

Curso 2010/11  
**CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/35**  
I.S.B.N.: 978-84-15287-65-0

**BEATRIZ ESQUIVEL VÁZQUEZ**

**Valoración epidemiológica de 10.264 estudios  
citogenéticos prenatales y contribución  
de las técnicas de Biopsia Corial  
y FISH a su diagnóstico**

**Director**  
**JOSÉ LUIS GARCÍA MIRANDA**



**SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS**  
**Serie Tesis Doctorales**

**A mi madre**

# Agradecimientos

---

A Pablo, por todo y por tanto. Por entender el esfuerzo que necesitaba esta tesis y apoyarme, por nuestros proyectos de futuro. GRACIAS. A mamá, mi ejemplo a seguir, por enseñarme tanto, por guiarme tanto. A papá, el cariño y el apoyo hechos persona. José, el hermano fiel, sin tus bromas y tus ánimos ni esto ni muchas otras cosas hubiera podido sacarlas adelante. José Emilio, gracias por empujarme siempre al siguiente escalón. Mis tíos Dory y Manolo que me han enseñado a lo largo de los años el valor de la educación. Abuela, por estar siempre dispuesta a aconsejar, a ayudar, a cuidarme y enseñarme, muchas gracias.

A mis chicas qué les voy a decir: gracias por aguantarme! Todos tenemos momentos de compartir grandes alegrías y otros en los que hay "nubes grises", lo importante es que habéis estado en todos. Mis dos grandes descubrimientos, Vanessa y Soraya. Lucía, nunca sabré si más familia o más amiga, y Raquel, siempre amiga, dispuestas entre las tres a arreglar el mundo. Olga, por haber estado desde siempre. Y la persona capaz de arrancarme una sonrisa con solo mirarme, Idaira. Gracias chicas! Vane no nos podíamos imaginar que después de aquella tarde explicándome la división celular con palitos, terminaría dedicándome a esto de los cromosomas!!

Javi Suárez, gracias por todas las horas dedicadas a jugar con los numeritos de esta tesis, sin las cuales no hubiera habido capítulo de resultados. Aga gracias por las horas familiares que te he robado y por esa útil revisión final. Fran, sin ti no hubiera terminado la licenciatura ni llegado a ser quien soy, son muchos los momentos compartidos. Javi González amigo, y compañero durante los años de facultad. Sé que me faltan familiares, amigos y profesores que de una u otra manera habéis puesto vuestro granito de arena en este trabajo, espero poder agradecerlos en persona.

Pero fundamentalmente agradecer al grupo de personas con el que trabajo codo con codo todos los días, es un placer tanto a nivel laboral como a nivel personal. Al "jefe", el doctor García Miranda, quiero agradecerle el cariño con el que enseña, la paciencia que tiene cuando nos equivocamos y la exigencia para hacer las cosas de la manera correcta. Gracias sobre todo por confiar en mí y por la oportunidad que me brindó. La doctora Ana Otero, siempre con palabras cálidas y siempre ayudando. Sandra gracias por

permitirme aprender tanto de ti. Luisa, Fátima, Manuel, Sole y Ángeles, gracias por vuestra ayuda, gracias por los buenos ratos y gracias por vuestra comprensión.

Quiero dedicar en parte esta tesis doctoral a la memoria del doctor Javier Corzo Varillas de quien guardo un millón de momentos maravillosos en los que recuerdo especialmente disfrutar de aprender a hacer ciencia y a investigar, junto al doctor Jairo Hernández. Pero también el apoyo, la ayuda y los consejos que me daba como si fuera un padre o un tutor. No lo puedo olvidar, me hubiera gustado que estuvieras aquí.

# Índice

---

<b>0 Resumen .....</b>	<b>17</b>
<b>1 Introducción .....</b>	<b>21</b>
<b>1.1 Diagnóstico prenatal .....</b>	<b>23</b>
<b>1.2 Citogenética .....</b>	<b>24</b>
1.2.1 Citogenética convencional: el cariotipo .....	26
1.2.1.1 Anomalías estructurales.....	27
1.2.1.1.1 Translocaciones .....	28
1.2.1.1.2 Inversiones.....	33
1.2.1.1.3 Deleciones.....	35
1.2.1.1.4 Duplicaciones.....	36
1.2.1.1.5 Isocromosomas.....	36
1.2.1.1.6 Cromosomas marcadores.....	36
1.2.1.2 Alteraciones numéricas.....	37
1.2.1.2.1 Aneuploidías .....	37
1.2.1.2.2 Poliploidía.....	42
1.2.1.3 Polimorfismos cromosómicos, variantes o heteromorfismos .....	43
1.2.2 Citogenética molecular: hibridación in situ fluorescente (FISH) .....	45
<b>1.3 Técnicas de diagnóstico prenatal invasivo.....</b>	<b>47</b>
1.3.1 Biopsia Corial (BC) o Biopsia de vellosidades coriales (BVC).....	48
1.3.2 Amniocentesis (LA) .....	55
1.3.3 Funiculocentesis (SC).....	57
1.3.4 Indicaciones para una prueba invasiva.....	59
1.3.5 Riesgos de una prueba invasiva .....	68
<b>2 Objetivos.....</b>	<b>71</b>

---

<b>3 Materiales y métodos .....</b>	<b>75</b>
<b>3.1 Recopilación de datos .....</b>	<b>77</b>
<b>3.2 Procesamiento técnico de la muestra .....</b>	<b>80</b>
3.2.1 Biopsia de vellosidades coriales.....	80
3.2.1.1 Cultivo de células de vellosidad corial .....	81
3.2.1.2 Hibridación in situ con fluorescencia (FISH) en biopsia corial sin cultivar .....	85
3.2.2 Amniocentesis (LA).....	88
3.2.3 Funiculocentesis (SC).....	90
<b>4 Resultados.....</b>	<b>91</b>
<b>4.1 Biopsia de Vellosidades Coriales.....</b>	<b>93</b>
4.1.1 Descripción de la serie de Biopsias Coriales.....	93
4.1.2 Descripción de los resultados de Biopsias Coriales .....	95
4.1.3 Concordancia de los resultados obtenidos por FISH en Biopsias de Vellosidades Coriales .....	99
4.1.3.1 Con el cariotipo por cultivo a largo plazo.....	99
4.1.3.2 Con las amniocentesis posteriores .....	100
4.1.3.3 Con el desenlace de la gestación.....	100
<b>4.2 Amniocentesis o muestras de líquido amniótico.....</b>	<b>101</b>
4.2.1 Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia (FISH) en líquido amniótico sin cultivar.....	101
4.2.1.1 Descripción de la serie de FISH .....	101
4.2.1.2 Descripción de los resultados del FISH.....	103
4.2.1.3 Concordancia de los resultados del FISH con los obtenidos en cariotipo tras cultivo .....	104
4.2.2 Cariotipo en amniocentesis.....	108



---

4.2.2.1 Descripción de la serie de amniocentesis.....	108
4.2.2.2 Descripción de los resultados de amniocentesis .....	111
4.2.2.3 Determinación del origen de las alteraciones cromosómicas.....	114
<b>4.3 Sangre de cordón (SC) o funiculocentesis .....</b>	<b>115</b>
4.3.1 Descripción de la serie de funiculocentesis .....	115
4.3.2 Descripción de los resultados de funiculocentesis.....	117
4.3.3 Concordancia de los resultados de las funiculocentesis con las amniocentesis previas.....	118
<b>4.4 Tasa de datos desconocidos .....</b>	<b>119</b>
4.4.1 Biopsia de Vellosidades Coriales .....	120
4.4.2 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente .....	120
4.4.3 Amniocentesis .....	121
4.4.4 Funiculocentesis .....	121
<b>4.5 Comparación de los casos cromosómicamente normales frente a los patológicos.....</b>	<b>122</b>
4.5.1 Edad materna y cromosomopatías.....	122
4.5.1.1 Patología en mayores y menores de 38 años .....	122
4.5.1.2 Relación de la edad materna con las cromosomopatías: Chi-cuadrado .....	124
4.5.2 Indicaciones en los casos cromosómicamente normales y patológicos .	125
4.5.3 Comparación de tres años de patología .....	128
<b>5 Discusión .....</b>	<b>131</b>
<b>5.1. Biopsia de Vellosidades Coriales .....</b>	<b>133</b>
5.1.1 Descripción de la serie .....	133
5.1.2 Descripción de los resultados de Biopsias Coriales .....	136

---

5.1.3 Concordancia de los resultados obtenidos por FISH en Biopsias de Vellosidades Coriales .....	140
<b>5.2 Amniocentesis o muestras de líquido amniótico.....</b>	<b>142</b>
5.2.1 Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia (FISH) en líquido amniótico sin cultivar.....	142
5.2.1.1 Descripción de la serie de FISH .....	142
5.2.1.2 Descripción de los resultados del FISH.....	144
5.2.1.3 Concordancia de los resultados del FISH con los obtenidos en cariotipo tras cultivo .....	149
5.2.2 Cariotipo en amniocentesis .....	152
5.2.2.1 Descripción de la serie de amniocentesis.....	152
5.2.2.2 Descripción de los resultados de amniocentesis .....	155
<b>5.3 Sangre de cordón o funiculocentesis .....</b>	<b>159</b>
5.3.1 Descripción de la serie de funiculocentesis.....	159
5.3.2 Descripción de los resultados de funiculocentesis .....	162
5.3.3 Concordancia de los resultados de funiculocentesis con las amniocentesis previas.....	164
<b>5.4 Tasa de datos desconocidos.....</b>	<b>165</b>
5.4.1 Biopsia de vellosidades coriales.....	165
5.4.2 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente .....	165
5.4.3 Amniocentesis .....	165
5.4.4 Funiculocentesis .....	166
5.4.5 Aportación a la mejora del flujo de información.....	166
<b>5.5 Comparación de los casos patológicos frente a los normales.....</b>	<b>168</b>
5.5.1 Edad materna y cromosomopatías.....	168
5.5.1.1 Patología en mayores y menores de 38 años.....	168

5.5.1.2 Relación de la edad materna con las cromosomopatías: Chi-cuadrado .....	169
5.5.2 Indicaciones en los casos normales y patológicos .....	170
5.5.3 Comparación de tres años de patología .....	172
<b>6 Conclusiones .....</b>	<b>175</b>
<b>7 Nomenclatura y designación.....</b>	<b>181</b>
<b>8 Índices de imágenes, gráficas y tablas .....</b>	<b>187</b>
<b>9 Bibliografía .....</b>	<b>195</b>
<b>10 Anexo: PUBLICACIONES .....</b>	<b>221</b>

## 0 Resumen

---

Se realiza un estudio retrospectivo de los casos de Diagnóstico Prenatal mediante amniocentesis, biopsia de vellosidades coriales y funiculocentesis, haciendo una cohorte histórica entre los años 1999 y 2009. Los estudios se han realizado mediante Citogenética Convencional (cariotipo) y Citogenética Molecular (Hibridación *in situ* con fluorescencia o FISH). Los datos se revisan de la base de datos de la Sección de Citogenética así como del archivo central del Hospital Universitario de Canarias (HUC) al que pertenece dicha sección. El análisis es observacional y descriptivo. Se analiza la aportación de la implantación de la técnica de FISH y la de Biopsia de Vellosidades Coriales en el diagnóstico de alteraciones cromosómicas. Además hace una comparación entre los resultados normales y con cromosomopatías.

We performed a retrospective study of cases of prenatal diagnosis, amniocentesis, chorionic villus sampling and cordocentesis (percutaneous umbilical blood sampling or PUBS), making an historical cohort between 1999 and 2009. The studies were performed using Conventional Cytogenetics (karyotype) and Molecular Cytogenetics (fluorescence in situ hybridization or FISH). The data are reviewed from the database of the section of cytogenetics and files of HUC (Hospital Universitario de Canarias) which includes that section. The analysis is observational and descriptive. It analyzes the contribution of the implementation of the FISH technique and Chorionic Villus Sampling to the chromosomal abnormalities. Furthermore it makes a comparison of results between the normal and the chromosomopathies.

# 1 Introducción

---

## 1.1 Diagnóstico prenatal

El concepto de **diagnóstico prenatal** ha ido variando con el paso del tiempo. Durante el último tercio del siglo XX, se ha pasado de desconocer casi en su totalidad la situación del feto, a contar con un conjunto de procedimientos diagnósticos que representan bastante fielmente la realidad de los primeros meses de vida. El obstetra comenzó estudiando la ubicación del feto dentro de la madre, su crecimiento aproximado y la positividad de su latido cardíaco usando métodos rudimentarios como la palpación o el uso de un fonendoscopio (Dexeus, *et. ál.*, 1989). Hoy en día se conocen muchas y variadas formas de aproximación a la realidad fetal, algunas de ellas se enumeran a continuación:

- Exámenes de sangre: screening de marcadores bioquímicos.
- Análisis de orina materna.
- Ecografía.
- Eco-cardiografía.
- Amniocentesis.
- Biopsia de vellosidades coriales.
- Biopsia de tejidos fetales: piel, hígado, etc.
- Análisis de sangre fetal: funiculocentesis.
- Fetoscopia (visualización directa de la superficie fetal).
- Punción vesical para análisis de orina fetal.
- Radiología.

Hace algunos años el concepto del diagnóstico prenatal se asociaba exclusivamente al análisis cromosómico del feto mediante estudio citogenético de las células en suspensión en el líquido amniótico. Actualmente se refiere a todas las posibles acciones diagnósticas dirigidas a descubrir cualquier tipo de defecto congénito.

Dentro del campo de la medicina fetal el diagnóstico prenatal está llegando incluso a considerarse como una subespecialización, en la que se impone la necesidad de multidisciplinariedad, intentando entre todos encontrar un método ideal de diagnóstico prenatal que sea no invasivo, seguro, rápido y preciso.

Se debe tener especial cuidado con el aspecto emocional que implica someterse a un diagnóstico prenatal, especialmente con técnicas invasivas ya que conlleva a la gestante a un estado de estrés, nerviosismo y ansiedad, motivado por el riesgo intrínseco de la prueba, la posibilidad de tener un hijo enfermo, así como la posible toma de decisiones ante un diagnóstico patológico.

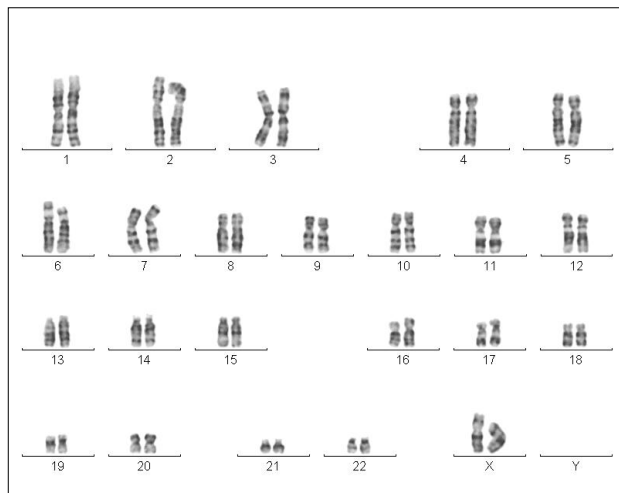
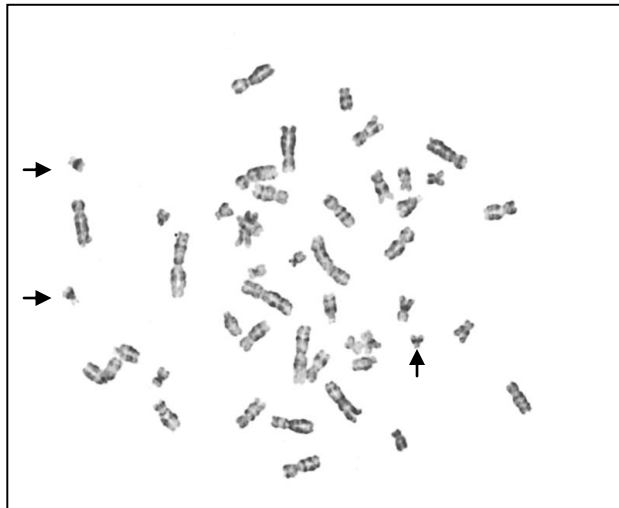
El objetivo principal del diagnóstico prenatal es el de poder adelantar el conocimiento de patologías antes del momento del nacimiento para ofrecer a los padres la posibilidad de elegir, apoyándose en la ley vigente, entre continuar o interrumpir la gestación, así como estudiar posibles alternativas quirúrgicas. Actualmente, el abanico de patologías que se pueden diagnosticar es bastante amplio, aunque está en constante crecimiento. Nuestro trabajo se centra exclusivamente en el diagnóstico prenatal citogenético, es decir el estudio de los cromosomas fetales mediante el cariotipo y también haciendo uso de técnicas de citogenética molecular (concretamente la hibridación *in situ* fluorescente), analizando diversos tipos celulares de origen fetal.

## 1.2 Citogenética

La **Citogenética** es la disciplina encargada del estudio de los cromosomas, resultado de la convergencia entre la citología y la genética (Novo Villaverde, 2007). El descubrimiento científico que determina el inicio de esta ciencia se publica por Tjio y Levan, 1956, quienes trabajando con células pulmonares fetales, establecen definitivamente el número de cromosomas de la especie humana en 46.



**Imagen 1 Arriba: metafase con bandas G (47, XY, +21), las flechas señalan los 3 cromosomas 21. Abajo: cariotipo con bandas G (46, XX)**



La primera anomalía se detectaba sólo tres años después (Lejeune *et. ál.*, 1959), y confirmaba la importancia de este tipo de estudios. Se observó que los desafortunadamente llamados por aquel entonces “niños mongólicos” eran portadores de un cromosoma extra o supernumerario. Se trataba del cromosoma 21 que en estos casos tenía dos homólogos en vez de uno, constituyendo una trisomía. De esta forma, se comenzaba el camino de la

---

etiología y mecanismos etiopatogénicos de enfermedades hereditarias o congénitas.

Un considerable avance en el campo de la citogenética fue la puesta en marcha de técnicas de bandeo cromosómico. Éstas se fueron descubriendo e implantando durante los años posteriores: bandas Q (con quinacrina), bandas C (con giemsa), bandas G (con proteasa y giemsa) y bandas R (inversas a las G). Las bandas G son las más usadas hoy en día en el análisis citogenético rutinario. En la imagen 1 se muestra en la parte superior un ejemplo de una metafase de un varón con trisomía 21 (47, XY, +21) y en la parte inferior un cariotipo de una mujer normal (46, XX) ambos mediante la técnica de bandas G.

### 1.2.1 Citogenética convencional: el cariotipo

Con el perfeccionamiento de las técnicas de bandeo se hizo posible analizar cada cromosoma individualmente y estudiar con mayor detalle las alteraciones cromosómicas, tanto numéricas como estructurales, y en algunos casos, determinar su origen. Incluso han permitido descubrir nuevos síndromes que antes pasaban desapercibidos, contribuyendo al progreso de la denominada **CITOGÉNÉTICA CONVENCIONAL**.

El **cariotipo** se define como el conjunto de características morfológicas y numéricas que presentan los cromosomas de un individuo. Se ha establecido por convenio que los autosomas se enumeren correlativamente del 1 al 22 siguiendo, en la medida de lo posible, un orden de magnitudes decrecientes, mientras que los cromosomas sexuales se denominan X e Y. Un cariotipo puede presentar alteraciones si se modifica el número o la estructura de los cromosomas dando lugar a las **cromosopatías o anomalías cromosómicas**. Éstas se presentan aproximadamente en 1 de cada 150 nacidos vivos y son la principal causa conocida de retraso mental y de la aparición de abortos, observándose entre el 20-50% de los abortos

espontáneos en el primer y segundo trimestre del embarazo (Gardner y Sutherland, 2003).

Las anomalías cromosómicas, cuya repercusión clínica es muy diversa, se clasifican en dos grupos: estructurales y numéricas.

### **1.2.1.1 Anomalías estructurales**

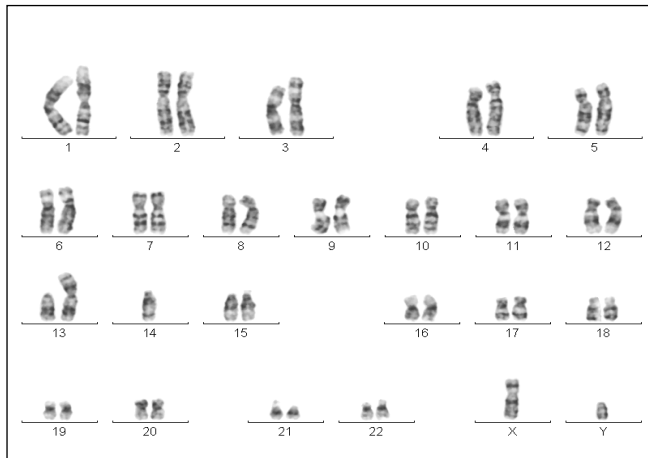
Se denominan así a las alteraciones que producen una eliminación, adición o reordenamiento de partes de uno o más cromosomas. Se originan como resultado de roturas cromosómicas y posterior ubicación anormal de los fragmentos originados.

Si la alteración da lugar a la pérdida o ganancia de material genético, se habla de alteraciones **desequilibradas**; en el caso contrario, se denominan **equilibradas**. Las alteraciones equilibradas no suelen tener repercusión en el fenotipo del individuo portador, pero sí presentar riesgo de tener descendencia afectada de alteraciones no equilibradas, derivadas de tales cromosopatías equilibradas, que generalmente conducen a defectos congénitos y/o a retraso mental (Moreno-García M., 2004).

Pueden aparecer **de novo** en un individuo o heredarse de alguno de los progenitores. De los recién nacidos con anomalías cromosómicas estructurales balanceadas *de novo* diagnosticadas mediante diagnóstico prenatal, se ha estimado que el 6,7% presentaban anomalías congénitas y/o retraso mental. Concretamente para el caso de translocaciones recíprocas el riesgo de padecer tales anomalías congénitas se calcula en un 6,1%, con translocaciones robertsonianas del 3,7% y con inversiones del 9,4%. El riesgo de anomalías congénitas en la población general está entre 2-3% (Warburton, 1991). Cuando la cromosopatía estructural equilibrada se hereda de alguno de los padres, dicho riesgo es igual al de la población general. Aunque no debe descartarse que el hijo porte un reordenamiento más complejo y con desequilibrio, sin ser detectable mediante citogenética convencional.

Las anomalías estructurales pueden ser de diferentes tipos: **translocaciones, inversiones, deleciones, duplicaciones, isocromosomas y cromosomas marcadores**. La imagen 2 muestra un ejemplo de un cariotipo con translocación robertsoniana entre los cromosomas 13 y 14.

