

Estudi citogenètic de líquid amniòtic i vellositats corials: valor de la implementació del cribatge combinat de primer trimestre de gestació en el diagnòstic prenatal d'anomalies cromosòmiques

Treball de recerca

**Nom: Adela Cisneros Sala
Director: Dr. Evarist Feliu Frasnado**

Convocatòria: Juny 2011

**Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Medicina
Programa de Doctorat: Medicina Interna**

CERTIFICAT DEL DIRECTOR O CO-DIRECTOR DEL TREBALL DE RECERCA

Evarist Feliu Frasnado Catedràtic de la Universitat Autònoma de Barcelona i Director Científic de l'Institut Català d'Oncologia.

FA CONSTAR,

que el treball titulat: **“Estudi citogenètic de líquid amniòtic i vellositats corials: valor de la implementació del cribatge combinat de primer trimestre de gestació en el diagnòstic prenatal d'anomalies cromosòmiques”** ha estat realitzat sota la meva direcció pel llicenciat Adela Cisneros Sala, trobant-se en condicions de poder ser presentat com a treball d'investigació de 12 crèdits, dins el programa de doctorat en Medicina Interna/Diagnòstic per la Imatge (curs 2010-2011), a la convocatòria de juny.

Barcelona, 31 de maig de dos mil onze.

Prof. Evarist Feliu Frasnado

Índex de Continguts

Resum.....	5
Introducció.....	6
Cribatge Prenatal.....	6
• Edat materna.....	7
• Cribatge de segon trimestre.....	10
• Cribatge de primer trimestre.....	10
Marcadors ecogràfics.....	11
• Ecografia de primer trimestre.....	14
• Ecografia de segon trimestre.....	17
Proves invasives.....	18
• Biòpsia de còrion.....	19
• Mosaics confinats a placenta.....	21
• Disomies uniparentals.....	23
• Amniocentesi.....	24
• Cordocentesi.....	24
Tècniques moleculars.....	25
• FISH.....	26
• QF-PCR.....	26
Aspectes ètics i legals.....	26
Hipòtesi i objectius.....	28
Material i mètodes.....	29
• Estudi de líquid amniòtic.....	29
• Estudi de vellositats corials.....	33

• Tècniques moleculars.....	38
• FISH.....	39
• QF-PCR.....	41
Resultats.....	45
• Descriptiva de líquids amniòtics.....	45
• Descriptiva de vellositats corials.....	51
• Decisió de les gestant.....	55
• Descriptiva dels resultats globals.....	56
Discussió.....	58
Conclusions.....	65
Bibliografia.....	66
Agraïments.....	70

Resum

Objectiu: Realitzar l'estudi citogenètic de líquid amniòtic (LA) i vellositats corials (VC) i valorar la implementació del cribatge de primer trimestre de gestació en el diagnòstic prenatal d'anomalies cromosòmiques.

Metodologia: S'estudien 20 metafases procedents de 2 cultius independents. Es realitza la tècnica molecular per la detecció d'aneuploidies més freqüents.

Resultats: S'analitzen 3707 mostres (3523 LA i 184 VC). En 3677 (99,19%) es va obtenir resultat (3498 LA i 179 VC). Dels 3498 LA, 83 eren alterats (2,37%) dels quals 67 (80,72%) eren anomalies numèriques: trisomia 21 en 33 (39,75%), alteracions de cromosomes sexuals en 17 (20,48%), trisomia 18 en 7 (8,43%), trisomia 13 en 4 (4,82%) i altres (altres trisomies o cromosomes marcadors) en 6 (6,2%). Les 16 (19,27%) restants eren anomalies estructurals: 8 (50%) *de novo* i 8 (50%) heretades. De les 179 VC, 22 (12,29%) presentaven alteracions, 3 (13,64%) eren mosaics confinats a placenta, tenim 19 (10,61%) casos d'anomalia amb significació clínica: trisomia 21 en 9 (40,90%), alteracions de cromosomes sexuals en 5 (22,73%), trisomia 18 en 4 (18,18%) i trisomia 13 en 1 (4,54%). La indicació clínica principal és el cribatge prenatal en un 66%. El valor predictiu positiu més alt és l'ecografia.

Conclusions: En el primer trimestre es detecten més anomalies que en el segon. El tipus d'anomalia és semblant. Degut al cribatge de primer trimestre s'ha disminuït el nombre de proves invasives en un 50% i ha augmentat la taxa de detecció d'anomalies un 10%.

Introducció

El diagnòstic prenatal es defineix com “ totes aquelles accions prenatales que tinguin per objecte la detecció i/o el diagnòstic d'un defecte congènit, entenent com a tal tota anomalia del desenvolupament morfològic, estructural, funcional o molecular present en néixer (encara que pot manifestar-se més tard), externa o interna, familiar o esporàdica, hereditària o no, única o múltiple” per tant, els defectes congènits impliquen defectes genètics (gènics o cromosòmics), ambientals o desconeguts, defectes dismòrfics ja siguin malformacions, displàsies, síndromes i deficiències mental i/o sensorials. La taxa de prevalença de defectes congènits de la població catalana es situa en un 3,6% del total de naixements, això vol dir que a Catalunya neixen a l'any uns 3.000 nadons amb defectes congènits (1)

El diagnòstic citogenètic prenatal està reconegut des de fa més de 40 anys com un mètode fiable per la detecció d'anomalies cromosòmiques fetals. Requereix d'una prova invasiva que s'associa a un risc de pèrdua fetal i per això no es realitza en totes les gestants, només en aquelles que pertanyen a un grup de risc. Des de 1980 aquest risc es calculava amb el criatge bioquímic de segon trimestre i l'amniocentesi es va convertir en la tècnica de rutina. A partir del 1990 es desenvolupa el criatge combinat de primer trimestre i la biòpsia de còrion es converteix en la tècnica escollida que permet una actuació més precoç. Cap al 1990 també es desenvolupen les tècniques moleculars (FISH i QF-PCR) per l'estudi de les aneuploïdies més freqüents.

Cribatge Prenatal

Les aneuploïdies són la principal causa de mort perinatal i de nens amb discapacitat. Per detectar les anomalies cromosòmiques cal realitzar una prova invasiva. El criatge prenatal es desenvolupa per identificar les gestants amb risc d'aneuploïdies amb l'objectiu d'assolir una

taxa de detecció el més pròxima al 100% (alta sensibilitat) i una taxa de falsos positius el més pròxima a 0 (alta especificitat) ja que els falsos positius serien proves invasives innecessàries. Amb els anys s'han desenvolupant diferents estratègies de cribatge per determinar el risc d'aneuploidia fetal (2). Taula 1

Table 1—Performance of different methods of screening for trisomy 21

Method of screening	Detection rate (%)	False-positive rate (%)
MA	30	5
First trimester		
MA + fetal NT	75–80	5
MA + serum free β -hCG and PAPP-A	60–70	5
MA + NT + free β -hCG and PAPP-A (combined test)	85–95	5
Combined test + nasal bone or tricuspid flow or ductus venosus flow	93–96	2.5
Second trimester		
MA + serum AFP, hCG (double test)	55–60	5
MA + serum AFP, free β -hCG (double test)	60–65	5
MA + serum AFP, hCG, uE3 (triple test)	60–65	5
MA + serum AFP, free β -hCG, uE3 (triple test)	65–70	5
MA + serum AFP, hCG, uE3, inhibin A (quadruple test)	65–70	5
MA + serum AFP, free β -hCG, uE3, inhibin A (quadruple test)	70–75	5
MA + NT + PAPP-A (11–13 weeks) + quadruple test	90–94	5

MA, maternal age; NT, nuchal translucency; β -hCG, β -human chorionic gonadotrophin; PAPP-A, pregnancy-associated plasma protein-A.

Taula1

Les diferents estratègies de cribatge per determinar el risc d'aneuploidia fetal.

Edat materna

En els seus inicis cap al 1970, el cribatge per risc d'aneuploidies es realitzava a partir de l'edat materna, tota dona amb edat superior a 35 anys era candidata a prova invasiva amb el que s'obtenia un rang de detecció per a la Síndrome de Down del 30% i un 5% de falsos positius. Actualment com a criteri únic ha quedat obsoleta ja que aquesta s'inclou en els programes de cribatge prenatal.

Es ben sabut que el risc de les alteracions cromosòmiques augmenta amb l'edat materna principalment la trisomia 21. L'efecte de l'edat materna va ser reconegut per Penrose al 1934 i des de les hores s'ha mantingut així sense masses variacions en els diferents països (3)

Figura 1

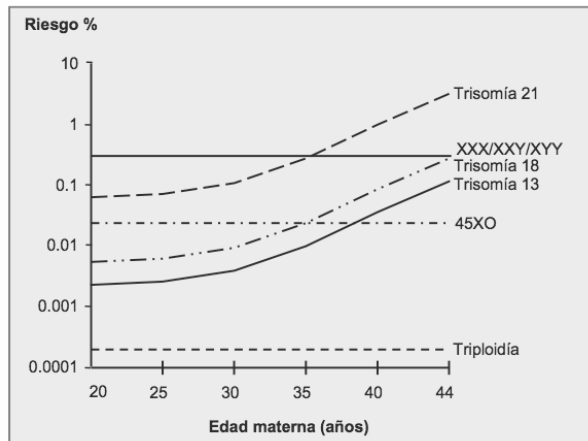


Figura 1

Risc d'anomalia cromosòmica en funció de l'edat materna (www.fetalmedicinefoundation.com).

En el 1970 un 5% de les dones embarassades tenien una edat superior o igual a 35 anys, amb un 30% de nens amb trisomia 21, en els següents anys el nombre de dones embarassades amb edat avançada era del 15% i s'observava una taxa de nens amb trisomia 21 del 50% (4). Al 2004, un 18,8% eren dones de més de 35 anys. Actualment però, amb l'augment de l'ús de tècniques de diagnòstic prenatal es produeixen més interrupcions de l'embaràs i per això el nombre de nens nascuts amb anomalies cromosòmiques es manté estable en la majoria de registres (5). Figura 2

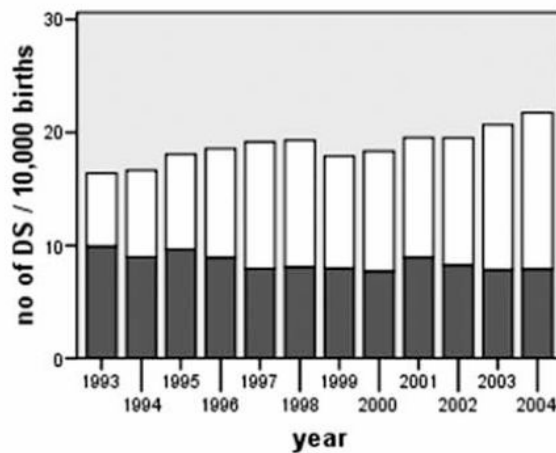


Figura 2

Mitjana de nens amb trisomia 21 d'Europa. Barra negra: nascuts vius i nascuts mort. Barra blanca: Interrupcions legals de l'embaràs (5)

Els fetus amb alteracions cromosòmiques tenen més probabilitats de morir *in utero* que els fetus normals, i per això el risc d'anomalia cromosòmica disminueix a mida que avança la gestació, per tant, es important establir l'edat materna i l'edat gestacional per poder estimar el risc d'anomalia fetal. El rang de mort fetal per trisomia 21 a les 12 setmanes de gestació és del 30%, a les 16 setmanes és del 20%. Per les trisomies 13 i 18 també s'observa un increment amb l'edat materna i una disminució amb l'edat gestacional, la mort intrauter de les 12 a les 40 setmanes de gestació arriba a un 80%. En la Síndrome de Turner generalment el cromosoma X que es perd és el cromosoma patern, per tant l'edat materna no influeix, però sí l'edat gestacional, ja que la prevalença a les 12 setmanes de gestació és de 1 per cada 1500 i va disminuint fins a 1 per cada 4000 a les 40 setmanes de gestació. Per les altres aneuploïdies dels cromosomes sexuals (47,XXX, 47,XXY, 47,XYY) no existeix relació amb l'edat materna ni amb l'edat gestacional, la prevalença és de 1 per cada 500. Les poliploïdies afecten a un 2% dels embarassos però són molt letals i per tant disminueixen moltíssim a mida que avança la gestació (4). El risc d'alteracions estructurals desequilibrades també presenta un increment en relació amb l'edat materna (6). Figura 3

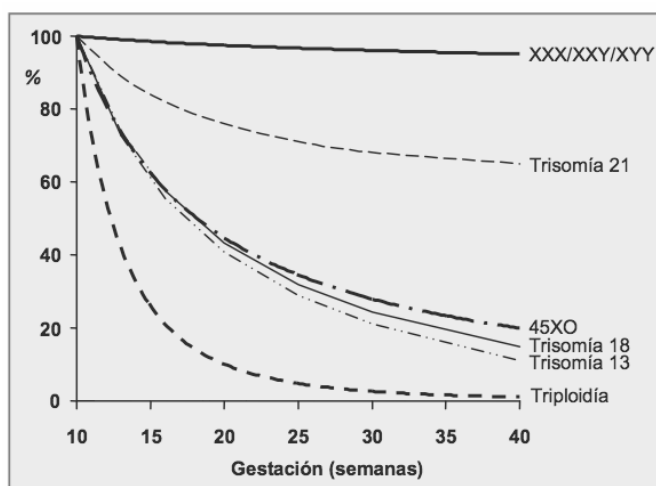


Figura 3

Risc d'anomalties cromosòmiques en funció de l'edat gestacional (www.fetalmedicinefoundation.com).

Les aneuploïdies presenten un risc de recurrència en les següents gestacions, del risc a priori per l'edat materna cal sumar-li un 0,75% (4). No obstant, aquest risc de recurrència és

específic per cadascuna de les aneuploïdies, és a dir, el risc de trisomia 21 no es veu incrementat en una dona amb un fill previ amb trisomia 18 (4).

Cribatge de segon trimestre

Cap al 1980 el cribatge d'aneuploïdies fetals es realitzava en el segon trimestre de gestació, entre les setmanes 14 i 16 de l'embaràs, on juntament amb l'edat materna es determinaven els nivells d'alfafetoproteïna (AFP) i els de la fracció lliure de la β gonadotrofina coriònica humana (f β -hCG) en sang materna. Éra el cribatge bioquímic. Més tard es va afegir la determinació de l'estriol no conjugat (uE3) d'aquí el nom de "triple test". Tenia un rang de detecció per a la Síndrome de Down del 60-65% i un 5% de falsos positius. Si el valor era superior a 1/270 es recomenava la prova invasiva.

Al desembre del 2008 surt la primera edició del "Protocol de Diagnòstic prenatal d'anomalies congènites fetals" (1), recomanacions de la Generalitat de Catalunya, del departament de salut, on es proposa l'utilització del cribatge de primer trimestre de gestació (2).

En el cas que la gestant consulti a partir de les 14 setmanes de gestació, no se li podrà oferir un cribatge de primer trimestre, en aquest casos es realitzarà el cribatge de segon trimestre actual, el "quadruple test", que determina els valors bioquímics de l'AFP, la f β -hCG, l'uE3 i d'un marcador més, la inhibina-A. El rang de detecció és del 65-70%.

Cal remarcar que les concentracions d'estriol estan subjectes a episodis diürns de variació i que l'estudi de la inhibina A és problemàtic ja que presenta variacions del 30% entre els diferents lots (1).

Cribatge de primer trimestre

Es desenvolupa a partir del 1990, s'anomena cribatge combinat (combina la bioquímica i l'ecografia), a part de l'edat materna inclou l'estudi en sang materna de dos paràmetres bioquímics: la f β -hCG i la proteïna plasmàtica A associada a l'embaràs (PAPP-A) més un paràmetre ecogràfic que és la translucidesa nucal (TN), aconseguint així un rang de detecció

d'entre el 85-95% i es redueixen el nombre de falsos positius al 3,3% (7,8). Es realitza entre les 8 i 13 setmanes de gestació.

Cal tenir en compte que entre la setmana 13.0 i 13.6 els valors bioquímics de primer i segon trimestre no són tant efectius, per la qual cosa es recomana no realitzar l'extracció en aquests dies i esperar a la setmana 14 per realitzar un cribatge de segon trimestre (1).

El risc individual d'aneuploidia per una gestant, depèn del risc *a priori* (edat materna i edat gestacional) multiplicat per l'anomenat *likelihood ratio* que és la probabilitat d'una gestació afecta. L'estimació d'aquest risc es porta a terme mitjançant un programa informàtic "l'ad hoc" (1) un cop s'han determinat els valors bioquímics i ecogràfics. Existeixen una sèrie de marcadors que influeixen en aquest càlcul de risc, el programa ajusta els valors segons les diferents circumstàncies maternes: el pes matern (el marcador bioquímic es considera més diluït a major volum sanguini), el tabaquisme (alguns marcadors varien en funció dels nivells de tabaquisme de la gestant), la diabetis insulíndependent (quan està poc controlada) i l'origen ètnic (existeixen diferències entre ètnies).

El punt de tall, a partir del qual s'indica una prova invasiva, és de 1/250 (1).

Marcadors ecogràfics

L'ecografia s'utilitza per datar l'edat gestacional de forma precisa i és una eina imprescindible en el diagnòstic prenatal. Amb els anys ha anat guanyant importància, cada cop són més els marcadors ecogràfics d'anomalia fetal que es coneixen i que es poden detectar.

Actualment la majoria d'anomalies ecogràfiques es poden detectar en el primer trimestre de gestació, degut ha això la "piràmide del control prenatal" s'ha invertit. Figura 4

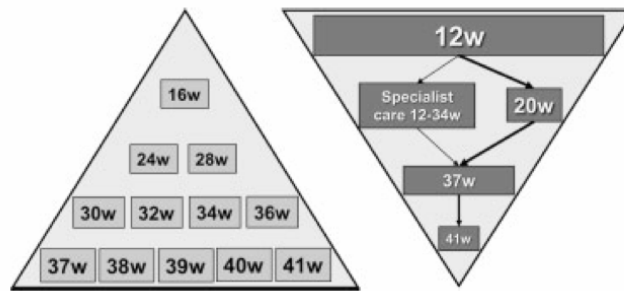


Figura 4

Piràmide de l'atenció prenatal. La piràmide de l'esquerra representa l'actitud de l'ecografista en el passat i la piràmide de la dreta el present (9)

A les 11-13 setmanes de gestació podem classificar les gestacions segons siguin de baix o d'alt risc. En les de baix risc només caldran 3 visites mèdiques: una a les 20 setmanes (avalua la morfologia fetal, el creixement i els possibles riscos de preclampsia i naixement a terme), l'altre a les 34 setmanes (determina la manera i el moment del part) i la tercera a les 41 setmanes (controla el part). En les gestacions d'alt risc es requerirà de més controls, proves addicionals i del seguiment de protocols per prevenir conseqüències adverses (9).

