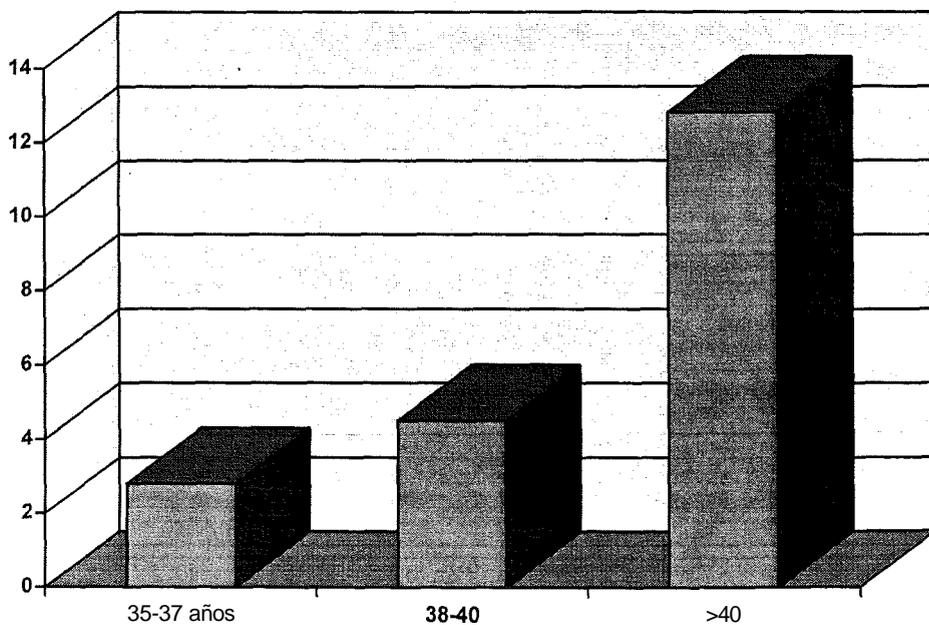


Figura 43 Anomalías cromosómicas en vellosidades codales observadas en nuestra serie en mujeres mayores de 35 años.

El tipo de anomalía cromosómica en vellosidades coriales más frecuente, cuando la indicación diagnóstica es la edad avanzada de la madre, es la trisomía (apartado 1.2 Introducción).

Los datos recopilados en el presente estudio coinciden con lo esperado y se muestran en la Figura 28. En ella se puede observar el incremento de las frecuencias de trisomías entre los grupos de edades y por lo tanto, el riesgo de tener una trisomía con relación a la edad materna. Los valores para mayores de 35 años oscilan entre el 2,2% del grupo de menores de 40 años y el 6,4% para mayores de 40 años.

Aunque todas las publicaciones se orientan a demostrar el crecimiento de las anomalías relacionadas con la edad materna, los grupos de edades que se publican son subjetivos y por tanto diferentes. Con el fin de poder comparar nuestros resultados con algunos de los publicados, hemos agrupado los tipos de anomalías cromosómicas más frecuentes según dos grupos de edades: uno de 35-38 años y otro de mayores de 38 (Tabla 70).

Tabla 70. Tipo de anomalía cromosómica en vellosidades coriales según la edad materna

Series	Edad	+21	+18	+13	raras	45,X	47,XXY	47,XXX
Ramos y col (1992)	35-38	0,7	0,4	-	-	-	0,4	-
	>38	4,2	1,4	-	-	0,4	0,7	0,4
Snijders y col.(1994)	35,38	0,7	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,03
	>38	3,0	2,2	0,3	0,1	0,1	0,3	0,2
Presente estudio	35-38	0,9	-	-	0,6	0,3	0,6	-
	>38	2,6	1,8	-	1,8	-	-	•

En todas las series las trisomías en general aumentan con el grupo de gestantes mayores de 38 años. Las trisomías sexuales son las menos frecuentes. En nuestro caso no se observó ningún caso de trisomía XXX, en la serie de Ramos y col. (1992) en una única ocasión; en la de Snijders y col. (1994) una en el grupo de 35-38 años y tres en >38 años. La trisomía XXY en el presente estudio se observó en dos ocasiones (0,6%) en el grupo de edades comprendido entre 35-38 años. En la serie de Ramos y col. (1992) se observó una en el mismo grupo y 2 (0,7%) en el de mayores de 38 años, y en la serie de Snijders y col. (1992) 1 y 3 respectivamente.

Las trisomías más frecuentes son las autosómicas y de ellas, en todas las series, la trisomía 21 y la 18. Ni en nuestra serie, ni en la de Ramos y col. (1992) se encuentra la trisomía 13. Ello puede ser debido al número de casos referidos en ambas series y a la baja incidencia de esta trisomía respecto a las dos más frecuentes (+21 y +18). La serie de Snijders y col. (1994) es más amplia (5814 casos) y encuentra 8 casos de trisomía 13 (0,1%).

En nuestro estudio se han hallado dos de las trisomías denominadas "raras" en el grupo de edad materna superior a los 38 años, y dos más en el grupo de 35-38 años. Snijders y col. (1994) encuentran también cuatro casos. Sin embargo el porcentaje que obtienen (0,1%) es muy inferior al observado en nuestra serie (1%). La diferencia es debida a que en nuestra serie se utiliza el cultivo semidirecto, en el que hay un mayor número de anomalías confinadas a la placenta que, en muchos casos, son trisomías "raras". En la serie de Snijders y col. (1994) se utiliza el cultivo largo. Las trisomías "raras" observadas en nuestro estudio en vellosidades coriales, son las que mediante amniocentesis, dieron un cariotipo fetal normal, por lo que se han catalogado como anomalías confinadas a la placenta. La relación de dichas anomalías y la edad materna se ha analizado de forma específica en el apartado 4.4.1.3 de Discrepancias cromosómicas.

En nuestro estudio no se observa ninguna trisomía 18 en el grupo de 35-38 años; mientras que en el grupo de mayores de 38 se han observado dos (1,8%). La serie de Ramos y col. (1992) y la de Snijders y col. (1994) obtienen resultados similares a los nuestros.

En cuanto a la más frecuente de las trisomías (la trisomía 21), los datos obtenidos son similares a los obtenidos por Ramos y col. (1992) y Snijders y col. (1994). No obstante, comparados año a año, los porcentajes del presente estudio con los de Snijders y col. (1994) y los de otra serie publicada anteriormente por y col. (1989) son más variables (Tabla 71); pero todas muestran una tendencia constante de que, a medida que aumenta la edad materna, también aumenta la frecuencia de trisomía 21. Es de destacar que la serie de Ramos y col. (1992) no indica los valores de trisomía 21 según la edad materna año a año.