**Imagen 2 Cariotipo 45, XY, der (13;14)(q10;q10)**



#### **1.2.1.1.1 Translocaciones**

Se denomina así al intercambio de fragmentos cromosómicos entre cromosomas. Se llaman translocaciones **recíprocas** cuando ambos cromosomas son donantes y receptores de material cromosómico, de modo que parte de un cromosoma pasa a otro y, a su vez, parte de éste pasa al primero. Las translocaciones recíprocas desequilibradas en las que se ha perdido o ganado material genético, son habitualmente causa de patología. Por el contrario, las translocaciones equilibradas no son necesariamente patogénicas, a no ser que los puntos de rotura en alguno de los cromosomas esté situado dentro de un gen, perdiendo éste su función, o que se altere alguna función génica debido a la nueva posición. Los portadores de este tipo de translocación podrán tener descendencia con alteraciones cromosómicas estructurales.

#### **A) Translocaciones recíprocas autosómicas**

Las translocaciones recíprocas que ocurren entre dos cromosomas no sexuales o autosómicos son comunes. Es frecuente encontrarse una translocación familiar de este tipo, siendo sus portadores fenotípicamente normales. Aproximadamente 1 de cada 500 personas se considera portadora de una translocación recíproca según Van Dyke et al., 1983 y Jacobs et al., 1992, y para las translocaciones no equilibradas la incidencia en la población es de 1 de cada 1000 nacidos vivos.

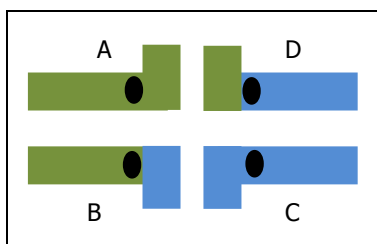
Un portador heterocigoto de estas translocaciones tiene riesgo de tener un hijo con anomalías físicas y mentales debido a que el segmento translocado cause desequilibrio, es decir, trisomías o monosomías parciales. Dependiendo del tipo de translocación (Gardner y Sutherland, 2003) se han calculado diferentes estimaciones del riesgo de tener un hijo con anomalías: la mayoría implican un riesgo de nivel medio (5-10%), pero también hay algunas asociadas a un alto riesgo (del 20% o menor) o a un riesgo bajo (menor del 1%), incluso algunas parecen no tener riesgo. Sin embargo, la probabilidad de que la descendencia sea portadora sí es alta en todos los casos.

Una situación habitual cuando se hace diagnóstico citogenético prenatal es encontrarse una translocación aparentemente equilibrada pero *de novo*, es decir que ninguno de los progenitores sean portadores de tal translocación. Entonces no se puede asegurar cómo va a ser el desarrollo del feto ni las posibles implicaciones que tenga tal hallazgo. Aunque aparentemente no haya duplicación ni pérdida de material cromosómico, el punto de rotura puede haber causado alteración en alguna función del genoma.

Durante la gametogénesis, en meiosis I, los cromosomas homólogos se aparean *punto por punto*, produciéndose el *crossing-over* que es lo que produce la variabilidad en la especie. Si existe una alteración cromosómica, como una translocación, se formará un tetravalente con el fin de que se pueda realizar dicho *crossing-over*. El problema surge en la anafase al separarse los cromosomas homólogos, originándose los **cromosomas derivativos (*der*)**.

Para este tipo de cromosomopatía se consideran diferentes modos de segregación. Suponemos dos pares de cromosomas AB y CD que presentan una translocación recíproca equilibrada (imagen 3). El cromosoma A es normal y el B es su homólogo translocado, lo mismo pasa con el C que es normal y el D que es su homólogo translocado. A continuación y haciendo uso del diagrama, se explican los diferentes gametos que se pueden originar en función de los posibles modos de segregación.

**Imagen 3 Representación de un cuadrivalente de una translocación equilibrada**



a.) Segregación 2:2, en la que dos cromosomas se van a una célula y los otros dos a la otra. En ella hay tres tipos de segregación:

- **Segregación alternante, cruzada o estable** en la que se separan conjuntamente los cromosomas AC y BD. Con lo que la mitad de los gametos podrán ser normales y la otra mitad serán portadores de la anomalía.

- **Segregación adyacente 1** en la que se van conjuntamente los cromosomas AD y BC. Suponiendo que el gameto con el que va a ocurrir la fecundación sea normal, las posibilidades para el producto de dicha fecundación será un 50% de la descendencia podrá tener una trisomía parcial del cromosoma A y monosomía parcial del cromosoma C; y el otro 50% presentará una trisomía parcial del cromosoma C y una monosomía parcial del cromosoma A (Afonso Hernández *et. ál.*, 2006).

- **Segregación adyacente 2** en la que se quedan por un lado los cromosomas AB y por el otro CD, que fecundado por un gameto normal dará una descendencia cuyo 50% puede tener una trisomía parcial del cromosoma A

y una monosomía grande del cromosoma C. El otro 50% presentará una trisomía parcial del cromosoma C casi completa y una monosomía del cromosoma A.

b.) Segregación 3:1, tres cromosomas van a una célula y uno a otra. Hay 4 posibles variantes al producirse fecundación con un gameto normal:

1.- **ABC+D**, entonces se obtiene con un 50% de probabilidad embriones con trisomías parciales en ambos cromosomas y el otro 50% tendrán una doble monosomía parcial de ambos cromosomas.

2.- **ACD+B**: obteniéndose en iguales proporciones productos de la fecundación con trisomía parcial de ambos cromosomas o monosomía parcial de ambos cromosomas.

3.- **BCD+A**: los productos de la fecundación tendrán con igual proporción una trisomía completa del cromosoma C o una monosomía completa del cromosoma C, sin ser portador de la translocación se puede afirmar que la monosomía se debe a ésta.

4.- **ABD+C**: se obtiene un embrión con trisomía completa del cromosoma A o monosomía completa del cromosoma A.

c.) Segregación 4:0, en la que los cuatro cromosomas se van a la misma célula, generando dobles trisomías y dobles monosomías.

## **B) Translocaciones robertsonianas**

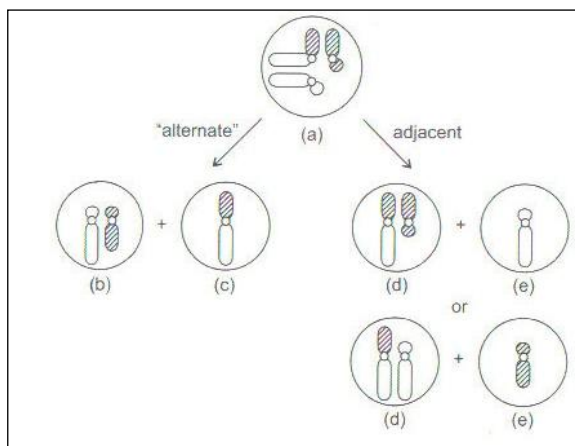
Se denominan así a las que ocurren entre los cromosomas acrocéntricos que en humanos son cinco: 13, 14, 15, 21, 22. La nomenclatura ISCN (Shaffer *et. ál.*, 2009) para este tipo de translocación acepta usar **der** como una translocación normal o se puede usar **rob** para especificar que se trata de este tipo de translocación.

Históricamente la translocación más importante es la que implica al cromosoma 21 (Gardner *et. ál.*, 2003), con cualquiera de los demás o incluso con él mismo, ya que puede originar trisomía 21 con carácter familiar o heredable. Es más frecuente encontrar translocaciones entre cromosomas no homólogos que pueden transmitirse entre generaciones de individuos fenotípicamente normales, que entre homólogos, ya que se formaría casi siempre una trisomía. Las más frecuentes son rob(13q14q) y rob(14q21q).

Como resultado de la translocación se forma el cromosoma robertsoniano o derivativo y un producto pequeño que normalmente se pierde, aunque en ocasiones aparece como un cromosoma ESAC o marcador. Cuando se pierde no parece tener efecto fenotípico porque a pesar de haberse perdido 2 regiones NOR (organizadores nucleolares), todavía se mantienen 8.

Si la translocación es entre cromosomas no homólogos, se asocian con abortos de repetición e infertilidad masculina. Y si son entre homólogos, puede ser un isocromosoma.

**Imagen 4 Representación de un trivalente de una translocación robertsoniana (Gardner y Sutherland, 2003) y sus posibles segregaciones: alternante o adyacente**



En la placa metafásica, se forma un trivalente, como se muestra en la imagen 4, con los siguientes modos de segregación: alternante, dando lugar a un gameto normal y a un gameto portador de la translocación, o adyacente 1 o



2, donde se obtiene un gameto sólo con un cromosoma de los implicados en la translocación y el otro gameto con el cromosoma derivativo y el otro implicado, dando lugar si se fusionara con un gameto normal a una monosomía completa en la primera opción y una trisomía parcial en la segunda. Además de la segregación 3:0, que es muy poco frecuente, hay seis posibles combinaciones, de las cuales una es normal, otra es portador equilibrado y cuatro son desequilibradas.

### **C) Translocaciones con cromosomas sexuales**

Los gonosomas o cromosomas sexuales pueden translocarse con un autosoma y/o con otro cromosoma sexual. Entre las peculiaridades de los gonosomas están que uno de los cromosomas X es capaz de sufrir silenciamiento transcripcional y que el cromosoma Y tiene abundante heterocromatina constitutiva de replicación tardía. Por lo tanto, las implicaciones de una translocación con el cromosoma X son bastantes diferentes para los varones y hembras. El caso más extremo consiste en la translocación de un autosoma al X inactivo de la hembra, ya que la inactivación del X puede extenderse al autosoma dando lugar a una deficiencia funcional.

Pueden ocurrir translocaciones entre los cromosomas X e Y, pudiendo originar mujeres 46, X, der(X) t(X;Y) y hombres 46, Y, der(X) t(X;Y). También se conocen translocaciones entre dos cromosomas X y entre dos cromosomas Y.

#### **1.2.1.1.2 Inversiones**

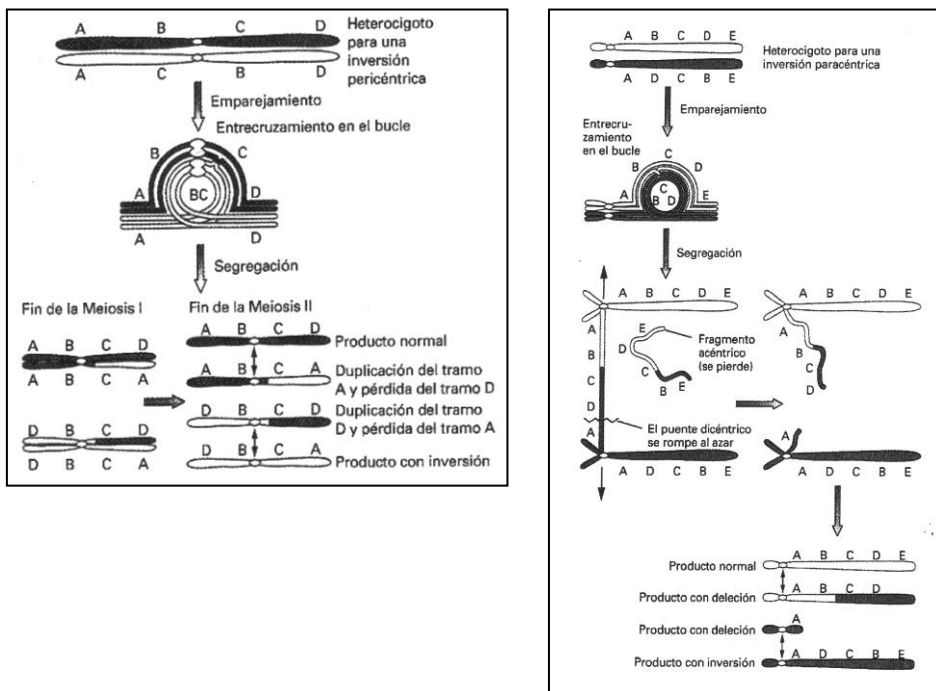
Este tipo de reordenamiento no implica ganancia ni pérdida de material genético, sino que un fragmento de un cromosoma cambia su sentido para lo cual son necesarias roturas en una o dos localizaciones.

Se clasifican en dos grupos según si el fragmento que se invierte incluye o no el centrómero. Se denominan inversiones **pericéntricas** si el centrómero está incluido en el segmento que cambia de dirección y se

denominan inversiones **paracéntricas** si el fragmento invertido excluye el centrómero.

A nivel fenotípico, el único efecto que pueden producir se debería a un defecto de función, por ejemplo, si la inversión transfiere un gen de una zona eucromática a una zona heterocromática, puede producirse su inactivación.

**Imagen 5 Representación del emparejamiento, entrecruzamiento y segregación de una pareja de cromosomas, uno de los cuales porta una inversión pericéntrica (izqda.) o paracéntrica (dcha.) (Griffiths *et. ál.*, 2000).**



En un cromosoma que tiene una inversión, por ejemplo pericéntrica, en el momento del apareamiento meiótico ha de formarse un bucle o loop durante la estructura de bivalente (imagen 5). A partir de ésta, la segregación puede ocurrir de dos maneras:

- Cada cromosoma se desplaza hacia un polo, de manera que el 50% de los descendientes serán portadores de la inversión.
- Se forma un quiasma y se segregan:

a.) Dos cromosomas que van a generar trisomías parciales y monosomías parciales.

b.) Un cromosoma normal y otro portador de la inversión.

En el caso de la inversión paracéntrica, tras el quiasma se originan un cromosoma normal, uno con inversión y dos cromosomas incompatibles con la vida, uno dicéntrico (con dos centrómeros) y otro acéntrico (sin centrómero).

### **1.2.1.1.3 Deleciones**

Este tipo de reordenamiento cromosómico puede detectarse mediante citogenética convencional, bandeo de alta resolución o citogenética molecular, en función del tamaño del segmento ausente. Las deleciones pueden ser terminales o intersticiales.

Una deleción causa una monosomía parcial y generalmente se asocian a patologías. Incluso en algunos casos ocurre pérdida de material sin efecto fenotípico como la pérdida asociada a una translocación robertsoniana o en determinadas regiones consideradas de heterocromatina. Los fragmentos delecionados de mayor tamaño tienen mayor efecto fenotípico que los más pequeños (Gersen y Keagle, 2005).

Un tipo especial de deleciones son las denominadas **Microdeleciones**, que con frecuencia son la causa de lo que se conoce como Síndrome de genes contiguos o Síndrome de aneusomía segmentaria (SAS) (Schmickel, 1986). Este tipo de reordenamiento suele ser intersticial y no visible en cariotipo, por lo que es necesario el uso de técnicas de citogenética molecular. Los síndromes que causan se relacionan con retraso psicomotor y problemas con el desarrollo, con lo que suelen detectarse en edades tempranas, aunque si existiera alguna sospecha se podrían diagnosticar en la etapa prenatal. A continuación se enumeran algunos de estos síndromes y su localización cromosómica:

- Síndrome de Cri-du-Chat (5p15.2)
- Síndrome de DiGeorge (22q.11)
- Síndrome de Prader Willi – Angelman (15q11-13)
- Síndrome de Williams (7q11.23)

- Síndrome de Miller-Dieker (17p13.3)
- Síndrome de Wolf-Hirschhorn (4p16.3)
- Síndrome de Smith-Mangenis (17p11.2)
- Síndrome de Kallman (Xp22)
- Síndrome de Grouchy (18p-)
- Síndrome de Taybi Rubinstein (16p13)
- Síndrome de Langer-Giedon (8q24)

#### **1.2.1.1.4 Duplicaciones**

Este término se refiere a la presencia adicional de un segmento cromosómico que por consiguiente produce una trisomía parcial. La mayoría se presentan en la misma dirección (directa), aunque puede aparecer invertida. Una duplicación puede presentarse de manera individual o en combinación con otros reordenamientos.

Se les considera menos frecuentes que las deleciones y menos severas. Sólo unas pocas se les asocia a síndromes definidos como por ejemplo el Cornelia de Lange que implica una duplicación distal en 3q (De Lange, 1933).

#### **1.2.1.1.5 Isocromosomas**

Son el producto de un tipo especial de deleción y duplicación que dan lugar a un cromosoma compuesto por dos brazos idénticos (Solari, 2004). En primer lugar ocurre una rotura a nivel del centrómero, luego se pierde uno de los brazos y el otro brazo, que queda unido al centrómero, se duplica.

El isocromosoma Xq (iXq) es el más frecuente. Es el resultado de la duplicación del brazo largo de un cromosoma X, con pérdida del brazo corto. Produce un fenotipo de Síndrome de Turner.

#### **1.2.1.1.6 Cromosomas marcadores**

Un pequeño fragmento cromosómico cuyo origen no pueda ser determinado se denomina cromosoma marcador o cromosoma extra estructuralmente anormal (ESAC) o cromosoma supernumerario. Aunque hoy

en día se consigue identificar la procedencia de muchos de ellos mediante técnicas de FISH o SKY (cariotipo espectral multicolor) (Otero Gómez *et. ál., 2006*).

La gran mayoría de los ESACs provienen de cromosomas acrocéntricos, resultando de los reordenamientos en los que participan las regiones satélites o a las centroméricas (Moreno García *et. ál., 2004*).

Un marcador de los más frecuentes es el que proviene de la duplicación invertida de la región proximal el cromosoma 15. Se ha observado tanto en individuos sanos como en pacientes con anomalías, y parece que la importancia del fenotipo está en relación con el tamaño del fragmento (Webb *et. ál., 1998*).

En ocasiones es posible su diagnóstico prenatal (Carrasco Juan *et. ál., 1990*). Se asocian con retraso mental o anomalías congénitas, pero el riesgo de que se produzca este fenotipo es del 13% cuando aparece *de novo*, siendo mínimo cuando el marcador está también presente en alguno de los padres (Gravholt y Friedrich, 1995).

### **1.2.1.2 Alteraciones numéricas**

En su conjunto tienen una incidencia de 1 cada 200 (0,5%) recién nacidos vivos y pueden ser de dos tipos: aneuploidías y poliploidías.

#### **1.2.1.2.1 Aneuploidías**

Término que hace referencia a la ganancia o pérdida de cromosomas individuales. La pérdida de un cromosoma se denomina *monosomía* y la ganancia *trisomía*, generalmente se asocia a un peor fenotipo la pérdida que la ganancia. La ausencia completa de un par cromosómico (*nulisomía*) es incompatible con la vida. En ocasiones la alteración sólo afecta a parte de un cromosoma siendo por tanto una aneuploidía *parcial*. Pueden aparecer en mosaico o no y su principal causa es la no disyunción meiótica. La tabla 1 detalla las incidencias estimadas para las aneuploidías más frecuentes.

**Tabla 1 Incidencias de las aneuploidías más frecuentes (Gardner y Sutherland, 2003)**

Aneuploidía	Incidencia
Síndrome de Down (trisomía 21)	1/660-1/800
Síndrome de Edwards (trisomía 18)	1/6000-1/8000
Síndrome de Patau (trisomía 13)	1/12000
Síndrome de Klinefelter (XXY)	1/1000
Síndrome de Turner (XO)	1/3000-1/4000
Duplo Y (XYY)	1/1000
Triplo X (XXX)	1/1000

### **A) Trisomía 21**

El Síndrome de Down se describió por primera vez en 1866 (Down, 1866), aunque no se conoció su base cromosómica hasta 1959 (Lejeune *et. ál.*, 1959). Se considera el tipo más frecuente de retraso mental congénito. Presenta un fenotipo peculiar (De Grouchy y Turleau, 1984, Pai *et. ál.*, 2003) caracterizado por fisuras palpebrales oblicuas, hipoplasia de la nariz, lengua protruyente, macroglosia (lengua más grande), braquicefalia (cabeza más corta), estatura baja, hipotonía muscular, línea simiesca en la palma de las manos, defectos cardíacos (canal atrioventricular), un grado variable de retraso mental, etc (Novo Villaverde, 2007).

La gran mayoría de los casos se deben a una no-disyunción durante la gametogénesis, de los que un 75% ocurre en meiosis I. El riesgo de recurrencia de tener un hijo con trisomía 21 está en torno al 1%. En algunos casos (estimado un 5%) son producto de una translocación robertsoniana generalmente entre los cromosomas 14 y 21. Y en ocasiones puede presentarse en forma en mosaico, implicando un menor grado de retraso (Papavassiliou, 2009) y desconociéndose el riesgo de transmisión de la trisomía en estos individuos.

Se considera que no es necesario ser portador de todo un cromosoma 21 completo, sino que existe una región crítica en la banda 21q22.3 que es la

responsable de las características más comunes del Síndrome de Down (McCormick *et. ál.*, 1989).

### **B) Trisomía 18**

Se estableció como Síndrome de Edwards en 1960 tras la publicación de Edwards *et. ál.*, 1960. Se caracteriza (De Grouchy y Turleau, 1984, Pai *et. ál.*, 2003) por retraso en el crecimiento intrauterino (CIR), fisuras palpebrales pequeñas, boca pequeña, manos características con el segundo dedo superpuesto sobre el tercero y el quinto sobre el cuarto, además de tendencia a los puños cerrados, los pies equinovaros, defectos cardíacos, anomalías gastrointestinales y genitourinarias, hipoplasia muscular, etc. Es letal tanto en fetos como en recién nacidos. Durante la infancia es también altamente letal, llegando sólo el 5-10% al primer año de vida y raros casos han llegado a la edad adulta. Incluso se ha visto algún caso de individuos con inteligencia normal cuya trisomía 18 se ha diagnosticado durante o pasada la infancia (Baty *et. ál.*, 1994).

La mayoría de los casos con trisomía 18 estándar son producto de errores de no disyunción meiótica, cuyo principal factor de riesgo es la edad materna avanzada. No se ha encontrado una región crítica responsable del fenotipo, que parece suavizarse si la trisomía 18 se encuentra en mosaico o sólo es una trisomía parcial.

### **C) Trisomía 13**

También denominado Síndrome de Patau fue descrito en 1960 (Patau *et. ál.*, 1960) y se caracteriza por presentar microftalmia, labio leporino, fisura palatina, polidactilia, pies equinovaros, úlceras en el cuero cabelludo, holoprosencefalia y otras malformaciones del sistema nervioso central, además de anomalías genitourinarias, etc (De Grouchy y Turleau, 1984).

Al igual que en el caso anterior, sólo el 5-10% de los que nacen alcanzan el primer año de vida. El retraso mental y de crecimiento suele ser severo. Ocasionalmente se encuentran adultos con trisomía 13 (Baty *et. ál.*, 1994).

La mayoría de los casos se deben a errores de no disyunción, pero la edad materna no parece afectar tanto como en la trisomía 21. Se estima que el 10% de los casos se originan de cromosopatías estructurales (Pai *et. ál.*, 2003).

Se consideran dos posibles regiones críticas con sus particulares fenotipos (Tharapel *et.ál.*, 1986):

- Trisomía 13q proximal: que incluye las bandas 13q11q22 y que se caracteriza por anomalías craneofaciales (nariz hundida y corta, labio leporino, fisura palatina), aumento de proyecciones nucleares en neutrofilos y alto nivel de hemoglobina.
- Trisomía 13 distal: que incluye la región 13q32-qter, es más común y se asocia a la trisomía 13 completa. Se caracteriza por hemangiomas en la línea media, polidactilia, anomalías genitourinarias y un retraso severo tanto mental como del crecimiento.

