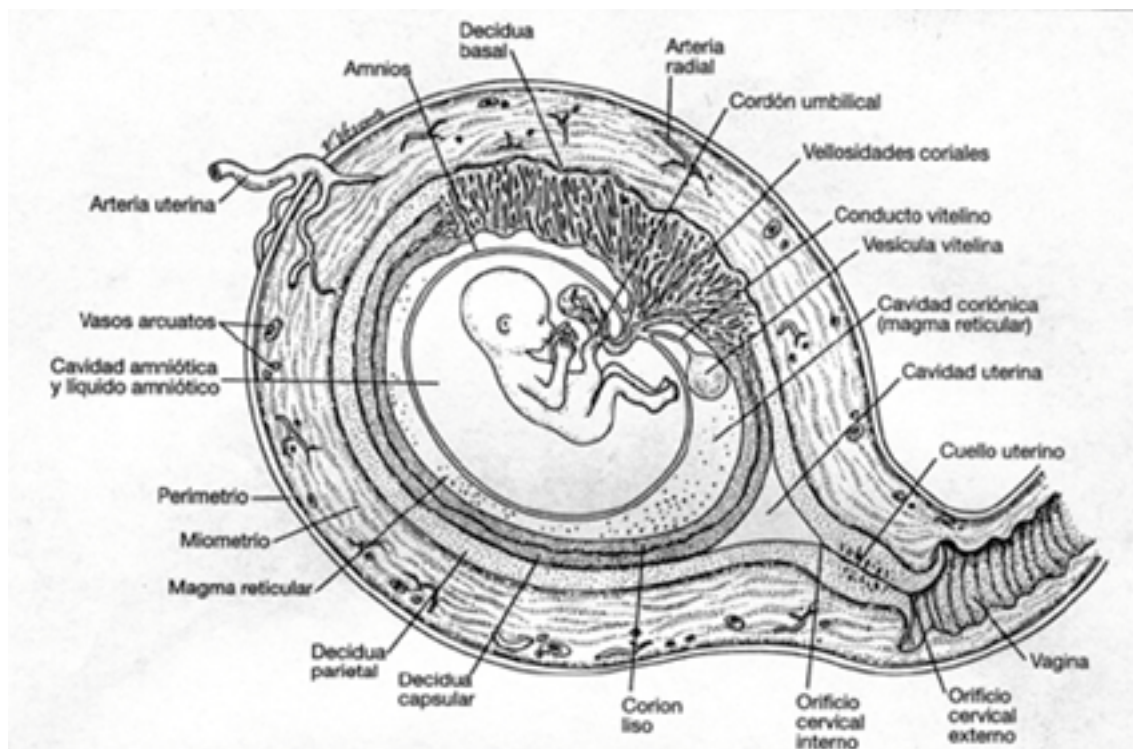


ANOMALIES CROMOSÒMIQUES EN AVORTAMENTS ESPONTANIS DE PRIMER TRIMESTRE



Isabel Ribas i Seix

**ANOMALIES CROMOSÒMIQUES EN AVORTAMENTS
ESPONTANIS DE PRIMER TRIMESTRE.**

Memòria presentada per Isabel Ribas Seix per aspirar al grau de
Doctor en Ciències (Secció Biologia) per la Universitat Autònoma de
Barcelona

Bellaterra, Gener del 2002

El Dr. Josep Egozcue, Catedràtic de Biologia Cel.lular, del Departament de Biologia Cel.lular, Fisiologia i Immunologia, Unitat de Biologia Cel.lular, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICA:

Que Isabel Ribas i Seix ha realitzat, sota la seva direcció, el treball “Anomalies cromosòmiques en avortaments espontanis de primer trimestre” per a l’obtenció del títol de Doctor en Ciències (Secció Biologia).

Aquest treball ha estat realitzat al Centro de Patología Celular y Diagnóstico Prenatal.

Bellaterra, Gener del 2002

Dr.Josep Egozcue

Isabel Ribas

Mamà, per què treballes tant?