Tabla 71. Trisomía 21 respecto a la edad materna en estudios de vellosidades coriales.

Edad materna	Hook y Cross (1989)	Snijders y col. (1994)	Presente estudio
35	0,4	0,4	-
36	0,6	0,5	1,1
37	0,7	0,7	-
38	1,0	0,2	-
39	1,3	2,1	-
40	1,8	2,2	3,6
41	2,4	2,2	4,3
42	3,2	3,2	6,7
43	4,2	7,3	-
44	5,6	5,1	-

La magnitud del efecto de la edad materna es inverso a la longitud del cromosoma según Hassold y col. (1984). Existe una relación entre la medida del cromosoma y el incremento exponencial de la tasa de trisomías después de los 30 años (Risch y col, 1986). El efecto de la edad en las trisomías va creciendo según se trate de los cromosomas 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21 y 22. Muchas de estas trisomías evolucionarán como abortos espontáneos. Nuestro análisis en vellosidades coriales, muestra trisomías viables (sobre todo la 18 y 21) y las trisomías "raras" (confinadas a la placenta).

Respecto a la monosomía X, algunos autores consideran que es independiente de la edad materna (Creasy, 1976; Hassold y col, 1980), mientras que otros autores consideran la existencia de un efecto de la edad materna inverso (Warburton y col, 1980). En nuestro caso tenemos una monosomía X en una gestante de 35 años. El resto de monosomías X pertenecen a mujeres de edades comprendidas entre los 25 y 34 años (6 casos), lo que parece confirmar que no está relacionado con la edad avanzada de la madre.

Es interesante comparar los valores de anomalías totales encontrados en vellosidades coriales respecto a amniocentesis y recién nacidos según la edad materna (Tabla 72).

Tabla 72. Frecuencia de anomalías cromosómicas en vellosidades coriales, amniocitos y recién nacidos, respecto a la edad materna.

Edad materna	Vellosidades coriales	Amniocentesis	Recién nacidos
	%	%	%
35	1,7	0,9	0,5
36	6,5	1,1	0,6
37	-	1,3	0,8
38	4,4	1,5	1,0
39	2,6	1,9	1,2
40	7,1	2,4	1,6
41	8,7	3,0	2,0
42	13,3	3,8	2,6
43	-	4,6	3,3
44	50,0	5,3	4,2

Los datos de vellosidades coriales son los resultados del presente estudio. Los de amniocentesis son de Ferguson-Smith y Yates (1984) y los de recién nacidos de Hook y col, (1983.)

En vellosidades coriales, en cada uno de los años, las frecuencias de anomalías cromosómicas encontradas son mayores que en amniocentesis (excepto a los 37 y 43 años en los que no se ha encontrado ninguna anomalía, posiblemente debido al número de muestras referidas en esas edades), y además la incidencia de anomalías cromosómicas en amniocitos son mayores que las encontradas en recién nacidos. Así pues se mantienen las frecuencias esperadas y comentadas en el apartado 4.4.1.1.1, en el que se muestra como los fetos con alteraciones se van perdiendo a lo largo del proceso reproductivo y que a su vez incrementan su frecuencia con el aumento de la edad materna.

Estos resultados coinciden con los datos obtenidos en abortos espontáneos en los que se muestra también una relación positiva entre edad materna y número de anomalías cromosómicas (Silvestre, 1991).

4.4.2.3 Edad gestacional

Existen numerosos estudios citogenéticos en abortos espontáneos con diferentes semanas de gestación. Los resultados de las incidencias de las anomalías cromosómicas entre los estudios son muy variables, pero todos coinciden en encontrar una baja frecuencia de alteraciones cromosómicas antes de la 8 semana de gestación. En la 12 semana encuentran

la mayor frecuencia de anomalías cromosómicas (50%), y a partir de aquí un decrecimiento de dichas anomalías (y de abortos) hasta el nacimiento en el que la incidencia de alteraciones cromosómicas es del orden del 5% (Tabla 70). Recientemente Eiben y col. (1990) han detectado un 50% de anomalías cromosómicas antes de la 8ª semana de gestación, al analizar vellosidades coriales de abortos mediante cultivo directo. Este elevado porcentaje puede ser debido a que las células del citotrofoblasto tienen mayor índice mitótico y frecuencia de mutación (ya comentado en los apartados de Mosaicos 4.4.1.2, y Discrepancias 4.4.1.3).

Simpson (1990) analizando porcentajes de anomalías cromosómicas, en este periodo gestacional tan crítico, sugiere la necesidad de realizar estudios más extensos y con diferentes metodologías para poder conocer valores más exactos.

Tabla 73. Anomalías cromosómicas en vellosidades coriales y abortos espontáneos según semanas de gestación.

Semanas de gestación	—Vellosidades coriales—			—Abortos espontáneos—		
	n	anomalías	%	n	Anomalías	%
8-11	491	20	4,0	1447	757	52,3
12-15	456	16	3,5	1787	870	48,7
16-19	76	3	3,9	670	209	31,2
20-27	21	2	9,5	699	58	8,3
>27	4	1	25,0	452	26	5,8

Los datos de vellosidades coriales son resultados del presente estudio. Los de Abortos son de Warbuton y col. (1980, 1986) y Kine (1989).

La comparación de nuestros resultados y los observados en abortos espontáneos se muestra en la Tabla 73. Los valores elevados de anomalías cromosómicas en abortos están situados entre la 8 y 11 semanas (52,3%) y la 12 y 15 semana (48,7%), mientras que en vellosidades coriales el porcentaje es mucho menor (4%). La Tabla 36 muestra cómo para las semanas 8 y 9 de gestación, el porcentaje de anomalías es muy elevado, pero estas anomalías viables hasta estas semanas, posiblemente en las semanas 12-14, evolucionarán como abortos espontáneos. Esto explicaría que en abortos espontáneos sean precisamente estas semanas las de más elevado índice de anomalías.

Se ha propuesto la existencia de una tendencia a retener "in útero" gestaciones con cariotipo anómalo (Warburton y col, 1980). La tendencia a retener "in útero" gestaciones cromosómicamente anómalas, explicaría la baja frecuencia observada de abortos espontáneos anómalos, antes de la 8 semana de gestación; y por tanto, explicaría la

elevada frecuencia de anomalías detectadas en vellosidades coriales detectadas en estas semanas.