#### **D) Monosomía del cromosoma X (45,XO)**

También conocido como Síndrome de Turner. Fue en 1959 (Ford, 1959) cuando la ausencia de un cromosoma X se asoció como la causa de las anomalías descritas por Turner, 1938 y por Ullrich, 1930. Se estima que el 99% de las concepciones 45, XO no llegan a término y de hecho el 20% de los abortos espontáneos del primer trimestre son portadores de esta monosomía.

La principal característica es la baja estatura, pero el fenotipo es muy variable dependiendo de la edad, la presencia o no de mosaico, si proviene o no de una anomalía estructural y los patrones de inactivación del cromosoma X (De Grouchy y Turleau, 1984, Pai *et. ál.*, 2003). Ecográficamente se identifican por un higroma quístico cervical o hidrops durante el primer o segundo trimestre. Los recién nacidos son de estatura normal pero presentan el cuello alado (*pterygium colli*), orejas grandes, paladar muy arqueado, uñas muy



convexas, linfedema en el dorso de manos y pies, así como defectos cardíacos (en el 20% de los casos).

Durante la infancia y adolescencia pueden identificarse fallos en el aprendizaje. Aunque el retraso mental es raro se asocia con frecuencia a cromosomas X en anillo. No tienen un desarrollo normal de la pubertad, ni menstruaciones regulares.

El fenotipo del Síndrome de Turner es tan variable que pasa de ser letal en la etapa fetal, durante la infancia puede serlo también debido sobre todo a fallos cardíacos, pudiendo llegar a la edad adulta y entonces presentar alto riesgo de desarrollar diabetes mellitus, osteoporosis, hipertensión y patologías de la piel, como la frecuente formación de queloides.

El 40% de los pacientes presentan monosomía del X en todas las líneas celulares, el 20% son portadores de un isocromosoma del X (iXq) y el resto son consecuencia de un mosaico 45,XO/46,XX, cromosoma X en anillo, translocaciones que impliquen al X o deleciones parciales. Pocos casos se deben a mosaicos 45,XO/46,XY.

### **E) Síndrome de Klinefelter (47,XXY)**

Se describió en 1942 (Klinefelter *et. ál.*,1942) y se caracteriza por hipogonadismo e infertilidad (De Grouchy y Turleau, 1984, Pai *et. ál.*, 2003). Son varones normales al nacimiento y se suelen reconocer durante la adolescencia. Suelen tener extremidades largas, lo que les hace ser altos, dientes largos, clinodactilia en el quinto dedo, sinostosis radioulnar. El retraso mental no suele estar asociado a este síndrome aunque pueden ser inmaduros, tímidos e inseguros. Pacientes con cariotipos 48,XXYY o 48,XXXY sí muestran disfunciones cognitivas. El hipogonadismo se debe a una atrofia testicular y altos niveles de gonadotropinas. Suelen presentar azoospermia y el 30% de los casos presenta ginecomastia.

Presentan alto riesgo de desarrollar diabetes mellitus, obesidad, carcinoma de mama y tumores en células germinales.

La edad materna avanzada no parece ser un factor de riesgo. El cromosoma X extra es de origen materno en los dos tercios de los casos y paterno en el resto.

### **F) Duplo Y (47,XYY)**

Estos varones son difícilmente diagnosticados por características clínicas. Suelen presentar sinostosis radioulnar, falta de deseo sexual, infertilidad, azoospermia o alguna enfermedad mental. Son altos, con la cara y las orejas alargadas. Es común el comportamiento agresivo, déficit de atención e hiperactividad. El desarrollo en la pubertad puede verse ligeramente retrasado.

### **G) Triplo X (47,XXX)**

Son mujeres con un fenotipo variable. Algunas pueden ser asintomáticas o débilmente afectadas, considerándose que sólo el 10% de los casos se diagnostica. Presentan estatura alta, hipotonía, clinodactilia, anomalías renales y genitoruinares y fallo ovárico prematuro, con problemas de fertilidad. Durante el desarrollo pueden presentar déficit cognitivo y dificultades para el aprendizaje, así como déficit de atención (Ottesen *et. ál.*, 2010).

Se origina por una no disyunción durante la meiosis, aunque en un 20% de los casos puede deberse a una no disyunción postcigótica. Se asocia a la edad materna avanzada. Se cree que su fenotipo puede deberse a que haya genes que se escapen a los mecanismos de inactivación del cromosoma X.

## **1.2.1.2.2 Poliploidía**

Ocurre cuando se presentan variaciones de tres o más dotaciones haploides, siendo la situación de *euploidía* la que presenta la dotación de cromosomas completa; siendo en la especie humana el estado diploide.

### **A) Triploidía**

Es el nombre específico cuando se presentan tres dotaciones haploides. Es el tipo más frecuente de poliploidía, se estima que en un 2% de todas las

concepciones, la gran mayoría son letales y son muy raras en nacidos vivos, de hecho si llegan a nacer normalmente mueren en el periodo neonatal. Se considera la causa de un 16% de los abortos espontáneos cromosómicamente anormales. La edad de los padres no parece tener relación y el riesgo de recurrencia es bajo (De Grouchy y Turleau, 1984, Pai *et. ál.*, 2003). El mecanismo más común para una triploidía es la fecundación de un óvulo por dos espermatozoides o por un espermatozoide diploide.

Sus principales características son retraso en el crecimiento intrauterino, labio leporino, fisura palatina, microftalmia, sindactilia, pies equinovaros, el sistema genitourinario suele ser normal en mujeres y con malformaciones en hombres, defectos cardíacos y también en el sistema nervioso central como onfalocelo, mielomeningocele, hidrocefalia, agenesia del cuerpo calloso, etc.

### **B) Tetraploidía**

Es el nombre específico de la poliploidía que porta cuatro dotaciones haploides. Un 6% de los abortos espontáneos cromosómicamente anormales presentan una tetraploidía. Normalmente es debida a un fallo en la primera división mitótica del cigoto.

El primer caso de paciente vivo fue descrito por Golbus *et. ál.*, 1976. Se caracteriza por retraso en el crecimiento intrauterino, microcefalia, anomalías en las orejas, nariz ancha, frente prominente, manos y pies estrechos y alargados, defectos cardíacos, malformaciones genitourinarias, retraso mental, etc. El paciente de mayor edad recogido fue una mujer que llegó a los 21 años a pesar de sus múltiples malformaciones (Pai *et. ál.*, 2003).

#### **1.2.1.3 Polimorfismos cromosómicos, variantes o heteromorfismos**

El término polimorfismo tiende a usarse actualmente en el contexto de genes o moléculas y los otros dos términos, variantes o heteromorfismos, parecen más apropiados cuando nos referimos a cromosomas (Kowalczyk,

2007). De manera que un heteromorfismo cromosómico es un ejemplo de polimorfismo genético. Sea como sea, aportan variabilidad a la especie sin tener repercusión en el fenotipo del portador. Se consideran regiones cromosómicas microscópicamente visibles que varían en tamaño, morfología y tinción.

Ya en 1966, se determinó la incidencia de los polimorfismos en la población de un 2-3% (Egozcue *et. ál.*, 1978). Estas alteraciones se detectan mediante técnicas de citogenética convencional y afectan a las regiones heterocromáticas de los cromosomas acrocéntricos, es decir a las regiones de los organizadores nucleolares, y de las constricciones secundarias de los pares 1, 9, 16 e Y. Lo que se observan son diferencias en el tamaño de esas regiones heterocromáticas, constituidas por DNA ribosómico. Con frecuencia, tras detectar algún polimorfismo mediante bandas G, se usan las bandas C (regiones heterocromáticas) o NOR (satélites) para su comprobación.

- Se conocen cromosomas que varían en el tamaño y posición de la **heterocromatina** en las regiones 1qh, 9qh, 16qh e Yqh. Incluso en estas regiones ocurren inversiones que se consideran también variantes de la normalidad. La más frecuente es la inv(9)(p11q12), así como inversiones del cromosoma 1.

- Variaciones de heterocromatina en los cromosomas 3, 4 y 18 se conocen pero se observan con muy baja frecuencia.

- La longitud del brazo corto de los cromosomas acrocéntricos presenta variaciones comúnmente observadas. Se deben a diferentes cantidades de secuencias de DNA repetidas en tándem (Kowalczyk, 2007) y se localizan en q11, q12 y q13. Han sido descritas translocaciones entre autosomas y estas regiones NOR que se han confundido con aumento de la longitud de los satélites y por lo tanto tenían implicaciones en el fenotipo del portador (Benzacken, 2001, Strake *et. ál.*, 2005).

Los polimorfismos podrían servir para distinguir células maternas de células fetales en cultivo de líquido amniótico, y como prueba de paternidad, pero al estar cada vez más desarrollado el uso de técnicas de biología molecular de mayor resolución, éstas no han llegado a tener tales aplicaciones.

Sin que se trate de verdaderos polimorfismos, existen otro tipo de alteraciones heredables sin aparente efecto en el fenotipo del portador como son los UBCA o anomalías cromosómicas no equilibradas y los EV o variantes de eucromatina (Barber, 2005, Kowalczyk *et. ál.*, 2007).

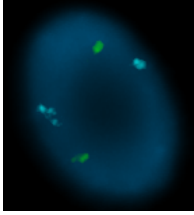
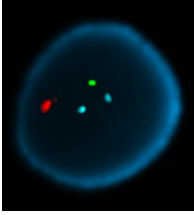
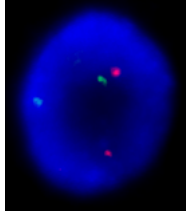
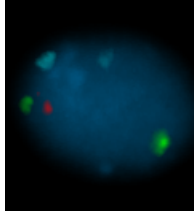
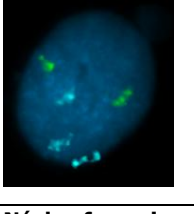
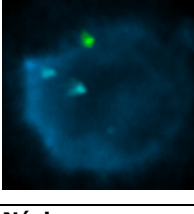
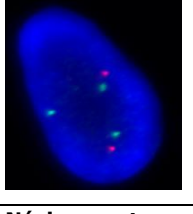
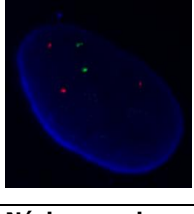
### **1.2.2 Citogenética molecular: hibridación *in situ* fluorescente (FISH)**

Finalmente, la Citogenética Convencional se ha combinado con técnicas de Biología Molecular para producir una nueva disciplina conocida como **CITOGÉNÉTICA MOLECULAR**. La técnica de mayor uso en la clínica dentro de este nuevo apartado es la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) que se basa en hibridar sobre el genoma de la muestra una sonda de DNA marcada con un fluoróforo para identificar una secuencia específica y complementaria. Las sondas anteriormente se marcaban con isótopos radioactivos, pero actualmente son oligonucleótidos acoplados a una sustancia fluorescente (fluoresceína, sulforrodamina, etc.) que absorbe la luz ultravioleta que se le irradia en el microscopio de fluorescencia y que emite a una longitud de onda mayor, lo cual nos permite observarlo mediante el uso de filtros adecuados e incluso fotografiarlo.

Este método en diagnóstico prenatal utiliza entre otros el kit *AneuVysion (Vysis)* que fue autorizado su uso en diagnóstico prenatal por la FDA (Food and Drug Administration) en 1997. Sirve para cuantificar la presencia de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y con lo que se detectan o descartan las aneuploidías más frecuentes explicadas anteriormente, con imágenes como las que se muestran en la tabla 2. Estudios de FISH en núcleos

interfásicos de muestras prenatales llevaban realizándose desde 1993 sólo a nivel de investigación.

**Tabla 2 Imágenes de núcleos hibridados mediante FISH con las sondas del Kit prenatal de Aneuvysion (Vysis)**

			
<b>Núcleo femenino con dos cromosomas 18</b>	<b>Núcleo masculino con dos cromosomas 18</b>	<b>Núcleo con dos cromosomas 13 y dos cromosomas 21</b>	<b>Núcleo con dos cromosomas X y un cromosoma Y (Sd. Klinefelter)</b>
			
<b>Núcleo femenino con tres cromosomas 18 (Sd. Edwards)</b>	<b>Núcleo con un cromosoma X y dos cromosomas 18 (Sd. Turner)</b>	<b>Núcleo con tres cromosomas 13 y dos cromosomas 21 (Sd. Patau)</b>	<b>Núcleo con dos cromosomas 13 y tres cromosomas 21 (Sd. Down)</b>

Esta técnica presenta una alta sensibilidad y especificidad. En algunos laboratorios han publicado datos del 100% de ambos parámetros (Witters *et. ál.*, 2002, Wang *et. ál.*, 2008). Además de una nula o baja tasa de falsos positivos y falsos negativos (Wang *et. ál.*, 2008 y Philip *et. ál.*, 1994). La concordancia estimada entre los resultados del FISH y los obtenidos por citogenética convencional son extremadamente altas: 100% (Liu *et. ál.*, 2010), 99,8% (Tepperberg *et. ál.*, 2001) y >99.5% (Philip *et. ál.*, 1994). En general es un método de diagnóstico rápido, barato, exacto, sensible y específico (Philip *et. ál.*, 1994).

Su gran ventaja frente al cariotipo es que ofrece resultados tanto en metafases como en núcleos interfásicos. Con lo que no hace falta esperar el tiempo del cultivo celular para obtener un resultado, incluso llegando a obtenerse un resultado 24 horas tras la extracción de la muestra.

Una limitación importante es que mediante esta técnica no es posible conocer la causa de una aneuploidía, es decir si ésta se ha originado por translocación, estándar, si se trata de un isocromosoma, etc. Se dificulta por lo tanto el consejo genético (Peach *et. ál.*, 2007) y es por lo que se suele usar en combinación con el estudio del cariotipo.

Como se acaba de comentar, la técnica de FISH en diagnóstico prenatal se usa habitualmente para detectar aneuploidías, pero en ocasiones interesa detectar otro tipo de alteraciones. Para ello se emplean distintos tipos de sondas específicamente diseñadas para detectar deleciones, translocaciones, inversiones, reordenamientos, etc. Además resulta especialmente útil para detectar mosaicismos.

A partir del FISH han derivado otras técnicas de citogenética molecular menos usadas hoy en día en diagnóstico pero muy usadas para la investigación en este campo, como son la hibridación genómica comparada (CGH o array-CGH) y el cariotipo multicolor, bien sea espectral (SKY-FISH) o multiplex (M-FISH). Estas técnicas complementan pero no excluyen al análisis del cariotipo. Además, se usan otras técnicas de biología molecular para este tipo de diagnósticos, entre ellas la QF-PCR, reacción en cadena de la polimerasa con fluorescencia cuantitativa, que se desarrolló hace unos 10 años en investigación y parece ofrecer buenos resultados por lo menos en diagnóstico prenatal.

### **1.3 Técnicas de diagnóstico prenatal invasivo**

Se utilizan tres posibles métodos para hacer diagnóstico prenatal invasivo, que son Biopsia de Vellosidades Coriales (BVC), Amniocentesis (LA) y Funiculocentesis (SC). Todas comparten el objetivo común de diagnosticar o descartar anomalías cromosómicas durante la etapa fetal.

### **1.3.1 Biopsia Corial (BC) o Biopsia de vellosidades coriales (BVC)**

El estudio de las **vellosidades coriales** se basa en el hecho de que la placenta o corion frondoso es un derivado mitótico del cigoto, es decir que se desarrolla a partir de las células provenientes del óvulo fecundado por el espermatozoide, y por lo tanto debe tener la misma información genética que el feto. Esta técnica se suele emplear para analizar no solo alteraciones cromosómicas, sino también metabólicas o genéticas.

La BVC constituye un procedimiento alternativo al estudio del líquido amniótico. Permite la detección de alteraciones citogenéticas en estadios más precoces del embarazo ya que está recomendada su realización entre las semanas 11 y 13 de la gestación (Nicolaidis, 2005). Por lo tanto, los resultados se obtienen aproximadamente un mes o mes y medio antes que los de la amniocentesis, recomendada en la semana 16, y en caso de interrupción de la gestación, ésta conllevará un menor riesgo. Además con esta técnica no existe la necesidad de invadir la cavidad amniótica. Sin embargo, presenta algunas desventajas frente a ellas, como que algunos autores le atribuyen mayor riesgo de aborto (Tabor *et. ál.*, 2009) y no permite detectar las anomalías por defectos del cierre del tubo neural.

Mediante citogenética convencional se ha estimado que en biopsia de vellosidades coriales (BVC) se detecta el 97´5-99´6% de las anomalías cromosómicas, no detectando pequeños reordenamientos, menores de 5-10 millones de pares de bases (Peach *et. ál.*, 2007). Se le atribuye una sensibilidad



de 98´6-99´5% y una especificidad de 98´5-98´8% (Hahnemann y Vejerslev, 1997-2),

Históricamente, las técnicas de biopsia placentaria se desarrollaron para el diagnóstico rápido de la mola hidatiforme: producto defectuoso de la concepción que se caracteriza por tumefacción edematosa de las vellosidades coriales cuyo diámetro es de 0,1-3cm y de aspecto de racimo de uvas.

La biopsia de vellosidades coriales comenzó a hacerse en China en 1970, para examinar los corpúsculos de Barr. En esta época había un intenso programa de control de la población, así que interesaba conocer el sexo fetal lo más pronto posible (Anshan, 1975).

Fue en 1982 cuando se consiguieron los primeros casos diagnosticados mediante biopsia de vellosidades coriales por investigadores de la entonces Unión Soviética (Kazy *et. ál.*, 1982). En Italia, el grupo de Brambati adquirió gran experiencia en este campo. Ellos comenzaron comparando tres formas de realizar la BVC: vía transcervical con fetoscopia y aspirado con y sin guía por ultrasonido (Brambati, *et. ál.*, 1986).

El supuesto de que la placenta era genéticamente idéntica al feto quedó desechado cuando se descubrió que la inactivación del cromosoma X en algunas gestantes difería entre la placenta y el feto. En éste, la inactivación de uno de los cromosomas X se produce al azar, de modo que aproximadamente en el 50% de las células se inactivará el materno y en el resto el paterno. En cambio, en la placenta se inactiva siempre el cromosoma X paterno, hecho que confiere a los tejidos de la interfase maternofetal una mayor similitud con los de la madre (Harrison, 1989, Lyon, 1988).

### **Desarrollo, histología y fisiología de la vellosidad corial**

Aproximadamente una semana después de la fecundación, en el estado de *blastocisto*, se identifican varios grupos de células. Unas darán lugar al embrión y otras, las de la periferia, darán lugar a la placenta y permitirán que aquél se implante en el interior del útero o cavidad endometrial iniciando una

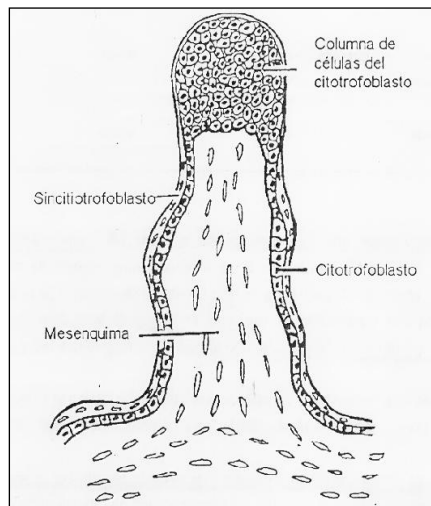
interrelación funcional entre la madre y el feto a través de este "órgano transitorio". El desarrollo placentario se inicia pocas horas después de la implantación, cuando determinados grupos de células del cigoto comienzan a diferenciarse en células del trofoblasto que formarán la placenta (Dexeus *et. ál.*, 1989, Redman *et. ál.*, 1995). Estas células trofoblásticas tienen un comportamiento biológico único que se asemeja a un cáncer por su capacidad de infiltrar o invadir el endometrio. El trofoblasto va formando múltiples ramificaciones o arborescencias que son las vellosidades coriales que se infiltran en el endometrio y alrededor de ellas llegan las arterias maternas formando lagos sanguíneos que regresan después, por las venas, a la circulación materna.

Una **vellosidad corial** presenta durante el primer trimestre de embarazo una zona central de *células mesenquimales* rodeada por una capa interna de *citotrofoblasto* y otra exterior de *sincitiotrofoblasto* (Redman *et. ál.*, 1995). La parte apical se denomina *bastón celular de citotrofoblasto* y es una densa columna de células (imagen 6).

Mediante el uso de timidina tritiada para detectar la síntesis activa de DNA, se observó que a lo largo de una vellosidad las células del mesénquima y del citotrofoblasto presentan división, no habiendo tal actividad en las zonas del sincitiotrofoblasto (Koulischer *et. ál.*, 1985). Siendo la zona del bastón celular la de mayor número de células en división. Por lo tanto, las técnicas de diagnóstico directo analizan las mitosis de este grupo de células. Así que se debe tener en cuenta la importancia de preservar la integridad de esta zona tanto en el momento de la toma de muestra como en su procesamiento posterior para los estudios cromosómicos directos. La ausencia de mitosis en preparaciones directas probablemente sea debido a la pérdida accidental de esta columna celular. Las células del citotrofoblasto tienen una vida media muy limitada en los cultivos a largo plazo, solamente perduran unos pocos días en cultivos *in vitro*, pero también proveen de metafases al cultivo directo. En cambio, las células del mesénquima en las mismas condiciones crecen rápidamente, formando colonias de fibroblastos porque a pesar de no tener

mucha actividad mitótica, la recobran tras el cultivo largo (Wegner, 1995). Es por esto que, tras la obtención de la biopsia de vellosidades coriales, es interesante estudiar ambos tipos celulares, mediante el empleo de técnicas de diagnóstico directo y técnicas de cultivo de ese mismo tejido a largo plazo.

**Imagen 6 Esquema de una vellosidad corial (Koulischer *et. ál.*, 1985)**



Las vellosidades coriales se encargan de realizar las funciones respiratorias, digestivas, excretoras y endocrinas durante la etapa más crítica del desarrollo, funciones todas que, posteriormente, requerirán de la actividad conjunta de muchos órganos y sistemas interrelacionados para mantener la vida extrauterina y adulta. Este órgano va a permitir el intercambio de gases y nutrientes, aunque no el paso libre de sustancias, pues constituye un filtro. Así pues, la placenta resulta indispensable e insustituible para lograr el adecuado desarrollo y crecimiento fetal.