Marcadors menors són comuns i en principi no s'associen a patologia a no ser que amaguin una anomalia cromosòmica.

Marcadors majors es poden agrupar en tres grups segons es poden o no detectar ecogràficament a les 11-13 setmanes de gestació (10). Figura 5.

- Alteracions fàcilment detectables: anencefàlia (només es detecten el 75% dels fetus afectes), holoprosencefalia (generalment es detecten el 100% dels casos i el 66% estan relacionats amb trisomia 13), exomfalos (el 95% es resolen espontàniament si només afecta intestí, si també afecta fetge generalment progressa i caldrà cirurgia neonatal, s'associa a trisomia 18), gastrosquisis (no s'associa a aneuploïdies, però generalment perdura fins el període neonatal), megacistis (el 90% dels casos amb tamanys inferiors o iguals a 16 mm es resolen espontàniament, si és superior a 16 mm acostumen a ser més

greus i progresen, el 30% s'associa a trisomia 13 i/o 18), artèria umbilical única (s'observa en un 3% dels fetus normals i en el 80% dels fetus amb trisomia 18).

- Alteracions indetectables: són aquelles que no es manifesten fins al segon o tercer trimestre de gestació com la microcefàlia (es diagnostica passades les 30 setmanes), l'agenèsia del cos callòs (es desenvolupa a les 14-19 setmanes), la ventriculomegàlia (acostuma a ser secundària a infeccions i hemorràgies que es produeixen al segon o tercer trimestre), els tumors fetals (teratoma sacrococcigeo), lesions ecogèniques del pulmó, l'atrèsia duodenal o la hidronefrosi severa.
- Anomalies potencialment detectables, es veuran segons el temps de l'exploració, la qualitat de l'equip, l'experiència de l'ecografista, del tipus de marcador i l'expressió fenotípica d'aquest al llarg de la gestació. Són: la fissura palatina (en el 20% de les trisomies 13 i 18), l'agenèsia renal, els ronyons multiquístics i alteracions cardíques.

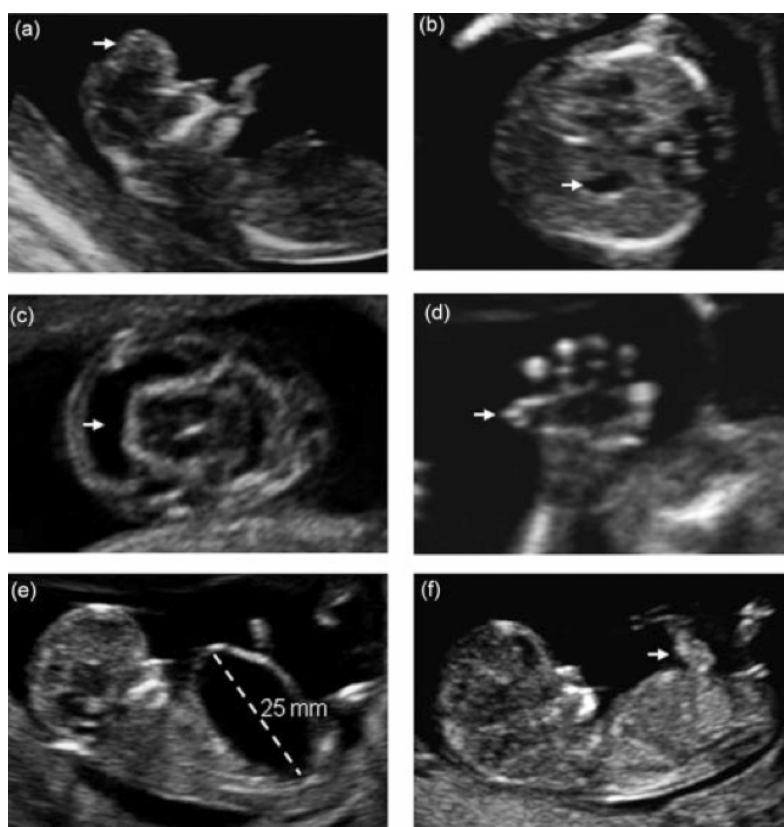


Figura 5

Anomalies fetals a les 11-13 setmanes de gestació: a) acrània, b) hèrnia diafragmàtica, c) holoprosencefalia amb un únic ventricle lateral, d) polidactília postaxial, e) megacistis severa de 25 mm de diàmetre, f) exomfalos, només conté l'intestí. (10)

Ecografia de primer trimestre

Es realitza entre les setmanes 11 i 12 de gestació i es determina el nombre de fetus, la seva viabilitat, s'avalua la quantitat de líquid amniòtic i la localització del còrion (en les gestacions múltiples s'ha d'establir la corionicitat, ja que només es pot establir de manera fiable en el primer trimestre), es mesura la longitud cefalocaudal (LCC) i la translucidesa nucal (TN). També ha d'incloure un estudi bàsic de cap, tronc i extremitats fetals per descartar anomalies majors.

En el primer trimestre de gestació, l'ecografia juga un paper clau ja que la mesura de la translucidesa nucal s'incorpora com a marcador ecogràfic en el cribatge combinat de primer trimestre.

- La Translucidesa Nucal (TN) és l'aparència ecogràfica de l'acúmul subcutani de líquid darrera el coll fetal en el primer trimestre de gestació. Es mesura seguint les pautes establertes per la *Fetal Medicine Foundation* (www.fetalmedicine.com) durant la setmana 11-13 de gestació amb un LCC entre 45 i 84 mm. Es pot mesurar tant per via transabdominal com per via transcervical, els resultats són similars (2). Es mesura la zona més ampla de l'espai anecogènic. Cal que la pell fetal i les membranes amniòtiques es diferenciïn clarament. Els cal·lipers es col·locaran sobre les línies ecogèniques. Si es considera convenient, es prendran diverses determinacions de la TN i s'anotará la superior (1). Figura 6

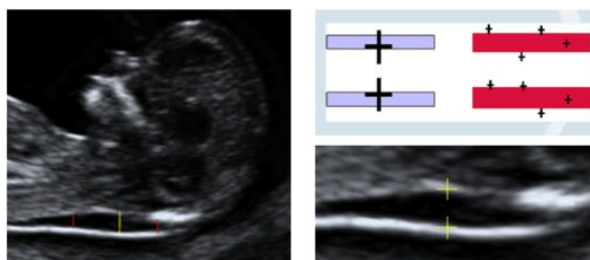


Figura 6

Imatge de la mesura correcta (en groc) de la translucidesa nucal (TN) i la correcta posició dels cal·lipers
Curs d'Ecografia i Doppler en Diagnòstic Prenatal. Dexeus

L'associació de la TN amb anomalia fetal ve determinada pel gruix més que per l'aparència. Els valors per sobre del percentil 99 o superiors a 3,5 mm es consideren valors de risc i en presència d'algun altre marcador es recomanarà la realització d'una prova invasiva. Taula 2.

Cariotipo Fetal	N	TN >Percentil 95	Riesgo $\geq 1/300$
Normal	95.476	4.209 (4.4%)	7.907 (8.3%)
Trisomia 21	326	234 (71.2%)	268 (82.2%)
Trisomia 18	119	89 (74.8%)	97 (81.5%)
Trisomia 13	46	33 (71.7%)	37 (80.4%)
Síndrome de Turner	54	47 (87.0%)	48 (88.9%)
Triploidia	32	19 (59.4%)	20 (62.5%)
Otros*	64	41 (64.1%)	51 (79.7%)
Total	96.127	4.767 (5.0%)	8.428 (8.8%)

Taula 2

Estudi multicèntric de la *Fetal Medicine Foundation*. Embarassos amb una translucidesa nual (TN)>p95 i el risc estimat d'anomalia fetal (www.fetalmedicinefoundation.com).

*Delecions, altres trisomies, translocacions desequilibrades i aneuploidies de cromosomes sexuals.

Si tenim un valor de risc i no tenim un estudi cromosòmic o aquest és normal, es recomanarà una ecografia precoç a les 14 setmanes de gestació i una ecocardiografia ja que la presència d'una TN augmentada es relaciona amb cardiopaties (el 35% dels fetus amb cardiopatia presenten una TN augmentada) (10), displàsies esquelètiques, hèrnies diafragmàtiques, malformacions fetals i síndromes genètics (11). Taula 3

Els valors de la TN es poden normalitzar a mida que avança la gestació però també poden evolucionar cap a un edema nual, un higroma quístic o un hidrops generalitzat.

Translucència nucal	Anomalías Cromosómicas	Cariotipo Normal Muerte Fetal	Normal Anomalías mayores fetales	Recién Nacido sano
< Percentil 95	0.2%	1.3%	1.6%	97%
Percentiles 95-99	3.7%	1.3%	2.5%	93%
3.5-4.4 mm	21.1%	2.7%	10.0%	70%
4.5-5.4 mm	33.3%	3.4%	18.5%	50%
5.5-6.4 mm	50.5%	10.1%	24.2%	30%
≥6.5 mm	64.5%	19.0%	46.2%	15%

Taula 3

Relació de la translucència nucal (TN) augmentada i el risc d'anomalia fetal (11)

- Altres marcadors ecogràfics: són signes fenotípics que s'observen sovint en fetus alterats, però que també els podem trobar en els fetus normals de manera aïllada, són marcadors ecogràfics de segona línia que encara no estan validats per ser aplicats a la població general. Figura 7. Són:
 - L'os nasal: quan la línia corresponent a l'os nasal és més petita o menys ecogènica que la de la pell ens indica que no tenim ossificació i per tant es considera que tenim falta d'os nasal, al voltant del 65% dels fetus amb trisomia 21 presenten hipoplàsia de l'os nasal (12)
 - El ductus venós: és un vas petit que connecta la vena umbilical amb la vena cava inferior imprescindible per enviar sang oxigenada al cervell fetal, si el flux de sang es reverteix pot indicar patologia.
 - La regurgitació tricuspídia: la vàlvula tricuspídia del cor no tanca bé, quan es contrau el ventricle, la sang retorna a l'aurícula dreta, s'associa a anomalia cromosòmica si es produeix entre les setmanes 11 i 14 de gestació, si la TN està augmentada la seva prevalència augmenta, i també s'associa a cardiopatia.
 - Recentment s'han descrit altres com l'angle maxilo-facial, l'arc aòrtic esquerra o el flux de l'artèria hepàtica fetal però encara calen més estudis (2,7)

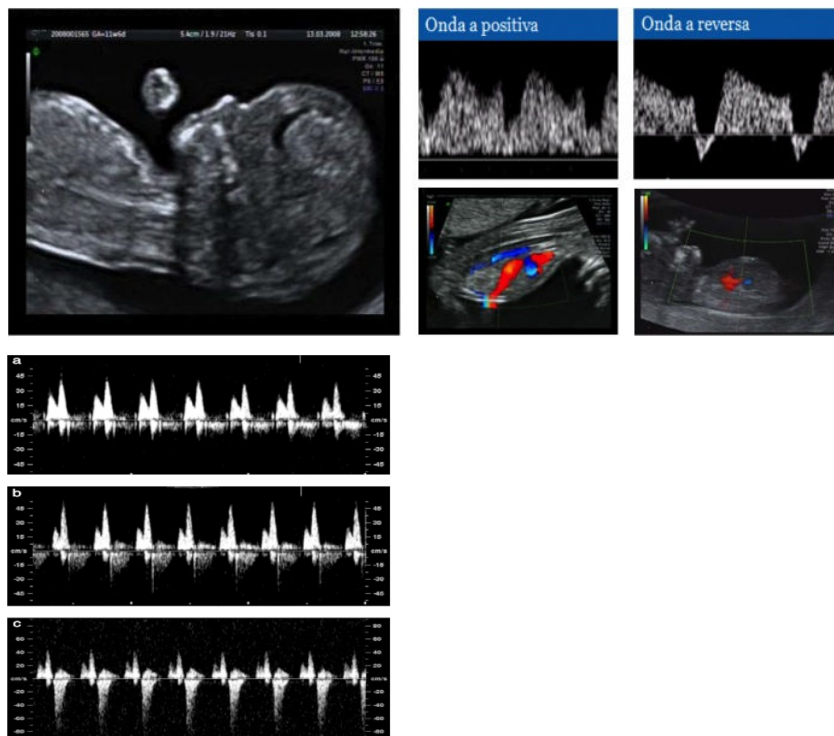


Figura 7

Amunt esquerra: absència d'os nasal, Amunt dreta: flux del ductus venós positiu i revers. A baix dreta: Flux del Doppler de la vàlvula tricuspídia: a) no regurgitació durant la sístole b) una petita corba reversa i c) regurgitació tricuspídia.

Curs d'Ecografia i Doppler en Diagnòstic Prenatal. Dexeus

El fet d'incorporar aquests marcadors ecogràfics en el cribatge combinat de primer trimestre fa que el rang de detecció arribi al 96% i es disminueixi la taxa de falsos positius fins a un 2,5%.

Ecografia de segon trimestre

Es realitza entre les setmanes 14 i 16 de la gestació. En els últims anys ha perdut importància en favor de l'ecografia de primer trimestre, no obstant, sí és important per controlar aquells marcadors ecogràfics alterats observats en el primer trimestre de gestació i per totes aquelles gestants que s'escapen al primer control de l'embaràs.

Els marcadors ecogràfics són: plec nucal, característiques facials, anomalia en mans i peus (clinodactilia), ectàsia pièlica, hiperrefringència intestinal, quistes de plexes coroïdeos, os nasal, focus hiperecogènic cardíac, fèmur i húmer curts, artèria umbilical única,

ventriculomegalia, megacisternamagna... Està indicada una prova invasiva en funció del tipus i el nombre de marcadors.

Segons el marcador ecogràfic observat en l'ecografia de segon trimestre podem sospitar d'una o altre anomalia cromosòmica (2)Taula 4

	Trisomia 21	Trisomia 18	Trisomia 13	Triploidia	Turner
Ventriculomegalia	+	+	+	+	
Holoprosencefalia			+		
Quistes de plexos coroïdeos		+			
Complejo Dandy Walker		+	+		
Hendidura facial		+	+		
Micrognatia		+		+	
Hipoplasia nasal	+				
Edema nucal	+	+	+		
Higroma quístic					+
Hernia diafragmàtica		+	+		
Anomalías cardíacas	+	+	+	+	+
Onfalocèle		+	+		
Atresia duodenal	+				
Atresia esofàgica	+	+			
Anomalías renales	+	+	+	+	+
Miembros cortos	+	+		+	+
Clinodactilia	+				
Dedos superpuestos		+			
Polidactilia			+		
Sindactilia				+	
Talipes		+	+	+	
Retraso del crecimiento		+		+	+

Taula 4

Anomalies ecogràfiques en relació a l'anomalia cromosòmica (2)

Proves Invasives

Mitjançant la prova invasiva es preten obtenir una mostra fetal per l'estudi citogenètic. Existeixen tres tipus de proves invasives: la biòpsia de còrion, l'amniocentesi i la cordocentesi. Aquestes proves invasives estan associades a un risc de pèrdua fetal d'entre l'1 i el 2% segons els diferents autors (4,13,14) i és per això que només es realitzen a aquelles gestants que presenten un risc incrementat d'anomalia fetal ja sigui per:

- Un criatge prenatal alterat.
- La presència de marcadors ecogràfics majors.
- Una gestació prèvia amb cromosomopatia.
- Un progenitor portador d'un reordenament cromosòmic.
- Una història familiar de malaltia monogènica amb diagnòstic prenatal disponible.

Biòpsia de corion

Va ser introduïda als inicis de 1980 i consisteix en l'obtenció de vellositats corials (VC). Es realitza en el primer trimestre de gestació, entre les 11-13 setmanes. L'obtenció de la mostra pot realitzar-se per dues vies:

- Via Transcervical (TC-CVS): per aspiració o mitjançant una pinça fina semirígida.

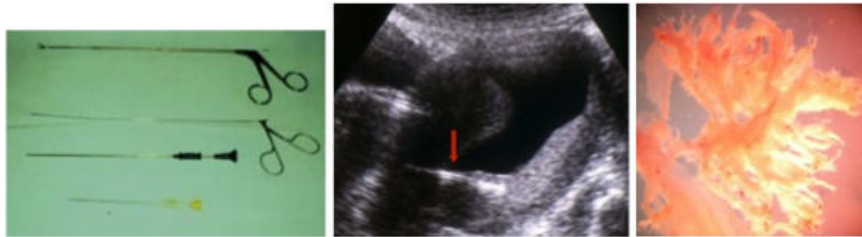


Figura 8

Via transcervical: Pinces, ecografia i vellositats corials (VC)

- Via Transabdominal (TA-CVS): per aspiració mitjançant una agulla fina o amb un trocar fi i una pinça transabdominal.

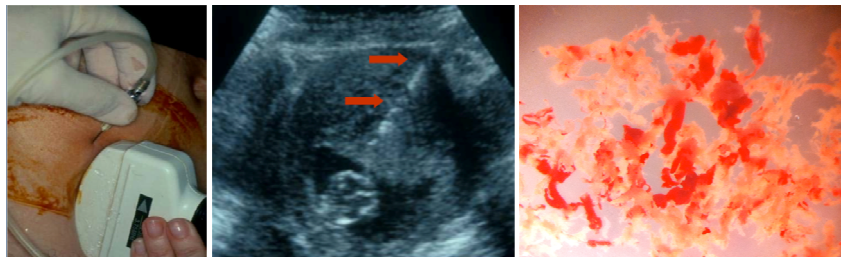


Figura 9

Via transabdominal: agulla fina, ecografia i vellositats corials (VC)

L'elecció dependrà de les setmanes de gestació, de la localització placentària i de l'experiència de l'operador/a. La via TC-CVS sembla que està més associada a dificultats d'obtenció de la mostra i a més entrades, però la mostra surt més neta i sencera i és menys dolorosa sobretot en dones més grosses degut al gruix de la pared abdominal (15). Per via TA-CVS les VC estan més trencades i brutes (més teixit matern), i quan la placenta és anteriors és el mètode escollit (47% de les gestacions) (16).

Les principals complicacions de la tècnica són: sagnats vaginals, trencament de membranes, infeccions bacterianes o fúngiques i perdues fetals (16).