En nuestro estudio, la 11 y 12 semanas de gestación, presentan el mayor número de casos procesados y el menor número de anomalías cromosómicas., ya que se encuentra en el periodo ideal de extracción de muestra. Esto se corresponde con los datos de abortos espontáneos en los que se produce el mayor número de abortos y estos presentan la mayor incidencia de alteraciones cromosómicas. Es decir, las que continúan como gestaciones viables, son las que tienen un número menor de anomalías, o bien éstas son compatibles con la viabilidad fetal.

Los valores elevados en el análisis de vellosidades realizados en las semanas 20-27 y mayores de 27, no pueden ser considerados como reales debido al bajo número de casos referidos en este periodo gestacional. Es lógico pensar que sea un efecto estadístico y no un efecto biológico al comparar los valores con abortos espontáneos. En ellos el porcentaje de anomalías cromosómicas desciende al 8,3% entre la 20 y 27 semana, y al 5,8% en abortos de más de 28 semanas. Este último valor se corresponde con el valor de anomalías cromosómicas detectadas en muertes perinatales. Así pues, el porcentaje de anomalías cromosómicas en abortos, disminuye a medida que aumenta el tiempo de gestación.

4.4.2.4 Medio de cultivo: pseudomosaicismo

Nuestros valores muestran una frecuencia de anomalías cromosómicas similar en los dos medios utilizados (Tabla 37). En el medio Chang se observa que un 3,6% de los casos presentan anomalías cromosómicas mientras que en RPMI-1640, se encuentra un porcentaje algo superior de un 4,1%. Estos resultados confirman el hecho bien conocido de que el medio de cultivo empleado no influye en la anomalía cromosómica fetal encontrada.

Si bien el medio de cultivo es independiente de la existencia y detección de una anomalía en el feto,. según sea el tipo y medio de cultivo empleado, pueden encontrarse más cantidad de células anómalas "individuales" en el análisis (pseudomosaicismo), pudiendo desvirtuar el diagnóstico. Es importante distinguir entre pseudomosaicismo y anomalía cromosómica fetal.

Se ha sugerido la posibilidad de encontrar un aumento de las anomalías cromosómicas "individuales" según el medio de cultivo utilizado. Krawezun y col. (1989) analizaron células de líquido amniótico en medios diferentes y encontraron un porcentaje de alteraciones mayor en medio Chang respecto al medio RPMI-1640. Bartritzke y col, (1992) analizaron 1585 líquidos amnióticos de los que cultivaron 499 muestras con medio TC199 y 1086 muestras con medio Chang y encontraron en medio Chang un 3,7% de metafases "individuales" con anomalías de tipo estructural, frente a un 1,4% en medio TC199. El mismo tipo de relación

positiva entre anomalías cromosómicas y medio Chang se ha descrito también por Eiben y col. (1994) en amniocentesis precoces, con una frecuencia de pseudomosaicismo del 9,9%. Los resultados apuntan a un incremento del porcentaje de pseudomosaicismo (incluyendo células "individuales" con anomalías cromosómicas numéricas o estructurales debido al medio de cultivo empleado. En nuestra serie la frecuencia del pseudomosaicismo obtenida es mucho menor (2.2%); aunque todas las anomalías cromosómicas han sido observadas en cultivos de medio Chang, igual que las anomalías observadas en la serie de amniocentesis precoces de Eiben y col. (1994). Por otra parte, el tipo de anomalía encontrada en pseudomosaicismo también coincide en el caso de la monosomía X, con los resultados de Eiben y col. (1994), pero no coincide con las otras dos inversiones de los cromosomas 7 y 11 encontradas en nuestros cultivos. El bajo número de células anómalas individuales (pseudomosaicismo) halladas en nuestra serie, puede ser debido al reducido tiempo de cultivo (24 horas) en el que se mantiene la muestra en el tratamiento de vellosidades coriales. En el caso del líquido amniótico, el tiempo de cultivo es mucho mayor (2 semanas), pudiendo producirse mayor número de alteraciones en las divisiones "in vitro".

En nuestra opinión la desventaja que presenta el medio Chang de producir un mayor número de anomalías cromosómicas "individuales" está compensada por el aumento de división celular y la mejor calidad de las divisiones obtenidas. Además, en el caso de realizar cultivo semidirecto el aumento de pseudomosaicismo es relativamente bajo (2.2%).

Será necesario realizar trabajos más amplios en este tipo de tejido corial para poder diferenciar y descartar los casos de pseudomosaicismo en el diagnóstico prenatal.

4.5 Fragilidad cromosómica espontánea

Actualmente, los lugares frágiles (LF) pueden definirse como aquellas regiones específicas de los cromosomas humanos que son especialmente vulnerables o sensibles a lesionarse de forma espontánea mediante la utilización de agentes inductores (Berger y col. 1985; Sutherland y Ledbetter, 1989; Smeets y Merkx, 1990). Hasta el momento se han descrito 113 LF (HGM 11, (1991) clasificados en dos grupos: los "raros" y los "comunes". Aquellos LF que se detectan en menos de un 2,5% de los individuos de la población se denominan "raros" (Berger y col, 1985); mientras que los "comunes" se consideran que están presentes en más del 50% de la población (Hecht, 1986). Se han observado variaciones en la expresión de LF entre los individuos de una determinada población (Samadder y col, 1993).

Por el momento, sólo se conocen tres LF (FRAXA, FRAXE y FRAXF) todos ellos localizados en la banda Xq27.3-Xq28, asociados a un Síndrome cromosómico bien definido en varones, caracterizado por la presencia de retraso mental y macroorquidia (Hegerman y col, 1991; Goldson y Hagerman, 1992). Este Síndrome conocido como Síndrome del X frágil es la segunda causa cromosómica más frecuente de retraso mental después del Síndrome de Down. El resto de LF no muestran ningún tipo de asociación o patología específica.

Los LF comunes se consideran dianas específicas para mutágenos y carcinógenos (Yunis y col, 1987) pudiendo evolucionar como puntos de rotura reales que originan reorganizaciones cromosómicas (Warren y col, 1987; Yunis, 1987; Miró y col, 1987) o facilitando la integración de ADN exógeno como por ejemplo viral (Romaní t col, 1990; Rassool y col, 1991; Caparossi y col, 1991).