### **Vías de obtención de la BVC**

Esta prueba invasiva se realiza bajo control ecográfico para ubicar correctamente el útero, la placenta y el feto, independientemente del examen ecográfico que se haya realizado previamente. Dependiendo de la ubicación de la placenta y del feto, así como de la experiencia del operador, se selecciona la forma de obtención (Brambati *et. ál.*, 1986, Redman *et. ál.*, 1995):

a) Transvaginal: es muy similar a la toma de una muestra para una citología cervico-vaginal, pero bajo estrictas medidas de asepsia. Con un fino y flexible catéter de plástico estéril y bajo control ecográfico, se dirige al sitio donde está la placenta, en un espacio libre entre el útero y el corion, en donde se pueden encontrar las vellosidades coriales flotando hasta la semana 12 de la gestación. Finalmente se toma una pequeña cantidad mediante una suave aspiración.

b) Transabdominal: el procedimiento es parecido a la amniocentesis, con la diferencia de que la aguja se dirige a la placenta sin introducirse en la cavidad amniótica. La aguja, de 18G o 20G (gauges), cuyo grosor aumenta al disminuir el número, va conectada mediante una cánula a una jeringa con la que se hace vacío para aspirar la muestra. También se realiza bajo control ecográfico.

### **Mosaicismo confinado a la placenta**

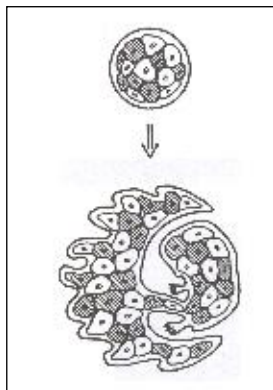
Se estima que en 1 de cada 1000 casos en que el resultado de la biopsia de vellosidades coriales es normal, el feto puede tener anomalías cromosómicas. Este falso negativo puede deberse a un mosaicismo confinado a la placenta. Se considera que el porcentaje de éxito del análisis cromosómico en las muestras de BVC es muy alto, en torno al 98%. Sin embargo, aproximadamente un 1–2% de las muestras presentan resultados ambiguos (Tóth *et. ál.*, 2001, Schreck *et. ál.*, 1990) debido a la presencia de lo que se denomina Mosaicismo confinado a la placenta. Éste es considerado la principal limitación de la técnica de BVC.

La interpretación de los mosaicismos cromosómicos en cultivos de biopsia de las vellosidades coriales es, en la mayoría de los casos, bastante complicado puesto que, puede existir una verdadera discrepancia entre la dotación cromosómica de las células del tejido embrionario/fetal y las del tejido corial. Esta dicotomía es el resultado del conjunto de complejos acontecimientos que tienen lugar en los estadios iniciales de la embriogénesis.

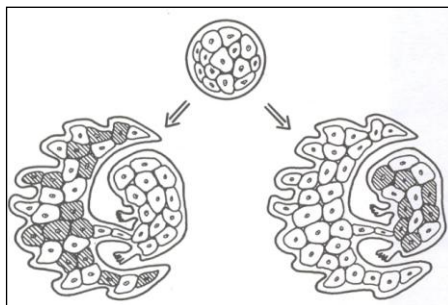
Tanto el linaje celular afectado como el momento del desarrollo en el que se produce la aparición de la segunda línea celular viable, son los responsables de los distintos patrones de mosaicismo que nos podemos encontrar (Kalousek y Vekemans, 1999):

A) Si la segunda línea celular viable se produce tras la primera división post-cigótica o un poco después, es muy probable que, la distribución de ambos genotipos en la mórula en mayor o menor grado, genere mosaicismo cromosómico tanto en las células del embrión/feto como en las de la placenta, que es el mosaicismo generalizado (imagen 7).

**Imagen 7 Mosaicismo generalizado en placenta y feto (Kalousek y Vekemans, 1999)**



**Imagen 8 Mosaicismo confinado a placenta (izqda.) o feto (dcha.) (Kalousek y Vekemans, 1999)**

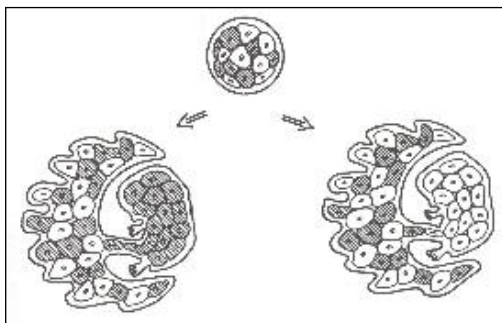


B) También se puede producir un mosaicismo en estadios posteriores al de mórula (estadio de blastocisto), en cuyo caso el mosaicismo quedaría

confinado bien a la placenta o bien al embrión o feto, menos frecuente y conocido como mosaicismo confinado al embrión o feto (imagen 8).

C) Cuando por el contrario, la segunda línea celular viable surge tras la tercera división postcigótica (estadio de 8 células), la localización de esa línea celular mutante en la mórula será la que determine su impacto sobre el embrión. Unas pocas células localizadas en capas internas contribuyen frecuentemente al incremento de la masa celular en mayor medida que las de la periferia. Una distribución desigual de ambas líneas celulares incrementa la probabilidad de que solamente una línea celular esté involucrada en la formación del embrión, mientras que el mosaicismismo quedaría confinado únicamente a la placenta, y por tanto se denomina mosaicismo confinado a la placenta (imagen 9).

**Imagen 9 Mosaicismo confinado a la placenta (Kalousek y Vekemans, 1999)**



Existen tres tipos de mosaicismo confinado a la placenta en gestantes con un feto cromosómicamente normal (tabla 3): el tipo I es el más común, es el mosaicismo confinado a la placenta propiamente dicho y se ha podido constatar que los estudios citogenéticos realizados en vellosidades coriales mediante cultivos directos (células del citotrofoblasto) manifiestan una incidencia de 0,8 – 2% de mosaicismo (Kalousek y Vekemans, 1999). En algunos casos puede producir crecimiento intrauterino retardado (CIR). Los otros dos tipos de mosaicismo son de muy baja frecuencia. El tipo II es poco común y se observa al analizar células de un cultivo largo, habiendo sido asociado en algunos casos a un retraso en el crecimiento fetal. El tipo III es

muy raro y se asocia a retraso en el crecimiento fetal y posterior muerte. Kalousek y Vekemans (1999) resumen los tres tipos de mosaicismos en la siguiente tabla:

En cualquier caso, se aconseja:

- Estudiar el mayor número de células posible.
- Confirmar el cariotipo fetal mediante estudio en otros tejidos fetales: el líquido amniótico o la sangre del cordón.
- Monitorizar cuidadosamente el embarazo.
- Si llega a término, realizar un análisis citogenético de ambos tejidos para establecer el tipo de mosaicismo.

**Tabla 3 Tipos de mosaicismos confinados a la placenta según el tejido en el que se localizan (Kalousek y Vekemans, 1999)**

Mosaicismo confinado a la placenta			
Tejido	Tipo I	Tipo II	Tipo III
<b>Citotrofoblasto (Directo)</b>	Aneuploidía (mosaico o no)	Normal	Aneuploidía (mosaico o no)
<b>Mesénquima (Cultivo)</b>	Normal	Aneuploidía (mosaico o no)	Aneuploidía (mosaico o no)
<b>Tejido fetal</b>	Normal	Normal	Normal

### 1.3.2 Amniocentesis (LA)

Esta técnica de punción para obtención de líquido **amniótico** se lleva realizando desde 1930 (Menees *et. ál.*, 1930). Sus primeras aplicaciones fueron para analizar el antígeno Rh fetal (Bevis y Manc, 1952) o determinar el sexo fetal mediante tinciones de Papanicolaou y Giemsa (Fuchs y Riis, 1956). Es a partir de 1966 cuando comienzan los cultivos de células amnióticas y el análisis de los cromosomas (Steele y Breg, 1966). Hoy en día, sigue siendo la técnica más utilizada para realizar diagnóstico citogenético prenatal ya que presenta mayor fiabilidad y técnicamente es más sencillo que la BVC o SC.

El líquido amniótico aporta al feto un medio con condiciones óptimas para su desarrollo, ya que se mantiene una temperatura adecuada, permite movimiento y crecimiento y ofrece protección física.

La **composición** del líquido amniótico varía (Rooney y Czepulkowski, 1992) en función de la edad gestacional. Sus células provienen del amnios, del feto (piel, aparato urogenital, conducto traqueobronquial y sistema digestivo), y de la madre, células generalmente sanguíneas. Tras unos días de cultivo, desaparecen muchos tipos celulares, quedando a las dos semanas solamente células epiteliales, fibroblastos y amniocitos, éstos son de origen fetal y derivan principalmente de la piel fetal y del amnios. Las células epiteliales derivan de la piel fetal, aparato genitourinario, respiratorio y digestivo, vagina, conjuntiva y amnios. Los fibroblastos son las células que mejor se comportan en cultivo y que más subcultivos soportan. Luego los amniocitos y por último las células epiteliales (Carrera *et. ál.*, 1987).

Si tomáramos una muestra durante el tercer trimestre de gestación, encontraríamos también células queratinizadas del feto. Además de células, el líquido amniótico está compuesto por agua (98-99%) y otros componentes: aminoácidos, proteínas, lípidos, carbohidratos, enzimas, hormonas, urea, creatinina, etc.

El líquido amniótico debe tener un color amarillo pálido, ligeramente opaco dependiendo de la densidad celular. El color ocre suele deberse a hemorragias previas, ya que la hemólisis de la sangre antigua causa ese color parduzco.

### **Técnica**

El momento óptimo durante la gestación para realizar una amniocentesis es entre la semana 15 y 16 de embarazo, porque es cuando se estiman 200ml de líquido amniótico (Gosden, 1983), volumen suficiente para que la extracción de aproximadamente 20ml (10%) no tenga repercusión negativa en el feto. Además las células extraídas durante este periodo crecen en cultivo con la velocidad necesaria para poder dar un diagnóstico en pocas



semanas y se ha calculado que el porcentaje de fallo del cultivo es menor de 0'5% (Gersen y Keagle, 2005).

El intervalo suele abarcar sin problemas hasta la semana 18, llegando a realizarse en ocasiones amniocentesis tempranas, previas a la semana 15 e incluso tardías, posteriores a la semana 24 de gestación. Antes de la semana 14 se han observado mayor número de pérdidas fetales significativamente si se comparan con las amniocentesis posteriores, además de nacidos con pies equinovaros, fallo en el cultivo y pérdida de LA tras la punción (CEMAT, 1998, Sundberg *et. ál.*, 1997, Nagel *et. ál.*, 1998).

La punción se realiza siempre bajo control ecográfico, además del examen previo que debe incluir la aproximación de la semana de gestación, presencia de uno o más fetos, frecuencia cardíaca fetal, localización placentaria, existencia de anomalías estructurales, además de la identificación del saco amniótico para decidir por dónde realizar la punción evitando atravesar la placenta y si no haciéndolo en la zona de menor grosor (Borrel *et. ál.*, 2000).

Actualmente las amniocentesis se realizan sin anestesia local y sin ingreso, sólo ambulatorio. La aguja comúnmente usada es la de 22G, que se inserta una vez se limpia la zona a pinchar con povidona yodada. Se retira el fiador cuando se llegue a la cavidad amniótica y se conecta la jeringa. Se aspiran entre 16-20ml. Tras la retirada de la aguja se precisa de valoración ecográfica.

### **1.3.3 Funiculocentesis (SC)**

La sangre materna llega hasta los lagos sanguíneos que rodean las vellosidades coriales, pero nunca pasa al feto. La **sangre fetal** circula por el cordón umbilical y llega a la placenta, a sus vellosidades, donde queda separada de la sangre por la membrana placentaria, que nunca rebasa. La placenta humana es hemocorial; esto quiere decir que la sangre materna y fetal nunca se mezclan.

Esta técnica también denominada cordocentesis, comenzó a usarse para el estudio de hemoglobinopatías (Valenti, 1973) gracias al desarrollo de las técnicas de fetoscopia (visualización del feto en el útero) que permitieron la extracción de sangre fetal a partir del cordón umbilical. Concretamente, la punción se realiza sobre la vena umbilical fetal (Daffos *et. ál.*, 1985) al final del segundo trimestre de la gestación.

Es una técnica que está considerada de mayor riesgo que la biopsia de vellosidades coriales y que la amniocentesis (Den Hollander *et. ál.*, 1994). Se le considera con una tasa de mortalidad tras el procedimiento mayor (2´1%) que la de la amniocentesis (0´5%). Acar *et. ál.* 2007 estiman también el riesgo de aborto tras una funiculocentesis entre 1-3%. Hay autores que plantean incluso que en gestaciones avanzadas se puede practicar una BVC en vez de la funiculocentesis, sólo con la desventaja de que la actividad mitótica en este tejido se ve disminuida al avanzar la gestación (Pijpers *et. ál.*, 1988).

El diagnóstico citogenético se obtiene en 48-72 horas, bastante rápido si se compara con el tiempo de cultivo de vellosidades coriales o líquido amniótico.

El acceso a la sangre fetal sirve además para realizar el cariotipo (Morrison y Rodeck, 1997) para determinar valores hematológicos, bioquímicos y serológicos. También es de utilidad en actuaciones terapéuticas como la transfusión intravascular fetal en enfermedad hemolítica o la administración de plaquetas en trombopenias. En casos específicos es preferible analizar la sangre fetal en vez del líquido amniótico, como ejemplo enfermedades hematológicas del tipo de la anemia de Fanconi.

### **Técnica**

Se extraen 1-2ml, máximo 5ml, de sangre de cordón en un tubo esterilizado y con heparina sódica, usando agujas de 20-22G. El tiempo de cultivo necesario para obtener un cariotipo es de 2 a 4 días.

Precisa también de un examen ecográfico detallado del feto, de la placenta y del espacio amniótico, así como de la localización para una punción accesible. Se recomienda la zona de inserción placentaria del cordón, aunque se puede realizar en zonas libres de asa de cordón. Para la punción, la vena umbilical es mejor que la arteria porque tiene menor riesgo de espasmo y bradicardia fetal.

Una alternativa a la punción en el cordón es usar el trayecto intrahepático de la vena umbilical (PIH: punción intrahepática). A pesar de ser una punción más complicada, ofrece ventajas en situaciones en las que haya que atravesar la placenta o que la posición fetal no permita acceder al cordón.

Tiene un elevado riesgo de contaminación con células maternas, lo cual genera un especial problema si el cariotipo obtenido es femenino ya que no se podría distinguir de un cariotipo femenino materno. Se puede confirmar que se trata de muestra fetal si se analiza el valor del volumen corpuscular medio de los hematíes que es mayor que el de sangre adulta y debe ser superior a 100, según método Coulter ( $VCM = \text{hematocrito} / \text{conteo de eritrocitos} \times 100$ ). Existen otros métodos para aislar exclusivamente eritrocitos fetales como el test de Keihauer-Betke (Zhang *et. ál.*, 2010) o la desnaturalización alcalina (Den Hollander *et. ál.*, 1994).

### **1.3.4 Indicaciones para una prueba invasiva**

Este tipo de pruebas están indicadas en mujeres embarazadas con alto riesgo de tener un hijo con anomalías cromosómicas. Este riesgo se obtiene en función de varios parámetros marcadores que aportan un valor de probabilidad. Hasta hace pocos años, este cribado de cromosopatías frecuentes dependía exclusivamente de datos epidemiológicos:

- a) Historia familiar.
- b) Edad materna superior a 35 años.
- c) Antecedentes clínicos.

Esta forma tan sencilla presentaba baja eficacia, baja sensibilidad (menor al 30%) y alta tasa de falsos positivos (10%). Por lo que se han planteado nuevas formas de cribado o *screening* (Bach *et. ál.*, 2004, Fortuny *et. ál.*, 2005, Fortuny *et. ál.*, 2006, Medina Castellano, 2006, Nicolaides, 2004, Nicolaides, 2005). En la actualidad hay diversidad de métodos de cribado de aneuploidías según la localización. En nuestro país, se encuentran diferencias entre las distintas Comunidades Autónomas y también en las distintas áreas sanitarias. Las estrategias más comunes son:

- a) Únicamente la edad materna avanzada.
- b) Marcadores bioquímicos del segundo trimestre y edad materna avanzada en un cálculo combinado de riesgo.
- c) Sólo marcadores ecográficos.
- d) Método combinado del primer trimestre (*test combinado*) que calcula el riesgo proporcional según la edad, los marcadores ecográficos (principalmente la sonolusencia nugal) y los marcadores bioquímicos (PAPP-A y fracción libre de la  $\beta$ hCG).

En resumen, a una gestante se le recomienda una u otra de las técnicas invasivas en función del momento del embarazo en que se detecten una o más de las siguientes situaciones:

- Edad materna avanzada.
- Marcadores bioquímicos en suero materno.
- Progenitores portadores de anomalía cromosómica.
- Gestación previa con alguna anomalía cromosómica.
- Anomalías ecográficas.
- Comprobación de un resultado previo.

A continuación se describen las principales indicaciones:

#### **1.3.4.1 Edad materna avanzada**

La asociación de la edad materna avanzada con el aumento del riesgo de tener concepciones con anomalías cromosómicas se conoce desde hace ya muchos años (Penrose, 1933), incluso antes de que se estableciera la asociación del Síndrome de Down con la trisomía 21 (Lejeune *et. ál.*, 1959).

Penrose afirma que "la edad del padre es un factor insignificante en la etiología del mongolismo, haciendo hincapié enteramente en la edad de la madre".

Hassold T., Hunt P.S. y Sherman S. publican un trabajo en 1993 sobre las trisomías en humanos. Acerca de su origen establecen que un 5% de los casos se deben a no disyunciones mitóticas. Asocian la causa más frecuente de trisomía en humanos a errores en la disyunción de la meiosis I materna. Y los pocos casos que se asocian a causas paternas, se refieren en su mayoría a errores en la meiosis II. Especialmente asociado a la no disyunción paterna está el 50% de los casos de Síndrome de Klinefelter y trisomías de los cromosomas medianos y grandes. A pesar de la cantidad de estudios que se han hecho sobre el tema, todavía no se han establecido con éxito los factores etiológicos que subyacen estas anomalías, aunque se piensa que deben existir factores ambientales implicados, así como predisposiciones familiares, además del indudable efecto de la edad materna. Se han planteado multitud de hipótesis sobre el efecto de la edad, llegando incluso a plantear que lo que disminuye es la probabilidad de abortar un feto trisómico en vez de aumentar la frecuencia en que se crean. Lo que sí planteaban era que no existían diferencias entre la media de edad materna en los casos de no disyunción en meiosis I y II, lo que sugiere que la edad afecta por igual a ambos tipos de divisiones.

Hassold *et. ál.*, 1995 estudiando material procedente de aborto con trisomías 16 plantean un modelo que relaciona la recombinación anómala con la causa de trisomía, siendo un factor importante de predisposición. Para ello se ha de formar un bivalente con alto número de emparejamientos anormales con otro bivalente, particularmente en la región proximal.

Hultén *et. ál.*, 2008 sugieren que la mayoría de los fetos femeninos normales son mosaicos ováricos de trisomía 21 y que la edad materna causa una selección diferencial de esas células durante el desarrollo fetal y postnatal hasta la ovulación. Asocian el hecho de haber encontrado tales mosaicismos ováricos a la alta recurrencia de las trisomías 21 en mujeres jóvenes.

---

Oliver *et. ál.*, 2008 sugieren que la no disyunción del cromosoma 21 en el oocito está asociada a patrones alterados de recombinación que se refieren a que no se realicen intercambios, un simple intercambio en la región telomérica o uno en la región pericentromérica. Para ellos, el riesgo de la ausencia de intercambios o de uno solo a nivel del telomero no se asocia a la edad del oocito. En cambio, el riesgo de no disyunción creado por un único intercambio a nivel del centrómero aumenta con la edad materna.

Ghosh *et. ál.*, 2009 se basan en los trabajos del equipo de Oliver y también trabajan sobre la idea de que las mujeres jóvenes presentan más errores en meiosis I que en meiosis II. Los autores encuentran una alta proporción de ausencia de recombinación en mujeres jóvenes, no tan alta como las mujeres de mayor edad pero sí mayor que las mujeres de mediana edad. La recombinación colabora con la orientación de los cromosomas adecuadamente en el huso meiótico, por lo que su reducción o ausencia se relaciona con el riesgo de no-disyunción. Se plantea que las mujeres jóvenes presentan mayor número de intercambios de recombinación en la zona peritelomérica y las mujeres mayores en la zona pericentromérica.

Según Hassold y Hunt (2009), tanto los errores en meiosis I como en meiosis II aumentan con la edad materna, pero mediante mecanismos de no-disyunción diferentes. Algunos cromosomas son más propensos que otros a cada una de esas rutas. Además plantean que exista una compleja relación entre recombinación alterada y edad materna. La proporción de casos en meiosis I asociados a fallos en la recombinación aumenta entre las mujeres jóvenes, por debajo de los 30 años, y se incrementa aún más en las mujeres mayores, por encima de los 40 años. Para ellos, la meiosis femenina humana tiene asociada cierta predisposición al error, no únicamente ligada a la división meiótica sino en la que están implicados otros aspectos como la relación entre recombinación alterada y las trisomías humanas. Por lo tanto el efecto de la edad materna no es un hecho aislado, sino que debe haber más de un mecanismo dependiente de la edad.

También en el 2009 Allen *et. ál.*, plantean otras hipótesis. Para ellos, la clara asociación entre la edad materna avanzada y la no-disyunción del cromosoma 21 está restringida a los errores meióticos del óvulo, en el 90%, siendo casi inexistentes los casos en los que se deben a errores paternos o mitóticos postcigóticos. La edad materna avanzada se asocia significativamente a la meiosis I y a la meiosis II. A todas las edades los errores en meiosis I son más numerosos que en meiosis II. Sin embargo, el ratio de errores I/II difiere según la edad materna. Es menor entre las mujeres jóvenes (<19 años) y mayores ( $\geq 40$  años), y es mayor entre las mujeres de mediana edad. Los errores en meiosis I disminuyen significativamente a partir de los 40 años. Se cree que factores adicionales más frecuentemente presentes al principio y al final de la edad reproductora guían ese aumento de errores meióticos en los que las cromátidas hermanas fallan al separarse adecuadamente.

El grupo de Allen plantea, citando trabajos de otros autores, que la detención en meiosis y su reanudación después de muchos años puede comprometer la habilidad del oocito de completar la meiosis adecuadamente. Muchas hipótesis sugieren que el efecto de la edad materna se debe a la degradación de la maquinaria meiótica. Se han visto cambios en la expresión génica en oocitos jóvenes comparados con oocitos de adultos en ratón. Algunos de estos perfiles génicos alterados están implicados en la regulación del ciclo celular, la estructura del citoesqueleto, vías energéticas, el control de la transcripción y respuestas a estrés. Así que tales cambios pueden afectar a las anomalías observadas en el huso meiótico visto en mujeres mayores. Además los sistemas de checkpoint que controlan el ensamblaje del huso y el movimiento de los cromosomas pueden no ser efectivos en los oocitos de mayor edad.