Agraïments:

- al Dr.Carrera, qui primer em va donar la idea d'aquesta Tesi i els ànims.
- al Dr.Egozcue, per voler dirigir-me-la, per tot el que he après en aquest darrer any.
- a la gent de citogenètica del C.P.C., que han patit aquesta Tesi quasi tant com jo mateixa: Begoña Méndez, Rosa Ferreti, M.Mar Punzón, Mònica Morán, Montse Suárez, Mireia Rodríguez, Laura Guerrero, Marta Fargas, Rocío Jiménez, Susana Martín, i d'altres...
- a la gent d'ecografia obstètrica i diagnòstic prenatal de l'Institut Dexeus, amb qui hem col.laborat estretament: Margarita Torrents, Anna Muñoz, Mina Comas, Roque Devesa, Elisabeth Miras.
- a l'Eva Salas, bibliotecària de l'Institut Dexeus, per a la seva búsqueda implacable de bibliografia, a vegades quasi sense dades.
- al Centro de Patología Celular y Diagnóstico Prenatal, que m'ha permès l'accés a les dades.
- als companys de professió, amics i coneguts que sempre m'han empès, a pesar dels moments de desànim.

ANOMALIES CROMOSÒMIQUES EN AVORTAMENTS ESPONTANIS DE PRIMER TRIMESTRE.

Index

	<u>pàg.</u>
1. Introducció.....	1
1.1.- Avortaments espontanis.....	3
1.1.1.- definició i incidència.....	3
1.1.2.- etiologia.....	4
1.1.2.1.- anomalies cromosòmiques de novo.....	5
1.1.2.2.- progenitors portadors d'una anomalia cromosòmica.....	6
1.1.2.3.- anomalies cromosòmiques en gàmetes de parelles infèrtils i estèrils amb cariotip normal.....	10
1.1.2.3.1.- oòcits.....	10
1.1.2.3.2.- espermatozoides.....	11
1.1.2.4.- anomalies anatòmiques uterines.....	13
1.1.2.5.- factors endocrins.....	13
1.1.2.6.- infeccions.....	14
1.1.2.7.- factors immunològics.....	15
1.1.2.8.- altres factors.....	17
1.2.- Anomalies cromosòmiques embrio-fetals.....	18
1.2.1.- incidència.....	18
1.2.2.- revisió històrica.....	21

1.2.3.- tipus d'anomalies cromosòmiques.....	22
1.2.3.1.- trisomies.....	24
1.2.3.2.- poliploidies.....	33
1.2.3.3.- monosomies.....	36
1.2.3.4.- anomalies estructurals.....	37
1.2.3.5.- mosaics.....	38
1.2.4.- anomalies cromosòmiques en el primer trimestre de la gestació.....	41
1.2.4.1.- incidència.....	41
1.2.4.2.- dificultats per al seu estudi.....	41
1.2.4.2.1.- contaminació materna.....	42
1.2.4.2.2.- contaminació fúngica o bacteriana.....	42
1.2.4.2.3.- no creixement.....	42
1.3.- L'estudi citogenètic de les vellositats coriòniques	43
1.3.1.- resum històric.....	43
1.3.2.- fiabilitat de la tècnica.....	43
1.3.3.- origen i desenvolupament embriològic de les vellositats coriòniques.....	47
1.4.- Estudi citogenètic de l'avortament espontani per aplicació del mètode semidirecte i el cultiu en les vellositats coriòniques obtingudes per biòpsia corial.....	51
1.4.1.- anàlisi citogenètic dels avortaments espontanis a partir de vellositats coriòniques.....	51
1.4.2.- aplicació del mètode semidirecte a l'estudi citogenètic dels avortaments espontanis.....	51