Se conoce poco respecto a la estructura molecular de los LF. La mayoría de información se ha obtenido a partir de unos pocos LF raros (FRAXA, FRAXE, FRAXF, FRA16A y FRA11B) caracterizándose todos ellos por la presencia de una región inestable de tripletes (CGG)_n repetidos que se localizan de forma adyacente a un dinucleótido CpG que está hipermetilado cuando el número de copias de estas regiones inestables alcanza un cierto valor límite. La expresión del LF se asocia o es consecuencia de la hipermetilación (Verkerk y col, 1991; Knight y col, 1993; Parrish y col, 1994; Nancarrow y col, 1994; Jones y col, 1995). Sin embargo, del resto de LF raros y de los LF comunes se desconoce tanto su estructura molecular como el mecanismo responsable de su expresión.

Aunque el papel biológico de los LF sigue siendo un enigma, cada vez hay más datos que asocian la localización de LF comunes con regiones genéticamente activas (Austin y col, 1991; Nancarrow y col, 1994). Si la expresión de fragilidad cromosómica "reflejara" la existencia de una alteración en la actividad transcripcional de estos lugares los LF podrían

jugar un papel biológico esencial en la aparición de diferentes patologías (Hecht y col, 1991; Simonic y Gericke, 1996).

Una de las características de un individuo portador de un determinado LF es que no lo expresa en el cien por cien de las células estudiadas (desconociéndose hasta el momento el motivo), lo que provoca que la gran mayoría de estudios de fragilidad cromosómica se realicen utilizando condiciones adecuadas de cultivo que inducen dicha expresión (HGM 11, 1991). Sin embargo, también se han publicado estudios de expresión de fragilidad espontánea en diferentes tejidos: linfocitos de individuos normales (Markkanen y col, 1982; Dai y col, 1986; Fuster, 1987; Hecht y col, 1988), en linfocitos de pacientes afectados o genéticamente predispuestos al cáncer (Richard y col, 1994; Udayakumar y col, 1994) o en el propio tejido tumoral (Abe y col, 1989; Ozisik y col, 1994). También se ha descrito la expresión espontánea de LF en cromosomas de espermatozoides de individuos normales (después de una fecundación "in vitro" heteróloga: oocitos de hámster, espermatozoides humanos) (Benet y col, 1989; Martorell, 1995) y en tejido placentario (Habibian y Surti, 1987).

En nuestro estudio, nos propusimos analizar la expresión espontánea de LF en muestras de vellosidades coriales con el fin de conocer si existía una mayor incidencia respecto a otros tejidos y sobre todo determinar si existía algún LF especialmente involucrado en estas primeras etapas del desarrollo embrionario (Míguez y col, 1991).

4.5.1 Relación con el tipo de medio de cultivo utilizado y la edad gestacional

La frecuencia de lesiones cromosómicas espontáneas observado en nuestro estudio ha sido del 9%, no observándose influencia del medio de cultivo utilizado (9,0% medio RPMI-1640 y 9,3% medio Chang). Esta frecuencia es estadísticamente superior ($p < 0,005$) a la observada en linfocitos de individuos normales analizados en nuestro laboratorio (3,4% y 2% en medio RPMI-1640 y Chang respectivamente). Este incremento de gaps y roturas, podría ser una característica de las células embrionarias en estas primeras fases del desarrollo ya que Habibian y Surti (1987) estudiando células normales de tejido placentario en el primer trimestre de gestación encuentran valores similares (7,7%). Es interesante destacar que en cromosomas de espermatozoides estudiados mediante fecundación de oocitos de hámster muestran también una elevada incidencia de lesiones cromosómicas (8,8%, 7,6%) (Benet y col, 1989; Martorell, 1995 respectivamente).

La sospecha de una fragilidad cromosómica elevada en tejidos embrionarios nos ha llevado a realizar un estudio de la misma en líquido amniótico y en sangre fetal. Los resultados se muestran en la Tabla 74. Observándose que también en estos tejidos fetales la incidencia de lesiones cromosómicas es elevada (5,7% en líquido amniótico y 6,8% en sangre fetal).

Tabla 74 Relación de frecuencias de lesiones cromosómicas en muestras de diferentes tejidos embrionarios.

Tejido	Nº	Nº	----lesiones---	
	muestras	metafases	Nº	%
Vellosidades coriales	244	3040	277	9,1
Líquido amniótico	55	507	29	5,7
Sangre fetal	17	146	10	6,8

Estos resultados coinciden con los publicados por Krawrzun y col (1991) en los que la frecuencia de expresión de LF espontáneos en amniocitos, vellosidades coriales y sangre fetal es similar (aunque inferior a la obtenida por nosotros ya que sus frecuencias son 1,9%, 2,2%, y 2,3% respectivamente).

Para ver si las semanas de gestación podían influir en este aumento de fragilidad se analizó este parámetro (Tabla 41), observando que no existe ninguna relación entre expresión espontánea de lesiones cromosómicas y edad gestacional. Sin embargo, en nuestro estudio en número de casos de semanas de gestación avanzada es escaso debido a que la semanas idóneas para la extracción de muestra son menores de la 20 semana, por lo que será necesario realizar más estudios para comprobar su efecto.

Un gran número de agentes que inducen la fragilidad cromosómica de las células en cultivo alteran la síntesis de DNA (retardándola o bloqueándola) o afectando los mecanismos de reparación (Laird y col, 1987). En el caso de la aparición espontánea de LF ésta podría darse en cualquier fase del ciclo celular. El hecho de que aproximadamente el 77% de las lesiones (78,2% en medio Chang y 76,4% en RPMI-1640) observadas en vellosidades coriales sea de tipo cromátide (Tabla 39) hace pensar que la mayor frecuencia de lesiones se producirán en fase S ó G₂. Una fase G₂ de corta duración en estas células, debido a que se dividen con rapidez, provocarían una condensación cromosómica incompleta que daría lugar a un elevado número de lesiones de cromátide (principalmente de tipo gaps, tal como hemos observado). Sin embargo, los estudios llevados a cabo por el equipo del Dr. Zahed en vellosidades coriales para determinar la duración de las diferentes fases del ciclo celular muestra resultados diferentes a los esperados ya que la duración de la fase G₂ es comparable a la de otros tejidos como sangre o fibroblastos (Zahed y col, 1988; Zahed, 1989).

4.5.2. Distribución de las lesiones cromosómicas en el cariotipo.

De las 270 lesiones cromosómicas observadas en nuestro estudio, se ha podido determinar la localización exacta en 101 (37%) gracias a la técnica secuencial uniforme-bandas G puesta a punto en este trabajo. (Pérez y col, 1990). El bajo rendimiento obtenido se debe a la propia calidad de los cromosomas de vellosidades coriales, y a que dicho estudio se realizó durante la etapa inmediata después de la obtención de bandas mediante esta técnica (hoy en día el rendimiento es mayor, próximo al 65%).