La formació de les vellositats corials s'inicia a la segona etapa del desenvolupament a partir del trofoblast que embolcalla i delimita externament el blastocist. Les cèl·lules del trofoblast sintetitzen enzims proteolítics que permeten la penetració i erosió de les cèl·lules epitalials de la decidua materna (nom que rep l'endometri durant la gestació) (17,18). Figura 10:

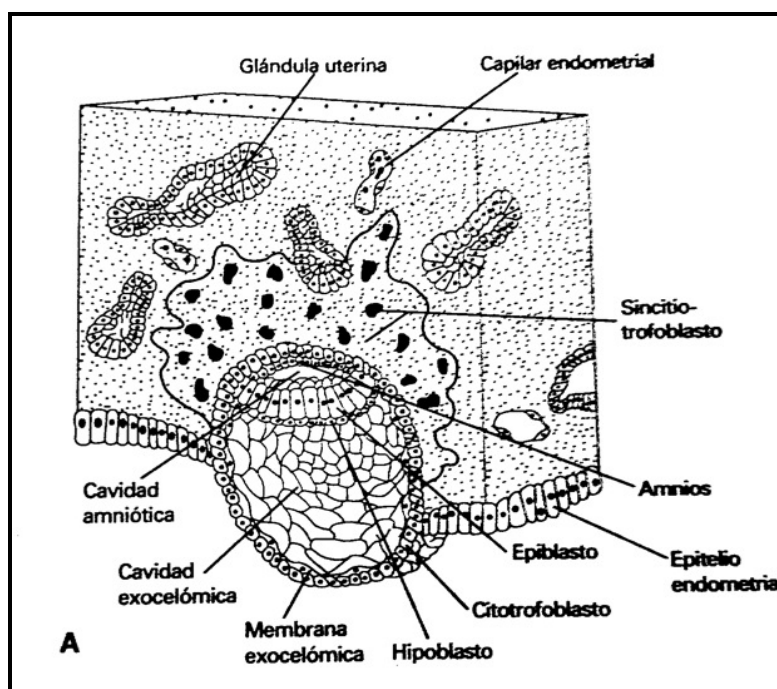


Figura 10

Tall de la implantació del blastocist a l'endometri als 8 dies de gestació (17)

A mida que va envaint l'úter, el trofoblast es diferencia en tres capes:

- Sincicitrofoblast: capa externa del trofoblast, està formada per una massa cel·lular multinucleada i sense límits intercel·lulars, es forma per la fusió de cèl·lules del citotrofoblast. Està implicada en la implantació i transport feto-matern.
- Citotrofoblast: capa interna del trofoblast, està formada per cèl·lules indiferenciades amb un únic nucli central i ben delimitades. Són cèl·lules amb una elevada activitat mitòtica espontània i molt actives durant el primer trimestre de gestació, són les cèl·lules que s'estudien en el cultiu curt de vellositats corials.
- Estroma o mesènquima: és la part més interna de la vellositat corial, són cèl·lules de tipus estromal i donaran lloc a l'angiogènesi, són les cèl·lules que s'estudien en el cultiu llarg de vellositats corials.

L'estudi de VC permet detectar **mosaics confinats a placenta (MCP)**:

Mosaïcisme cromosòmic: es defineix com la presència de dues o més línies cel·lulars en un mateix individu, generalment s'origina per una no disjunció, i el seu efecte en la gestació dependrà del moment en el que tingui lloc, del llinatge cel·lular afectat i de la viabilitat d'aquesta alteració cromosòmica. Figura 11.

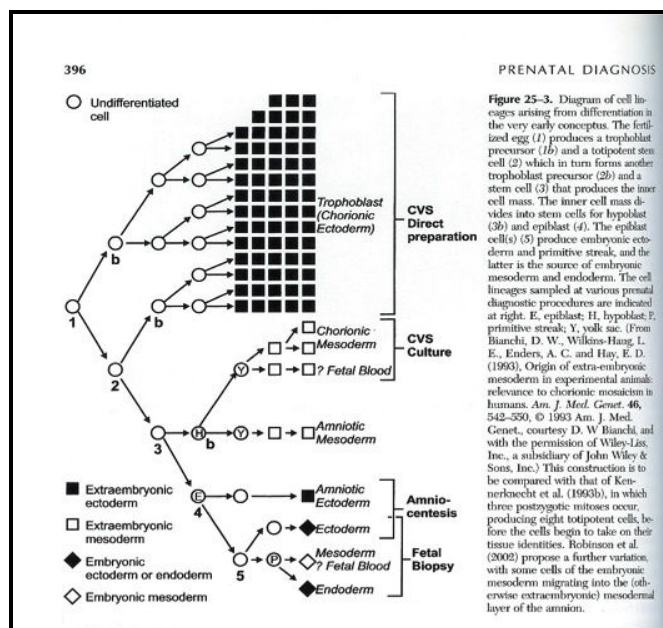


Figura 11

Diagrama dels llinatges cel·lulars en les etapes primerenques del desenvolupament (6)

Tenint en compte que de les 60-100 cèl·lules que formen el blastocist, només 16 formaran la massa cel·lular interna, és més probable que les anomalies cromosòmiques originades en estadis primarencs del desenvolupament embrionari quedin confinades a la placenta (18,19).

Els mosaics confinats a placenta (MCP) s'observen en el 1-2% dels estudis de vellositats corials i aproximadament el 10% són en realitat mosaics reals (20). Podem tenir 3 tipus de MCP depenent de la ubicació de les cèl·lules anòmales: tipus I: confinat al citotrofoblast, tipus II: confinat a l'estroma (mesènquima) vellositari i tipus III: present tant en el citotrofoblaste com en l'estroma vellositari. En qualsevol cas caldrà demanar una mostra de líquid amniòtic per poder determinar si el mosaic és fetal o confinat a placenta. Taula 5:

MCP tipus	Citotrofoblast	Mesènquima	Teixit embrionari
I	anòmal	normal	normal
II	normal	anòmal	normal
III	anòmal	anòmal	normal

Taula 5:

Els 3 tipus de mosaic confinat a placenta (MCP).

La discrepància entre els cultius ens permet detectar possibles disomies uniparentals.

Disomia uniparental (DUP): El concepte va ser introduït en el 1980 per Eric Engel i segons la literatura la freqüència de la DUP en nens nascuts vius és de 0,029% (21). Es dona quan un parell de cromosomes s'hereten d'un mateix progenitor. Parlem de isodisomia uniparental quan es tracta del mateix cromosoma i heterodisomia uniparental quan són els 2 cromosomes homòlegs. Aquest fenomen es dona per un rescats trisòmics (pèrdua d'un cromosoma en una trisomia per ser diploïd) o per un rescat monosòmics (duplicació del cromosoma per compensar la falta). És important quan afecta a cromosomes que presenten *imprinting* genòmic (un gen s'expressa de manera diferent depenent de si la seva procedència és materna o paterna) (22). Els cromosomes afectats per l'*imprinting* són el 6, 7, 11, 14 i 15. En alguns casos es descriuen també els cromosomes 2, 16 i 20 ja que presenten regions d'*imprinting*, però són pocs els casos clínics i és complicat associar-los a DUP.

En un estudi citogenètic on trobem MCP, translocacions robertsonianes familiars o de novo, o un cromosoma marcador que involucri els cromosomes 6, 7, 11, 14 i 15, caldrà fer un estudi de DUP (23). Les Síndromes associades a problemes d'*imprinting* són:

matUPD(7): Silver Russel syndrome (SRS; OMIM #180860). Meiotic origin suggested in 58% of matUPD(7) patUPD(11): Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS; OMIM #130650) matUPD(14): Temple syndrome (TS; see OMIM *605636 and #176270) patUPD(14): paternal UPD(14) syndrome (patUPD (14); OMIM #608149). matUPD(15): Prader Willi syndrome (PWS; OMIM #176270). Meiotic origin suggested in 89% of matUPD(15) patUPD(15): Angelman syndrome (AS; OMIM #105830). Meiotic origin suggested in 16% in patUPD(15).
--

Taula 6

Malalties associades a *imprinting* genòmic (21)

Amniocentesi

Va ser introduïda als inicis de 1970 i consisteix en l'obtenció de líquid amniòtic (LA). Es realitza en el segon trimestre de gestació, entre les 15-17 setmanes, en gestants que per diferents motius no han tingut accés al criatge de primer trimestre o en el context d'un control seqüencial. És una punció percutània ecoguiada de l'abdomen matern fins el sac amniòtic, d'on s'aspiren aproximadament 20 ml.



Figura 12
Amniocentesi: Punció, ecografia i líquid amniòtic (LA).

Les principals complicacions de la tècnica són: pèrdua de líquid amniòtic, pèrdues fetals, amniorrèxis, tàlipes i problemes respiratoris fetals (24).

La composició del líquid amniòtic en un 99% és aigua on estan suspeses cèl·lules epitelials fetals descamades, sals orgàniques (la meitat proteïnes i la resta carbohidrats, greixos, enzims, hormones i pigments) i inorgàniques. A mida que avança la gestació, la composició del LA canvia per l'addició dels excrets del fetus (meconi i orina) (17).

Cordocentesi

Consisteix en l'obtenció de sang fetal. Es pot realitzar a partir de les 18-19 setmanes de gestació. És una punció percutània materna al cordó umbilical, s'aspiren de 2 a 3 ml de sang i cal verificar l'origen fetal de la sang. És el procediment més difícil, s'associa a un risc de pèrdues fetals del 2% i per tant s'utilitza de manera excepcional (1). Les principals complicacions són la corioamniòtitis, hemorràgies, hematoma de cordó, bradicàrdia, part preterme, pèrdues fetals i hemorràgia feto materna.

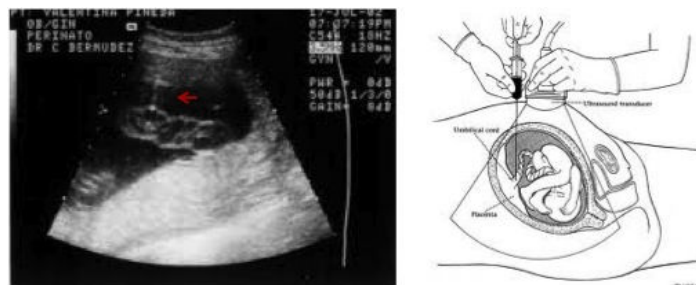


Figura 13:
Cordocentesi. Ecografia i esquema de la punció.

Tècniques moleculars

Està reconegut que el temps d'espera dels resultats citogenètics provoquen angoixa a les gestants, i aquesta és una de les principals raons per les quals cap als anys 1990 es desenvolupen les tècniques moleculars de detecció ràpida (25). Analitzen les aneuploidies més freqüents en diagnòstic prenatal que són les dels cromosomes: 13, 18, 21, X i Y associades a les Síndromes de Patau, de Edwards i de Down, i les anomalies dels cromosomes sexual (Síndrome de Turner, de Klinefelter, triple X i les variants d'aquestes). Representen el 70-80% de les anomalies cromosòmiques mes comuns associades a problemes físics i/o mentals.

Aneuploidia	Incidència
Trisomia 21	1/660
Trisomia 18	3/1000
Trisomia 13	1/5000
XXY	1/500
XYY	1/840
XXX	1/1000
X	1/2500

Taula 7

Incidència de nens nascuts vius amb les aneuploidies més freqüents (26)

L'avantatge principal d'aquestes tècniques es que no requereixen de cèl·lules en divisió i amb només 2 ml de mostra proporcionen un resultat en 24-48 hores. És important destacar que només detecten anomalies numèriques dels cromosomes analitzats, no detecten aneuploidies d'altres cromosomes, no detecten anomalies estructurals ni cromosomes marcadors. Tampoc detecten mosaics inferiors al 20-30% (27), però son una eina molt útil en els casos de no creixement i/o contaminació.

Les tècniques implementades per aquest diagnòstic són la hibridació in situ fluorescent (FISH) i la reacció en cadena de la polimerasa - quantitativa fluorescent (QF-PCR).

FISH: La FISH és una tècnica que utilitza sondes d'ADN marcades amb un fluorocrom per a detectar anomalies genètiques o cromosòmiques d'una cèl·lula. Es basa en la propietat que té l'ADN de desnaturalitzar-se (separar la doble hèlix) i d'hibridar (unir-se per complementarietat de bases) amb una seqüència complementària.

QF-PCR: La QF-PCR és una tècnica que es basa en la presència de marcadors STR (seqüències curtes repetides en tandem) i d'altres marcadors no tant polimòrfics presents en el genoma. Estan conservats en els diferents individus, però cada individu presenta un nombre de repeticions diferents. Es sintetitzen uns "primers" marcats amb fluorescència que permeten amplificar aquestes regions concretes del cromosoma sent el nombre de còpies finals un indicador del nombre de còpies d'aquest cromosoma.

Aspectes ètics i legals

El fet de trobar una anomalia en diagnòstic prenatal comporta ansietat, angoixa i estrès en la parella, per això és important un correcte consell genètic per facilitar la presa de decisions (28-30).

Mitjançant el criatge, l'ecografia i la prova invasiva aconseguim un diagnòstic prenatal.

És essencial que la informació d'aquest diagnòstic sigui transmesa de manera correcta ja que influirà en la presa de decisions. Per tant la informació ha de ser:

Completa: incloure els riscos i limitacions del diagnòstic, el pronòstic i les alternatives de tractament.

Asèptica: la persona que informi no ha d'imposar el seu criteri.

Entenedora sigui quin sigui el nivell social i cultural.

Evitar la confrontació d'idees: respectar les creences i la cultura de la parella.

No demanar conclusions de forma immediata: donar temps i la possibilitat d'altres entrevistes.

És important tenir en compte que la reacció d'una parella davant la notícia que el seu fill o filla té o pot tenir una malformació o defecte, dependrà d'uns factors propis, la seva personalitat, de les seves creences i sentiments, però també de factors externs com la tradició o la pressió ambiental. Per tant la forma de reaccionar davant un mateix esdeveniment pot ser molt diferent. La parella es troba davant d'una situació difícil, que la pot desestructurar amb facilitat i això, en part, pot dependre de com es percep la informació que se'ls hi dóna (1).

Transmetre aquesta informació no és res més que proporcionar un correcte **consell genètic** que es defineix com: el procés pel qual el pacient o familiar amb risc de patir una malaltia que es pot heretar és assessorat sobre les conseqüències del procés, la probabilitat de desenvolupar-la o transmetre-la, i de la forma a través de la qual aquesta pot ser previnguda, evitada o pal·liada. D'aquesta manera les parelles podran amb total coneixement prendre la decisió de continuar o interrompre la gestació d'acord amb els supòsits previstos per la llei.

Hipòtesis i Objectius

Hipòtesis

Amb la implementació del cribatge combinat de primer trimestre per el diagnòstic prenatal, es pot disminuir el nombre de proves invasives i aconseguir una sensibilitat més alta per a la detecció d'anomalies cromosòmiques.

Objectius

Realitzar l'estudi citogenètic de líquid amniòtic i vellositats corials i valorar la implementació del cribatge de primer trimestre en el diagnòstic prenatal d'anomalies cromosòmiques en el nostre centre des de 1999 fins a l'actualitat.

- Caracterització de les anomalies cromosòmiques en líquid amniòtic i en vellositats corials.
- Identificació de la principal indicació clínica per realitzar una prova invasiva.
- Valoració de la evolució del nombre de proves invasives realitzades en el temps.
- Càlcul del valor predictiu positiu de la indicació clínica per realitzar una prova invasiva.

Material i Mètodes

Els **subjectes a estudi** són dones embarassades de primer i de segon trimestre de gestació, dels serveis de Ginecologia de l'Hospital Germans Trias i Pujol (Badalona) i l'Hospital Verge de la Cinta (Tortosa), amb una mitjana d'edat de 35,45 anys (mínima de 17 anys i màxima de 46 anys), que són sotmeses a una tècnica invasiva de diagnòstic prenatal per indicació clínica.

El **mètode** és l'estudi citogenètic convencional i molecular (FISH, QF-PCR) de mostres obtingudes per biòpsia de còrion (vellositats corials, primer trimestre de gestació) o per amniocentesi (líquid amniòtic, segon trimestre de gestació). Tots els estudis s'han realitzat a la unitat de citogenètica del servei laboratori d'hematologia de l'hospital Germans Trias i Pujol.

El **material** del que es disposa són els estudis citogenètics de diagnòstic prenatal realitzats des de la implementació de la citogenètica en el nostre centre (1999) fins a l'actualitat (març 2011). S'han analitzat de forma retrospectiva un total de 3707 mostres de les quals 3523 són líquids amniòtics i 184 són vellositats corials.

Totes les tècniques es realitzen sota la normativa i les guies Europees de diagnòstic prenatal (31,32).

Estudi del líquid amniòtic (LA)

Són necessaris entre 15 i 20 ml de líquid amniòtic transportat en condicions estèrils i a temperatura ambient. Es processa immediatament, en casos excepcionals es podria conservar la mostra fins a 48 hores, però cal tenir en compte que les cèl·lules en suspensió del LA aniran morint.

Un cop rebuda la mostra, ens podem trobar que la mostra presenti contaminació per sang materna o que estigui contaminada per fongs o bacteris. En aquests casos, es notifica al metge sol·licitant i es confirma en un període d'uns 6-7 dies si el cultiu tindrà èxit o no. En el

cas de mostra contaminada per cèl·lules maternes i un resultat de 46,XX (nena) caldrà un estudi ecogràfic exhaustiu.

Si el volum de la mostra rebuda és inferior a 10 ml, es considera mostra insuficient, es notifica al metge sol·licitant que el resultat podria ser incomplet.

Sempre es treballa en condicions estèrils sota la campana de flux laminar.

Muntatge del líquid amniòtic

- Es reparteix la mostra en dos tubs cònics i es centrifuga a +/-1700 rpm entre 7 i 10 minuts (sempres són les mateixes condicions de centrifuga).
- Una part del sobrenedant, aproximadament 1ml, es recupera i s'envia a la secció de bioquímica per a la determinació de l'alfa-feto-proteïna per descartar els defectes del tub neural (DTN). La resta del sobrenedant es desestima.
- Es resuspenen el botó cel·lular dels tubs afegint uns 3 ml de medi de cultiu (BIOAM-F), i es distribueixen en 2 ó 3 flascons de cultiu segons la quantitat de la mostra, al microscopi invertit es valora la concentració cel·lular i la quantitat d'hematies presents.
- Els cultius es guarden en incubadores de CO₂ al 5% a una temperatura de 37°C +/- 1°C. Una mateixa mostra quedarà sempre repartida entre 2 incubadores diferents i es sembrarà amb diferents lots de medi de cultiu per si hi hagués algun problema.
- Al sisè o setè dia es comprova amb el microscopi invertit l'existència de cèl·lules, tipus fibroblast, adherides a la base del flascó de cultiu, si és així, es canvia el medi. A partir d'aquest moment es controla el creixement cel·lular i es canvia el medi cada 2 ó 3 dies. Quan es considera que es té un nombre suficient de colònies i cèl·lules en divisió es realitza el processat per a l'obtenció dels cromosomes.