2. Objectius.....	53
3. Material i mètodes.....	57
3.1.- Origen i característiques de les mostres.....	59
3.1.1.- procedència de les mostres.....	59
3.1.2.- obtenció de les mostres.....	59
3.1.2.1.- via d'accés.....	59
3.1.2.2.- nombre d'intents.....	61
3.1.3.- datació de la gestació.....	62
3.1.3.1.- càlcul de les setmanes de gestació.....	62
3.1.3.1.1.- embrió.....	63
3.1.3.1.2.- altres elements en la morfologia de l'embrió.....	64
3.1.3.1.3.- altres estructures embrionàries.....	64
3.1.3.2.- edat gestacional de les mostres biopsiades.....	67
3.1.4.- indicacions per a l'estudi citogenètic.....	68
3.1.5.- edat materna.....	71
3.2.- Selecció de les mostres.....	72
3.3.- Mètode semidirecte.....	73
3.3.1.- incubació.....	73
3.3.2.- processament.....	74
3.3.3.- bandeig.....	75
3.3.4.- anàlisi microscòpica.....	75

3.4.- Cultiu llarg.....	76
3.4.1.- disgregació enzimàtica.....	76
3.4.2.- cultiu.....	77
3.4.3.- processament.....	77
3.4.4.- bandeig.....	78
3.4.5.- anàlisi microscòpica.....	78
3.5.- Informe citogenètic.....	78
4. Resultats.....	81
4.1.- Resultats de la tècnica d'obtenció de les mostres.....	83
4.2.- Resultats de la tècnica citogenètica.....	83
4.2.1.- èxit de la tècnica citogenètica.....	83
4.2.2.- mètode semidirecte.....	84
4.2.3.- cultiu llarg.....	85
4.3.- Anàlisi dels resultats citogenètics.....	85
4.3.1.- cariotips normals.....	86
4.3.2.- cariotips patològics.....	86
4.3.2.1.- monosomia X.....	87
4.3.2.2.- monosomia autosòmica.....	88
4.3.2.3.- trisomies.....	88
4.3.2.4.- poliploidies.....	90
4.3.2.5.- anomalies estructurals	90
4.3.3.- mosaics.....	92
4.3.4.- contaminació materna.....	93
4.3.5.- discrepàncies del mètode semidirecte vs.cultiu llarg.....	95

4.4.- Edat materna.....	96
4.5.- Indicacions diagnòstiques per a l'estudi citogenètic de l'embrió.....	99
4.6.- Raó sexual.....	103
ANNEX I: Quadre de resultats per setmanes de gestació.....	105
ANNEX II: Quadre de resultats per patologies.....	109
ANNEX III: Cariotips amb anomalies de tipus estructural trobats.....	111
5. Discussió.....	117
5.1.- Representativitat de la població en estudi.....	119
5.1.1.- obtenció de les mostres.....	119
5.1.2.- edat materna.....	121
5.1.3.- edat gestacional.....	122
5.2.- Resultat de la tècnica citogenètica.....	124
5.2.1.- èxit de la tècnica citogenètica.....	124
5.2.2.- resultats del mètode semidirecte.....	126
5.2.3.- resultats del cultiu llarg.....	127
5.2.4.- contaminacions bacterianes i fúngiques.....	129
5.3.- Anàlisi dels resultats citogenètics.....	131
5.3.1.- incidència d'anomalies cromosòmiques.....	131
5.3.2.- tipus d'anomalies cromosòmiques.....	132
5.3.2.1.- trisomies.....	133
5.3.2.2.- monosomia X.....	137
5.3.2.3.- monosomia 21.....	139
5.3.2.4.- poliploidies.....	140