En conclusión, se establece relación entre la edad materna y fallos en la disyunción meiótica de los ovocitos. Sin olvidar que la edad paterna avanzada como posible fuente del error en la disyunción meiótica y errores mitóticos tras la formación del cigoto también están implicados aunque con

menor probabilidad. Se conocen cálculos de riesgo de anomalías cromosómicas asociadas con cada grupo de edad (tabla 4).

**Tabla 4 Riesgos de trisomía 21 y otras cromosopatías según la edad materna (Hook, 1981, Cuckle, 1987 )**

Edad Materna	Riesgo de síndrome de Down	Riesgo de otras cromosopatías
15	1:1578	1:454
20	1:1528	1:525
25	1:1351	1:475
30	1:909	1:384
35	1:384	1:178
36	1:307	1:148
37	1:242	1:122
38	1:189	1:104
39	1:146	1:80
40	1:112	1:62
43	1:49	1:30
45	1:28	1:18
50	1:6	-

Desde algunos años, existe en este país una tendencia a cambiar el criterio de edad materna avanzada de los 35 a los 38 años como indicación para procedimiento invasivo en diagnóstico prenatal, debido a que el cambio del screening del segundo trimestre al screening del primer trimestre (planteado por Nicolaides en el año 2005 y explicado más adelante) ha aumentado la sensibilidad.

#### **1.3.4.2 Datos ecográficos**

Los marcadores ecográficos son modificaciones fetales detectables ecográficamente cuya presencia es significativamente más frecuente en presencia de fetos con anomalías cromosómicas respecto a fetos cromosómicamente normales (Fortuny *et. ál.*, 2005).



La *sonolusencia o translucencia nucal (SN, TN)* es una acumulación fisiológico y transitorio de líquido en la región de la nuca fetal que procede embriológicamente del sistema linfático paracervical. Se mide en mm y es la medida y no la presencia lo que indica riesgo cuando su espesor es superior a 2,5-3mm, entre la semana 10,5 y 13,5 de embarazo. Es un marcador muy sensible y específico de las trisomías 21(T21), 18 (T18) y 13 (T13), así como de monosomías (XO) y alteraciones estructurales. Cuanto mayor sea, mayor riesgo.

A continuación se resumen los principales marcadores ecográficos para las trisomías más frecuentes (Chen y Chien, 2007, Carrera *et. ál.*, 2008, Ruoti *et. ál.*, 2008):

### **TRISOMÍA 21**

- Hipoplasia nasal.
- Aumento del pliegue nucal.
- Anomalías cardíacas: comunicaciones auriculo-ventricular, interauricular o interventricular.
- Atresia duodenal o esofágica.
- Hiperecogenicidad cardíaca o intestinal.
- Fémur o húmero corto.
- Ventriculomegalia.
- Arteria umbilical única.

### **TRISOMÍA 18**

- Cráneo en fresa.
- Quistes en los plexos coroideos.
- Micrognatia.
- Alteraciones cardíacas, torácicas y abdominales.
- Alteraciones en manos y pies.

### **TRISOMÍA 13**

- Holoprosencefalia.
- Alteraciones faciales, cardíacas y abdominales (onfalocele).
- Hidrops generalizado.

- Crecimiento intrauterino retrasado (CIR).
- Arteria umbilical única.

### **MONOSOMÍA DEL CROMOSOMA X**

- Higroma quístico.
- Translucencia nucal aumentada.
- Hidrops fetal.
- Anomalías cardiovasculares.
- Anomalías urinarias.
- Anomalías en las extremidades.
- Otras anomalías estructurales.

#### **1.3.4.3 Marcadores bioquímicos**

Los marcadores bioquímicos son sustancias de origen fetal o placentario, detectables en suero materno que, en presencia de determinadas anomalías cromosómicas fetales se encuentran significativamente incrementadas o reducidas respecto a fetos sin tales anomalías (Fortuny *et. ál.*, 2005). La tabla 5 resume los marcadores utilizados, su origen y la variación de sus concentraciones en suero materno cuando hay alteración cromosómica.

**Tabla 5 Resumen de los principales marcadores bioquímicos, su origen y lo que ocurre para que sea indicativo de patología (Bach *et. ál.*, 2004)**

Marcadores	Origen	Indicación
<b>AFP</b>	Fetal	↓ en T21
<b>βhCG total o libre</b>	Placentario	↑ en T21 ↓ en T18 y T13
<b>Estriol no conjugado (uE3)</b>	Feto-placentario	↓ en T21
<b>Inhibina A</b>	Placentario (citotrofoblasto)	↑ en T21 en 2º trimestre (semana 13-16)
<b>PAPP-A</b>	Trofoblasto	↓ en 1º trimestre en todas

AFP: α-fetoproteína, βhCG: gonadotropina coriónica humana β, PAPP-A: proteína A plasmática asociada al embarazo

- **Screening combinado del primer trimestre (Nicolaidis, 2005)**

El riesgo de detectar una anomalía cromosómica aumenta con la edad materna como ya se ha visto. En cambio, se considera que disminuye según se incrementa la edad gestacional. Esto se debe a que es más probable una muerte intraútero en un feto con cromosomopatías que en un feto normal, y dicho riesgo disminuye conforme avanza la gestación. Para un feto portador de una trisomía 21, el riesgo de muerte a partir de la 12 semana es del 30% y de la semana 16 del 20%. En el caso de las trisomías 13 y 18, la tasa de muerte fetal a partir de la semana 12 es del 80%.

El riesgo calculado debe ser individual de cada gestante y en él influye la edad materna y la edad gestacional. Para calcular el resultado del screening se combinará con los hallazgos ecográficos y las pruebas bioquímicas en sangre materna.

a) Screening combinado de la edad materna y la translucencia nucal (NT) fetal: la principal dificultad es el cálculo de la NT. Si ésta se mide con éxito, se obtiene una tasa de falsos positivos del 5% y una tasa de detección que oscila entre el 70-80% de la trisomía 21 y otras cromosomopatías importantes. Con una tasa de falsos positivos del 2%, la detección es del 70%.

b) Screening en embarazos gemelares: cuando son bicoriónicos, las tasas son similares al apartado anterior de embarazos individuales. En gestaciones monocoriónicas, la tasa de falsos positivos es mayor. Esto se explica porque el hecho de observar el pliegue nucal aumentado se puede deber a que ocurra una anomalía cromosómica o a una manifestación del síndrome transfusional feto-fetal entre gemelos.

c) Screening combinado de TN fetal y concentraciones en el suero sanguíneo materno de la  $\beta$ -hCG libre y PAPP-A: en gestaciones con trisomías 21 los niveles de  $\beta$ -hCG libre son mayores que los de gestaciones cromosómicamente normales, mientras que los de PAPP-A son menores. De esta forma se ha demostrado un 90% de detección con un 5% de falsos

positivos y un 80% de detección con un 2% de falsos positivos. Para las trisomías 13 y 18, los valores de ambas moléculas disminuyen. Para las anomalías de los cromosomas sexuales, la  $\beta$ -hCG libre permanece entre valores normales y la PAPP-A disminuye. En triploidías por diandria, la  $\beta$ -hCG libre aumenta y la PAPP-A disminuye levemente, mientras que en las triploidías por diginia se asocian a un marcado descenso de ambas moléculas. El cribado usando esta combinación es capaz de identificar el 90% de todas estas anomalías cromosómicas, con una tasa de falsos positivos del 1%.

Según el resultado del screening, las gestantes se clasifican en tres grupos:

- Grupo de alto riesgo: con valores entre 1/2 y 1/100 a las que se les ofrece directamente una prueba invasiva.
- Grupo de bajo riesgo: con valores inferiores a 1/1000 con poca probabilidad de anomalías.
- Grupo de riesgo intermedio: con valores entre 1/101 y 1/1000. Éstas se someten a un estudio ecográfico más extenso, centrándose en otros marcadores ecográficos que se consideran sensibles y específicos para la trisomía 21, como son: la ausencia de hueso nasal, detectada en un 60-70% de los fetos con dicha cromosomopatía y en un 1-2% de los fetos normales, el flujo ductal anormal, detectado en el 80% de las trisomías 21 y en un 5% de los fetos normales y la regurgitación tricuspídea, detectada en el 70% de los síndrome de Down y en un 5% de los fetos cromosómicamente normales. Algunos de éstos ya fueron comentados en el apartado 1.3.4.2 junto con los hallazgos ecográficos característicos del resto de las aneuploidías más frecuentes.

### **1.3.5 Riesgos de una prueba invasiva**

La realización de una prueba invasiva indica que se han asumido por parte del personal médico como por parte de la gestante determinados riesgos, como pueden ser:

1. **Aborto:** es el riesgo más serio y trascendente. En biopsia de vellosidades coriales se ha estimado que ocurre en un 2% de los casos (Tabor *et. ál.*, 2009). Cuando se realiza una amniocentesis existe, según Tabor *et. ál.*, 1986, un 1% de pérdida fetal más que en gestaciones sin dicha prueba. El riesgo de aborto depende de varios factores como la práctica de quien la realiza, el número de punciones, el tamaño de la aguja, etc., de manera que su estimación debería ser individual. El índice de pérdida fetal estimado para la funiculocentesis oscilar del 1,5% al 3% (Acar *et. ál.*, 2007).

2. **Hemorragias, hematomas y calambres:** son síntomas bastante frecuentes tras la punción, pero no suelen tener demasiada trascendencia.

3. **Infecciones:** son raras aunque no deben ser desatendidas. Se estima que un 0,12% de los casos desarrolla una coriamnionitis.

4. **Daños al feto:** a comienzos de los años 90 se observó que el realizar una biopsia corial podría incrementar el riesgo de defectos en los miembros del feto (reducciones de extremidades, falta de desarrollo de los dedos de la mano o del pie) (Brambati *et. ál.*, 2005). La incidencia de este defecto es de menos de 1 por cada 1000 embarazadas que se realizan una BVC, cuando ésta es practicada en semanas tempranas del embarazo. En amniocentesis el riesgo de lesión fetal es prácticamente nulo con buena experiencia del operador. Tras una funiculocentesis el principal riesgo para el feto es la bradicardia fetal persistente.

5. Necesidad de repetir el estudio: ocasionalmente el médico no puede obtener suficiente material o el laboratorio no obtiene un resultado, porque por ejemplo no haya habido crecimiento de las células en cultivo. En estos casos se deberá valorar la necesidad de volver a repetir la prueba o elegir otra diferente.

6. En una amniocentesis la **pérdida de líquido amniótico**, se registra en un 0,4% de los casos. Un 40% de gestaciones en que ocurre, los

nacidos evolucionan normalmente. La reducción del volumen de LA conlleva riesgo de hipoplasia pulmonar y deformaciones posturales del feto.

7. En ocasiones se observa mezcla de células al microscopio. Esta situación se ha estimado en un 1% para las biopsias coriales y se considera un resultado ambiguo (Tóth *et. ál.*, 2001). La explicación puede ser variada: una contaminación por células maternas, un mosaicismo confinado a la placenta, mosaico cromosómico, etc.

El **mosaicismo cromosómico** se define como la presencia de dos o más líneas celulares con cariotipos distintos en el mismo individuo; con frecuencia, una de las líneas celulares es totalmente normal y la otra es aneuploide.

Los mosaicismos se originan durante el desarrollo post-cigótico como consecuencia de una no-disyunción o una anafase tardía. No obstante, debe tenerse en cuenta que pueden darse al menos tres situaciones en que la presencia de mosaicos cromosómicos en las células de un cultivo de un tejido no sean reflejo de la situación real del tejido fetal:

- A)** Las condiciones a que se someten las células en los cultivos *in vitro* pueden originar la aparición de alteraciones en alguna línea celular que puede ser interpretado como mosaico cuando se estudia.
- B)** La muestra puede contaminarse con otras células cromosómicamente diferentes a las que se estudian, como es el caso de la contaminación por células maternas.
- C)** La proporción de células normales y anormales encontradas en los cultivos celulares puede ser diferente de la proporción de dichas células *in vivo*.

## **2 Objetivos**

---

---

Los objetivos de esta Tesis Doctoral son:

- Puesta a punto de la técnica de **Biopsia de Vellosidades Coriales** y análisis de sus resultados, utilizando la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y el cariotipo de células cultivadas.
- Evaluar la aportación de los resultados obtenidos mediante **Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)** frente al cariotipo en muestras de líquido amniótico.
- Valoración **estadístico-descriptiva** de los cuatro tipos de pruebas invasivas para el diagnóstico citogenético prenatal: biopsia de vellosidades coriales, hibridación *in situ* fluorescente, amniocentesis y funiculocentesis.
- Evaluar la **concordancia** de los resultados comparando los de una prueba con los de otra cuando se realicen varias sobre una misma gestación.
- Comparar los **casos cromosómicamente normales frente a los patológicos**, especialmente en función de la edad materna, la indicación para realizar la prueba y la frecuencia de aparición de cromosopatías.
- Analizar el **flujo de información** entre la clínica y el laboratorio y proponer una mejora en la recogida de datos y su registro electrónico, lo cual permitirá obtener historias clínicas más completas y ayudará a estudios futuros.



## **3 Materiales y métodos**

---

### 3.1 Recopilación de datos

Se realiza un estudio retrospectivo de las muestras prenatales tanto vellosidades coriales (BVC), líquido amniótico (LA) y sangre de cordón (SC) analizadas en la Sección de Citogenética del Hospital Universitario de Canarias (HUC), haciendo una cohorte histórica que finaliza el 31 de diciembre de 2009. Esta cohorte comienza en 1999 con datos sobre amniocentesis y funiculocentesis, en cambio no es hasta 2007 cuando se comienzan a realizar biopsia de vellosidades coriales de manera rutinaria y es el 1 de enero de ese año donde da comienzo este estudio.

Durante estos 10 años, se han analizado 63 muestras de SC y 9119 de LA, a las cuales desde el año 2002 se les ha realizado 967 estudios mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH). El total de muestras de BC analizadas en los tres años han sido 115.

Las muestras que llegan a la Sección de Citogenética del HUC lo hacen desde este mismo centro, desde el HUNSC (Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria) también en la isla de Tenerife, del Hospital Nuestra Señora de Las Nieves en la isla de La Palma y ocasionalmente del resto de las islas de la Provincia.

La información para el estudio se recoge de la propia base de datos de la Sección de Citogenética del HUC, de la Unidad de Diagnóstico Prenatal del mismo hospital y de las historias de su archivo central.

Debido a la reciente puesta a punto de la técnica de BVC, el análisis sobre la misma va a ser más extenso y completo que el de LA, FISH y SC. Las variables recogidas sobre las **Biopsia de Vellosidades Coriales** han sido:

- Fecha de realización.
- Edad materna.
- Semana de gestación.
- Vía de realización de la técnica.

- Indicación de diagnóstico prenatal.
- Número de abortos previos.
- Número de interrupciones voluntarias del embarazos (IVEs) previos.
- Número de embarazos previos.
- Número de fetos.
- Concepción natural o mediante FIV.
- Desenlace de la gestación.
- Resultado del FISH.
- Realización y resultado del cultivo a largo plazo.
- Contaminación por células maternas.

Para las muestras de **Amniocentesis, FISH y Funiculocentesis** se han recogido las siguientes variables:

- Fecha de realización.
- Edad materna.
- Semana de gestación.
- Indicación de diagnóstico prenatal.
- Resultado.
- Concordancia con otras pruebas si las hubiera.

En cuanto a los motivos de **indicación** para una prueba invasiva se utilizan:

- Edad materna avanzada.
- Resultado del screening o cribado de aneuploidías.
- Hallazgos ecográficos.
- Antecedentes.
- Combinada, utilizada cuando son dos o más indicaciones de las ya enumeradas.
- Comprobación, cuando se realiza para comprobar el resultado de una prueba previa.

- Otros, donde se incluyen indicaciones tipo: no específicas (sospechoso, sospecha de cromosomopatía, etc.), técnicas artificiales de fecundación (ICSI, FIV, etc.), patologías no relacionadas con el estudio del cariotipo (enfermedad de Duchene, enfermedad de Leign, leucemias, etc.), consanguinidad, etc.
- Desconocido, en el caso de no estar informado el motivo por el que se realiza la prueba.

- **Herramientas estadísticas**

Con toda esta información se hace un estudio descriptivo de los datos, haciendo uso del software estadístico SPSS 18 para los datos obtenidos de los cuatro tipo de pruebas realizadas.

Se realizan contrastes usando el test Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) o test de asociación de variables cualitativas, que permite determinar si hay relación estadísticamente significativa o no entre dos variables dicotómicas. Este tipo de contraste se usa para relacionar las variables edad materna avanzada y resultado patológico.

En algunos casos en los que existe dependencia entre las variables de estudio, se efectúan diversos análisis de correspondencias, concretamente entre las indicaciones para realizar una prueba invasiva y los casos en que cada una de esas pruebas resulta patológica. Este tipo de análisis descriptivo permite representar gráficamente las relaciones de dependencia entre los atributos de las variables de estudio. En dicho gráfico, se representan las posibles modalidades y la proximidad entre los puntos se relaciona con el nivel de asociación entre ellas.

Además se van a estimar los siguientes parámetros:

- Valor predictivo positivo: probabilidad de padecer una enfermedad si el resultado del test ha dado positivo (Altman y Bland, 1994, Fernández, 2003).  $VPP = \text{patológicos} / (\text{patológicos} + \text{normales})$

- Sensibilidad: probabilidad de que un individuo enfermo obtenga un resultado patológico (Altman y Bland, 1994, Fernández, 2003). Se relaciona con los casos de falsos positivos.  $\text{Sensibilidad} = \frac{\text{verdaderos positivos}}{\text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}}$

- Especificidad: probabilidad de que un individuo sano obtenga un resultado normal (Altman y Bland, 1994, Fernández, 2003). Se relaciona con los casos de falsos negativos.  $\text{Especificidad} = \frac{\text{verdaderos negativos}}{\text{verdaderos negativos} + \text{falsos positivos}}$

## **3.2 Procesamiento técnico de la muestra**

Debido a la organización del procedimiento de las muestras de líquido amniótico y de vellosidades coriales, a la hora de realizar las hibridaciones del FISH y los cambios de medios del cultivo, se intentan organizar los días de extracción de muestra en lunes y jueves, aunque no siempre es posible debido a circunstancias de las pacientes, del calendario de festivos, etc. La entrada de las muestras de sangre de cordón se prefieren los lunes, martes o viernes debido a los tres días de cultivo que precisan.

Lo primero que se hace con una muestra que llega al laboratorio es registrar correctamente la entrada, dándole un número y recogiendo los datos personales de la paciente así como la indicación de la prueba.

### **3.2.1 Biopsia de vellosidades coriales**

El estudio a nivel citogenético de las biopsias de vellosidades coriales (BVC) se había realizado de una manera más o menos puntual en el HUC, contando, entre los años 2003 y 2006, un total de 17 determinaciones (no incluidas en este estudio). Fue durante los últimos meses del 2006 cuando se comienza a poner a punto una nueva técnica para procesar este material y que se explica detenidamente en el apartado 3.2.2.1.

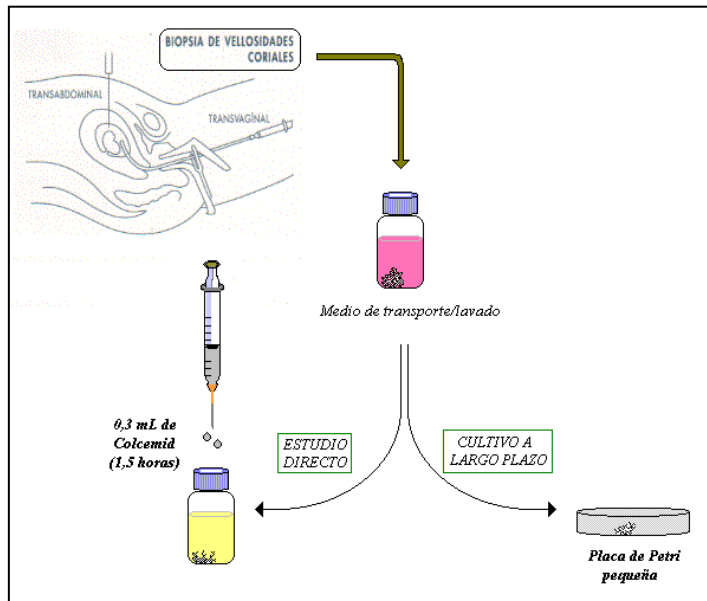
Como se recomienda desde la Asociación Española de Diagnóstico Prenatal (AEDP, 2004), se intenta que esté presente un citogenetista en el momento de la toma de muestra, pudiendo así hacer una primera valoración de la cantidad y calidad de la muestra. Ésta se introduce en suero fisiológico y se transporta al laboratorio. Deben rellenarse correctamente los documentos de datos personales de la paciente así como el consentimiento informado para la prueba que se le realiza.

### 3.2.2.1 Cultivo de células de vellosidad corial

Una vez en el laboratorio se trabajará, la gran mayoría de la técnica, bajo la cabina de flujo laminar.

Con la ayuda de una pipeta se coloca la muestra en una placa para poder evaluar su estado y cantidad. Se separan los coágulos y se limpia con suero fisiológico. Se dividirá la muestra para estudio directo y cultivo a largo plazo (imagen 10).

**Imagen 10 Llegada de la muestra al laboratorio y separación para ambos tipos de estudio**



### a) Estudio directo

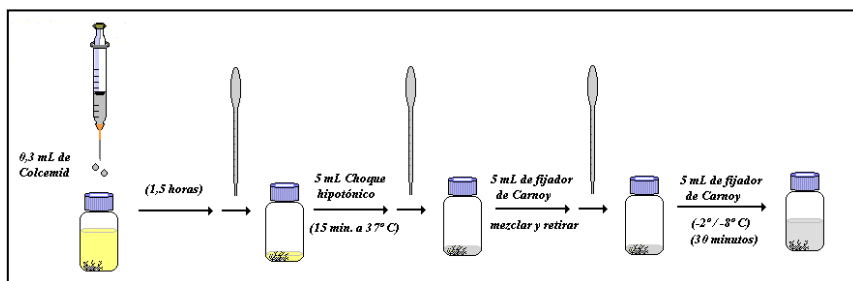
- Colocar aproximadamente 20mg de muestra (Chen *et. ál.*, 2008) en un tubo cónico con el medio de cultivo. Se prueba con el medio de cultivo HAM-F10, habitual del laboratorio para el cultivo de amniocitos, y el medio Chang (Míguez, 1996), habitual del laboratorio para el cultivo directo de muestras de aspirado medular de difícil crecimiento.

- Se añaden 0,3ml de colchicina, antimetabólico que detendrá el ciclo celular en metafase, y se deja actuar durante una hora y media en la estufa a 37°C (imagen 11).

- Con la ayuda de pulsos de centrifuga y una pipeta, se retira cuidadosamente y casi en su totalidad el medio de cultivo y se añaden 5ml de choque hipotónico de KCl al 0,56% (imagen 11). Se incubará en la estufa a 37°C durante 15´.