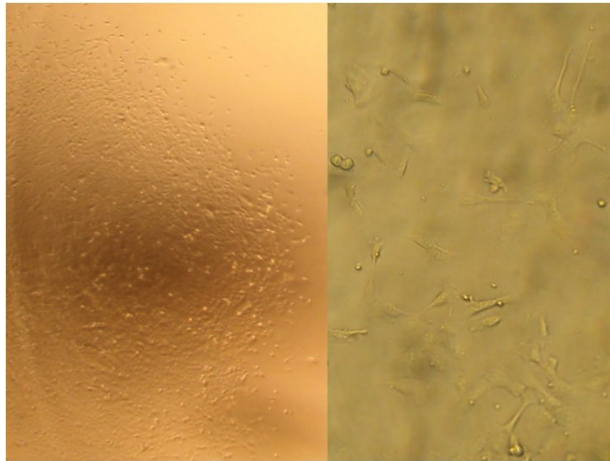


Figura 14

Imatge ampliada del creixement cel·lular. Esquerra: colònia cel·lular. Dreta: detall d'unes cèl·lules enganxades, les microesferes refringents son cèl·lules en divisió.

En aquells casos on només es van realitzar dos cultius per falta de material, se'n fa un tercer del material sobrant, tot el contingut dels 2 flascons s'introdueix en un tub de centrifuga prèviament numerat i es centrifuga, es treu el sobrenedant i es resuspèn el botó cel·lular amb medi de cultiu (BIOAM-F), es sembra en un tercer flascó anomenat cultiu secundari que guardarem a la incubadora per ser controlat en 6-7 dies.

Processat de la mostra

- Es canvia el medi de cultiu 19-20 hores abans d'ésser processat, per tal d'estimular el cicle cel·lular.
- S'afegeixen 50 μ l de Colcemid (antimitòtic que provocarà l'aturada de la divisió cel·lular) i es deixa actuar durant 3 hores dins de la incubadora.
- El contingut del flascó s'introdueix en un tub de centrifuga prèviament numerat. Les cèl·lules, que segueixen adherides a la base del flascó, són rentades amb uns 3 ml de solució salina Hank's que seguidament es llença, el Hank's elimina els ions inhibidors de la tripsina. S'afegeixen 3 ml de tripsina-EDTA per fer que les cèl·lules es desenganxin del flascó. Es deixa actuar durant 10' a la incubadora, després es controla en el microscopi invertit que totes les cèl·lules estiguin en suspensió, es recuperen i s'introdueixen en el tub de centrifuga.

- Es centrifuga la mostra, s'aspira el sobrenedant i es llença. S'afegeixen uns 8 ml de xoc hipotònic KCl (0,075M) prèviament escalfat a 37°C +/- 1°C i es resuspèn el botó cel·lular. Es deixa actuar entre 25 i 30' a 37°C +/- 1°C.
- Passat el temps, s'afegeixen +/-10 gotes de fixador (3 de metanol per 1 d'àcid acètic) en cada tub i es resuspèn, es repeteix dues vegades més fins a un total de 30 gotes. Es deixa actuar durant 10' a temperatura ambient.
- Es centrifuga, s'aspira el sobrenedant i es llença. Es posen 8 ml de fixador, resuspenent després de cada pipeta, es deixa actuar durant 10' i es centrifuga. Es repeteix l'operació mínim dues vegades més.
- En la última centrifugació s'aspira el sobrenadant i es resuspèn el botó cel·lular, es realitzen les extensions a mà alçada. En el microscopi invertit es controla la qualitat de cada extensió.

Les extensions s'envelleixen per temperatura (1 hora aproximadament a 100°C). Un cop envellides, una extensió de cada cas es suca a la solució 2xSSC a 65+/- 1°C i es renten amb aigua de l'aixeta. Es tenyeix amb una part de colorant Wright i tres parts de solució Sørensen, aproximadament 2'30". Amb aquest tipus de tinció s'aconsegueix el patró de bandes G. Si els cromosomes han quedat ben bandejats es tenyeixen la resta d'extensions de la mateixa manera, si no és així, es fa una altre prova. Si han quedat:

- Massa tenyides, farem menys temps de tinció.
- Una tinció uniforme on no es veuen les bandes, deixarem el porta més estona sucant al 2xSSC.
- Cromosomes estan desfets, no sucarem el porta a la solució 2xSSC.

Expressió de resultats

- Es realitza l'estudi dels cromosomes al microscopi òptic segons el patró de bandes G.
- S'estudien 20 metafases procedents de 2 cultius independents i sempre que sigui possible s'estudiarà per dues persones diferents.
- En cas que s'observi alguna alteració numèrica o estructural que no es repeteix, s'han de consultar els criteris de la Hsu et al (33), per determinar si es tracta d'un mosaic o d'un

pseudomosaic.

- L'expressió del resultat es farà segons la ISCN 2009 (34).
- Els polimorfismes i/o variants de la normalitat no seran informats, no es coneix repercussió pel fetus i per contra crea molta angoixa a les gestants.

Poden apareixer problemes com ara: un nombre baix de mitosis, una resolució de bandes insuficient o una contaminació per cèl·lules maternes.

Estudi de vellositats corials (VC)

La mostra es transporta a temperatura ambient, en un recipient estèril amb medi de cultiu RPMI 1640 suplementat amb 1ml d'antibiòtic (penicilina i estreptomycina) a 37°C.

El temps que ha de transcorre des de que s'extreu la mostra fins l'arribar al laboratori ha d'ésser el mínim possible.

El cariotip a partir de les vellositats corials s'obté a partir de dos tipus de cultiu:

- El **cultiu curt** (directe o semidirecte): on es fan créixer les cèl·lules del citotrofoblast, que aniran a formar les cobertes extraembrionàries. Són cèl·lules amb divisions espontànies, les podem processar immediatament (cultiu directe) o a les 16-24h (cultiu semidirecte) i així evitem el creixement de cèl·lules maternes i/o gèrmens que ens puguin contaminar la mostra. Els cromosomes son petits i amb poca resolució de bandes.



Figura 15

47,XY,+21.Exemple de la resolució de bandes en l'estudi citogenètic del cultiu curt de vellositats corials (VC).

- El **cultiu llarg**: on creixen les cèl·lules del mesènquima, són les que formaran l'embrió, no tenen divisions espontànies i per tant cal fer-les créixer sobre una superfície, necessiten un mínim de 6-7 dies per adherir-se al flascó de cultiu, durant aquest temps poden créixer cèl·lules maternes o de gèrmens que podrien contaminar-nos la mostra. Els cromosomes són més llargs, tenen més resolució de bandes.

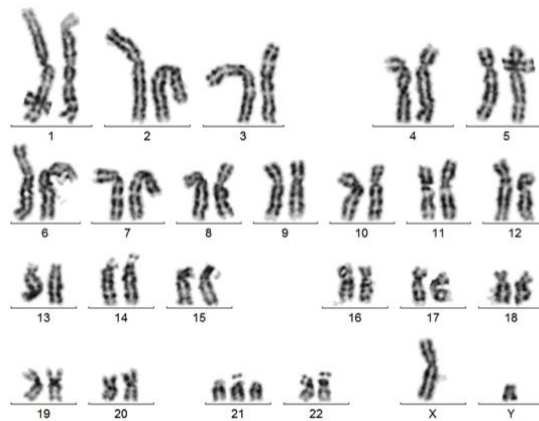


Figura 16
47,XY,+21. Mateix cas però amb una resolució de bandes de cultiu llarg de vellositats corials (VC).

Un cop es repcepciona la mostra en el laboratori es traspassa a una càpsula de petri estèril de 35mm de diàmetre amb medi de cultiu i s'analitza sota la lupa per natejar-la de possibles restes de decídua materna.

Sempre es treballa en condicions estèrils sota la campana de flux laminar.

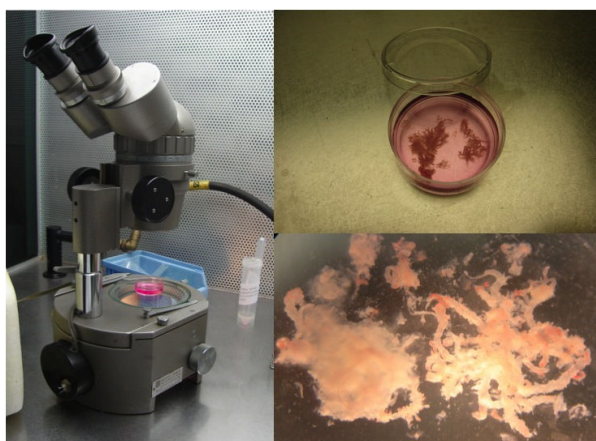


Figura 17

Esquerra: lupa per separar els fragments. Dreta amunt: mostra de vellositats corials (VC) a la placa de 35 mm. Dreta a baix: ampliació de la mostra, decídua materna (esquerra) i VC (dreta).

Es seleccionen diversos fragments, segons la quantitat. Si és insuficient, es recomana el muntatge del cultiu llarg i s'informa al metge sol·licitant.

- Un fragment petit es col·loca en un tub estèril de 2ml per a realitzar la detecció ràpida d'aneuploidies fetals mitjançant la tècnica de QF-PCR.
- Uns altres fragments es col·loquen en 2 plaques de petri de 35mm de diàmetre per procedir al cultiu curt. El medi de cultiu per aquest estudi és el RPMI 1640.
- La resta de fragments serviran pel muntatge del cultiu llarg. El medi de cultiu per aquest estudi és el BIOAM-F.

	QF-PCR	Cultiu Curt	Cultiu Llarg
Contaminació	No	No	Si
Resultat	24h	24h	15 dies
Anàlisi	Només X,Y, 13,18,21	Tots els cromosomes	Tots els cromosomes
Bandes	Pics	<400	400
Origen cel·lular	Citotrofoblast - Mesènquima	Citotrofoblast	Mesènquima
Obtenció	Extracció de DNA	Divisions Espontànies	Cultiu Cel·lular
Rendiment	Alt	Baix	Alt

Taula 8

Resum de les principals diferències entre les 3 tècniques utilitzades per l'estudi de les vellositats corials (VC).

Cultiu curt

Muntatge de la mostra:

- Partim de les dues càpsules de petri de 35mm de diàmetre amb 3 ml de medi de cultiu. Es fragmenta la mostra amb l'ajut de dues agulles o d'un bisturí, es fan bocinets petits i es col·loquen en una safata dins la incubadora de CO₂ al 5% i 37°C de temperatura.
- S'incuben de 16 a 20 hores

Processat de la mostra:

- S'afegeixen 50µl de Colcemid a cada càpsula per aturar la divisió cel·lular i es deixa actuar durant 45 minuts dins la incubadora.
- Es retira el medi i s'afegeixen 2,5ml /càpsula de solució hipotònica (1'14gr de citrat trisòdic en 100ml d'aigua destil·lada escalfada a 37°C). Les càpsules estaran amb l'hipotònic 14 minuts a la incubadora.
- Es retira l'hipotònic i s'afegeixen 2,5ml/càpsula de fixador fresc (3 d'etanol absolut per 1 d'àcid acètic glacial). Es deixen 10 minuts a temperatura ambient.
- Es canvia dues vegades el fixador deixant-lo actuar 10 minuts cada vegada.
- Es retira el fixador i s'afegeixen 10 gotes d'acètic diluït (4ml d'àcid acètic en 6ml d'aigua destil·lada) i es deixa actuar 10 minuts. En el cas que només hi hagi una sola càpsula s'afegeixen el doble de gotes.
- S'ajuda a disgregar el material amb una pipeta de vidre estèril amb la punta trencada.
- Es realitza l'extensió en una màquina extensora (extensor de vellositats) a una temperatura de 37°C. Es diposita la suspensió obtinguda en els portaobjectes i quan la gota s'ha reduït a una quarta part, es decanta el portaobjectes i es deixa assecar a temperatura ambient.
- Les preparacions obtingudes s'hidraten 3-4 segons submergint-les en aigua de l'aixeta.

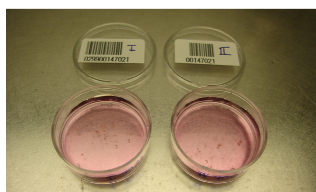
L'envelliment i tinció de les preparacions es realitza seguint el mateix protocol que el de les mostres de LA.

Cultiu llarg

Muntatge de la mostra:

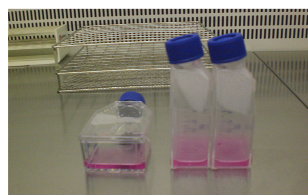
- Partim de la mostra arribada amb medi de cultiu. Es treu el medi i afegim 1-2 ml de tripsina per disgregar la mostra (disgregació mecànica i enzimàtica) durant 10 minuts amb l'ajut de dues agulles, es fan bocinets molt petits.
- Es recull tot en un tub de centrifuga, s'afegeix medi de cultiu i es centrifuga.
- S'elimina el sobrenedant i el botó cel·lular es resuspèn aproximadament en 2 ml de medi de cultiu. Es pipeteja enèrgicament per acabar de disgregar els agregats cel·lulars i el contingut es traspassa a 2 o 3 flascons de cultiu, es guarden a la incubadora.
- Al sisè o setè dia es comprova amb el microscopi invertit l'existència de cèl·lules adherides a la base del flascó de cultiu.

A partir d'aquest punt, tant pel que fa al control del creixement, el processat de la mostra i l'envelliment i tinció de les preparacions, es procedeix de igual forma que amb les mostres de líquid amniòtic.



Cultiu Curt

- 14 -18 h a l'incubador
- Hipotònic
- Fixadors
- Acètic
- Extensions
- Tinció
- Estudi



Cultiu Llarg

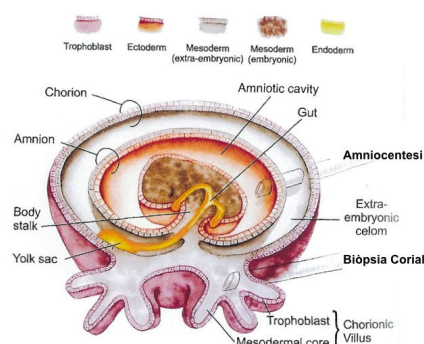
- Disgregació amb tripsina
- 7 dies a l'incubador
- Control creixement
- Trypsina
- Canvi de medi
- Hipotònic
- Fixadors
- Extensions
- Tinció
- Estudi

Figura 18
Esquema del processat de vellositats corials

Expressió de resultats

L'expressió de resultats també segueix les mateixes pautes que s'utilitzen per l'estudi de LA, però en aquest cas, s'analitzen 10 metafases del cultiu curt i 10 metafases del cultiu llarg, si no es disposa de cultiu curt s'analitzaran 20 metafases del cultiu llarg procedents de 2 cultius independents. En casos de discrepància de resultats entre els dos tipus de cultiu, es sol licitarà mostra de LA.

	Biòpsia Corial	Amniocentesis
Setmanes gestació	12	16
Mostra	VC	LA
Obtenció	Transcervical Transabdominal	Transabdominal
Cèl·lules estudiades	Citotrofoblaste - Mesènquima	amniòcits
Temps de resultat	24h -15 dies	15 dies
Resolució de bandes	400pb	550pb
Discrepàncies entre cultius	Sí	No
Risc pèrdues fetals	Més elevat	Meny elevat



Taula 9 - Figura 19

A forma de resum, podem veure les principals diferències entre l'amniocentesis i la biòpsia de còrion.

Tècniques moleculars

En aquest últim any, en el nostre centre s'ha substituït la tècnica de FISH per la tècnica de QF-PCR ja que és més ràpida tant pel que fa a la tècnica (manual *versus* automatitzada) com pel que fa a l'anàlisi de resultats (30 minuts per mostra *versus* 5 minuts). També ens permet detectar contaminacions per cèl·lules maternes (la FISH només pot fer-ho en els casos de fetus XY) i veure l'origen del cromosoma extra, si és matern o patern. A més és una tècnica molt més econòmica.

Hibridació in situ fluorescent (FISH)

Les sondes utilitzades són de la casa IZASA i venen en un kit comercial, l'Aneuvysion. El kit es conserva en el congelador i es protegeix de la llum ja que porta un marcatge fluorescent. El kit conté 3 vials:

- Un vial conté les sondes centromèriques: CEPX SpectrumGreen a la regió Xp11.1-q11.1, CEPY SpectrumOrange a la regió Yp11.1-q11.1 i CEP18 SpectrumAqua a la regió 18p11.1-q11.1. Aquestes sondes hibriden amb les regions α -satèl·lit de les regions centromèriques dels cromosomes, són regions de seqüències repetitives molt conservades

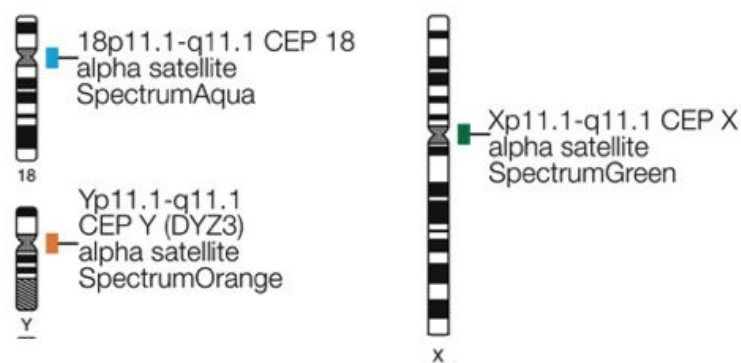


Figura 20

Localització de les sondes centromèriques.

- L'altre vial conté les sondes de seqüència única que marquen regions concretes del cromosoma a analitzar. El cromosoma 13: LSI 13 SpectrumGreen a la regió 13q14 que conté seqüències úniques de DNA del gen RB1, de mida de 180 kb, la sonda s'estén 110-170 kb en direcció 5' i 120 kb en direcció 3'. La mida real de la sonda és de 440 kb. El cromosoma 21: LSI 21 SpectrumOrange a la regió 21q22.13-q22.2 que conté seqüències úniques de DNA complementaries als loci D21S259, D21S341 i D21S342. La mida de la sonda és de 200 kb.