5.3.2.5.- anomalies estructurals.....	143
5.3.2.6.- mosaics.....	146
5.3.3.- indicacions per a l'estudi citogenètic.....	148
5.3.3.1.- infertilitat primària.....	148
5.3.3.2.- infertilitat secundària.....	149
5.3.3.3.- reproducció assistida.....	150
5.3.3.4.- gestacions anembrionades.....	152
5.3.3.5.- alerta ecogràfica.....	152
5.3.3.6.- pares portadors d'anomalies cromosòmiques.....	154
5.3.3.7.- anomalia cromosòmica en gestació anterior.....	155
5.3.4.- discrepàncies.....	155
5.3.4.1.- contaminació materna.....	156
5.3.4.2.- discrepàncies entre el mètode semidirecte i el cultiu llarg.....	159
5.3.4.3.- mosaicisme confinat a placenta.....	160
5.3.5.- raó sexual.....	162
6. Conclusions.....	165
7. Bibliografia.....	173

1.- INTRODUCCIÓ

1.1.- Avortaments espontanis

1.1.1.- definició i incidència

Per avortament espontani s'entén la interrupció de la gestació abans que el fetus sigui viable. Aquest concepte de viabilitat és relatiu i amb el temps s'ha anat modificant. Els avenços en neonatologia portaren a l'Organització Mundial de la Salut, el 1976, a definir *avortament* com l'expulsió o extracció d'un embrió o fetus quan pesa menys de 500 g., el que correspon a les 20-22 setmanes de gestació.

Els avortaments espontanis poden ser precoços (fins a la setmana 12 incluída) o tardans (de la setmana 13 a la 22), i també poden ser classificats en primaris (quan no ha existit abans en la parella cap gestació a terme) o secundaris (quan abans de l'avortament la parella ha tingut alguna gestació a terme).

Per últim, per *avortaments de repetició*, la *Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia* entén dos o més avortaments consecutius o més de dos avortaments no consecutius (Parrilla 1997).

En l'espècie humana, aquest fet és molt freqüent i afecta al 65% de les gestacions (Egozcue 1997; Santaló et al. 1987). Així doncs, podem parlar de *fecundabilitat* com la possibilitat que una dona pugui donar lloc a un descendent viable per cicle menstrual i aquesta taxa en l'espècie humana és entre 25-30% (Edmonds et al. 1982; Jacobs 1990; Hill 1994).

De totes les concepcions, un 25% es perdrien abans de la implantació, un 30% en el període post-implantatori i abans del reconeixement clínic de la gestació, almenys un 15% en avortaments espontanis entre les setmanes 6 i 28 de gestació, i finalment vora un 1% serien recent nascuts morts en les darreres setmanes de gestació (Jacobs 1990).

1.1.2.- etiologia

Els avortaments espontanis representen un mecanisme de selecció natural, que elimina la majoria de les concepcions anòmales. Tot i que s'han descrit diversos factors etiològics, en el 50-60% dels casos se'n desconeix l'origen (Hill 1994; Sargent 1995).

Dins dels principals factors que s'han associat a avortaments espontanis hi ha les anomalies cromosòmiques embrionàries, ja siguin de novo o degudes a l'herència d'una anomalia cromosòmica ja present en els progenitors (de forma constitucional o en gàmetes, i equilibrada o desequilibrada); les anomalies anatòmiques uterines; els factors endocrins; les infeccions maternes; els factors immunològics; i d'altres més discutides, com poden ser els factors ambientals, les drogues, els anticonceptius, el tabac, la ingesta de cafeïna, l'estrès o bé factors relacionats amb la situació afectiva de la dona.

1.1.2.1.- anomalies cromosòmiques *de novo*

Una anomalia cromosòmica *de novo* és quan apareix una cromosomopatia en la descendència sense que cap dels dos progenitors en sigui portador. La presència d'una anomalia cromosòmica *de novo* en un embrió corresponent a un avortament espontani és el factor etiològic més freqüent, ja que en el primer trimestre pot arribar al 70% de les concepcions (Edwards 1986).

Els estudis cromosòmics en els avortaments espontanis de primer trimestre rarament es realitzen des del primer avortament de la parella, i tot just comencen a aparèixer als protocols recomanats en el cas d'una parella amb avortaments de repetició (Font et al. 2001). La cromosomopatia *de novo* pot produir-se en la gametogènesi, en la fertilització o en l'embriogènesi.