La localización cromosómica de las lesiones observadas (gaps y roturas) muestran una coincidencia del 76,2% (77/102) con bandas donde se sitúan los lugares frágiles (HGM 1, 1991). Estos resultados corroboran los obtenidos en linfocitos (Dai y col, 1986; Fuster, 1987; Hecht y col, 1988) y en espermatozoides (Benet, 1988; Estop y col, 1995), según las cuales las lesiones cromosómicas espontáneas no se distribuyen al azar en el cariotipo humano, sino que se localizan en bandas donde se han descrito LF (bandas LF). Al tener en cuenta la longitud relativa de las bandas e interbandas en el cariotipo y realizar un análisis estadístico para determinar cómo se distribuyen las lesiones cromosómicas observadas en vellosidades coriales hemos observado que estas preferentemente se localizan en bandas-LF ($p < 0,005$). Estos resultados sugieren que en vellosidades coriales las lesiones observadas corresponderían a una verdadera expresión espontánea de LF. Debido al corto tiempo de cultivo (24 h.) estos hallazgos podrían reflejar una situación que también se produciría "in vivo".

Un total de 48 lesiones identificadas (47,5%) se localizan en 8 bandas cromosómicas (Figura 30). De ellas la región más afectada ha sido la 1q12-q21.1 con 16 lesiones (15,8%). La zona implicada por la lesión abarca la heterocromatina constitutiva, que en este tejido presenta un elevado grado de descondensación, tal y como hemos indicado en el apartado 3.4, dificultando así la determinación exacta del punto implicado en la lesión, por ello se ha descrito como 1q12-q21.1.

El elevado número de lesiones localizadas en esta región (incluso en una metafase se observó la presencia del cromosoma con la deleción y el fragmento acéntrico correspondiente) parece que estaría relacionado precisamente con la descondensación de la heterocromatina ya que al estar ésta menos condensada podría ser también más sensible a las roturas. No obstante, otras regiones con descondensación de la heterocromatina, como el 9qh o 16qh, no están especialmente afectados por lesiones. Si bien las roturas afectan principalmente a la región 1qh también hemos detectado la presencia de lesiones en 9qh. Un estudio llevado a cabo por Mamuris y col, (1991) en individuos normales puso en evidencia la existencia de roturas espontáneas en 9q1 y observando que la frecuencia de lesiones aumentaba en los individuos que presentaban polimorfismo 9qh+.

En otros estudios realizados en nuestro laboratorio en cromosomas de espermatozoide no se observa una acumulación de gaps y roturas en estas regiones 1qh, 9qh y 16qh a pesar de que el grado de descondensación es muy superior al observado en vellosidades coriales (Benet y col, 1989; Martorell, 1995) lo que dificulta relacionar la descondensación de la heterocromatina con la expresión de fragilidad al menos en todos los tipos celulares.

La existencia de descondensación espontánea de la heterocromatina 1, 9, 16 acompañada de un incremento de lesiones en estas regiones (principalmente en los cromosomas 1 y 16) ha sido observado en linfocitos de pacientes con el Síndrome ICF (inmunodeficiencia, inestabilidad centromérica y anomalías faciales) (Haas, 1990; Brow y col, 1995; Sawyer y col, 1995). Así mismo, los estudios realizados utilizando distintos inductores de descondensación de la heterocromatina muestran un elevado número de lesiones en estas regiones, especialmente en 1qh y 16qh (Yu y col, 1992; Kokalj-Vokacy col, 1993). Nuestros resultados junto con los de estos autores sugieren que la propia descondensación de la heterocromatina podría ser la responsable de la fragilidad observada en estas regiones, al menos en determinados tejidos como linfocitos o vellosidades coriales.

Si bien la región 1q12-q21.1 es estable respecto a la aparición de reorganizaciones cromosómicas como traslocaciones e inversiones, en células cancerosas esta región (al igual que las zonas de heterocromatina 9qh y 16qh) presenta una alta frecuencia de roturas asociadas al desarrollo neoplásico en una gran variedad de tumores. Por ejemplo, el 67% de tumores de mama muestran reorganizaciones que afectan a las regiones 1qh y 16qh (Brito-Babapulle y Atkin, 1981; Dutrillaux y col, 1990; Kallioniemi y col, 1994). Alteraciones dentro o en las zonas inmediatamente adyacentes de las regiones de heterocromatina también se han observado de forma altamente significativa en desórdenes mielo y linfoproliferativo, melanomas malignos, tumores testiculares y encarcinoma de vejiga, bronquial y endometrial (Poddighe y col, 1992; Brito-Babapulle y Atkin, 1981; Fountain y col, 1990; Johansson y col, 1994; Shan y col, 1994). También se han descrito roturas en las regiones de heterocromatina 1qh y 9qh en líneas celulares de coriocarcinoma (Sheppard y col, 1985; Habibian y Surti, 1987). La implicación de la región 1q12-q21.1 en reorganizaciones cromosómicas en coriocarcinoma y otros tipos de roturas a la vez que el elevado porcentaje de lesiones cromosómicas observadas en nuestro estudio en vellosidades coriales, sugiere que esta región podría tener un papel importante en células con una elevada tasa de proliferación.

Por otra parte, estudios realizados en tejidos embrionarios por otros autores parecen evidenciar la importancia que podría tener esta región 1q12-q21.1 durante el desarrollo embrionario. Bartnitzke y col (1992) han observado la presencia de lesiones y deleciones en 1qh en células de líquido amniótico, mientras Caparossi y col (1995) analizando la frecuencia y el tipo de LF inducidos por afidicodina (un inductor de la fragilidad cromosómica)

en células embrionarias de diferentes orígenes (no incluyen vellosidades coriales) encuentran un aumento significativo del LF 1q21. Si se demuestra en el futuro que la expresión de un LF refleja una alteración en la actividad transcripcional de estas regiones, tal como han propuesto Simonic y Gericke (1996), este LF podría desempeñar un papel muy importante durante el desarrollo embrionario, ya que al menos en vellosidades coriales los genes próximos o en la región 1q12-q21.1 podrían activarse tal como propone Hulten y col (1995) como consecuencia de la descondensación de la heterocromatina.