- De forma similar a la anterior, se retira el choque hipotónico y se añaden 5ml de fijador Carnoy (metanol y ácido acético, 3:1), se mezcla en vortex y se retira el fijador, para añadir 5ml de fijador fresco (imagen 11). Es decir hemos hecho un lavado con fijador para detener la acción del choque hipotónico y se añade nuevamente fijador para dejar actuar en nevera durante un tiempo mínimo de media hora hasta su extensión. Se suele trabajar dejando la muestra fijándose hasta el día siguiente, por motivos de horario y para garantizar su correcta fijación.

**Imagen 11 Pasos de parada del ciclo celular en metafase, tratamiento hipotónico y fijación**

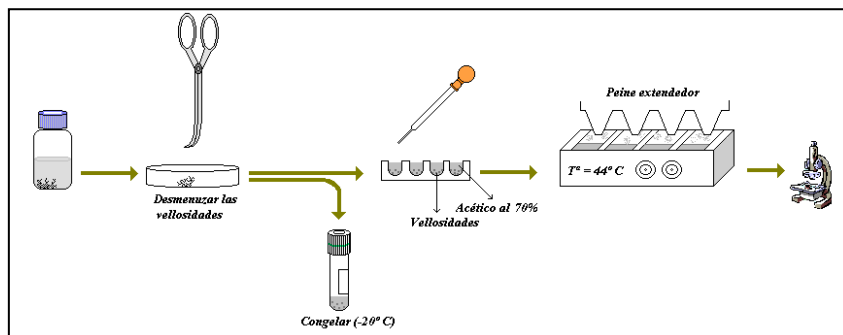


- Al día siguiente se realizan una o varias extensiones del material. Durante los primeros meses, la extensión se realizaba usando una placa calefactora a  $44^{\circ}\text{C}$  y se curvaba una pipeta pasteur con la ayuda de una llama. Luego se adquirió un extensor de vellosidades que automáticamente calienta la superficie donde se coloca el porta y cuenta con un peine para desplazar la muestra. De una u otra manera lo que se intenta es fijar los núcleos a lo largo de todo el porta.

- El material se coloca sobre una placa de petri de plástico que se mantiene inclinada al apoyarla sobre una placa de pocillos microtitter (imagen 12). Con el uso de unas tijeras de punta fina se trocea la muestra y se pasa a un pocillo limpio. En cada pocillo cabe el volumen apropiado para extender un solo porta. Se deja precipitar, se retira el fijador y se añade ácido acético al 70%. Éste se deja actuar unos minutos (2-5'). Se puede observar cómo el material se va distribuyendo por todo el pocillo y cambiando de un color de blanquecino hacia más transparente. Lo que se está haciendo es una disgregación física y química de la muestra.

- Con una pipeta se coloca sobre uno de los portos y se comienza a extender. Retirando si ha quedado algún fragmento demasiado grande, se espera hasta la completa evaporación del acético. Se comprueba que en la extensión haya un número suficiente de núcleos fijados mediante un microscopio invertido (imagen 12).

**Imagen 12 Disgregación mecánica y química y extensión de la muestra**



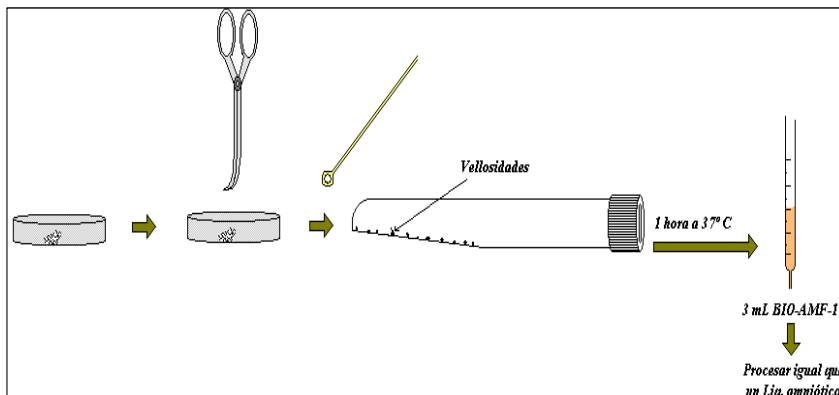


- Se deben realizar varias extensiones, sobre una de ellas se hará el FISH y las demás, su número dependerá de la cantidad de material remitido, se dejaran envejecer en la estufa de 56°C hasta el día siguiente y se bandearán con tripsina y giemsa, para estudiar el cariotipo.

### b) Cultivo a largo plazo

- La porción de la muestra que se va a cultivar debe mantenerse bajo condiciones de esterilidad. Para iniciar los cultivos se pueden desmenuzar muy finamente las vellosidades, lo que se conoce como técnica de maceración (Niaz *et. ál.*, 1981) o someterlas a tratamiento enzimático para disgregar las células del mesénquima.

**Imagen 13 Disgregación mecánica e inclusión de la muestra**



- Tras limpiar la muestra correctamente, se trocean los fragmentos más grandes con un bisturí y se introducen en un frasco de cultivo junto con el medio de cultivo apropiado (imagen 13). Se probaron los siguientes medios de inclusión:

- Ham F-10 para cultivo en estufa a 37°C
- Bio AMF1 para cultivo en estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C

- Además de haber probado los cultivos con y sin CO<sub>2</sub>, se compararon varias formas de realizar la inclusión del material:

a) Trocear el material, introducirlo cuidadosamente en el frasco de cultivo separando los fragmentos, dejar que se fijen a la superficie incubando en la estufa durante 2 horas, luego añadir medio de cultivo.

b) Tras trocear el material en la placa, añadir el medio de cultivo, recoger el material y pasarlo al frasco de cultivo.

c) El material troceado sobre la placa se introduce en el frasco de cultivo con la ayuda del bisturí. Se añaden los 4ml de medio de cultivo directamente al frasco.

- De cualquier manera, el tiempo de cultivo será aproximadamente de dos semanas, habrá que ir controlando con observación mediante microscopio invertido el crecimiento y la ausencia de contaminación. Los primeros días no debe de tocarse el frasco en la estufa, luego cada 4-5 días se realiza un cambio de medio, por medio fresco.

- Cuando se observe un crecimiento óptimo se realizará un subcultivo tripsinizando las células, levantándolas y volviéndoles a permitir que se fijen con medio fresco.

- Si el cultivo crece correctamente, al día siguiente se realizará la técnica o sacrificio. Esto consiste en volver a levantar las células del frasco de cultivo, someterlas a un choque osmótico de KCl (5,59g/l) durante 20' a 37°C y realizar varias fijaciones con Carnoy, incluyendo una de 30' y a 4°C.

- Finalmente se extienden varios portas, una gota por cada uno desde cierta altitud. Suelen quedar bien si el porta se apoya en el borde de la mesa del laboratorio, nos colocamos de pie y nuestra mano con la pipeta se sitúa a la altura de nuestra cara. De todas formas se conocen varias formas para extender y cada laboratorio ha adquirido la suya. Estas preparaciones se bandean con tripsina y giemsa y se analizan al microscopio óptico, usando el software Metasystems (Ikaros) de Vysis®.

### **3.2.1.2 Hibridación in situ con fluorescencia (FISH) en biopsia corial sin cultivar**

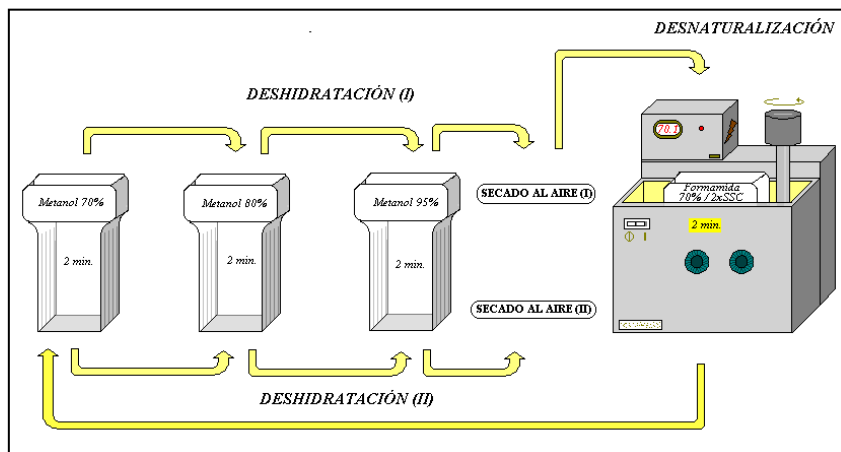
- La extensión que se va a hibridar pasa por un proceso de desnaturalización que consiste en mantener las preparaciones durante 2 minutos en las siguientes soluciones, que deben haberse atemperado previamente (imagen 14).

- En cada uno de la serie de alcoholes al 70%-85%-100% (-20°C). Dejar secar en estufa a 37°C.

- En formamida a 73°C (formamida al 70% en 2XSSC, pH 5´3).

- En cada uno de la serie de alcoholes al 70% (muy importante que este paso sea rápido para detener el efecto desnaturalizante de la formamida con el cambio brusco de temperatura y de composición)-85%-100%. Dejar secar en estufa a 37°C.

**Imagen 14 Deshidratación y desnaturalización**

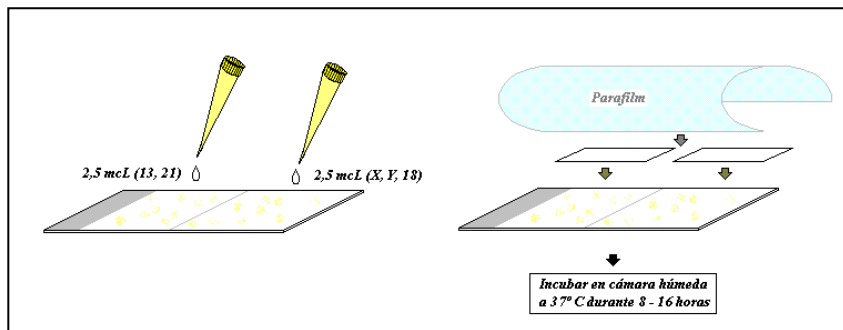


- Las **sondas** que se van a utilizar pertenecen al kit Aneuvysion de Vysis®, en el que un vial contiene secuencias de ADN alfa-satélite de la región centromérica del cromosoma 18 (18p11.1-q11.1) que está marcado en aqua, del cromosoma X (Xp11.1-q11.1) marcado en verde y del cromosoma Y (YP11.1-q11.1) marcado en rojo. El otro vial contiene secuencias únicas de ADN del gen RB1, aproximadamente 440Kb localizado en el brazo largo del cromosoma 13 (13q14) marcado en verde y marcado en rojo el cromosoma 21, concretamente en la región crítica del síndrome de Down (DSCR: "Down

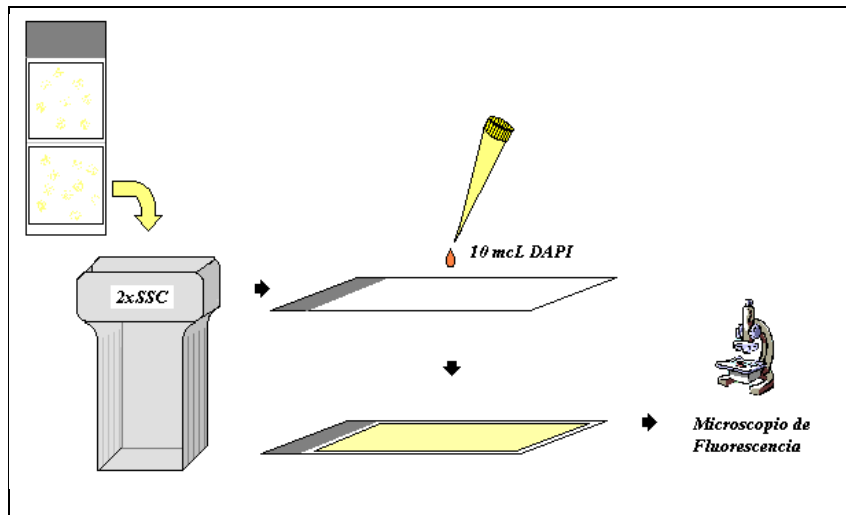
Syndrome Critical Region”) midiendo aproximadamente 200Kb y se localiza en el brazo largo en 21q22.13-q22.2.

- Se añaden 10µl de cada vial a cada lado de la preparación, se coloca sobre cada gota un cubre y se envuelve la preparación con Parafilm®, para evitar la entrada de oxígeno entre cubre y porta que inhibiría la reacción de hibridación (imagen 15). El paquete se introduce en una caja húmeda y se incuba en una estufa a 37°C durante un mínimo de 16 horas.

**Imagen 15** Añadir sondas a la preparación, cubrir y envolver con Parafilm®



**Imagen 16** Lavado y contratinción de la preparación



- Normalmente se dejan hasta el día siguiente, momento en el que se retira el Parafilm® y el cubre. Se introduce en una jarra tipo coplin con

2xSSC/0,1% NP-40 agitando durante 2'. Se añaden 10µl de DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato) a la preparación algo húmeda, para la contratinción de los núcleos (imagen 16). Se colocan dos cubres nuevos, dejando la preparación lista para ser analizada bajo el microscopio de fluorescencia, usamos el software Metasystems (Isis) de Vysis®.

### **3.2.2 Amniocentesis (LA)**

#### **3.2.2.1 Cultivo de células de líquido amniótico**

Para obtener metafases tras el cultivo de muestras de líquido amniótico se ha seguido el protocolo habitual de la Sección de Citogenética.

#### **3.2.2.2 Hibridación in situ con fluorescencia (FISH) en líquido amniótico sin cultivar**

Para esta técnica se usan las mismas sondas, software y microscopio que para BVC (3.2.1.2).

- Una vez registrada e identificada la muestra, se centrifugan 2-5ml de líquido amniótico, durante 10' a 2000rpm.

- Se resuspende el pellet o botón celular en 8ml de choque hipotónico durante 20' a 37°C en baño-maría o estufa, pipeteando cada 5' para romper las membranas celulares.

- Se añade 0'5ml de fijador Carnoy a temperatura ambiente con el vortex y centrifugar 5' a 2000rpm. Decantar el sobrenadante.

- Se añaden esta vez 8ml de fijador (atemperado en nevera), homogeneizar la muestra y dejar en reposo durante 15' a temperatura ambiente.

- Pasado este tiempo se centrifuga 5' a 2000rpm. Decantar el sobrenadante y añadir 4ml de fijador, homogeneizar y conservar en nevera a

4°C hasta que se vayan a hacer las extensiones para el FISH, mínimo 20´ o hasta el día siguiente.

- Se centrifugan las muestras 5´ a 2000rpm. Tras decantar el sobrenadante se añade fijador para que el pellet celular quede a una concentración adecuada. Extender y dejar secar al aire.

- Se introducen las preparaciones en una solución de pepsina (0´6 mg de pepsina, 0´03 ml de HCl 1 N, 100ml de agua destilada) durante 20-30´ a 37°C, este tiempo se aumenta según la edad gestacional.

- Las extensiones se pasan a una solución de formaldehído (2´5 ml de formaldehído, 5 ml de MgCl<sub>2</sub>, 100 ml de 1xPBS) durante 10´ a temperatura ambiente.

- Pasar por una serie de alcoholes en grado creciente de 70%-85%-100% durante 2´ en cada uno y dejar secar al aire.

- Se introducen las preparaciones en la solución de formamida (ya descrita) a 72°C durante 5´.

- Rápidamente se deshidratan las soluciones en alcoholes en grado creciente durante 2´ en alcoholes a 70%-85%-100%, preferiblemente en frío. Se sacan y se permiten que se evapore el alcohol hasta que estén totalmente secas.

- Se añaden 10µl de la sonda en cada porta en la placa a 72°C durante 4´. Se coloca el cubre y se envuelven en parafilm, para mantenerlas a 37°C mínimo durante 16 horas, en cámara húmeda.

- La solución 0,4X SSC/0,3% NP-40 se precalienta a 72°C y se lavan las preparaciones durante 2´ agitando cada 30 segundos. El segundo lavado se hace durante 2´ en 2XSSC/0,1%NP-40 a temperatura ambiente agitando cada 30 segundos. Dejar secar totalmente las muestras. Nota: dejar sólo 20 segundos la preparación de la sonda 13-21.

- Se añaden 10 $\mu$ l de DAPI al 50% diluido en agua, se coloca un cubre y se pone en cámara oscura para llevar al microscopio de fluorescencia.

### **3.2.3 Funiculocentesis (SC)**

#### **3.2.3.1 Cultivo de linfocitos de sangre de cordón**

Para obtener metafases tras el cultivo de muestras de sangre de cordón se ha seguido el protocolo habitual de la Sección de Citogenética.

#### **3.2.3.2 FISH de sangre de cordón**

- Esta técnica se realiza sobre la muestra una vez transcurridos los 3 días de cultivo que requiere.

- Luego se realiza una extensión que se envejece mediante 2h en la estufa de 60° C o en el microondas 1 '45 ' ' a 800W.

- El tiempo de desnaturalización en formamida es de 2 '.

- El resto del protocolo es idéntico al explicado en el apartado 3.2.2.2.

## 4 Resultados

---

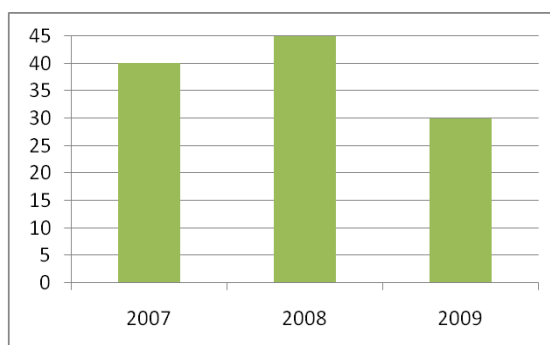


## 4.1 Biopsia de Vellosidades Coriales

### 4.1.1 Descripción de la serie de Biopsias Coriales

Durante los años 2007, 2008 y 2009 han sido analizadas un total de **115 muestras de Biopsia de Vellosidades Coriales (BVC)** variando entre 30 y 45 muestras al año (gráfica 1).

**Gráfica 1 Evolución anual del número de muestras de BVC por año (n=115)**



**Tabla 6 Descripción poblacional de las muestras de BVC**

n=115		
<b>Gestaciones</b>		108
<b>Gestaciones dobles</b>		2
<b>Gestaciones triples</b>		1
<b>Edad gestacional (semanas)</b> n=110	Media	12'24 ± 1'3
	Rango	9-16
<b>Edad materna (años)</b> n=114	Media	34'15 ± 5'5
	Rango	18-43
<b>Vía de toma de muestra</b>	99'13%	Transabdominal

Los valores medios se acompañan de la desviación típica

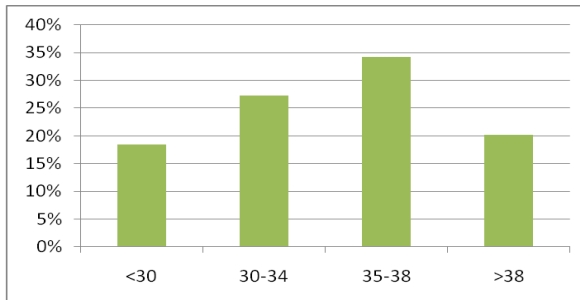
A alguna de las gestantes le corresponde más de una muestra (tabla 6), debido a un embarazo gemelar, al que además hubo que repetir una de las

punciones y le corresponden 3 muestras; otro embarazo gemelar con 2 muestras y un embarazo triple con 3 muestras.

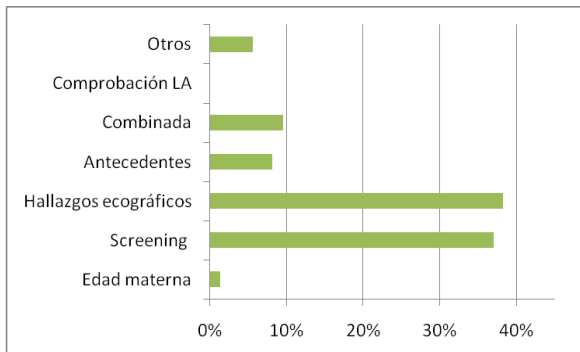
La media de **semana gestacional** en la que se realizó la Biopsia Corial fue 12. El 56´5% de las muestras se realizaron entre las semanas 10 y 12 de embarazo. El resto se realizó en la semana 9 (2´6%) o entre las semanas 12 y 16 (36´5%).

La media de **edad materna** entre las gestantes fue de 34 años (tabla 5), situándose entre los 30 y 35 años el 32% de las BVC realizadas (gráfica 2).

**Gráfica 2 Distribución de frecuencias para las edades a las que se ha realizado la BVC (n=114)**



**Gráfica 3 Frecuencias de las indicaciones de BVC (n=73)**



Las principales **indicaciones** para realizar una Biopsia de Vellosidades Coriales han sido los hallazgos ecográficos y el screening del primer trimestre, ambos en porcentajes similares, 38´3% y 37% respectivamente (gráfica 3).

La **vía de obtención** más utilizada fue la transabdominal (99´13%). En 2 casos realizados durante el año 2009, se probó la obtención de muestra

por vía transvaginal. En ellos se consiguieron resultados con la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH), pero no en los cultivos, ya que en una muestra no se obtuvo resultado y en la otra crecieron exclusivamente células maternas. Con frecuencia, la muestra presenta aspecto hemático. En estos casos además de separar cuidadosamente las vellosidades coriales de los coágulos, es conveniente considerar la aumentada probabilidad de que el resultado observado esté contaminado por células maternas.