Per assegurar que una anomalia cromosòmica és realment *de novo* no n'hi ha prou amb un cariotip en sang perifèrica d'ambdós pares, ja que cal tenir en compte els mosaics en cèl.lules germinals, que farien que la persona portadora d'aquest mosaic germinal pogués transmetre de nou la mateixa anomalia cromosòmica a la seva descendència.

Per altra banda, en alguns casos molt concrets de translocacions recíproques *de novo* en que s'ha estudiat el cariotip en espermatozoides del pare, s'ha pogut determinar que no hi havia mosaic germinal però en canvi s'ha trobat un major nombre de fragilitats o reordenaments que afecten a un dels cromosomes implicats i que fan que aquesta persona en concret tingui un

major risc de tenir novament descendència amb anomalies estructurals en aquest cromosoma afectat, si bé no tenen perquè ser iguals a l'avortament anterior (Colls et al. 1998).

1.1.2.2.- progenitors portadors d'una anomalia cromosòmica

Els estudis citogenètics en cèl.lules somàtiques de parelles amb avortaments (generalment a partir d'un cultiu de limfòcits per estimulació amb fitohemaglutinina) donen com a resultat que un dels dos membres de la parella és portador d'una anomalia cromosòmica en un 3-7% dels casos, índex significativament superior al de la població general (0.5-1%) (Bourrouillou et al. 1986; Lippman Hand i Vekemans 1983; Portnoi et al. 1988; Tuerlings et al. 1998).

Aquests valors poden diferir bastant si se separen les parelles amb avortaments segons la infertilitat sigui primària o secundària: si han tingut algun fill sa, la taxa de parelles amb una anomalia cromosòmica es situa al 2.4%, però si només han tingut avortaments puja fins al 5.27% (Bourrouillou et al. 1986).

Les anomalies cromosòmiques poden ser tant numèriques com estructurals, i també poden presentar-se en mosaic. Les estructurals més freqüents són les translocacions recíproques (50% del total d'anomalies cromosòmiques) i les translocacions robertsonianes o fusions centrals (24%).

En el grup d'anomalies de tipus numèric, les més freqüents són les alteracions en el nombre de cromosomes X, presentant-se sobretot en mosaic i en les dones (Carrera et al. 2000).

Els individus portadors de reorganitzacions estructurals equilibrades són fenotípicament normals però presenten un risc elevat d'avortaments espontanis o de descendència amb defectes congènits, ja que durant la seva meiosi es pot produir una segregació anòmala dels cromosomes implicats en la reorganització, donant lloc a gàmetes amb duplicacions i/o deficiències que poden provocar desequilibris gènics en l'embrió o fetus.

En estudis realitzats en espermatozoides d'individus portadors d'una translocació robertsoniana s'ha trobat un 15% d'espermatozoides desequilibrats (contra el 66% teòric estimat), mentre que en portadors de translocacions recíproques la taxa d'espermatozoides desequilibrats observats presenta un rang de 20-77% (risc teòric 50%). Finalment, portadors d'inversions, pericèntriques o paracèntriques, tenen un 0% d'espermatozoides desequilibrats si el segment invertit és petit i un 25-30% si és llarg (Egozcue et al. 2000).

En la figura 1.1, pàgina 8, es poden veure les diferents possibilitats de segregació a partir de l'aparellament meiòtic de les dues parelles de cromosomes implicades en una translocació recíproca equilibrada en un progenitor. Només la segregació alterna donarà lloc a descendents

fenotípicament normals, mentre que les adjacents 1 i 2 poden donar lloc a esterilitat, avortaments espontanis o fetus amb defectes congènits.