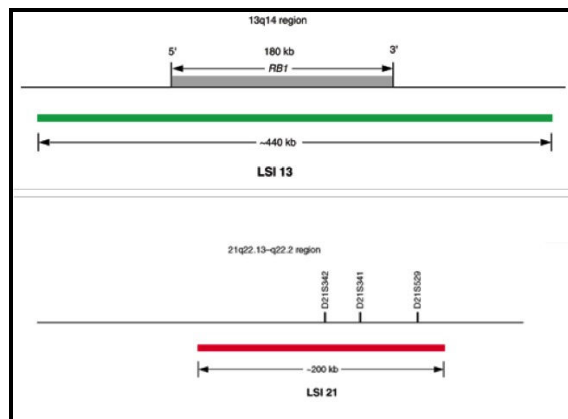


Figura 21

Localització de les sondes de seqüència única dels cromosomes 13 (verd) i 21 (vermell).

- El tercer vial conté el DAPI, la contraindicació que ens permetrà visualitzar els nuclis per localitzar les senyals d'hibridació.

Processat de la mostra

- S'agafen entre 2 i 5 mL de líquid amniòtic en un tub cònic i es centrifuga 10 minuts a 2500 rpm (les condicions de centrifuga sempre són les mateixes).
- S'elimina el sobrenadant i es resuspen el botó cel·lular amb 5 ml de Tripsina que es deixa actuar 10 minuts a 37°C (aquest pas és opcional).
- Es centrifuga, s'aspirar el sobrenadant i es resuspen el botó cel·lular.

A partir d'aquest punt, es segueix el mateix protocol de la tècnica de processat de líquids amniòtics amb la diferència que en aquest cas es resuspen el botó cel·lular amb vòrtex i les mostres es mantenen a la nevera en els temps de fixador.

Extensions: Quan es volen realitzar les extensions es centrifuga i es resuspen el botó cel·lular amb el mínim sobrenadant per concentrar la mostra. Es llença una gota a mà alçada en cada portaobjectes damunt la placa d'extensions a 37°C. Es marquen les dues àrees d'hibridació amb un llapis de diamant.

Hibridació: Un cop tenim el portaobjectes sec, s'afageixen 5µl de sonda damunt l'àrea a hibridar, es cobreix amb un cubreobjectes de 18x18mm i es segella amb cola.

- Per a la sonda X,Y i 18 es deixa damunt la placa calefactora 3 minuts a 74°C.
- Per a la sonda 13 i 21 es deixa damunt la placa calefactora 5 minuts a 75°C.

Els portaobjectes es guarden en una cambra humida i fosca a 37°C i s'incuben durant tota la nit.

Rentats: Es treuen els cubreobjectes i es banyen les extensions en solució 0.4xSSC/0.3% detergent a 73°C ±1° durant 2 minuts. Posteriorment es sumergeixen en solució 2xSSC/0.1% detergent a temperatura ambient entre 5 i 60 segons i es deixen eixugar a l'aire.

S'apliquen 10µl de DAPI sobre l'àrea d'hibridació, es col·loca un cubreobjectes i es mantenen congelades a -20°C i a les fosques fins al seu estudi.

Expressió de resultats: Es realitza l'anàlisi dels senyals d'hibridació en el microscopi de fluorescència, es conten un mínim de 50 nuclis. En els casos de mostra hemàtica s'analitza un nombre més elevat de nuclis.

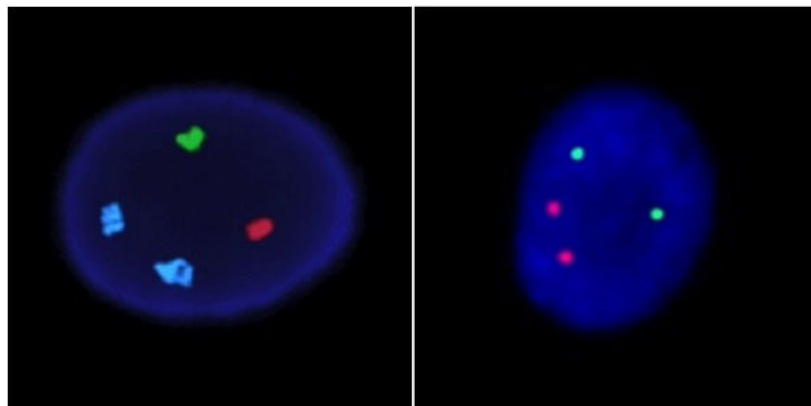


Figura 22

Imatge de FISH, sexe cromosòmic masculí normal per els cromosomes analitzats. Esquerra: verd (cromosoma X), vermell (cromosoma Y), blau (cromosoma 18). Dreta: verd (cromosoma 13) vermell (cromosoma 21).

Reacció en cadena de la polimerasa - quantitativa fluorescent (QF-PCR)

L'anàlisi de la QF-PCR requereix d'una extracció de l'ADN de la mostra, una amplificació dels diferents marcadors que s'analitzen i una seqüenciació per visualitzar els resultats.

Per l'estudi es fa servir el kit comercial Devyser Compact de la casa Palex. Es conserva guardat en el congelador i protegit de la llum ja que està marcat amb fluorescència. El vial és per 50 determinacions i s'al·liqüota en tubs d'Eppendorfs de 20 µl per evitar congelar i descongelar el material. S'analitzen els següents marcadors:

Marcador	Localització	Rango de tamaño del marcador (bp)*		Color marcado
		POP-4/POP-6	POP-7	
13A	13q12.12	234 - 327	232 - 323	Verde
13B	13q21.32	370 - 430	365 - 425	Azul
13C	13q31.3	425 - 474	425 - 474	Amarillo
13D	13q13.3	420 - 490	413 - 479	Verde
18B	18q12.3	180 - 228	180 - 228	Amarillo
18C	18q12.3	298 - 350	298 - 350	Azul
18D	18q22.1	330 - 408	325 - 403	Verde
18I	18q21.31	360 - 415	360 - 415	Amarillo
18J	18p11.31	430 - 487	430 - 487	Rojo
21A	21q21.3	150 - 205	150 - 207	Azul
21B	21q21.1	220 - 283	220 - 285	Azul
21C	21q22.3	256 - 350	256 - 353	Amarillo
21D	21q22.13	440 - 492	440 - 492	Azul
21H	21q21.3	360 - 415	360 - 415	Verde
21I	21q21.1	105 - 150	105 - 150	Amarillo

Marcador	Localització	Rango de tamaño del marcador (bp)*		Color marcado
		POP-4/POP-6	POP-7	
XY1	Xp22.22	X = 105	X = 106	Verde
	Yp11.2	Y = 110 (+/- 2bp)	Y = 112 (+/- 2bp)	
XY2	Xq21.3	180 - 220	182 - 222	Verde
	Yp11.31			
X1	Xq26.2	120 - 170	120 - 170	Verde
X2	Xq13.1	230 - 260	230 - 260	Rojo
X4	Xq21.33	290 - 350	290 - 350	Rojo
Y1	Yp11.31	235 (+/- 2bp)	236 (+/- 2bp)	Amarillo
7X	7q34	7 = 183	7 = 184	Rojo
	Xq13	X = 203 (+/- 2bp)	X = 204 (+/- 2bp)	

Taula 10

Localització cromosòmica dels marcadors STR analitzats en el kit comercial Devyser Compact.

Extracció de DNA

- S'agafen 2 ml de LA o una branca de VC trocejada en un tub estèril de 2 ml
- Es centrifuga durant 5' a 3000 rpm.

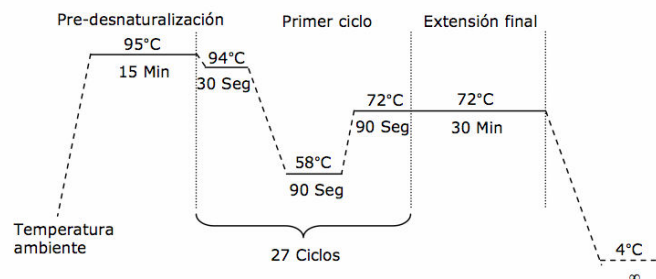
Si el pellet és hemàtic, s'aspira el sobrenadant i s'afegeix 1 ml d'H₂O estèril que es deixa actuar 2' a T^a ambient i es centrifuga una altra vegada.

Un cop tenim el pellet net:

- Treiem el sobrenadant i s'afegeixen 150 µl de RA (estabilitzador d'àcids nucleics) i s'homogeneïtza.
- Es realitza l'extracció de DNA amb el QiaCUBE.

Amplificació de la mostra

- Per cada mostra treiem del congelador un tub d'Eppendorf al·liqüotat amb 20 µl de la "master mix" del Devyser Compact i li afegim 5µl de DNA de la mostra. Es posa en el termociclador perquè ens amplifiqui els marcadors STR amb el següent programa:



Seqüenciació de resultats

Preparem les mostres per analitzar-les amb el seqüenciador ABIPrism 3130 i l'aplicació del GeneScan.

- En un tub d'Eppendorf identificat posem:
 - 15 µl de formamida
 - 0'1 µl de LIZ
 - 1'5 µl del producte de PCR o del producte de dilució
- S'homogenitza amb vórtex 15" i es realitza un xoc tèrmic durant 2' a 95°C per separar les cadenes de ADN.
- Carreguem el volum total de l'ependorf a la placa del seqüenciador que ens seqüenciarà la mostra.

Anàlisi de resultats

La quantitat relativa de cada al·lel es quantifica mitjançant la relació alçada/àrea entre determinats pics del cromatograma. En una mostra diploïd (normal) els dos al·lels d'un marcador STR determinat s'identifiquen com a dos pics en relació 1:1 (heterozigot per aquest marcador) o d'un únic pic (homozigot per aquell marcador). L'identificació d'un tercer al·lel apareix com a un tercer pic en relació 1:1:1 o bé com a dos en relació 2:1 o 1:2, el que ens portaria a concloure la presència d'un tercer cromosoma, com succeeix en els casos de trisomia. Es necessitem com a mínim 2 marcadors informatius de cadascun dels cromosomes per poder donar un resultat.

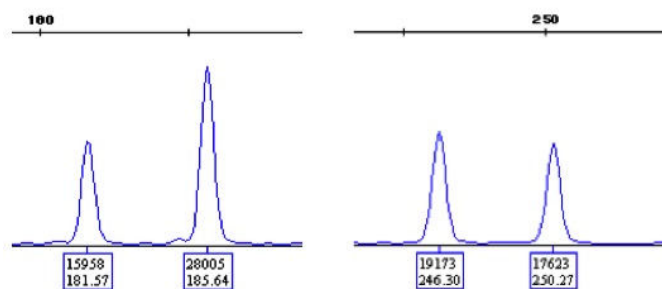


Figura 23

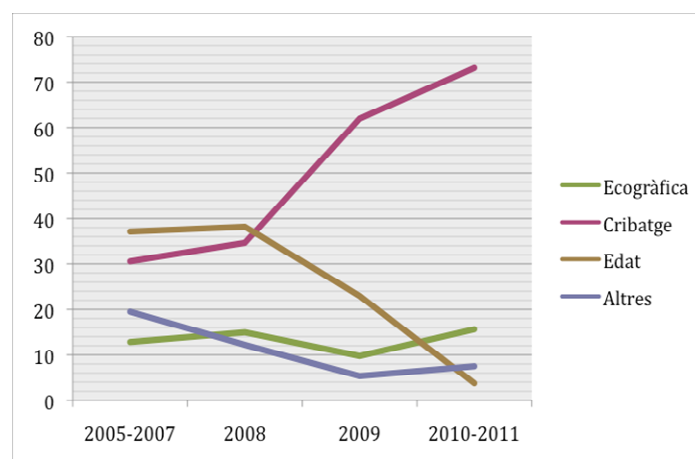
Esquerra: marcador dial·lèlic de trisomia 1:2. Dreta: marcador dial·lèlic de disomia heterozigota 1:1.

Resultats

Descriptiva de líquids amniòtics

L'anàlisi citogenètic convencional en mostres de líquid amniòtic s'incorpora en el nostre centre a partir de l'any 1999.

Les principals indicacions clíniques per realitzar una amniocentesi han anat canviant al llarg dels anys. Aquests canvis es poden visualitzar en el gràfic:



Gràfic 1

Percentatges de les indicacions clíniques per realitzar una amniocentesi al llarg dels anys.

Altres: inclou anomalia cromosòmica en anteriors gestacions, progenitor portador d'un reordenament cromosòmic o angoixa materna.

En el total de les 3523 mostres analitzades de LA vam obtenir resultat en 3498 (99,29%) mostres i en 25 (0,71%) de les mostres no es va obtenir resultat citogenètic: en 4 (16%) per creixement insuficient, en 6 (24%) per mostra insuficient, i en 15 (60%) per problemes tècnics.

Tenim un total de 3498 mostres amb resultat citogenètic de LA, de les quals 3415 (97,63%) presentaven un cariotip normal i 83 (2,37%) presentaven un cariotip alterat: 74 (2,11%) tenien significació clínica i les 9 (0,25%) mostres restants eren alteracions heretades d'algun dels progenitors. De les 74 mostres amb cariotip alterat i significació clínica, 63 (85,14%) eren anomalies numèriques i 11 (14,86%) eren anomalies estructurals *de novo*.

Segons l'anomalia cromosòmica i la indicació clínica per la que es va realitzar la prova invasiva, podem calcular el valor predictiu positiu (VPP) per cada tipus d'anomalia cromosòmica.

	Trisomia 13	Trisomia 18	Trisomia 21	Cromosomes sexuals	altres numèriques	estructurals	MCP
Edat materna avançada	0,22	0,66	1,32	1,54	0,22	1,32	0
Cribatge prenatal	0,16	0,32	2,85	0,47	0,16	0,95	0
Anomalia ecogràfica	1,05	1,05	2,11	1,05	1,58	0,52	0
Altres	0	0	2,43	1,47	0,91	0,97	0

Taula 11

Valor predictiu positiu (VPP) de les diferents indicacions clíniques per realitzar una amniocentesi segons l'anomalia cromosòmica.

La tècnica de FISH s'incorpora al laboratori a partir de l'any 2004 i es realitza fins al febrer de 2010 que és substituïda per la tècnica de QF-PCR.

Amb la tècnica de **FISH**, s'han analitzat 1066 mostres de líquid amniòtic de les que s'obtenen 1028 (96,43%) mostres normals, 37 (3,47%) mostres patològiques i 1 (0,09%) mostra sense resultat per falta de nuclis.

Un cop s'analitza el cariotip, veiem que tots els resultats patològics per FISH van ser confirmats per citogenètica convencional i que dels 1028 casos normals, 17 (1,65%) presentaven un cariotip alterat, dels quals 9 (52,94%) casos tenien significació clínica o si més no, presentaven un risc d'anomalia fetal més alt per ser anomalies *de novo* i els 8 (47,06%) restants presentaven un risc més baix per ser anomalies heretades d'un dels progenitors. Cap d'aquestes anomalies es podia haver detectat per FISH.

Nº	Mostra	FISH	Cariotip	Resultat
25	LA	Normal	46,XY,t(15;18)(q22.1;q21.3)dn	SC
29	LA	Normal	46,XX,del(18)(p11.2)dn	SC
30	LA	Normal	47,XX,+22[13]/46,XX[5]	SC
32	LA	Normal	47,XY,+mar[13]/46,XY[11]dn	SC
40	LA	Normal	46,XX,inv(5)(q22q31.3)mat	NSC
44	LA	Normal	46,XX,t(1;3)(p32;p25)dn	SC
48	LA	Normal	47,XY,+mar dn	SC
49	LA	Normal	46,XX,t(10;15)(p13;q13)pat	NSC
52	LA	Normal	45,XY,der(14;15)(q10;q10)mat	NSC
53	LA	Normal	47,XX,+12[7]/46,XX[15]dn	SC
54	LA	Normal	46,XX,t(8;9)(q24.3;p22)pat	NSC
59	LA	Normal	46,XY,inv(3)(q12q29)mat	NSC
62	LA	Normal	46,XX,t(1;6)(p22;q15)pat	NSC
66	LA	Normal	46,XX,t(3;9)(p21;q22)dn	SC
68	LA	Normal	47,XY,+mar mat	NSC
70	LA	Normal	45,XX,der(14;21)(q10;q10)dn	SC
71	LA	Normal	46,XY,t(9;14)(p22;q22)pat	NSC

Taula 12

Casos amb citogenètica convencional alterada i FISH normal.
SC: tenen significació clínica. NSC: no tenen significació clínica.

Amb la tècnica de **QF-PCR** s'han analitzat 133 mostres de LA on trobem: 121 (91%) mostres normals, 9 (6,76%) patològiques i 3 (2,24%) incompletes (un dels cromosomes no tenia un mínim de 2 marcadors informatius. En els 3 casos era el cromosoma 13, és el que té un menor nombre de marcadors STR).

Un cop s'analitza el cariotip, veiem que tots els resultats patològics per QF-PCR van ser confirmats per citogenètica convencional i que dels 121 casos normals per QF-PCR, 2 (1,65%) presentaven un cariotip alterat i tenien significació clínica. Dels 2 casos, en 1 s'hauria d'haver detectat l'anomalia per QF-PCR, afectava al cromosoma X, per tant tenim un 0,82% de falsos negatius.

Nº	Mostra	QF-PCR	Cariotip	Resultat
80	LA	Normal	46,XY,add(3)(q25)dn	SC
83	LA	Normal	45,X [11] /46,X,del(X)(q26q28)[29]	SC

Taula 13

Casos amb citogenètica convencional alterada i QF-PCR normal.

SC: tenen significació clínica.