Respecto a las otras regiones en las que también hemos observado acumulación de lesiones en vellosidades coriales se encuentran: 1q36, 1q44, 2q37, 3p24, 3q27, 16q22 y 16q23. Tres de ellas muestran una elevada incidencia de lesiones al utilizar medios inductores de fragilidad: 3q27 en vellosidades coriales el 16q23 en sangre fetal (Krawrzun y col, 1991); 3q27, 10q22 y 16q23 en diferentes tejidos embrionarios (Caparossi y col, 1995). El hecho de que se observen implicadas las bandas 3q27, 10q22 y 16q23 especialmente en tejidos embrionarios tanto al estudiar la fragilidad espontánea (nuestro trabajo) como mediante diferentes condiciones de inducción (Krawrzun y col, 1991; Caparossi y col, 1995) podría indicar que estas regiones también tendrían un papel activo en el desarrollo embrionario.

Por último, es interesante destacar que el FS 3p14 que es el lugar frágil más frecuentemente expresado en la población (presente en el 100% de los individuos en linfocitos) no lo hemos observado con una gran frecuencia en vellosidades coriales. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Krawrzun y col (1991).

4,6 Descondensación espontanea de la heterocromatina constitutiva en vellosidades coriales

A nivel citogenético se pueden diferenciar dos tipos de cromatina: la que descondensa durante la interfase y replica durante la fase S, y la **heterocromatina** que permanece condensada a través del ciclo celular, replicando en la fase S tardía. Además de diferir en los ciclos de condensación-descondensación durante el ciclo celular, se diferencian en la localización nuclear, la heterocromatina se encuentra en la periferia del núcleo y alrededor del nucléolo asociada a la lámina nuclear, matriz nuclear y al armazón de la cromatina ("scaffold"). Así mismo, la eucromatina posee la mayoría de genes (John, 1988).

Las diferencias entre ambos tipos de cromatina se debe a la existencia de una estructura topológica específica de estas regiones (Vogt, 1990; Dorer y Henikoff, 1994). Mientras la eucromatina está enriquecida de secuencias únicas de ADN, la heterocromatina consiste en secuencias de ADN moderadas y altamente repetitivas (Miklos y Cotsell, 1990; Vogt, 1990). Estas secuencias repetitivas podrían unirse a proteínas heterocromáticas específicas, como la proteína 1 (hp1), interviniendo así en la organización estructural de estas regiones de heterocromatina (Saunders y col, 1993; Kellum y col, 1995). También se ha sugerido que podrían intervenir en esta organización estructural isoformas específicas de histonas, como la histona H4 acetilada, que se distribuye de forma similar a la proteína HP1 (Turner y col, 1992).

Entre los "bloques" de heterocromatina (definidos por ser secuencias de ADN altamente repetitivo que pueden ser identificados bajo microscopio) encontramos: los centrómeros, la mayoría de regiones paracentroméricas y los telómeros. Las regiones centroméricas están formadas por ADN alfoide (compuesto por repeticiones de 170pb) y los telómeros por secuencias TTAGGG repetidas de 10000-15000 pb. Los mayores bloques de heterocromatina paracentromérica están situados en las zonas adyacentes de los centrómeros de los cromosomas 1, 9, 16 y en el extremo de los brazos largos del cromosoma Y; estas regiones están constituidas por el denominado ADN satélite "clásico" (Vogt, 1990).

Por el momento, se desconoce la función de la heterocromatina en organismos superiores, sugiriéndose un papel importante en los procesos de: segregación normal de los cromosomas, inhibición de la replicación, organización de la cromatina en el núcleo y regulación génica (Irrick, 1994; Zuckerkandl y Hennig, 1995).

La descondensación de las regiones de heterocromatina puede ser **inducida** por la presencia de ligandos específicos AT (no intercaladores) como Hoechst 33258, Distamicina A, DAPI, y el Berenil (Hilwig y Gropp, 1973; Prantero y col, 1981; Schmid y col, 1984; Haaf y

col, 1989). Sin embargo, la adición de análogos de la citosina 5-azacitidina y 5-azadeoxicitidina induce la descondensación específica de la heterocromatina constitutiva de los cromosomas 1, 9, 15, 16 e Y (Schmid y col, 1983).

La descondensación **espontanea** de la heterocromatina de las zonas 1qh, 9qh, 16qh e Yqh, ha sido descrita en metafases de espermatogonias, en espermatocitos primarios y secundarios (Hulten y col, 1986; Armstrong y col, 1994), y en cromosomas de espermatozoides (Rudak y col, 1978, Martin, 1983, Brandriffy col, 1984; Navarro y col, 1987, Martorell, 1995). Recientemente, ha sido publicado la presencia espontanea de la descondensación de estas regiones en cultivos de linfocitos de pacientes con el Síndrome ICF (este síndrome extraordinariamente raro se caracteriza por inmunodeficiencias, inestabilidad centromérica y anomalías faciales (Jeanpierre y col, 1993; Smeets y col, 1994). Dicha descondensación se observa sólo de forma ocasional en cultivos de linfocitos de individuos normales (Ferguson-Smith y col, 1962). También se ha descrito la presencia de la descondensación espontanea de las zonas 1qh y 16qh en células linfoblásticas (Almeida y col, 1993). Por último, en nuestro estudio hemos detectado la presencia de descondensación espontanea de la heterocromatina en las zonas 1qh, 9qh, 16qh e Yqh en vellosidades coriales (Pérez y col, 1991).

La descondensación espontanea de la heterocromatina de las constricciones secundarias de los cromosomas 1, 9, 16 y de a parte distal del brazo largo del cromosoma Y observada en nuestro estudio presenta un grado muy variable d descondensación, tanto intraindividual (en una misma muestra) como sobre todo entre las diferentes muestras estudiadas. Dicha variabilidad ha sido también observada en nuestro laboratorio en la descondensación de la heterocromatina de cromosomas de espermatozoide (Navarro y col, 1987; Martorell, 1995).

La frecuencia de descondensación espontánea de las distintas regiones d heterocromatina constitutiva observada e vellosidades coriales varia según las muestras analizadas, siendo la más frecuente la 9qh (42,4% de las muestras) seguida de la 1qh (22,2%). (Tabla 42). También hay que señalar que mientras en cromosomas de espermatozoide es habitual observar en casi todas las metafases descondensación de 1qh, 9qh, 16qh e Yqh, en vellosidades coriales, en el caso de observarse descondensación, ésta afecta predominantemente a una sola región, siendo la más frecuentemente expresada la 9qh (9% de las metafases) seguida de 1qh (5,4%) (Tabla 43),

4.6.1. Posible influencia de las condiciones de cultivo en la descondensación espontánea de la heterocromatina constitutiva en vellosidades coriales.