#### 4.1.2 Descripción de los resultados de Biopsias Coriales

**Tabla 7 Resumen de los resultados de BVC**

<b>Resultados diagnosticados</b>	<b>112</b>	<b>97´4%</b>
<b>Resultado normal del FISH</b>	<b>92</b>	<b>80%</b>
<b>Casos masculinos</b>	50	43´4%
<b>Casos femeninos</b>	42	36´5%
<b>Resultado del FISH con cromosopatía</b>	<b>19</b>	<b>16´5%</b>
<b>Sd. Down (+21)</b>	4	3´48%
<b>Sd. Edwards (+18)</b>	6	5´22%
<b>Sd. Patau (+13)</b>	5	4´35%
<b>Sd. Turner (X0)</b>	3	2´61%
<b>Triploide (69)</b>	1	0´87%
<b>Falso mosaicismo</b>	1	0´87%
<b>Sin resultado</b>	<b>3</b>	<b>2´61%</b>
<b>Repeticiones de extracción de muestra</b>	<b>1</b>	<b>0´87%</b>
<b>Contaminación materna</b>	<b>9</b>	<b>12´9%*</b>
<b>Cariotipo tras cultivo a largo plazo</b>	<b>34</b>	<b>29´57%</b>
<b>Amniocentesis posterior</b>	<b>10</b>	<b>8´70%</b>
<b>No concordantes cultivo/FISH</b>	<b>4</b>	<b>3´48%</b>

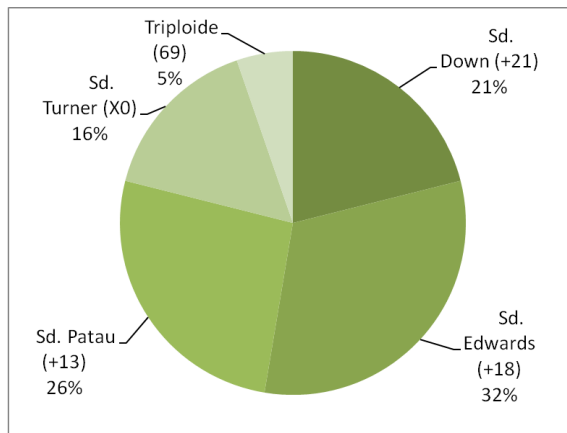
LA: líquido amniótico, +21: trisomía 21, +18: trisomía 18, +13: trisomía 13, XO: monosomía X, FISH: hibridación *in situ* con fluorescencia, \*contaminación materna calculada sobre n=70 fetos masculinos o patológicos

De las 115 muestras analizadas, el 97'4% fueron informativas (tabla76). Esto indica que en tres casos no se emitió un informe: en una ocasión se repitió la punción debido a material insuficiente en el primer intento y en los otros dos se procedió a realizar una amniocentesis posterior.

En una ocasión se registró un **falso mosaicismo**. En un principio fue interpretado como un posible mosaico Down, es decir dos líneas celulares, una normal (99%) y otra portadora de una trisomía 21 (1%). Finalmente, y tras comprobación mediante amniocentesis, se descartó. Interpretándose aquel resultado como una hibridación inespecífica de la técnica de FISH.

La **patología** detectada mediante la técnica de FISH en Biopsia Corial representa casi un 17% de las muestras analizadas. Si observamos cómo se distribuye dicha patología (gráfica 4), es la trisomía 18 la aneuploidía más frecuente (32%) seguida de la trisomía 13 (26%) y en tercer lugar la trisomía 21 (21%).

**Gráfica 4 Resultados patológicos obtenidos mediante FISH en BVC (19/115; 16'5%)**



La **contaminación materna** mediante la técnica de FISH sólo se puede detectar en fetos varones (n=51) o patológicos (n=19) y de ellos se pudieron identificar 9 contaminaciones celulares maternas, lo que representa aproximadamente un 13% (9/70) de estos casos, es decir un 7'8% (9/115) del

total. Entre ellos la mayoría son gestantes menores de 38 años, sólo una es mayor de esa edad. En 3 de estos casos se detectó patología, dos Síndromes de Turner y una trisomía 18 masculino.

En relación a la obtención de **cariotipo**, se ha trabajado tanto el cultivo directo como el cultivo a largo plazo. En **cultivo directo** no se han conseguido resultados hasta la fecha. Durante los primeros meses se intentaron obtener metafases por cultivo directo, mediante la adición de colchicina al medio de cultivo y su incubación a 37°C durante una hora y media. Se probó con el medio de cultivo HAM-F10 y Chang (Míguez, 1996) (utilizado en nuestro laboratorio para el cultivo directo de muestras de aspirado medular de difícil crecimiento) sin conseguir los resultados esperados.

A finales de marzo de 2008, se comenzaron a registrar los intentos de realizar **cultivos a largo plazo** de BVC. Desde ahí al final de la cohorte se obtuvieron 34 cariotipos tras cultivo (30% aproximadamente de la población total), lo que supone el 50% de las muestras entre marzo 2008 y diciembre de 2009. Para el cultivo a largo plazo, la forma en que mejores resultados se obtuvieron fue la de introducir en el frasco el material fragmentado y luego añadir el medio de cultivo. Al evaluar crecimientos según el tipo de medio de cultivo, se consiguieron para la incubación con CO<sub>2</sub> (Bio AMF1) mejores resultados debido al mayor número de cultivos exitosos, menor tiempo de cultivo y mayor número de metafases obtenidas.

Se realizaron 10 **amniocentesis** posteriores a la biopsia corial para comprobación de resultados. Todos eran en gestantes mayores de 38 años y entre los cuales se detectaron dos casos patológicos, un Síndrome de Edwards femenino y un Síndrome de Turner. Otra de las amniocentesis, como se acaba de comentar, sirvió para descartar un posible mosaico Down de baja expresión.

Se registraron n=9 gestaciones con Biopsias de Vellosidades Coriales que habían sido concebidas mediante **técnicas de reproducción asistida**. Esto representa un 26´5% de los casos en que se pudo recoger este dato (n=34) y un 7´8% del total. Sólo una de ellas se realizó sobre una gestante

mayor de 38 años. Se detectaron dos casos patológicos, una trisomía 21 masculino y una trisomía 13 femenina.

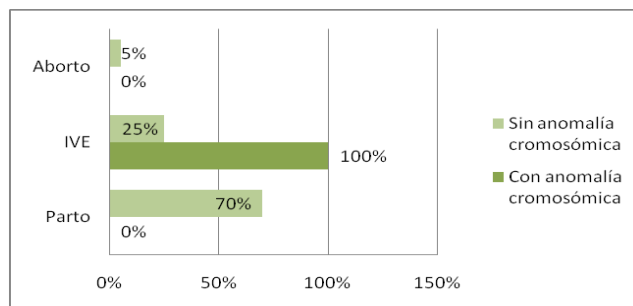
En cuanto a la **historia reproductiva** de las gestantes, se recopiló la siguiente información: 48 gestantes habían tenido embarazos previamente, 15 interrupciones voluntarias del embarazo (IVEs) y 23 abortos espontáneos. De ellas se revisó cuáles habían tenido anomalías cromosómicas en esta gestación y se muestran los resultados en la tabla 8.

**Tabla 8 Relación del resultado de la BVC con la historia reproductiva previa de las gestantes**

	Con aneuploidía n=19	Sin aneuploidía n=91
<b>Embarazos previos</b>	5/48	42/48
<b>IVE previas</b>	2/15	13/15
<b>Abortos previos</b>	1/23	20/23

En el **desenlace de las gestaciones** se detectaron diferencias importantes (gráfica 5). No se detectó ningún parto entre los casos con anomalía cromosómica, todos los registrados fueron IVE (n=15). Entre los casos sin anomalía cromosómica la mayoría concluyeron en parto (n=42), registrándose también abortos espontáneos e IVEs debidas a diferentes motivos como pueden ser malformaciones presentes en el feto.

**Gráfica 5 Comparación del desenlace de las gestaciones entre los grupos con y sin anomalía cromosómica**



### 4.1.3 Concordancia de los resultados obtenidos por FISH en Biopsias de Vellosidades Coriales

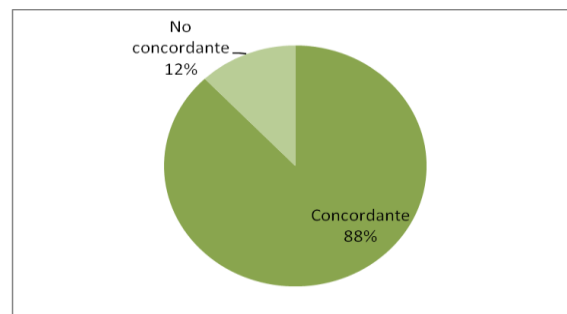
#### 4.1.3.1 Con el cariotipo por cultivo a largo plazo

De las 33 ocasiones en que se obtuvo cariotipo tras cultivo a largo plazo, en 29 casos éste coincidía con el resultado del FISH (tabla 9): 8 hembras, 16 varones y 5 casos patológicos, dos síndromes de Down, dos síndromes de Edwards y un triploide. Esto representa un 88% de concordancia entre los resultados el cultivo y los del FISH.

**Tabla 9 Casos concordantes entre los resultados del FISH y del cariotipo tras cultivo celular (n=29)**

	Cariotipo
<b>XX (n=8)</b>	46, XX
<b>XY (n=16)</b>	46, XY
<b>XX, +21 (n=2)</b>	47, XX, +21
<b>XX, +18 (n=2)</b>	47, XX, +18
<b>XXX, +13, +18, +21 (n=1)</b>	69, XXX

**Gráfica 6 Porcentajes de resultados de cariotipo en BVC concordantes y no concordantes con el FISH (n=33)**



Sólo en 4 ocasiones no hubo concordancia entre los resultados del cultivo y los del FISH, lo que representa un 3'5% del total de muestras y 12% de los cultivos (gráfica 6): dos de ellos habían dado sexo masculino en el FISH y se obtuvieron metafases femeninas en el cultivo, otro había dado síndrome de Turner y el cultivo resultó femenino sin patología, así como un cuarto caso

diagnosticado mediante FISH de trisomía 18 masculino y sus metafases correspondían con sexo femenino sin patología (tabla 10).

**Tabla 10 Casos no concordantes entre los resultados del FISH y el cariotipo en BVC (n=4)**

FISH	Cariotipo
XY (n=2)	46, XX
XO (n=1)	46, XX
+18 (n=1)	46, XX

#### 4.1.3.2 Con las amniocentesis posteriores

Se realizaron 10 amniocentesis (tabla 6) para comprobar los resultados de la BVC. Uno de ellos ya se explicó en el apartado 4.1.2, que fue el de la comprobación del resultado de falso mosaicismo.

En el resto, hubo concordancia entre los resultados de la BVC y de la amniocentesis en todos los casos con lo que representa un 100% de concordancia. Se registraron dos hembras normales, tres varones normales, un Síndrome de Turner y un Síndrome de Edwards.

También fue comentado anteriormente que dos de las tres ocasiones en que no se obtuvo resultado por FISH en BVC, se realizó una amniocentesis de comprobación.

#### 4.1.3.3 Con el desenlace de la gestación

Tras revisar detalladamente las historias clínicas disponibles de cada una de las gestantes, se registraron los casos en los que estaba reflejada en ellas el resultado de la gestación. Éste se comparó con los resultados citogenéticos obtenidos.

Tal comprobación sólo se pudo hacer en 32 ocasiones (27´8%) y en todas había concordancia (100%), tanto en las 18 gestaciones normales como



en las 14 patológicas: 3 trisomías 21, 4 trisomías 13, 6 trisomías 18 y un triploide.

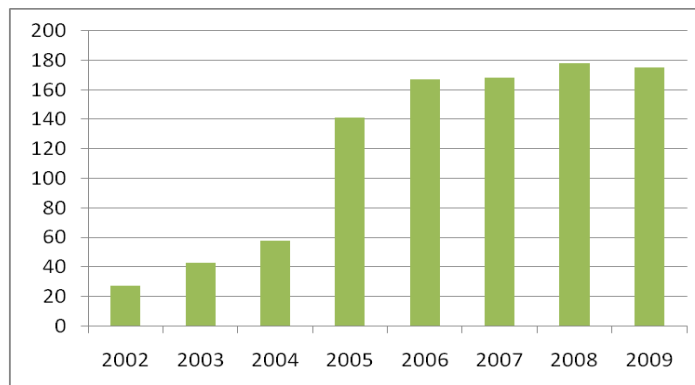
## 4.2 Amniocentesis o muestras de líquido amniótico

### 4.2.1 Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) en líquido amniótico sin cultivar

#### 4.2.1.1 Descripción de la serie de FISH

La técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en **muestras de líquido amniótico sin cultivar** comienza a realizarse en la Sección de Citogenética del HUC en mayo de 2002. Desde entonces hasta el 31 de diciembre de 2009 se han analizado 967 muestras (gráfica 7).

**Gráfica 7 Evolución anual del volumen de muestras de FISH**



Las amniocentesis se han realizado en **edades gestacionales** que oscilan entre la semana 9 y 33, estimando su media próxima a la semana 18 (tabla 11). El 23´6% de de las pruebas se realizaron entre las semanas 15 y 17, y superior a esta edad gestacional se realizaron el 27´7% de las amniocentesis con FISH.

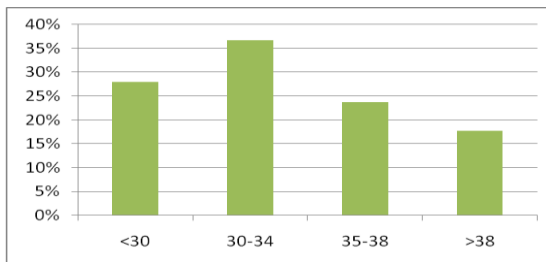
**Tabla 11 Descripción poblacional de las muestras a las que se les realizó FISH**

n=967		
<b>Edad gestacional (semanas)</b> n=548	Media	17´87 ± 3´2
	Rango	9-33
<b>Edad materna (años)</b> n=874	Media	32´62 ± 6´1
	Rango	15-46

Los valores medios se acompañan de la desviación típica

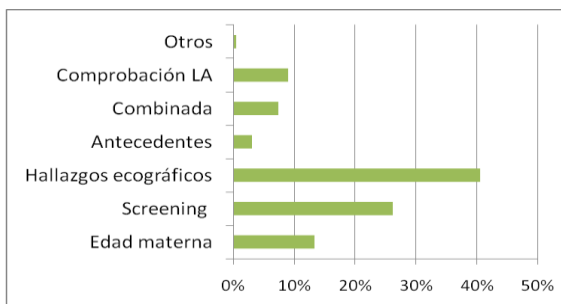
La **edad materna** a la que se les ha practicado la amniocentesis a las gestantes oscila entre los 15 y los 46 años (tabla 11) con una media de 32 años. El 36´7% de las pruebas se realizan a gestantes entre 30 y 34 años (gráfica 8).

**Gráfica 8 Distribución de frecuencias para la edad materna en amniocentesis con FISH (n=874)**



Las **indicaciones** más frecuentes para la realización del FISH en una muestra de líquido amniótico fueron los hallazgos ecográficos, con un porcentaje del 40´5%. En segundo lugar fue el cribado de aneuploidías (26´2%) (gráfica 9).

**Gráfica 9 Frecuencia de las indicaciones de las amniocentesis para realizar FISH (n=656)**



#### 4.2.1.2 Descripción de los resultados del FISH

Del total de las muestras que llegaron a la Sección de Citogenética (n=967), el 97% de los casos fueron informativos. El resultado del 88´3% de los casos fue normal y en el resto (8´7%) se detectaron aneuploidías. La más frecuente fue la trisomía 21 con cerca de un 5% de representatividad (tabla 12).

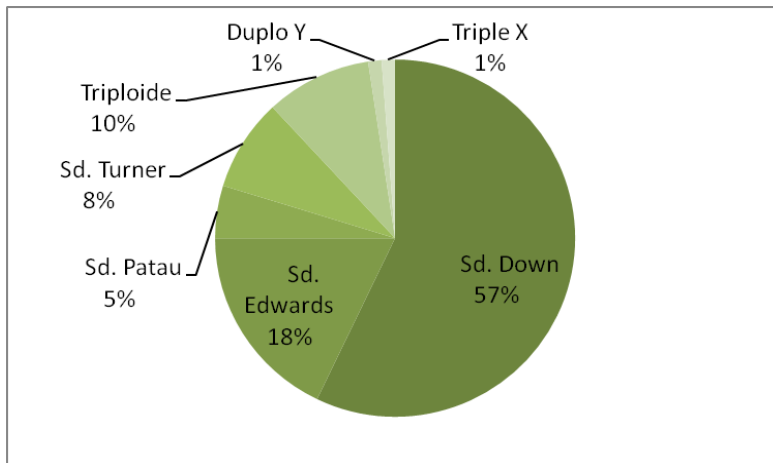
**Tabla 12 Resultados obtenidos por FISH en amniocentesis**

<b>Resultados diagnosticados</b>	<b>938</b>	<b>97%</b>
<b>Resultado normal del FISH</b>	<b>854</b>	<b>88´3%</b>
<b>Casos masculinos</b>	446	46´1%
<b>Casos femeninos</b>	408	42´2%
<b>Resultado del FISH con cromosomopatía</b>	<b>84</b>	<b>8´7%</b>
<b>Sd. Down (+21)</b>	48	5%
<b>Sd. Edwards (+18)</b>	15	1´5%
<b>Sd. Patau (+13)</b>	4	0´4%
<b>Sd. Turner (X0)</b>	7	0´7%
<b>Triploide (69)</b>	8	0´8%
<b>Sin resultado</b>	<b>29</b>	<b>3%</b>
<b>Sin resultado de cariotipo</b>	<b>291</b>	<b>30%</b>
<b>No concordantes FISH/cultivo</b>	<b>9</b>	<b>0´9%</b>
<b>Contaminación materna</b>	<b>4</b>	<b>0´75%*</b>

+21: trisomía 21, +18: trisomía 18, +13: trisomía 13, XO: monosomía X, FISH: hibridación *in situ* con fluorescencia, \*contaminación materna calculada sobre n=530 fetos masculinos o patológicos

Se detectan 84 casos con cromosomopatías patológicas, lo que hace una tasa de detección del 8´7%. Si nos centramos exclusivamente en dicho porcentaje patológico (gráfica 10), su distribución muestra una alta frecuencia de la trisomía 21 (57%) seguida de la trisomía 18 (18%).

**Gráfica 10 Patología detectada por FISH en las amniocentesis (84/967; 8´7%)**



Además del denominado FISH prenatal en el que se estudian las aneuploidías más frecuentes en las que están implicados los cromosomas X, Y, 13, 18 y 21, sobre algunas de estas muestras (n=28) y debido a que existía sospecha clínica previa, se realiza la técnica de FISH con sondas que detectan específicamente Síndromes de Microdelección, también denominados Síndromes de Genes Contiguos (tabla 12). En todos los casos el resultado fue negativo.

**Tabla 13 Síndromes de Microdelección**

	n= 28
<b>Sd. Di George (22q11)</b>	24
<b>Sd. Miller Dieker (17q13.3)</b>	1
<b>Sd. Prader Willi – Angelman (15q11-13)</b>	2
<b>Sd. Cri du Chat (5p15.2)</b>	1

**4.2.1.3 Concordancia de los resultados del FISH con los obtenidos en cariotipo tras cultivo**

En un 0´9% de los casos (n=9) se han observado diferencias entre el resultado del FISH y del cariotipo, obtenido posteriormente tras el cultivo de células amnióticas. La mayoría se deben a contaminaciones por células maternas.

---

– En dos de los casos, un síndrome de Down y un síndrome de Edwards, la contaminación se detectó en FISH no creciendo dichas células maternas en cultivo.

– En dos casos masculinos, la contaminación se detectó sólo en metafases en un caso y sólo en FISH en el otro.

– En una ocasión se dio un resultado por FISH de masculino normal y tras analizar los dos frascos de cultivo se observaron algunas metafases de 92, XXYY. Solo se pudo confirmar en uno de ellos, con lo que se determinó que se debía a una anomalía *in vitro*, producto del crecimiento de células en cultivo, y que no representa la realidad fetal.

– Otro de los casos se estimó por FISH un 99´4% de células femeninas y un 0´4% de células masculinas. Como tras el cultivo el 100% de las metafases estudiadas correspondían al sexo femenino, se estimó que tan bajo porcentaje correspondía a inespecificidad de la técnica de hibridación.

– Una de las muestras aparentemente hemática dio un resultado femenino por FISH, no coincidiendo con el resultado masculino que se obtuvo en metafases tras cultivo. De lo que se supuso que el FISH analizó células maternas y el cariotipo fue fetal. Además de la comprobación del sexo fetal por ecografía, en estos casos se revisan todos los casos anteriores y posteriores al mismo para comprobar que no ha habido ninguna equivocación.

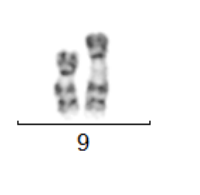
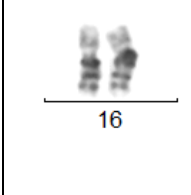
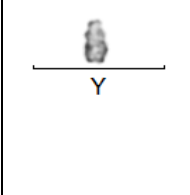
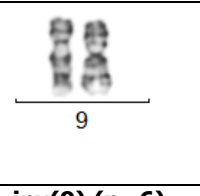
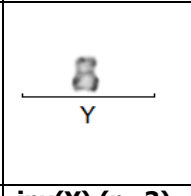
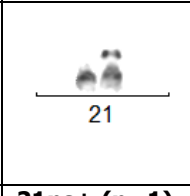
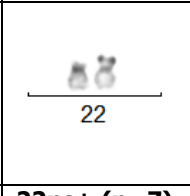
– Un caso dio un resultado femenino mediante FISH y tras el estudio de las metafases, se observó un mosaico de células normales femeninas y células con un cromosoma adicional que en ese momento se pensó que correspondía a una trisomía 21, a pesar de no haberse detectado en el resultado inicial. En estudios posteriores en sangre de cordón y sangre periférica tras el nacimiento, se ha podido observar un mosaico de células con variado número de cromosomas marcadores. Estudiado más ampliamente con la técnica de FISH se determinó que ninguno correspondía al cromosoma 21, coincidiendo con el resultado inicial, y que algunos de ellos eran derivados del

cromosoma 15. Este caso se considera un falso positivo de amniocentesis, al haber comprobado posteriormente que la patología no era la correcta.

– En el año 2005 hubo un caso cuyo resultado por FISH fue masculino con dos cromosomas 21 y en metafases se observó una trisomía 21, confirmada en ambos frascos de cultivo. De los 9 casos descritos es el único en el que hay discordancia entre ambos resultados.

• **Alteraciones citogenéticas no detectables por FISH**

**Tabla 14 Polimorfismos de las amniocentesis a las que se les realizó FISH previo al cariotipo (n=24)**

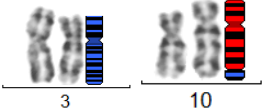
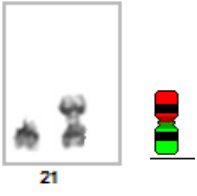
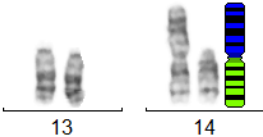

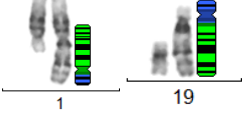
			
<b>9qh+ (n=2)</b>	<b>16qh+ (n=1)</b>	<b>Yqh+ (n=4)</b>	
			
<b>inv(9) (n=6)</b>	<b>inv(Y) (n=3)</b>	<b>21ps+ (n=1)</b>	<b>22ps+ (n=7)</b>

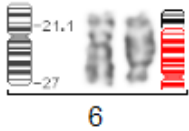
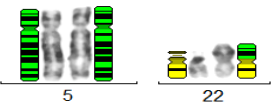
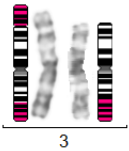
Además de los casos descritos anteriormente, en ocasiones en el cariotipo se observan alteraciones no detectables por FISH, ya que éste sólo es capaz de cuantificar 5 cromosomas. De esta manera, el cariotipo contribuye al diagnóstico del FISH. Cuando se observa el espectro completo del cariotipo se pueden detectar alteraciones estructurales u otras aneuploidías. En las muestras analizadas se han podido ver: 24 **polimorfismos** (tabla 14) y 13 **alteraciones estructurales** (tabla 15).