Nº	Estat	Indicació	FISH	Cariotip	Diagnòstic	Desició
1	39	Edat	-	46,del(4)(p16)	S. Wolf-Hirschhorn	ILE
2	25	Desconeguda	-	47,XY,+21	S. Down	NC
3	34	Cribatge	-	46,XY,t(2;12)(p25;q22)mat	Heretat	Part
4	33	Ecogràfica	-	47,XX,+21	S. Down	ILE
5	35	Cribatge	-	47,XY,+21	S. Down	NC
6	30	Desconeguda	-	49,XXXXY	S. Klinefelter	ILE
7	36	Desconeguda	-	46,XY,der(13)	SC	ILE
8	36	Desconeguda	-	47,XX,+21[24]/46,XX[8]	S. Down	NC
9	36	Antecedents	-	47,XY,+mar[4]/46,XY[14]dn	SC	NC
10	28	Ecogràfica	-	47,XX,+18	S. Edwards	ILE
11	33	Cribatge	-	47,XY,+18	S. Edwards	ILE
12	43	Edat	-	47,XX,+18	S. Edwards	ILE
13	36	Cribatge	-	47,X,inv(Y)(p11q11),+21	S. Down	NC
14	40	Edat	-	45,X[7]/47,XXX[28]	S. Turner	Part
15	22	Cribatge	-	47,XX,+21	S. Down	ILE
16	35	Cribatge	-	47,XX,+21	S. Down	ILE
17	36	Cribatge	-	47,XX,+18	S. Edwards	ILE
18	33	Desconeguda	-	47,XX,+21	S. Down	ILE
19	36	Ecogràfica	A	47,XY,+13	S. Patau	ILE
20	38	Edat	A	47,XX,+21	S. Down	ILE
21	17	Desconeguda	A	45,X	S. Turner	ILE
22	32	Desconeguda	A	47,XX,+21	S. Down	ILE
23	31	Cribatge	A	47,XY,+21	S. Down	ILE
24	41	Desconeguda	A	47,XY,+21	S. Down	ILE
25	38	Edat	N	46,XY,t(15;18)(q22.1;q21.3)dn	SC	NC
26	38	Edat	A	47,XXY	S. Klinefelter	ILE
27	40	Cribatge	A	47,XY,+21	S. Down	ILE
28	42	Edat	A	47,XX,+21	S. Down	ILE
29	40	Ecogràfica	N	46,XX,del(18)(p11.2)dn	SC	ILE
30	46	Ecogràfica	N	47,XX,+22[13]/46,XX[5]	SC	ILE
31	29	Angoixa	A	47,XXX	S. Triple X	Part
32	37	Ecogràfica	N	47,XY,+mar[13]/46,XY[11]dn	SC	Part
33	34	Cribatge	A	47,XX,+21	S. Down	NC
34	29	Ecogràfica	A	47,XX,+21	S. Down	AD
35	29	Cribatge	A	47,XX,+21	S. Down	ILE
36	30	Ecogràfica	A	69,XXX	Triploidia	AD
37	39	Edat	A	47,XXX	S. Triple X	NC
38	39	Edat	A	47,XX,+21	S. Down	ILE
39	28	Cribatge	A	47,XX,+21	S. Down	ILE

40	30	Antecedents	N	46,XX,inv(5)(q22q31.3)mat	Heretat	Part
41	29	Ecogràfica	A	47,XXY	S. Klinefelter	ILE
42	39	Cribatge	A	47,XY,+13	S. Patau	NC
43	29	Antecedents	A	45,X	S. Turner	ILE
44	31	Cribatge	N	46,XX,t(1;3)(p32;p25)dn	SC	ILE
45	41	Edat	A	47,XXY	S. Klinefelter	Part
46	38	Edat	A	47,XXY	S. Klinefelter	AD
47	38	Ecogràfica	A	47,XY,+21	S. Down	ILE
48	37	Edat	N	47,XY,+mar	SC	ILE
49	34	Cribatge	N	46,XX,t(10;15)(p13;q13)pat	Heretat	Part
50	40	Edat	A	47,XY,+13	S. Patau	ILE
51	29	Cribatge	A	47,XY,+21	S. Down	ILE
52	40	Edat	N	45,XY,der(14;15)(q10;q10)mat	Heredat	Part
53	22	Cribatge	N	47,XX,+12[7]/46,XX[15]dn	SC	Part
54	39	Edat	N	46,XX,t(8;9)(q24.3;p22)pat	Heretat	Part
55	43	Edat	A	47,XXY	S. Klinefelter	ILE
56	34	Ecogràfica	A	47,XX,+18[11]/46,XX[11]	S. Edwards	NC
57	42	Edat	A	47,XY,+21	S. Down	ILE
58	35	Cribatge	A	47,XX,+21	S. Down	ILE
59	37	Cribatge	N	46,XY,inv(3)(q12q29)mat	Heretat	Part
60	41	Edat	A	47,XXX	S. Triple X	ILE
61	38	Edat	A	47,XY,+21	S. Down	NC
62	38	Edat	N	46,XX,t(1;6)(p22;q15)pat	Heredat	Part
63	35	Ecogràfica	A	46,XY,+13,der(13)t(13;21)(q32.3;q22.1)mat,-21	S. Patau	Part *
64	38	Ecogràfica	A	47,XX,+21	S. Down	ILE
65	35	Edat	A	47,XX,+21	S. Down	ILE
66	26	Cribatge	N	46,XX,t(3;9)(p21;q22)dn	SC	Part
67	25	Edat	A	47,XX,inv(2)(p11.2q13),+18	S. Edwards	AD
68	25	Antecedents	N	47,XY,+mar mat	Heredat	Part
69	39	Edat	A	47,XX,+18	S. Edwards	Part *
70	34	Edat	N	45,XX,der(14;21)(q10;q10)dn	SC	Part
71	30	Cribatge	N	46,XY,t(9;14)(p22;q22)pat	Heretat	Part
72	41	Cribatge	A	47,XY[7]/46,XY[15]	S. doble Y	ILE
73	38	Cribatge	A	47,XX,+21	S. Down	Part *
74	40	Cribatge	A	47,XY,+21	S. Down	ILE
75	35	Cribatge	A	47,XY,+21	S. Down	ILE
76	42	Cribatge	A	47,XX,+21	S. Down	ILE
77	37	Cribatge	A	47,XX,+21	S. Down	ILE
78	41	Cribatge	A	47,XXX	S. Triple X	Part
79	29	Cribatge	A	47,X,i(X)(q10),Y	S. Klinefelter	Part
80	32	Angoixa	N	46,XY,add(3)(q25)	Risc Patològic	ILE
81	38	Cribatge	A	47,XY,+21	S. Down	ILE
82	39	Cribatge	A	47,XY,+21	S. Down	ILE
83	35	Ecogràfica	N	45,X [11] / 46,X,del(X)(q26q28)[29]	S. Turner	ILE

Taula 14

Descriptiva dels casos patològics en mostres de LA.

A: alterat, N: normal, - : tècnica no realitzada, SC: Amb significació clínica, ILE: interrupció legal de l'embaràs, AD: avortament diferit, NC: no consten les dades, Part*: mort neonatal.

Alguns exemples de casos patològics:

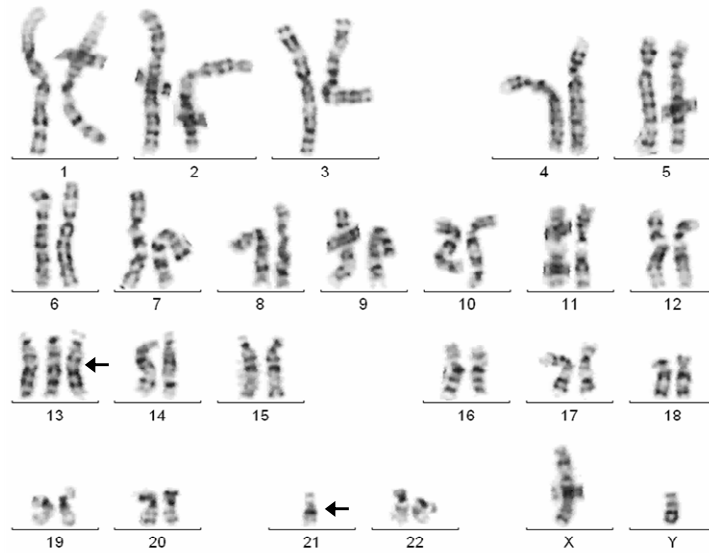


Figura 24

Cariotip patològic en líquid amniòtic (LA). Cas n° 63: 46,XY,+13,der(13)t(13;21)(q32.3;q22.1)mat,-21

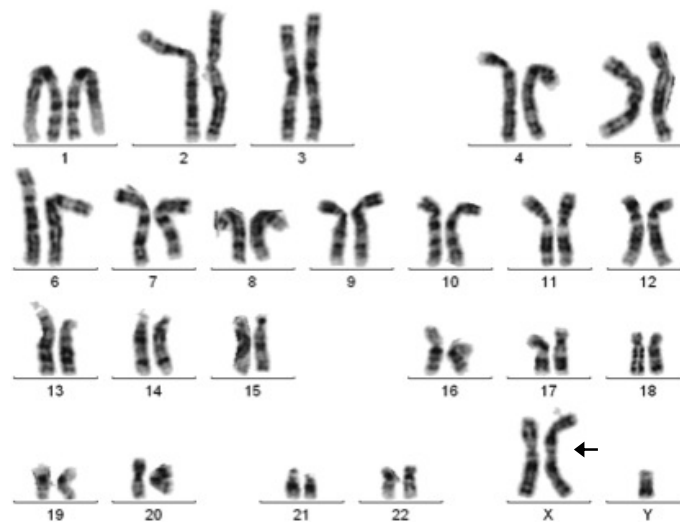


Figura 25

Cariotip patològic en líquid amniòtic (LA). Cas n° 79: 47,X,i(X)(q10),Y[22]

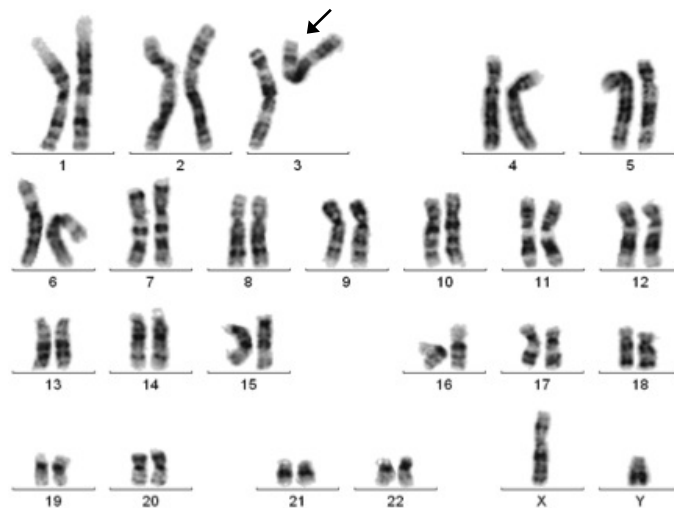
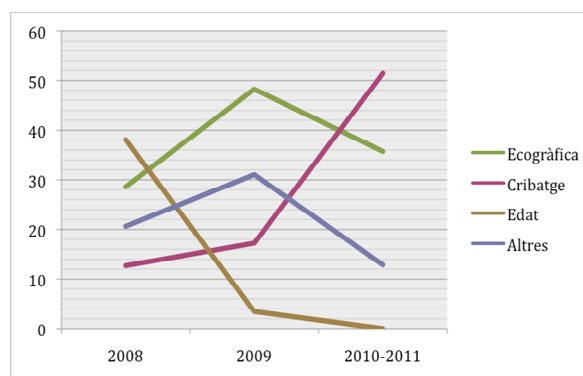


Figura 26
Cariotip patològic en líquid amniòtic (LA). Cas nº 80: 46,XY,add(3)(q25) [22]

Descriptiva de vellositats corials

L'estudi citogenètic convencional en mostres de vellositats corials s'incorpora en el nostre centre a partir de l'any 2008.

Les principals indicacions clíniques de prova invasiva en mostres de VC han anat canviant amb els anys. Ho podem veure en el gràfic:



Gràfic 2

Percentatges de les indicacions clíniques per realitzar una biòpsia de còrion al llarg dels anys.

Altres: inclou anomalia cromosòmica en gestació anterior, progenitor portador d'un reordenament cromosòmic o angoixa materna.

En el total de les 184 mostres analitzades de VC vam obtenir resultat en 179 (97,28%) casos i en 5 (2,72%) casos no es va obtenir resultat citogenètic, en 2 (40%) per contaminació de la mostra i en 3 (60%) perquè la mostra remesa era teixit matern.

Tenim un total de 179 mostres amb resultat citogenètic de les quals 157 (87,71%) presentaven un cariotip normal i 22 (12,29%) presentaven un cariotip alterat: 19 (10,61%) tenien significació clínica i les 3 (1,67%) mostres restants eren mosaics confinats a placenta. No es van detectar anomalies estructurals.

Segons l'anomalia cromosòmica i la indicació clínica per la que estava orientada la prova invasiva, podem calcular el valor predictiu positiu (VPP) per cada tipus d'anomalia cromosòmica:

	Trisomia 13	Trisomia 18	Trisomia 21	Cromosomes sexuals	altres numèriques	estructurals	MCP
Edat materna avançada	0	0	8	4	0	0	0
Cribatge prenatal	0	2,04	2,04	0	0	0	2,04
Anomalia ecogràfica	1,75	5,26	8,77	5,26	0	0	1,75
Altres	0	0	3,22	3,22	0	0	3,22

Taula 15

Valor predictiu positiu (VPP) de les diferents indicacions clíniques per realitzar unabiòpsia de còrion segons l'anomalia cromosòmica.

Es realitza la QF-PCR de 74 mostres de VC on trobem: 68 (91,90%) mostres normals i 6 (8,10%) patològiques. Un cop s'analitza el cariotip, veiem que tots els resultats patològics per QF-PCR van ser confirmats per citogenètica convencional i que dels 68 casos normals, 2 (2,94%) presentaven un cariotip alterat, sense significació clínica, eren MCP. Dels 2 casos, en un sí s'hauria d'haver detectat l'anomalia ja que afectava al cromosoma 21, per tant tenim un 1,47% de falsos negatius.

Nº	Mostra	QF-PCR	Cariotip	Resultat
15	VC	Normal	47,XX,+7/46,XX	NSC
16	VC	Normal	48,XY,+2,+21[10]/46,XY[42]	NSC

Taula 16

Casos amb citogenètica convencional alterada i QF-PCR normal.

NSC: no tenen significació clínica.

Des de la implementació en el nostre centre de la tècnica de vellositats corials (2008) fins a la implementació de la tècnica de la QF-PCR (març de 2010), de totes les mostres de vellositats corials rebudes s'enviava una petita branca per l'estudi de la QF-PCR a l'Hospital Clínic de Barcelona, van ser un total de 95 mostres, de les quals 20, es van realitzar en paral·lel per estandarditzar la tècnica en el nostre centre. Aquestes dades no s'analitzen en aquest estudi.

Nº	Edat	Indicació	QF-PCR	Cariotip	Diagnòstic	Decisió
1	44	Edat	-	47,XXY	S. Klinefelter	ILE
2	41	Edat	-	47,XY,+21	S. Down	ILE
3	29	Ecogràfica	-	47,XX,+18	S. Edwards	ILE
4	33	Ecogràfica	-	47,XX,+18	S. Edwards	ILE
5	37	Ecogràfica	-	47,XY,+18	S. Edwards	ILE
6	24	Ecogràfica	-	92,XXXX[5]/46,XX[7]	MCP III	Part
7	44	Ecogràfica	-	47,XX,+21	S. Down	ILE
8	41	Ecogràfica	-	47,XX,+21	S. Down	Part
9	39	Ecogràfica	-	45,X/46,XX	S. Turner	AD
10	39	Ecogràfica	-	47,XX,+21	S. Down	ILE
11	29	Ecogràfica	-	47,XX,+21	S. Down	ILE
12	36	Antecedents	-	47,XY,+21	S. Down	ILE
13	31	Ecogràfica	-	45,X	S. Turner	ILE
14	39	Antecedents	-	47,XXY	S. Klinefelter	ILE
15	35	Cribatge	N	47,XX,+7/46,XX	MCP I	Part
16	38	Ecogràfica	A	47,XY,+13	S. Patau	AD
17	39	Cribatge	A	47,XX,+18	S. Edwards	ILE
18	33	Antecedents	N	48,XY,+2,+21[10]/46,XY[42]	MCP II	Part
19	29	Ecogràfica	A	47,XX,+21	S. Down	ILE
20	28	Ecogràfica	A	45,X [20]	S. Turner	ILE
21	45	Edat	A	47,XX,+21[20]	S. Down	ILE
22	38	Cribatge	A	47,XX,+21[8]	S. Down	ILE

Taula 17

Descriptiva dels casos patològics en mostres de primer trimestre de gestació

A: alterat, N: normal, -: tècnica no realitzada en el nostre centre, ILE: interrupció legal de l'embaràs, AD: avortament diferit.

Alguns exemples de casos patològics:

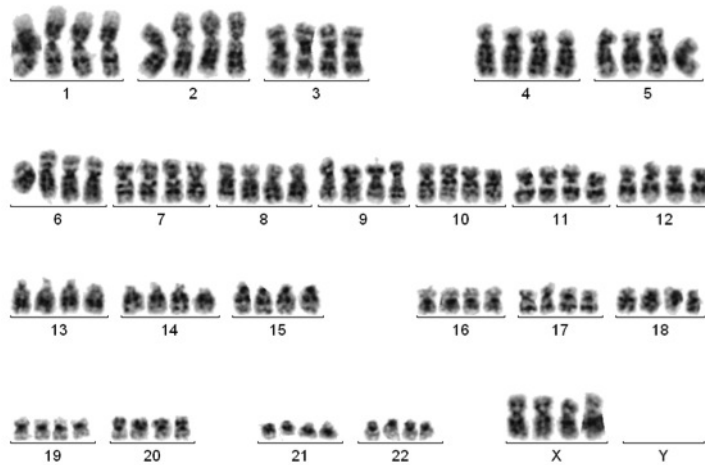


Figura 27

Cariotip patològic en vellositats corials (VC). Cas n° 6: 92,XXXX[5]/46,XX[7]

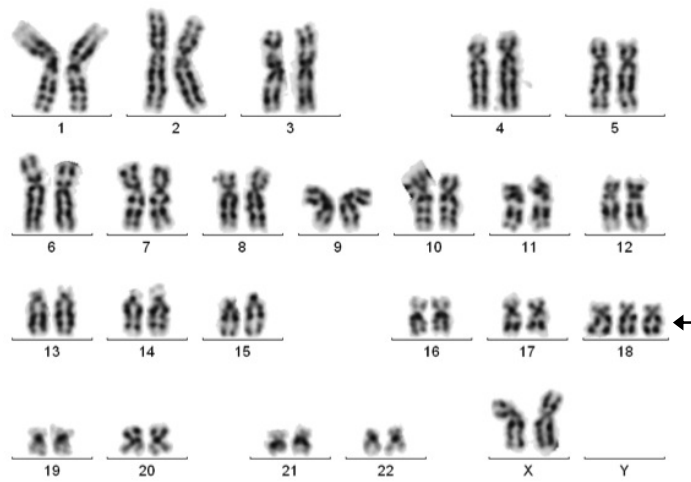


Figura 28

Cariotip patològic en vellositats corials (VC). Cas n° 17: 47,XX,+18[22]

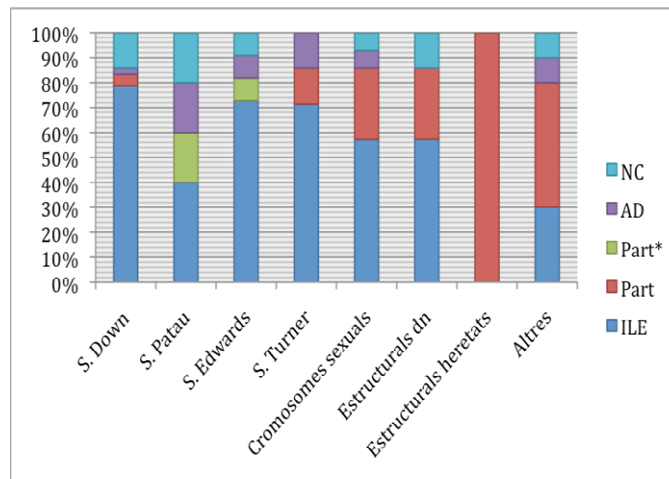
Decisió de les gestants

De les 83 mostres de líquid amniòtic amb resultat citogenètic alterat, 4 (4,82%) van ser avortaments diferits, 47 (56,63%) van fer una interrupció legal de l'embaràs (ILE), 21 (25,3%) van continuar amb la gestació i d'11 (13,25%) casos desconeixem la decisió presa.