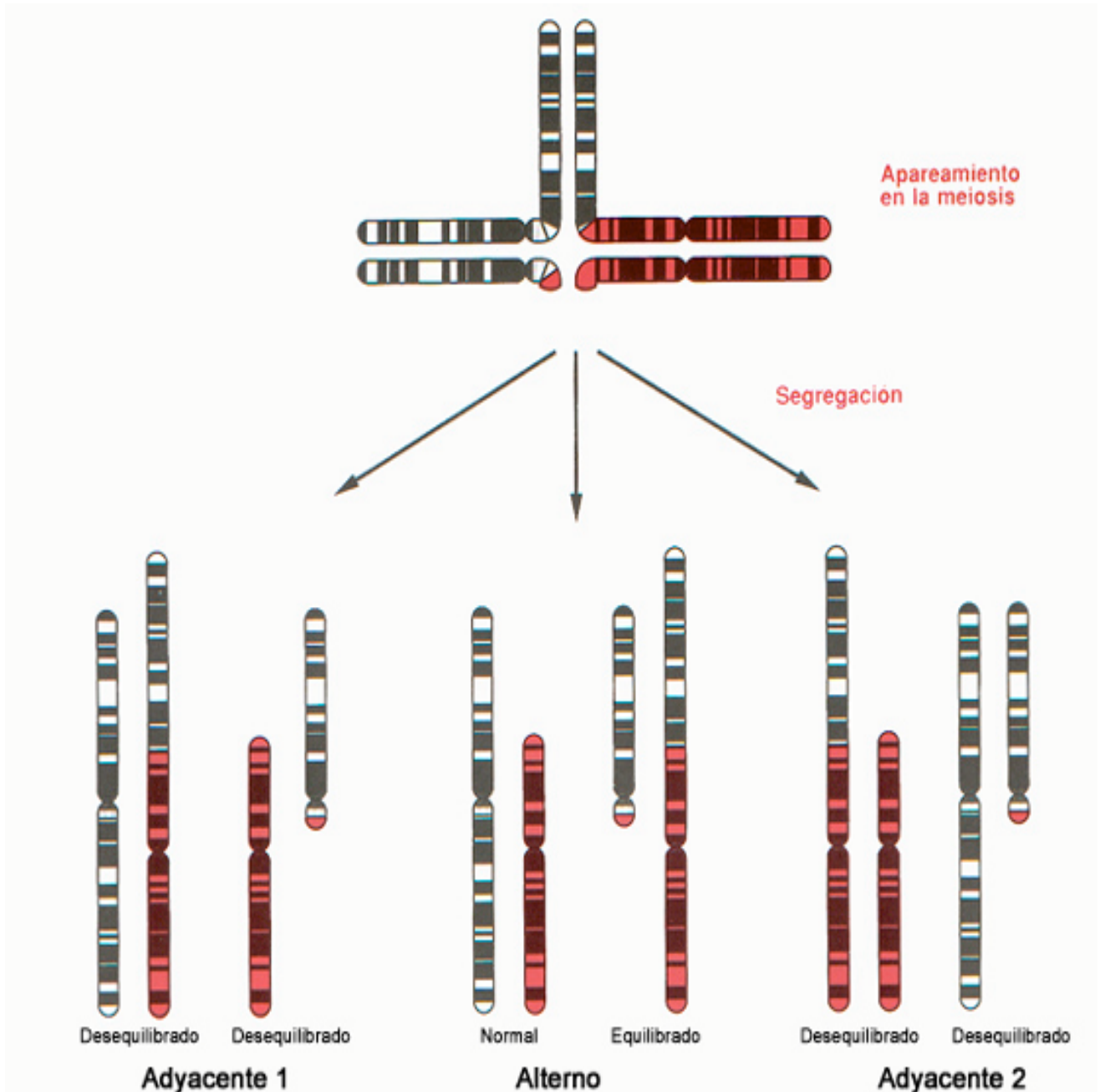


Fig. 1.1.- esquema de les segregacions meiótiques que es produeixen en un portador d'una translocació recíproca equilibrada.