La descondensación espontánea de la heterocromatina constitutiva observada en nuestro estudio podría deberse a las características intrínsecas de este tipo de tejido embrionario o al procesado de la muestra. Con el fin de averiguar si alguno de los factores implicado en las condiciones de cultivo podría influir en dicha descondensación, hemos analizado distintos parámetros.

En el caso de la utilización de distintos medios de cultivo (Chang, RPMI-1640 y F-1) o hemos observado diferencias en la frecuencia de descondensación espontánea de la heterocromatina (Tabla 44).

Otra de las causas que podían afectar a la descondensación de la heterocromatina en vellosidades coriales podría ser el corto periodo de cultivo (24 horas). Este tiempo de cultivo es similar al utilizado en cromosomas de espermatozoides, observando en este último caso que la frecuencia de descondensación era mucho más evidente que en vellosidades coriales. Además, no encontramos diferencias en las frecuencias y grado de descondensación de estas regiones entre cultivos de vellosidades coriales de 24 y 48 horas; lo que parece descartar este factor como activador de la descondensación.

La larga exposición a Colcemid en nuestro método (50 minutos) también debe descartarse como causa de la descondensación, ya que células de tumores sólidos, analizadas en nuestro laboratorio, expuestas durante largo tiempo (5-12 horas) a Colcemid, no presentan dicha descondensación (Berrozpe y col, 1991).

Otra posible explicación de la descondensación de la heterocromatina podría ser el tratamiento de las vellosidades coriales con ácido acético al 60% para realizar las extensiones cromosómicas. De hecho se observa descondensación cuando se utiliza este procedimiento (método directo) para obtener cromosomas de colonias de pólipos adenomatosos. Sin embargo, es sorprendente que en cromosomas de espermatozoide, donde se observa el mayor grado de descondensación de la heterocromatina, las concentraciones de ácido acético utilizadas son mucho más bajas (25%) y el método de fijación empleado para obtener cromosomas de espermatozoide es el mismo que el usado para otro tipo de preparaciones citogenéticas (Carnoy; metanol: ácido acético, 3:1) por lo que parece evidente que tampoco la elevada concentración de ácido acético, sería la responsable de la aparición de la descondensación de la heterocromatina.

4.6.2 Posible influencia de la edad gestacional o de la duración de la fase G₂ en la descondensación espontánea de la heterocromatina en vellosidades coriales.

El porcentaje de casos con descondensación de la heterocromatina incrementa significativamente con la **edad gestacional** ($p < 0,05$) (Tabla 45). Estos resultados podrían indicar la existencia de una inmadurez citoplasmática que podría originar descondensación cromosómica, así como condensación prematura de centrómeros. Esta última anomalía ha sido observada en cigotos humanos después de la fertilización "in vitro" (Schmiady y col, 1986) o después de la fertilización de ovocitos inmaduros de ratón (Badenas y col, 1989). También podría ser un simple reflejo del papel de la heterocromatina durante estas primeras etapas del desarrollo que sería más intenso a partir de las 15-20 semanas.

Otra posible causa que podría explicar dicha descondensación es si en vellosidades coriales la fase G₂ del ciclo celular fuera más corta que en otros tejidos, lo que favorecería un pobre empaquetamiento de la cromatina que podría mantenerse durante la mitosis. Si embargo, esta hipótesis también ha tenido que ser descartada ya que los estudios realizados por el equipo de Zahed, tal y como hemos indicado anteriormente, ponen de manifiesto que la fase G₂ en vellosidades coriales es comparable a la de otros tejidos como sangre periférica o fibroblastos (Zahed y col, 1988; Zahed, 1989).

4.6.3 Posible papel de la heterocromatina descondensada en vellosidades coriales

La descondensación espontánea de la heterocromatina observada en los diferentes tipos celulares difiere en la frecuencia de expresión y en el tipo de región afectada.

La descondensación espontánea de la heterocromatina en cromosomas de espermatozoide afecta a las regiones 1qh, 9qh, 16qh e Yqh más o menos con igual frecuencia, expresándose en casi el 100% de las metafases (Benet, 1988; Martorell, 1995). En cultivo de linfocitos de pacientes con el Síndrome ICF la descondensación más frecuente afecta a las regiones 1qh y 16qh, y en menor grado a la 9qh, siendo el porcentaje de metafases que presentan descondensación de cualquiera de estas regiones de aproximadamente el 30% (Haas, 1990; Brown, 1995; Sawyer, 1995). En vellosidades coriales, la frecuencia de aparición de heterocromatina descondensada que hemos observado es mucho menor (del 5-9% de las metafases analizadas) y la región más frecuente es la 9qh seguida de 1qh. Todos estos resultados podrían indicar que la estructura de la heterocromatina de estas zonas no es la misma, lo que a su vez podría estar relacionado con algún tipo de función probablemente distinta según los diferentes casos.

Para averiguar si esta descondensación afecta a otros tejidos embrionarios, hemos analizado la frecuencia de aparición de la descondensación espontánea de estas regiones en 55 muestras de líquido amniótico (802 metafases) y 20 muestras de sangre fetal (176 metafases) y las hemos comparado con los 339 casos de vellosidades coriales (5820 metafases) (Pérez y col, 1991). Los resultados se muestran en la Tabla 75. Las regiones más frecuentemente afectadas en amniocitos han sido la 9qh seguida de la 1qh (al igual que lo observado en vellosidades coriales). Estos datos parecen indicar que la función de la heterocromatina constitutiva podría ser distinta en los diferentes tejidos embrionarios: vellosidades coriales, amniocitos, linfocitos.”

Tabla 75. Estudio de la incidencia de descondensación espontánea de la heterocromatina constitutiva en tejidos fetales,

Tipo de tejido	n	%
Vellosidades coriales	339	46,6
Líquido amniótico	55	9,1
Sangre fetal	20	0,0

Los estudios llevados a cabo por Akopian y col (1992) han puesto de manifiesto que la región de heterocromatina de los cromosomas 1, 9 e Y es estadísticamente más corta en linfocitos de embriones humanos (6-8 semanas) que de recién nacidos, o que estaría de acuerdo con los resultados que hemos obtenido, al no observar en ningún caso descondensación de la heterocromatina en este tejido embrionario.

Recientemente, la utilización de enzimas exonucleasas ha puesto de manifiesto que las regiones de la heterocromatina del 1qh, 16qh, Yqh y sobre todo la 9qh, resulta más afectada en células de líquido amniótico que en linfocitos de recién nacidos o adultos (Fernández y col, 1995). Según estos autores, esta distinta sensibilidad a la digestión con exonucleasas podría ser explicada gracias a la existencia de una distinta organización de la cromatina de esta región debida a asociaciones con proteínas específicas. Así, en linfocitos, estas proteínas estabilizarían la estructura haciéndola más compacta, mientras que la ausencia de estas proteínas o la presencia de otras provocaría el efecto opuesto. Esta misma explicación podríamos aplicarla a vellosidades coriales.