Dels 21 casos que van continuar amb la gestació, 3 (14,28%) van ser morts neonatals i 18 (85,72%) van néixer però no es té informació sobre el seguiment del neonat.

De les 22 mostres de vellositats corials amb resultat citogenètic alterat, 2 (9,10%) van ser avortaments diferits, 16 (72,73%) van fer una ILE i 4 (18,18%) van continuar amb la gestació.

En el gràfic podem veure com el tipus d'anomalia cromosòmica influeix en la decisió de les parelles. En aquest cas separem la Síndrome de Turner de les altres anomalies dels cromosomes sexuals per la diferent repercussió clínica de la malaltia:



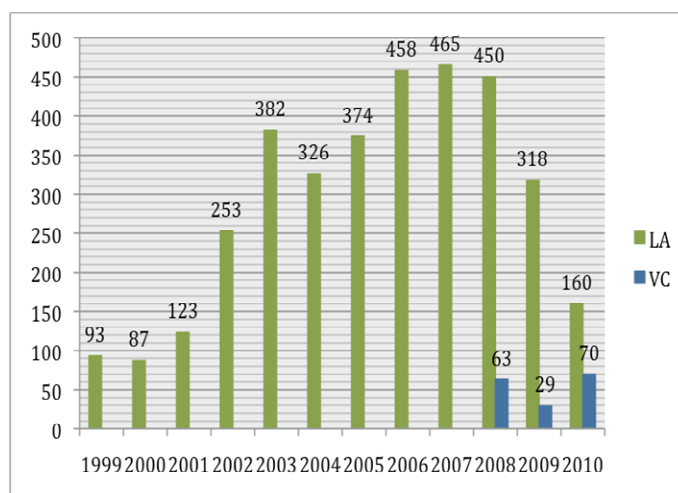
Gràfic 3

Percentatge de la decisió final de la gestació segons l'anomalia cromosòmica.

AD: Avortament diferit, ILE: interrupció legal de l'embaràs, NC: no tenim informació de la decisió presa, Part*: mort neonatal, Altres: inclou altres aneuploidies o cromosomes marcadors.

Descriptiva dels resultats globals

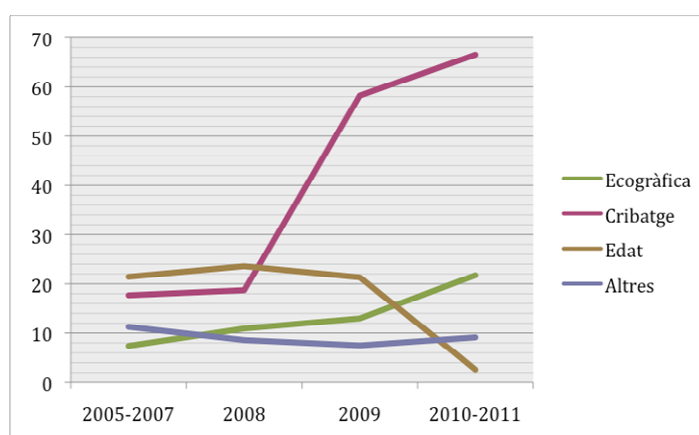
Des de 1999 fins al març de 2011, s'han analitzat un total de 3707 mostres prenatales de les quals 3523 són líquids amniòtics i 184 són vellositats corials. El total de mostres de LA i VC en funció dels anys analitzades en el nostre laboratori es pot visualitzar en el gràfic:



Gràfic 4

Total de mostres rebudes de líquid amniòtic (LA) i vellositats corials (VC) al llarg dels anys

Les indicacions clíniques per realitzar una prova invasiva han anat canviant al llarg dels anys. Es pot visualitzar en el gràfic



Gràfic 5

Percentatges de les indicacions clíniques per realitzar una prova invasiva de primer o segon trimestre de gestació al llarg dels anys.

		3523 LA	184 VC	3707 Totals
Indicació Clínica de prova invasiva	Edat materna avançada	30,65%	15,43%	29,15%
	Cribatge prenatal	42,61%	30,25%	41,39%
	Anomalia ecogràfica	12,83%	35,18%	15,03%
	Altres	13,91%	19,14%	14,43%
Anàlisi de les Mostres	Fracàs de la tècnica	25 (0,71%)	5 (2,72%)	30 (0,81%)
	Èxit de la tècnica	3498 (99,29%)	179 (97,28%)	3677 (99,19%)
	Mostres normals	3415 (97,63%)	157 (87,71%)	3572 (97,14%)
	Mostres alterades	83 (2,37%)	22 (12,29%)	105 (2,86%)
	Alterades amb SC	74 (89,16%)	19 (86,36%)	93 (88,57%)
Anomalies cromosòmiques	Trisomia 13	4,82%	4,54%	3,81%
	Trisomia 18	8,43%	18,18%	9,53%
	Trisomia 21	39,75%	40,90%	41,90%
	Cromosomes sexuals	20,48%	22,73%	20%
	Altres numèriques	7,22%	13,63%	6,67%
	Estructurals	19,27%	0%	18,09%
Valor Predictiu Positiu	Edat materna avançada	5,29%	12%	5,64%
	Cribatge prenatal	4,91%	6,12%	5%
	Anomalia ecogràfica	7,37%	22,81%	10,93%
	Altres	9,68%	6,80%	7,17%
FISH	Mostres analitzades	1066	0	1066
	Normals	1028 (96,43%)	0	1028 (96,43%)
	Alterades	37 (3,47%)	0	37 (3,47%)
	Sense resultat	1 (0,09%)	0	1 (0,09%)
	alterats que es perden	17 (31,48%)	0	17 (31,48%)
	Es perden amb SC	9 (52,94%)	0	9 (52,94%)
	Detecció d'anomalies amb SC	99,16%	0	99,16%
	Pèrdues diagnòstiques	0,84%	0	0,84%
QF-PCR	Mostres analitzades	133	74	133
	Normals	121 (90,98%)	68 (91,89%)	189 (91,30%)
	Alterades	9 (6,77%)	6 (8,11%)	15 (7,25%)
	Inconplertes	3 (2,25%)	0%	3 (1,45%)
	alterats que es perden	2 (1,50%)	2 (2,70%)	4 (1,93%)
	Es perden amb SC	2 (100%)	0 (0%)	2 (50%)
	Detecció d'anomalies amb SC	98,50%	100%	99,04%
	Pèrdues diagnòstiques	1,50%	0%	0,96%
Resultat final de la gestació	Avortament diferit	4,82%	9,10%	5,71%
	Part	25,30%	18,18%	23,81%
	Interrupció legal de l'embaràs	56,63%	72,73%	60%
	Desconeguda	13,25%	0%	10,48%

Taula 18

Descriptiva dels resultats obtinguts

SC: tenen significació clínica. Altres: inclou antecedents d'anomalia cromosòmica en gestació anterior, progenitor portador d'un reordenament cromosòmic o angoixa materna.

Discussió

L'estudi citogenètic tant de vellositats corials com de líquid amniòtic està acceptat i permet un diagnòstic prenatal acurat. El problema principal de l'estudi en LA és que l'estudi citogenètic es fa en el segon trimestre de gestació i per tant en molts casos el resultat definitiu no està informat fins al cinquè mes i en els casos on existeix un fetus amb una anomalia cromosòmica, si es vol finalitzar la gestació, la relació feto-materna està molt establerta i la interrupció de l'embaràs és molt més traumàtica i difícil que en el primer trimestre de gestació. La utilització de les tècniques de FISH i QF-PCR avancen els resultats i són extremadament importants en els casos de no creixement o de contaminació microbiològica, serveixen per reduir l'ansietat materna fins a l'espera del cariotip i per prendre decisions ràpides en els límits d'interrupció de l'embaràs, però, aquests estudis són parcials, només informen d'alteracions numèriques dels cromosomes analitzats (13,18,21,X,Y) però no donen informació d'anomalies estructurals, ni detecten mosaics de baixa freqüència, no proporcionen tota la informació de la constitució cromosòmica fetal. Es per això que en la última dècada s'han focalitzat els esforços per desenvolupar un cribatge de primer trimestre i l'estudi citogenètic de vellositats corials per el diagnòstic prenatal d'anomalies cromosòmiques ja que permet un diagnòstic precoç: s'avancen els resultats, es disposa de més temps per realitzar proves complementàries, es poden analitzar les opcions més detingudament i permet interrompre la gestació de forma més segura i menys traumàtica (10). Aquest canvi d'estratègia ha repercutit en els estudis citogenètics.

S'observen canvis pel que fa a les indicacions clíniques per realitzar una prova invasiva. En mostres de segon trimestre la principal indicació era l'edat materna avançada (30,65%), l'únic paràmetre associat a la S. de Down, el cribatge bioquímic (42,61%) l'ha anat reemplaçant progressivament (35). Aquestes dades són superposables a les descrites en series més llargues on troben el cribatge bioquímic en el 44,1% de les indicacions i l'edat materna avançada en el 30% {{ 60 Mademont-Soler,I. 2011;}}. En el primer trimestre de gestació, l'edat materna avançada ha quedat totalment eliminada i les principals indicacions són el cribatge combinat de primer trimestre (30,25%), amb molta més sensibilitat i especificitat que el de

segon, i les anomalies ecogràfiques (35,18%), on la mesura de la translucidesa nugal juga un paper clau en el diagnòstic prenatal (2).

El nombre de mostres de LA des de l'any 1999 a l'any 2007 van anar augmentant considerablement, segurament degut a l'arribada d'extrengers en edat reproductiva i a l'augment progressiu de dones embarassades en edat avançada. A partir del 2007 s'observa una devallada del nombre de LA, moment en el qual de manera progressiva es comença a introduir el cribatge de primer trimestre, amb el consegüent augment del nombre de VC, però amb una disminució del nombre de proves invasives. En el 2007 es van realitzar 465 estudis en LA i en el 2010 es van realitzar 230 estudis (160 de LA i 70 de VC), per tant, en 3 anys s'han reduït en un 50% el nombre de proves invasives. En series publicades descriuen reduccions del 40% (36), s'ha de tenir en compte que encara no s'havia implementat el cribatge de primer trimestre.

La implementació del cribatge de primer trimestre permet una millor selecció de les gestants amb risc d'aneuploïdia, el nombre d'anomalies detectades en el primer trimestre de gestació (12,29%) és superior que el detectat en el segon trimestre (2,37%), el percentatge de detecció ha augmentat un 10%. Estudis previs mostren que la incidència d'anomalies cromosòmiques en LA està entre el 1 i el 6,7% (35) altres el descriuen del 2,9% (37). Respecte a les mostres de VC, estan descrites deteccions d'anomalies del 8,6% (38), són sensiblement més baixes que les nostres, però cal tenir en compte, com s'ha mencionat abans, que les dades en aquesta serie fan referència als resultats de 2007, abans de la implementació del cribatge de primer trimestre.

Les anomalies cromosòmiques que es detecten amb més freqüència són les aneuploïdies, a la nostra serie representen el 73% en el segon trimestre de gestació i el 86% en el primer. En tots dos trimestres l'aneuploïdia més freqüent és la trisomia 21 (del 40,90% en el primer trimestre i del 39,75% en el segon), cosa esperada ja que és l'aneuploïdia més viable i en la que es focalitzen tots els programes de cribatge, després tindrem les anomalies dels cromosomes sexuals similars en percentatges de detecció entre el primer (22,73%) i el segon (20,48%) trimestre, en tercer lloc trobem les anomalies estructurals que curiosament a primer trimestre no s'en detectaven i a segon trimestre són del 19,27%, segurament perquè la serie és molt curta ja que en series més llargues troben un 22,56% d'anomalies estructurals en mostres

de VC (38). Després trobem la trisomia 18 amb un 18,18% a primer trimestre i un 8,43% a segon. Els MCP en un 13,63% i les altres anomalies numèriques en un 7,22%. En últim lloc la trisomia 13 en un 4,54% a primer trimestre i un 4,82% a segon. Els percentatges d'anomalies cromosòmiques trobats en LA són com els descrits a la literatura (37). Pel que fa a les VC toben els mateixos percentatges tant per la trisomia 13, 18 i 21, però el percentatge d'anomalies dels cromosomes sexuals és considerablement més baix (11,30%) (38). Segurament per la gran diferència en el nombre de mostres de la sèrie (179 *versus* 3868).

Aquest augment d'anomalies cromosòmiques detectades en el primer trimestre de gestació pot ser enganyós, ja que una part d'aquestes alteracions no són viables i per tant el fetus no sobreviuria al segon trimestre. En la nostra serie tenim 2 (9,10%) casos d'anomalia cromosòmica en primer trimestre que van resultar avortaments diferits, un era un mosaic de Turner (cas nº9) i l'altre una trisomia 13 (cas nº16). En aquests casos, el diagnòstic prenatal, no proporciona un benefici immediat per la gestació en curs, però si que molt sovint, proporciona una explicació a la pèrdua fetal i ofereix la possibilitat d'un consell genètic per les futures gestacions.

Les anomalies estructurals desequilibrades i les aneuploidies és consideren de mal pronòstic ja que s'associen a anomalia fetal congènita i amb repercussions mentals. Per contra, les anomalies aparentment equilibrades i els mosaics de baixa freqüència no s'associen a fenotips tant greus. El risc associat a un reordenament cromosòmic aparentment equilibrat de novo és del 6%. El risc de fenotip anòmal associat a un mosaic dels cromosomes sexuals és del 10%, en els casos de cromosomes marcadors, el risc d'anomalia depen de la mida del marcador i del cromosoma que el forma, no sempre es pot identificar i en aquets casos l'ecografia és una eina molt important (6). El risc associat a una aneuploidia de cromosomes autosòmics dependrà del cromosoma implicat. En la nostra serie tenim un LA (cas nº 30) que presentava una trisomia 22 en mosaic, la trisomia 22, al igual que la trisomia 16 en mosaic, presenten un risc d'anomalia fetal relativament alt, del 64-75% (39), la parella va decidir interrompre la gestacio. També es va detectar una trisomia 12 en mosaic que en principi confereix un elevat risc d'anomalia fetal, però no es pot establir un percentatge ja que els fenotips descrits són molt variables: des de la letalitat a casos d'infertilitat (6), en aquest cas la parella va decidir continuar amb la gestació, però no tenim un seguiment del neonat.

Un dels avantatges que presenta l'estudi citogenètic en vellositats corials davant l'estudi en líquid amniòtic es la possibilitat de realitzar l'estudi del cultiu curt, on obtenim un resultat de tots els cromosomes en 24h, els microorganismes (bacteris i fongs) no tenen temps de créixer i tampoc creixeran les cèl·lules maternes ja que aquestes no tenen divisions espontànies com s'ha comentat anteriorment. Aquest cultiu ens permet diagnosticar alteracions relacionades amb la DUP al detectar MCP que poden tenir una relevància clínica important.

En la nostra sèrie hem trobat un 1,67% (3/179) de MCP, aquest valor és similar al descrit en altres sèries que parlen d'una freqüència d'entre l'1% i el 2% de MCP (20).

Eren 3 MCP: el primer era un MCP tipus III (cas nº 6) indicat per anomalia ecogràfica (cultiu curt i cultiu llarg en VC 92,XXXX/46,XX i LA 46,XX) es va donar de normal ja que l'anomalia ecogràfica havia desaparegut en els següents controls però es va informar que podria presentar prematuritat, problemes al part i retràs de creixement intrauterí com està descrit per alguns autors (20). La nena va néixer i va presentar complicacions, es va realitzar l'estudi citogenètic en sang perifèrica i en biòpsia de pell amb un resultat en els 2 casos de 46,XX per tant, no podem atribuir les alteracions fenotípiques al cariotip, però tampoc podem descartar-les, ja que podria ser un mosaic de baixa freqüència confinat a algun teixit determinat, tot i que baix, està descrit un 0,03% de falsos negatius (40) i està descrit que al voltant d'un 10% dels casos on es sospita un MCP són en realitat mosaics veritables (20).

El segon MCP detectat era de tipus II (cas nº 18) indicat per antecedents d'aneuploidia (no hi va haver mostra per el cultiu curt i s'observa un mosaic en el cultiu llarg de 48,XY,+2,+21[10]/46,XY[42], l'estudi de LA va ser de 46,XY). En aquest cas, tot i no tenir estudi de cultiu curt es va etiquetar de MCP tipus II ja que es va realitzar l'estudi per QF-PCR que analitza tant les cèl·lules del citotrofoblast (cultiu curt) com les del mesènquima (cultiu llarg) i el resultat va ser de normalitat, no va detectar la trisomia 21, el que fa suposar que l'anomalia estava en baixa freqüència i només en un dels cultius, en aquest cas, en el cultiu llarg, on l'anomalia estava en mosaic i no arribava al 30%, la tècnica de QF-PCR necessita com a mínim entre un 20 i un 30% de cèl·lules per ser detectades (25).