De manera semblant, la figura 1.2 mostra la formació de gàmetes en un portador d'una translocació robertsoniana o fusió cèntrica. A partir de la cèl.lula germinal parental, es poden produir tres tipus de productes. En la forma A es produeixen dos gàmetes equilibrats, ja sigui el normal o el translocat. En les formes B i C, per contra, els gàmetes seran desequilibrats ja que presentaran trisomia o monosomia per un o altre dels dos cromosomes acrocèntrics implicats.

Finalment, també hi ha pacients amb anomalies sinàptiques, no detectables en el cariotip, que donen lloc a una taxa d'errors meiòtics del 6%, que s'eleva al 17.5% en pacients amb oligoastenozoospermia severa (Egozcue et al. 2000). Aquesta situació pot produir anomalies en els espermatozoides, per exemple en forma de gàmetes diploides i aneuploides.

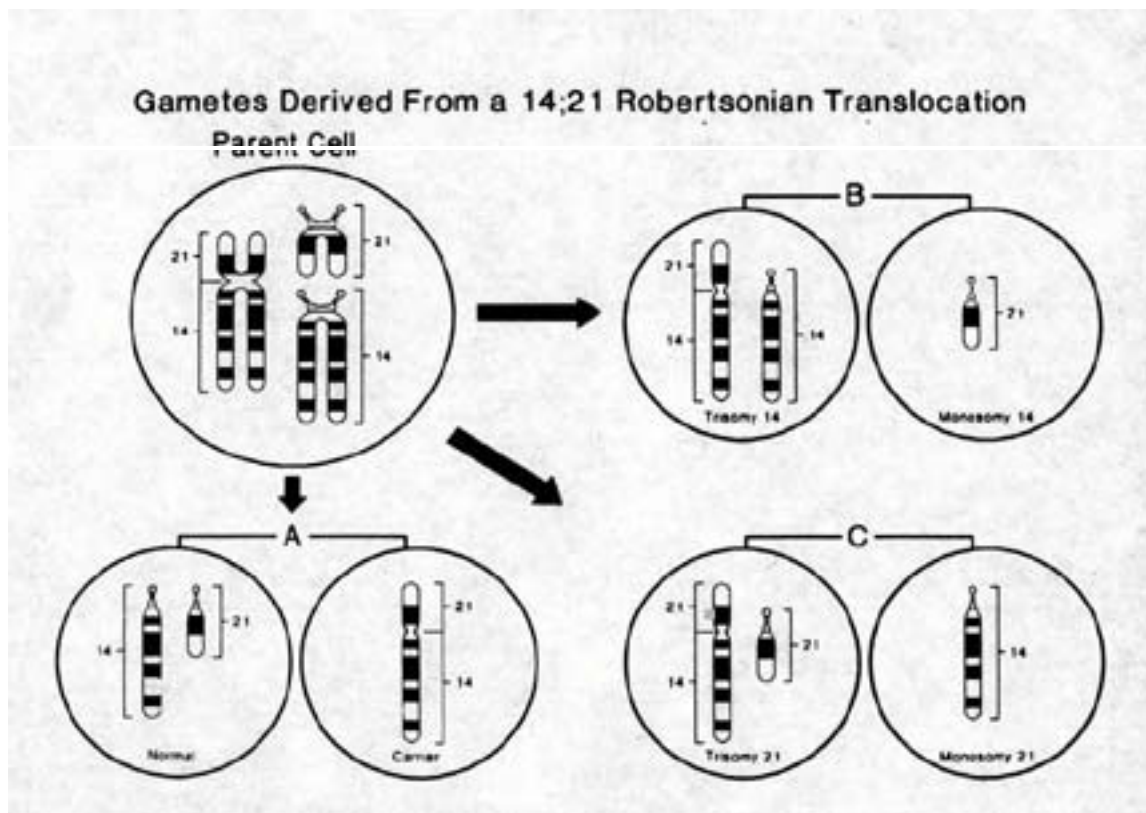


Fig. 1.2.- Esquema de les possibles segregacions en un portador d'una translocació robertsoniana entre els cromosomes 14 i 21.