En nuestro estudio hemos encontrado que las regiones con mayor frecuencia de descondensación espontánea han sido la 9qh y 1qh, tanto en vellosidades coriales como en amniocitos, coincidiendo con los resultados obtenidos en células de líquido amniótico mediante digestión con exonucleasas llevados a cabo por el equipo de Fernández y col

(1995). Ambos estudios apoyan los trabajos previamente publicados por Podugolnikova y Blumina (1983) en los que se sugiere que la extensión de las secuencias altamente repetitivas de los cromosomas 1 y 9 podrían influir en el desarrollo embrionario temprano.

Los primeros trabajos realizados mediante 5-azacitidina (5-aza), un inhibidor de la condensación de la heterocromatina constitutiva, pusieron de manifiesto que las regiones de heterocromatina contienen ADN altamente metilado (Miller y col, 1974; Schnedl y col, 1975) que por acción de la 5-aza pasa a ser hipometilada (Mohandas y col, 1981; Santi y col, 1983). La asociación entre la descondensación de la heterocromatina y la desmetilación ha sido confirmada en una gran variedad de tejidos: e cultivo de linfocitos de individuos normales (Schmid y col, 1984), en cultivo de linfocitos de pacientes con el Síndrome ICF (Smeets y col, 1994), en líneas linfoblásticas (Almeida y col, 1993), en células de las distintas fases de la espermatogénesis (Mitchell, 1992), en espermatozoides (Chernos y col, 1986; Martorell, 1996) y en tejido placentario (Schmid y col, 1984; Craig y Bickmore, 1994). Es decir, que las secuencias de ADN de estas regiones en tejido extraembrionario y en la línea germinal están substancialmente hipometiladas, en contraste con el alto grado de metilación observado en tejidos somáticos de individuos adultos.

Los estudios mediante digestión con metilasas realizados por Jeanpierre y col. (1993) confirman los resultados obtenidos con 5-aza, ya que las regiones de heterocromatina constitutiva descondensada en vellosidades coriales, placenta y testículo (de individuos adultos) están claramente hipometiladas.

Los experimentos con 5-aza han contribuido a poner en evidencia que la metilación del ADN desempeña un papel importante en la inhibición de la actividad génica (Jones y Taylor, 1980; Jones, 1984). El mecanismo exacto aún se desconoce; probablemente los grupos metilo actúan evitando la unión de factores de transcripción (Buschhausen y col, 1987; Becker y col, 1987), interfiriendo la función de la cromatina activa (Keshet y col, 1986) o atrayendo proteínas específicas que al unirse al ADN provoquen la represión de la transcripción (Meehan y col, 1989).

Los genes específicos de tejidos están hipometilados en sus respectivos tipos celulares, mientras que en otras células están claramente metilados (Bird, 1986), mientras los genes domésticos ("housekeeping") parecen estar constitutivamente hipometilados en el organismo (Yeivin y Razin, 1993).

Se sabe que la metilación del ADN sufre cambios durante la embriogénesis (revisado por Brandéis y col, 1993). El genoma está altamente hipometilado en estadios de preimplantación (Monk y col, 1987; Howlett y Reik, 1991). Los modelos de metilación del genoma adulto se establecen después de la implantación del embrión y va acompañado de

una ola de metilaciones que se producen justo antes de la gastrulación, si bien algunas metilaciones se producen más tarde (revisión Brandéis y col, 1993). El papel tan importante que juega la metilación en este proceso viene avalado por la observación en ratones con una mutación para el gen de la ADN-metiltransferasa que queda inactivo provocando un proceso embriológico anómalo que resulta letal (Li y col, 1992).

Se ha sugerido que la heterocromatina (definida citológicamente) y la cromatina silenciada, genéticamente inactiva (definida funcionalmente), serían las dos caras de una misma moneda (Loo y Rine 1995).

Desde hace años, se sabe que se puede producir una inhibición de la actividad de genes situados en la eucromatina cuando pasan a estar adyacentes a la heterocromatina debido, por ejemplo, a la existencia de una reorganización cromosómica. Este fenómeno se conoce como efecto de posición (position-effect-varieization: PEV) (Karpen, 1994; Zuckerkande y Hennig, 1995). Este proceso observado inicialmente en *Drosófila* se desconoce si también tiene lugar en la especie humana.

Recientemente, Hulten y col (1995) han propuesto un mecanismo de expresión de regulación génica en humanos similar al efecto PEV. Esta hipótesis se basa en dos hallazgos distintos en los que la descondensación de la heterocromatina específica de tejido puede estar implicada en la regulación de la transcripción de genes localizados en la eucromatina adyacente. Una de estas observaciones es la presencia de descondensación de la heterocromatina asociada a una patología en pacientes con Síndrome ICF. La segunda observación es la presencia de una descondensación diferencial de los bloques de la heterocromatina Yqh en espermatogénesis. En el primer caso, la descondensación de la heterocromatina provoca que genes implicados en la respuesta inmune (como el gen zeta, ubicado en 1q23.1) queden afectados en su expresión, en el segundo caso se cree que la descondensación Yqh está implicada en la activación selectiva de genes, ubicados en la eucromatina adyacente, implicados en el proceso de espermatogénesis.

Los procesos durante el desarrollo embrionario temprano han sido relacionados desde hace tiempo con las regiones de la heterocromatina. Así, Vogt (1990) propuso que estas regiones descondensadas podrían ser génicamente activas en estas primeras etapas del desarrollo. el modelo propuesto por Hulten y col (1995) intenta explicar cómo la heterocromatina podría regular el desarrollo embrionario: La descondensación estaría asociada a la activación de genes específicos mientras la condensación se relacionaría con la inactivación de los mismos.

El hecho de que en nuestro estudio observemos descondensación espontánea de la heterocromatina constitutiva en vellosidades coriales sugiere que probablemente

desempeñen algún tipo de regulación génica, activando genes específicos en este tejido (aún por descubrir) ubicados en la eucromatina adyacente. Sin embargo, será necesario realizar más investigaciones para averiguar si el comportamiento diferencial de la heterocromatina constitutiva que hemos observado es específico de vellosidades coriales o si representa un proceso en la diferenciación de tejidos durante el desarrollo embrionario.