El tercer i últim MCP detectat, era de tipus I (cas nº 15) indicat per criatge combinat alterat (cultiu curt 47,XX,+7, cultiu llarg i LA 46,XX), involucrava el cromosoma 7, un dels cromosomes afectats per imprinting genòmic i per tant si el fetus expressa disomia uniparental pot presentar alteracions fenotípiques, per això es van realitzar estudis de DUP que van

resultar negatius, no obstant en altres circumstàncies haurien pogut ser rellevants, i per això és important la seva detecció. Segons les nostres dades, els MCP representen el 13,64% (3/22) del total de cariotips alterats de primer trimestre, i el 33,3% (1/3) ha requerit de tècniques complementaries per determinar l'herència biparental del cromosoma. Altres series parlen d'un 20% de MCP amb un risc de DUP del 26,8% , i d'aquests en un 5,5% dels casos es detecten repercussions fenotípiques fetals degudes a la DUP (38).

En relació al VPP de les diferents indicacions per la detecció d'anomalies cromosòmiques, veiem que la indicació amb un valor predictiu més elevat tant en primer (22,81%) com en segon (7,37%) trimestre són les troballes ecogràfiques, el que indica que les exploracions ecogràfiques juguen un paper clau en el diagnòstic prenatal d'anomalies cromosòmiques. Altres articles presenten els mateixos resultats del 5,9% (35) i del 7,47% (37) en mostres de segon trimestre. Curiosament, el valor predictiu positiu per el cribatge prenatal es molt baix, del 6,12% al primer trimestre i del 4,91% en el segon. Alguns autors que presenten series molt llargues de LA troben un VPP encara més baix, del 2,2% (37) i atribueixen aquest resultat a que al ser mostres de segon trimestre, el cribatge prenatal presenta una taxa de detecció d'aneuploidies (65-70%) inferior a la taxa de detecció del cribatge de primer trimestre (85-95%)(2). En la nostre sèrie, tot i que es molt curta, veiem que el VPP del cribatge de primer trimestre també és baix, per tant, que el cribatge prenatal tingui un VPP baix, no ho podem atribuir a la menor sensibilitat del cribatge de segon trimestre, segurament és atribuïble a que els cribatges estan desenvolupats per la detecció de trisomies 21 i tot i que és l'anomalia més freqüent també es detecten moltes d'altres.

Amb la introducció del cribatge de primer trimestre com s'ha comentat anteriorment, el nombre de mostres de LA disminueix en favor de les mostres de VC, i tot i que podem realitzar la tècnica de FISH en mostres de VC és molt millor utilitzar la tècnica de QF-PCR ja que d'una branca de VC obtenim pocs nuclis però molta quantitat d'ADN, per tant amb aquesta nova implementació les tècniques moleculars també s'han vist afectades. En el nostre centre la tecnica de FISH ha estat substituïda per la tècnica de QF-PCR amb una taxa de detecció d'anomalia cromosòmica amb significació clínica del 99,04%. Els estudis publicats presenten taxes de detecció similars, del 94,6% (41) i del 98,5% (39). De manera general està descrit que la QF-PCR detecta més d'un 80% de les anomalies amb significació clínica (25).

Un problema que se'ns presenta amb la QF-PCR i que no ens succeïa amb la FISH és la presència de duplicacions en els marcadors STR polimòrfics, on s'observa un patró típic per un únic marcador STR. De les 207 mostres analitzades es van detectar en 7 (3,38%), 5 eren mostres de VC i 2 eren mostres de LA. Degut a la nostra poca experiència aquest fenomen ens han creat moltes angoixes ja que un únic marcador duplicat pot ser indicatiu d'artefacte de la tècnica o d'un polimorfisme, però també d'una duplicació en aquesta regió(27). En els 2 primers casos que vam detectar es va demanar un rentat bucal dels pares on es va confirmar la presència de la duplicació en un dels progenitors, en la resta de casos, no es va sol·licitar la mostra dels progenitors ja que els hi crea angoixa i aquests polimorfismes estan descrits, s'expliquen per herència d'algun dels progenitors o per una inestabilitat somàtica del microsatèl·lit. En el cas que la detectem en un dels progenitors podem dir que és heretada, però si no la detectem no podem saber si és un artefacte, un polimorfisme o una duplicació real, per tant és una limitació de la tècnica. El percentatge descrit en la nostra sèrie (3,38%) és més elevat del reportat per altres sèries més extenses que parlen d'un 0,34% (41). Aquesta discrepància es pot explicar per la diferència entre el nombre de mostres de cada sèrie (207 *versus* 42231) i perquè els marcadors STR utilitzats són diferents, possiblement els nostres són marcadors més inestables.

Alguns autors comencen a suggerir utilitzar la tècnica de QF-PCR com a tècnica única en els casos d'edat materna avançada, cribatge combinat positiu o angoixa materna i oferir l'estudi complet del cariotip només en aquelles pacients amb anomalies ecogràfiques o reordenaments cromosòmics en algun dels progenitors. A Anglaterra, s'està implementant aquesta estratègia i ja han publicat els seus 2 anys d'experiència (42). Si seguíssim aquestes noves directrius, dels 4 casos (2 VC i 2 LA) amb cariotip alterat i QF-PCR normal només haguéssim realitzat el cariotip a un dels LA (cas nº 83) que consultava per anomalia ecogràfica. Els altres 3 diagnòstics s'haguéssin perdut, dels quals un tenia significació clínica important. Hauríem perdut 2 casos de MCP (casos nº 15 i 16) que en una altra ocasió poden conferir un risc de DUP i un cas de LA (cas nº 80) que va presentar una alteració cromosòmica en desequilibri, per tant tenia un risc molt elevat d'anomalia fetal.

Si analitzem els casos estudiats per FISH que també hauríem perdut si seguíssim aquestes recomanacions, tindríem que dels 17 casos amb anomalia cromosòmica no detectada per FISH, en 9 (52,94%) casos no hagués estat indicat l'estudi del cariotip, dels quals 6 (casos nº

25,44,48,53,66 i 70) si presentaven alteracions amb significació clínica, per tant les pèrdues diagnòstiques amb significat clínic serien del 66,67%. En el 33,33% restant de gestants a les que no s'haguessin realitzat el cariotip, no s'haguessin pogut beneficiar d'un consell genètic ni reproductiu per futurs embarassos ja que no hauriem detectat que eren portadors d'anomalies cromosòmiques. En el global de les tècniques moleculars hauriem perdut 7 (58,33%) casos amb significació clínica, les dades publicades descriuen pèrdues del 70% (43).

Un altre punt a tenir en compte és que les tècniques moleculars sí ens detectaran una trisomia 21, però no detecten si aquesta està involucrada en un reordenament estructural, equilibrat o desequilibrat heretat d'un dels progenitors, dada molt important per l'estudi de futures gestacions. Per evitar totes aquestes pèrdues cal considerar les tècniques moleculars com a tècniques complementàries de la citogenètica convencional. No obstant, és una tècnica cost-efectivitat molt alta i per això es continua valorant com a única tècnica en determinats casos. A Suècia i a Holanda és la gestant la que escull entre la tècnica de QF-PCR o la citogenètica convencional, sorprenentment, a Suècia, més d'un 70% de les parelles escullen la QF-PCR com a tècnica única (43).

Si analitzem les decisions preses segons les anomalies cromosòmiques podem veure que decideixen interrompre la gestació un 60%, principalment són els casos d'aneuploidies més freqüents, trisomia 13, 18 i 21 i la S. de Turner, que s'associen a un elevat risc d'alteracions fenotípiques i mentals pel fetus. En les anomalies dels cromosomes sexuals i les alteracions estructurals de novo podem observar que un 25% dels casos decideixen continuar amb la gestació, segurament perquè en els casos d'anomalies dels cromosomes sexuals (exceptuant la S. de Turner) les repercussions fenotípiques i mentals són molt menors i en els casos d'anomalies estructurals, si aquestes són aparentment equilibrades i no s'observen anomalies ecogràfiques, moltes parelles assomeixen el risc del 6%.

D'aquest 60% de gestant que van decidir interrompre l'embaràs, el 25,40% (16/63) eren gestacions de primer trimestre.

El fet que el diagnòstic sigui precoç té repercussions a nivell poblacional, ja que l'actuació a primer trimestre és menys costosa. La intervenció mèdica és més econòmica tant pel que fa a la interrupció com als possibles trastorns psicològics que li puguin quedar a la gestant.

Conclusions

Les nostres dades confirmen que amb la implementació del criatge combinat de primer trimestre s'han produït els següents canvis:

- El nombre d'anomalies cromosòmiques detectades en el primer trimestre és superior al de les detectades en el segon trimestre.
- No es troben diferències entre el tipus d'anomalies detectades en el primer i en el segon trimestre a excepció de les anomalies estructurals.
- Les tècniques moleculars són una eina complementària molt útil en els casos de no creixement o de contaminació i avancen els resultats de les aneuploïdies més freqüents.
- La principal indicació per realitzar una prova invasiva passa de ser l'edat materna avançada a ser el criatge combinat de primer trimestre.
- El nombre de proves invasives ha disminuït des de la implementació del criatge de primer trimestre de gestació.
- El nombre d'estudis en mostres de líquid amniòtic disminueix en favor del nombre d'estudis en vellositats corials tot i que tots dos són bons mètodes per la detecció d'anomalies cromosòmiques fetals.
- La indicació clínica amb un valor predictiu positiu (VPP) més alt per la detecció d'anomalies fetals és l'ecografia.

Bibliografia

- (1) Jané i Checa M, Prats i Coll R, Plasència i Taradach A, Catalunya, Catalunya. Protocol de diagnòstic prenatal d'anomalies congènites fetals. Barcelona: Departament de Salut, Direcció General de Salut Pública; 2008.
- (2) Nicolaides KH. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn* 2011;31(1):7-15.
- (3) Hulten MA, Patel SD, Tankimanova M, Westgren M, Papadogiannakis N, Jonsson AM, et al. On the origin of trisomy 21 Down syndrome. *Mol Cytogenet* 2008 Sep 18;1:21.
- (4) Nicolaides KH. Screening for chromosomal defects. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 2003;21(4):313-321.
- (5) Cocchi G, Gualdi S, Bower C, Halliday J, Jonsson B, Myrelid A, et al. International trends of Down syndrome 1993-2004: Births in relation to maternal age and terminations of pregnancies. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010 Jun;88(6):474-479.
- (6) Gardner RJM, Sutherland GR. Chromosome abnormalities and genetic counseling. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press; 2004.
- (7) Borrell A, Casals E, Fortuny A, Farre MT, Gonce A, Sanchez A, et al. First-trimester screening for trisomy 21 combining biochemistry and ultrasound at individually optimal gestational ages. An interventional study. *Prenat Diagn* 2004 Jul;24(7):541-545.
- (8) Malone FD, Canick JA, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, Bukowski R, et al. First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome. *N Engl J Med* 2005 Nov 10;353(19):2001-2011.
- (9) Nicolaides KH. A model for a new pyramid of prenatal care based on the 11 to 13 weeks' assessment. *Prenat Diagn* 2011;31(1):3-6.
- (10) Syngelaki A, Chelemen T, Dagklis T, Allan L, Nicolaides KH. Challenges in the diagnosis of fetal non-chromosomal abnormalities at 11-13 weeks. *Prenat Diagn* 2011 Jan;31(1):90-102.
- (11) Souka AP, Von Kaisenberg CS, Hyett JA, Sonek JD, Nicolaides KH. Increased nuchal translucency with normal karyotype. *Am J Obstet Gynecol* 2005 Apr;192(4):1005-1021.
- (12) Cicero S, Rembouskos G, Vandecruys H, Hogg M, Nicolaides KH. Likelihood ratio for trisomy 21 in fetuses with absent nasal bone at the 11-14-week scan. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2004 Mar;23(3):218-223.

- (13) Caughey AB, Hopkins LM, Norton ME. Chorionic villus sampling compared with amniocentesis and the difference in the rate of pregnancy loss. *Obstet Gynecol* 2006 Sep;108(3 Pt 1):612-616.
- (14) Tabor A, Vestergaard CH, Lidegaard O. Fetal loss rate after chorionic villus sampling and amniocentesis: an 11-year national registry study. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009 Jul;34(1):19-24.
- (15) Wax JR, Davies NP, Watson WJ, Cartin A, Pinette MG, Chard R, et al. Pain associated with chorionic villus sampling: transabdominal vs transcervical approach. *Am J Obstet Gynecol* 2009 Oct;201(4):400.e1-400.e3.
- (16) Blumenfeld YJ, Chueh J. Chorionic villus sampling: technique and training. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2010 Apr;22(2):146-151.
- (17) Moore KL, Persaud TVN. *Before we are born : essentials of embryology and birth defects*. 5th ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 1998.
- (18) Silvestre i Fortea E. *Estudi d'una serie d'avortaments espontanis: analisi citogenetica i histologica*. 1998.
- (19) Kalousek DK, Vekemans M. Confined placental mosaicism. *J Med Genet* 1996 Jul;33(7):529-533.
- (20) Toutain J, Labeau-Gauzere C, Barnetche T, Horovitz J, Saura R. Confined placental mosaicism and pregnancy outcome: a distinction needs to be made between types 2 and 3. *Prenat Diagn* 2010 Dec;30(12-13):1155-1164.
- (21) Liehr T. Cytogenetic contribution to uniparental disomy (UPD). *Mol Cytogenet* 2010 Mar 29;3:8.
- (22) Oliva Virgili R. *Genética mèdica*. 3a rev ed. Barcelona: Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona; 2004.
- (23) Dawson AJ, Chernos J, McGowan-Jordan J, Lavoie J, Shetty S, Steinraths M, et al. CCMG guidelines: prenatal and postnatal diagnostic testing for uniparental disomy. *Clin Genet* 2011 Feb;79(2):118-124.
- (24) Brambati B, Tului L. Chorionic villus sampling and amniocentesis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005 Apr;17(2):197-201.
- (25) Shaffer LG, Bui TH. Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007 Feb 15;145C(1):87-98.
- (26) Jones KL, Campo Casanelles Md. Smith, *Patrones reconocibles de malformaciones humanas*. 6a ed. Madrid etc.: Elsevier; 2007.

- (27) Hulten MA, Dhanjal S, Pertl B. Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR. *Reproduction* 2003 Sep;126(3):279-297.
- (28) Barel O, Vaknin Z, Smorgick N, Reish O, Mendlovic S, Herman A, et al. Fetal abnormalities leading to third trimester abortion: nine-year experience from a single medical center. *Prenat Diagn* 2009 Mar;29(3):223-228.
- (29) Gagnon A, Wilson RD, Allen VM, Audibert F, Blight C, Brock JA, et al. Evaluation of prenatally diagnosed structural congenital anomalies. *J Obstet Gynaecol Can* 2009 Sep;31(9):875-81, 882-9.
- (30) Gorincour G, Tassy S, Payot A, Philip N, Malzac P, Harle JR, et al. Decision-making in termination of pregnancy: A French perspective. *Gynecol Obstet Fertil* 2011 Apr;39(4):198-204.
- (31) Quality guidelines and standards for genetic laboratories/clinics in prenatal diagnosis on fetal samples obtained by invasive procedures. An attempt to establish a common European framework for quality assessment. EUCROMIC Quality Assessment Group. *Eur J Hum Genet* 1997 Nov-Dec;5(6):342-350.
- (32) Hastings RJ, Cavani S, Bricarelli FD, Patsalis PC, Kristoffersson U, ECA PWG Co-ordinators. Cytogenetic Guidelines and Quality Assurance: a common European framework for quality assessment for constitutional and acquired cytogenetic investigations. *Eur J Hum Genet* 2007 May;15(5):525-527.
- (33) Hsu LY, Kaffe S, Jenkins EC, Alonso L, Benn PA, David K, et al. Proposed guidelines for diagnosis of chromosome mosaicism in amniocytes based on data derived from chromosome mosaicism and pseudomosaicism studies. *Prenat Diagn* 1992 Jul;12(7):555-573.
- (34) International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature, Shaffer LG, Slovack ML, Campbell LJ. *ISCN an International System for Human Cytogenic Nomenclature* (2009). Basel: Karger; 2009.
- (35) Han SH, An JW, Jeong GY, Yoon HR, Lee A, Yang YH, et al. Clinical and cytogenetic findings on 31,615 mid-trimester amniocenteses. *Korean J Lab Med* 2008 Oct;28(5):378-385.
- (36) Kjaergaard S, Hahnemann JM, Skibsted L, Jensen LN, Sperling L, Zingenberg H, et al. Prenatal diagnosis of chromosome aberrations after implementation of screening for Down's syndrome]. *Ugeskr Laeger* 2008 Mar 31;170(14):1152-1156.
- (37) Mademont-Soler I, Morales C, Clusellas N, Soler A, Sanchez A, Group of Cytogenetics from Hospital Clinic de Barcelona. Prenatal cytogenetic diagnosis in Spain: analysis and evaluation of the results obtained from amniotic fluid samples during the last decade. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011 Apr 12.
- (38) Soler A, Morales C, Badenas C, Rodriguez-Revenga L, Carrio A, Margarit E, et al. A retrospective and theoretical evaluation of rapid methods for detecting chromosome

abnormalities and their implications on genetic counseling based on a series of 3868 CVS diagnoses. *Fetal Diagn Ther* 2008;23(2):126-131.

(39) Speevak MD, McGowan-Jordan J, Chun K. The detection of chromosome anomalies by QF-PCR and residual risks as compared to G-banded analysis. *Prenat Diagn* 2011 May;31(5):454-458.

(40) Hahnemann JM, Vejerslev LO. Accuracy of cytogenetic findings on chorionic villus sampling (CVS)--diagnostic consequences of CVS mosaicism and non-mosaic discrepancy in centres contributing to EUCROMIC 1986-1992. *Prenat Diagn* 1997 Sep;17(9):801-820.

(41) Cirigliano V, Voglino G, Ordonez E, Marongiu A, Paz Canadas M, Ejarque M, et al. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR, results of 9 years of clinical experience. *Prenat Diagn* 2009 Jan;29(1):40-49.

(42) Hills A, Donaghue C, Waters J, Waters K, Sullivan C, Kulkarni A, et al. QF-PCR as a stand-alone test for prenatal samples: the first 2 years' experience in the London region. *Prenat Diagn* 2010 Jun;30(6):509-517.

(43) Comas C, Echevarria M, Carrera M, Serra B. Rapid aneuploidy testing versus traditional karyotyping in amniocentesis for certain referral indications. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2010 Sep;23(9):949-955.

Agraïments

Al Director del treball, per les seves indicacions i correccions.

Al Servei Laboratori d'Hematologia, especialment a la Cap de Servei i als departaments de Citogenètica i Biologia Molecular, per la seva ajuda, suport i la feina realitzada.

Al Servei de Ginecologia i Obstetrícia de l'Hospital Germans Trias i Pujol (Badalona) i l'Hospital Verge de la Cinta (Tortosa) per la seva implicació.

A la meva família, pel seu suport i paciència.

Moltes gràcies a tots