Uno de los polimorfismos **9qh+** se detectó en un caso de trisomía 21. Además se detectó el polimorfismo **46, XY, var(21)(p21)pat** del que no se

tienen imágenes por pertenecer a la base de datos antigua y que consiste en un aumento del tamaño de los satélites y de la heterocromatina. Se pudo determinar el origen paterno.

**Tabla 15 Alteraciones estructurales detectadas en las amniocentesis a las que se les realizó FISH previo al cariotipo (n=12)**

	<p><b>46, XX, t(3;10) (p23;q25) pat</b></p> <p>Tras analizar el cariotipo a los padres, se establece el origen paterno de la translocación y se considera sin repercusión en el fenotipo del portador salvo posibles anomalías en la descendencia.</p>
	<p><b>46, XX,+21, der(21;21) y 46, XY, +21, der(21;21)</b></p> <p>En ambos casos, es una trisomía 21 por translocación que tras analizar el cariotipo a los padres, se establece el origen <i>de novo</i> de la translocación. El FISH ya había detectado la trisomía 21.</p>
	<p><b>46, XY, +13, der(13;14)(q10;q10)</b></p> <p>Es una trisomía 13 por translocación originada <i>de novo</i>, ya que ninguno de los progenitores era portador de dicha translocación. El FISH ya había detectado la trisomía 13.</p>
	<p><b>46,XX,del(4p14)</b></p> <p>Tras analizar el cariotipo a los padres, se establece el origen <i>de novo</i> de la deleción. Se comprobó realizando un FISH con la sonda para el Síndrome Wolf-Hirschhorn (Afonso Hernández <i>et. ál.</i>, 2007).</p>
	<p><b>46, XX, t(1;19) (1q1.2;19q13.1) pat</b></p> <p>Tras analizar el cariotipo a los padres, se establece el origen paterno de la translocación y se considera sin repercusión en el fenotipo del portador salvo posibles anomalías en la descendencia.</p>

	<p><b>46, XX, inv(6)(p21q31) pat</b></p> <p>Tras analizar el cariotipo a los padres, se establece el origen paterno de la inversión y se considera sin repercusión en el fenotipo del portador salvo posibles anomalías en la descendencia.</p>
	<p><b>46, XY, -22 +der (22) (5p15,3 5p11 :: 22p11,1 22p13)</b></p> <p>Trisomía parcial del cromosoma 5 que tras analizar el cariotipo a los padres, se establece su origen <i>de novo</i> (Afonso <i>et. ál.</i>, 2010).</p>
	<p><b>46, XY, rec(3) dup(3q) inv ins(3)(p26q29q25)pat</b></p> <p>Cromosoma 3 recombinante con una duplicación de la región q25q29 como origen de una inversión inserción en dicho cromosoma de origen paterno.</p>

Por pertenecer a la base de datos antigua no se tienen imágenes de estas otras translocaciones: **46, XX, t(9;15)(q34;p23)** y **46, XY, t(4;19)(p24;p13.3)** (n=2). En ellas también se establece el origen *de novo* de tales anomalías estructurales, tras analizar el cariotipo a los padres.

## 4.2.2 Cariotipo en amniocentesis (LA)

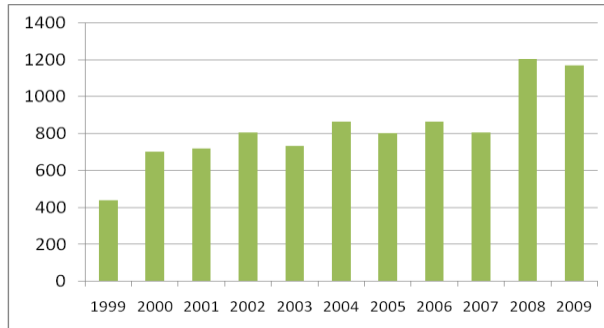
### 4.2.2.1 Descripción de la serie de amniocentesis

Desde el mes de agosto del 1999 hasta el final del año 2009 se han realizado 9119 determinaciones por cariotipo en amniocentesis en la Sección de Citogenética del HUC (gráfica 11). De esas determinaciones, 255 han sido gestaciones múltiples, con lo que se estima que hayan sido analizadas 8864 gestantes (tabla 17).

La media de **edad gestacional** es la semana 16. El 75´5% de las amniocentesis se realizaron entre las semanas 15 y 17 de gestación (tabla 16).



**Gráfica 11 Evolución anual de la frecuencia de amniocentesis**



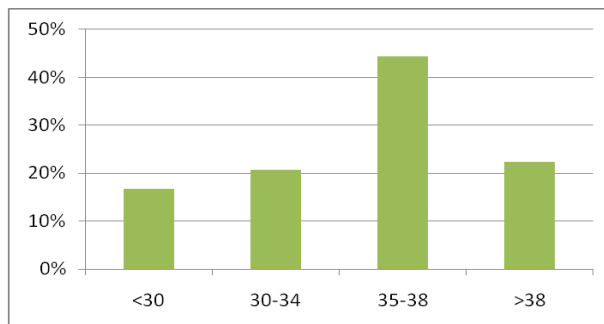
**Tabla 16 Descripción de la serie de datos de las amniocentesis**

		n=9119
<b>Gestantes</b>		8864
<b>Gestaciones múltiples</b>		255
<b>Edad gestacional (semanas)</b>	Media	16´35 ± 1´5
n=7810	Rango	1-38
<b>Edad materna (años)</b>	Media	35´09 ± 4´8
n=8142	Rango	14-49

Los valores de la media vienen acompañados del valor de la desviación típica

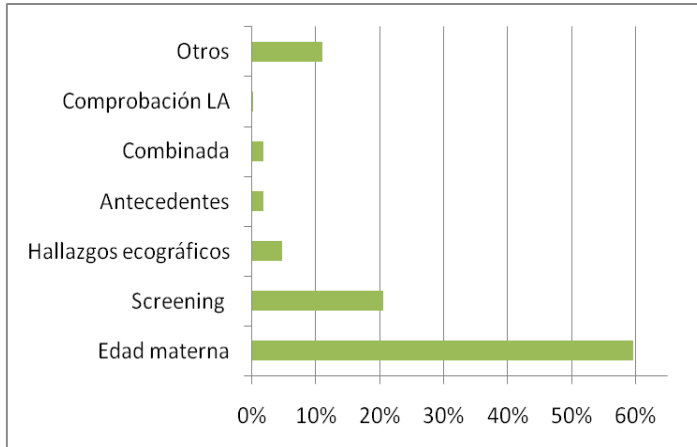
La media de **edad materna** es de 35 años, con un amplio rango que abarca de los 14 a los 49. Aproximadamente el 45% de las amniocentesis se realizaron con edades entre los 35 y 38 años, ambos inclusive (gráfica 12).

**Gráfica 12 Distribución de frecuencias para la edad materna en amniocentesis (n=8141)**



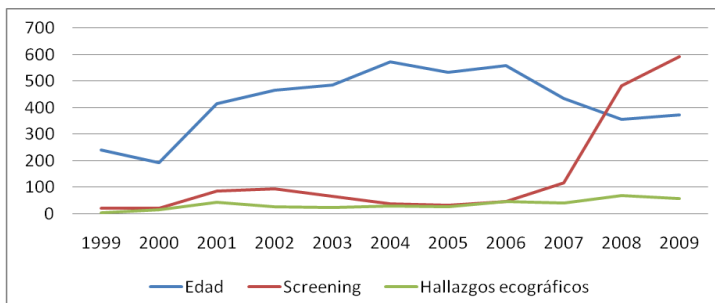
La **indicación** más frecuente en amniocentesis fue la edad materna, aproximadamente en el 60% de las determinaciones (gráfica 13).

**Gráfica 13 Frecuencia de las indicaciones para amniocentesis (n=7757)**

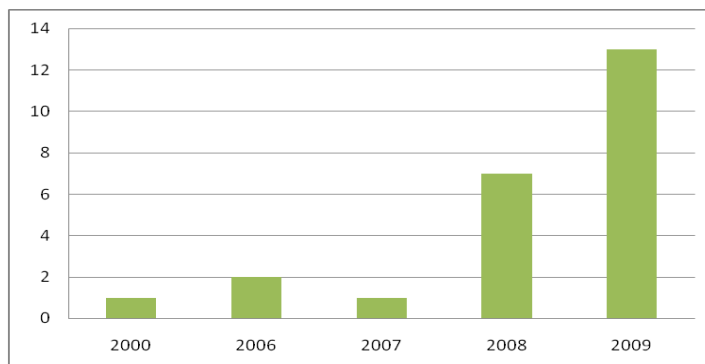


La evolución anual de las 3 indicaciones de mayor frecuencia (edad materna, screening combinado y hallazgos ecográficos) revela un cambio de tendencia en el año 2008 (gráfica 14), a partir del cual aumenta considerablemente el número de amniocentesis indicadas como resultado del screening y disminuyen las realizadas en función de la edad materna avanzada, además aumenta considerablemente el número de casos patológicos diagnosticados por screening positivo (gráfica 15).

**Gráfica 14 Evolución anual de las tres principales indicaciones para realizar una amniocentesis**



**Gráfica 15 Frecuencia absoluta de amniocentesis realizadas por un resultado de screening positivo y diagnosticados como patológicos**



#### 4.2.2.2 Descripción de los resultados de amniocentesis

En el 93% de los casos el resultado fue normal 46, XX o 46, XY (tabla 17). En el resto (6%) se han encontrado alteraciones numéricas o estructurales que se clasifican en tres grupos: las cromosopatías propiamente dichas y que por lo tanto producen patología (2%), las anomalías cromosómicas que aparentemente no afectan al fenotipo del portador pero sí pueden ocasionar errores de disyunción meiótica (0´5%) y variantes de la normalidad, comúnmente conocidos como polimorfismos cromosómicos (3´5%).

**Tabla 17 Resumen de los resultados de las amniocentesis**

<b>Resultados diagnosticados</b>	<b>9043</b>	<b>99´17%</b>
<b>Cariotipo normal</b>	<b>8493</b>	<b>93´14%</b>
<b>Casos masculinos</b>	4348	47´68%
<b>Casos femeninos</b>	4145	45´45%
<b>Con contaminación materna</b>	11	0´12%* <sup>1</sup>
<b>Cariotipo con cromosopatías</b>	<b>550</b>	<b>6´03%</b>
<b>A) Que producen patologías</b>	<b>184</b>	<b>2´02%</b>
<b>Sd. Down (+21)</b>	104	1´1%
<b>Sd. Edwards (+18)</b>	15	0´16%

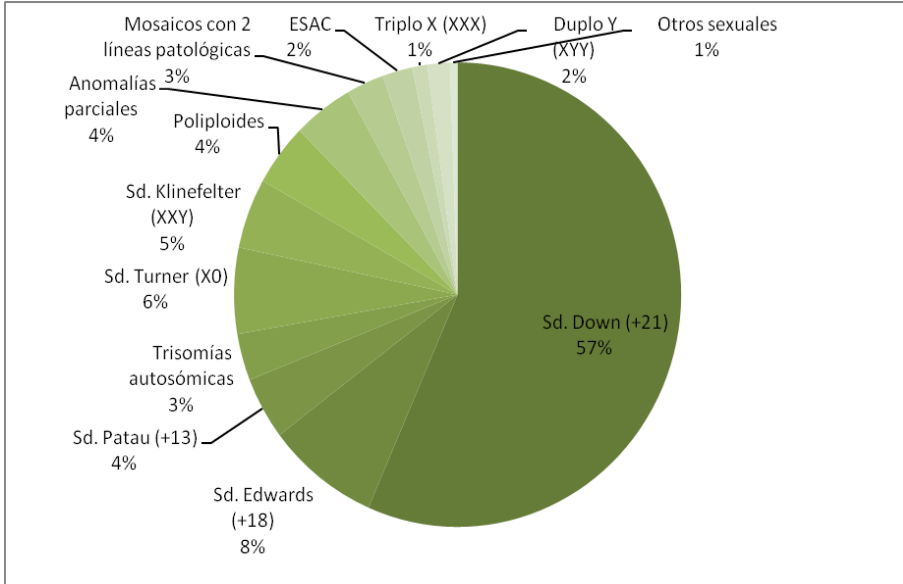
<b>Sd. Patau (+13)</b>	8	0´09%
<b>Otras trisomías</b>	7	0´08%
<b>Sd. Turner (X0)</b>	13	0´14%
<b>Sd. Klinefelter (XXY)</b>	9	0.10%
<b>Triplo X (XXX)</b>	3	0´03%
<b>Duplo Y (XYY)</b>	3	0´03%
<b>Otros sexuales</b>	1	0´01%
<b>ESAC</b>	4	0´04%
<b>Poliploides</b>	8	0´09%
<b>Anomalías parciales</b>	9	0.10%
<b>B) Sin repercusión en portador</b>	<b>45</b>	<b>0´49%</b>
<b>Translocaciones equilibradas</b>	29	0´32%
<b>Translocaciones robertsonianas</b>	5	0´05%
<b>Translocaciones cromosomas sexuales</b>	2	0´02%
<b>Inversiones no polimórficas</b>	9	0´10%
<b>C) Polimorfismos</b>	<b>321</b>	<b>3´52%</b>
<b>Variantes</b>	1	0´01%
<b>Satélites</b>	63	0´69%
<b>Aumento de heterocromatina</b>	94	1´03%
<b>Inversiones</b>	163	1´79%
<b>Sin resultado</b>	<b>76</b>	<b>0´83%</b>
<b>Contaminación materna</b>	<b>22</b>	<b>0´24%*<sup>2</sup></b>

+21: trisomía 21, +18: trisomía 18, +13: trisomía 13, XO: monosomía X, ESAC: extra small abnormal chromosome (cromosoma marcador o cromosoma adicional estructuralmente anormal), \*<sup>1</sup> contaminación materna calculada sobre n= 4348 fetos masculinos \*<sup>2</sup>contaminación materna calculada sobre n=4974 fetos masculinos o patológicos

El grupo de las anomalías cromosómicas que producen patología se distribuye entre diferentes síndromes (gráfica 16), siendo el más abundante el síndrome de Down o trisomía 21 con 104 casos detectados. Uno de los casos

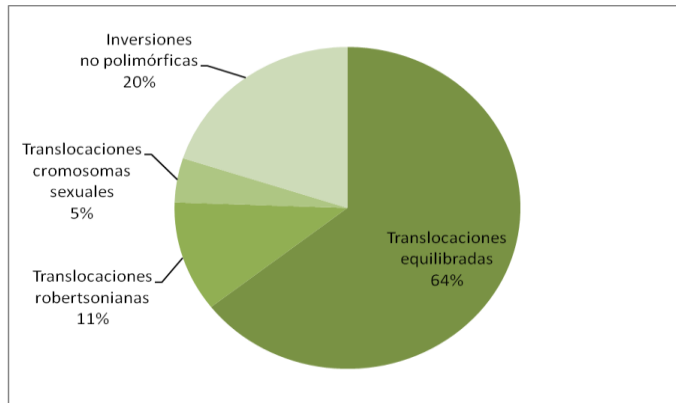
clasificados como "Otras trisomías" es una trisomía 8 en mosaico diagnosticado tras indicación de hallazgos ecográficos (Esquivel Vázquez *et. ál.*, 2011).

**Gráfica 16 Porcentajes de las patologías detectadas en las amniocentesis (2%)**



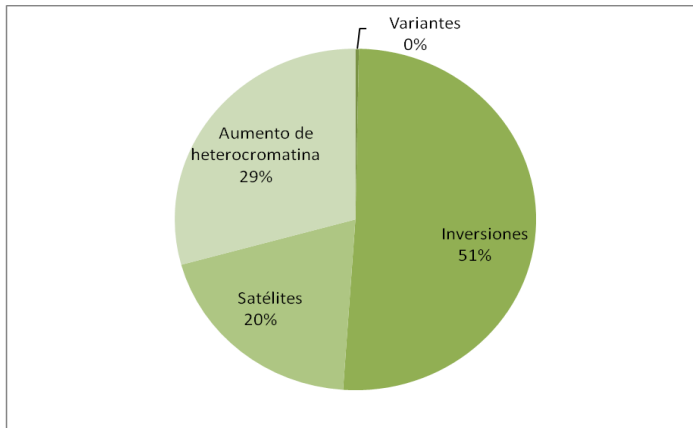
Se determinaron 45 alteraciones cromosómicas que no tienen repercusión en el fenotipo del portador pero sí le pueden originar dificultades en la fecundación derivados de errores meióticos durante la gametogénesis. Éstas pueden ser de varios tipos y se presentan con diferente frecuencia (gráfica 17).

**Gráfica 17 Porcentajes de las alteraciones cromosómicas sin repercusión en el fenotipo del portador detectadas en las amniocentesis (0´5%)**



Se detectaron 321 casos con polimorfismos, que se pueden agrupar en inversiones, aumento en la longitud de la heterocromatina, de los satélites y variantes (gráfica 18).

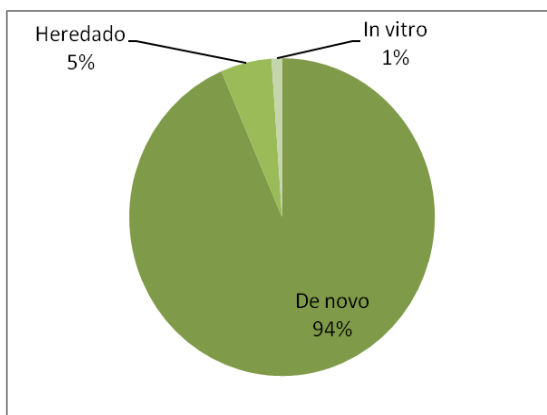
**Gráfica 18 Porcentaje de los polimorfismos cromosómicos (3' 5%)**



#### 4.2.2.3 Determinación del origen de las alteraciones cromosómicas

En los 184 diagnósticos patológicos, el origen de éstas pudo ser generado *de novo* (n=172), heredado (n=10) u originado *in vitro* (n=2) (gráfica 19).

**Gráfica 19 Porcentaje del origen de las cromosopatías detectadas en amniocentesis (n=184)**



Las cromosopatías que no reflejan patología en el portador salvo posibles errores en la disyunción meiótica (n=45) también pudieron ser *de novo* (n=27) y heredados de alguno de los progenitores (n=18) (gráfica 20).

**Gráfica 20** Porcentaje del origen de las anomalías cromosómicas sin repercusión en el fenotipo del portador detectadas en las amniocentesis (n=45)



Todos los polimorfismos pueden ser transmitidos entre generaciones. De los registrados en este estudio (n=321), sólo se comprobó su origen paterno en la ocasión del variante del cromosoma 21, ya comentado en otros apartados.

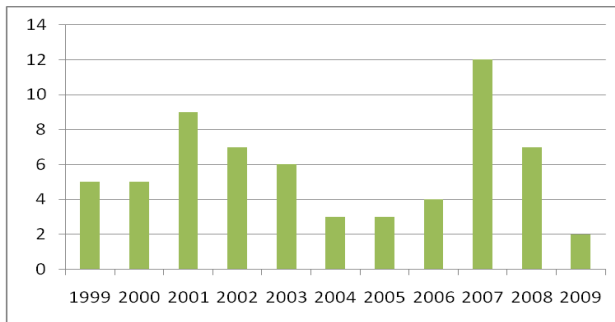
## 4.3 Sangre de cordón (SC) o funiculocentesis

### 4.3.1 Descripción de la serie de SC

En este estudio se incluyen 63 muestras de SC que abarcan desde junio de 1999 al 31 de diciembre de 2009 (gráfica 21).

La **semana de gestación** a la que se realiza la funiculocentesis más frecuentemente es la semana 22 (tabla 18), cubriendo un rango entre la 16 y 39 semanas. El 9´6% de las SC se realizaron entre las semanas 18 y 20 de gestación y otro 9´6% por encima de este rango.

**Gráfica 21 Frecuencia anual de las muestras de SC**



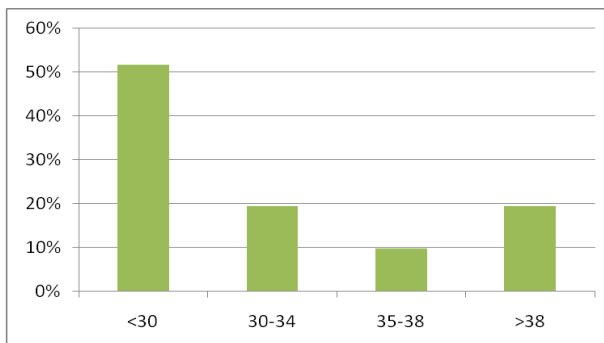
El rango de **edad materna** a la que se realiza esta prueba abarca de los 16 a los 42 años (tabla 17), estando su valor medio en los 29 años. Casi el 52% de las funiculocentesis se realizaron en gestantes menores de 30 años (gráfica 22).

**Tabla 18 Datos generales sobre la serie de muestras de SC**

n=63		
<b>Edad gestacional (semanas)</b> n=12	Media	22'67 ± 7'27
	Rango	16-39
<b>Edad materna (años)</b> n=31	Media	29'39 ± 7'67
	Rango	16-42

Los valores medios se acompañan de la desviación típica

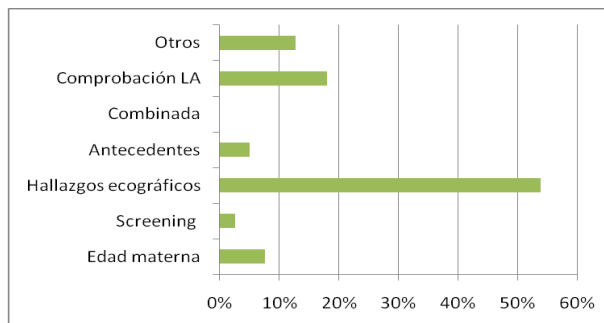
**Gráfica 22 Distribución de frecuencias para la edad materna en las funiculocentesis (n=31)**





La **indicación** más frecuente al realizar funiculocentesis son los datos ecográficos (21/39; 53´8%) y en segundo lugar la comprobación de los resultados de la amniocentesis (7/39; 18%) (gráfica 23).

**Gráfica 23 Frecuencia de las indicaciones para funiculocentesis (n=39)**



### 4.3.2 Descripción de los resultados de SC

Del total de muestras, se emitió un informe con los resultados en 58 ocasiones, lo que se traduce en un 92% de resultados informativos (tabla 19). De ellos 48 cariotipos resultaron normales y 10 portadores de alguna cromosomopatía (aproximadamente un 16%), siendo la cromosomopatía más frecuente la trisomía 21 (gráfica 24).

Los casos de mosaicos patológicos detectados en muestras de sandre de cordón (n=2) fueron los siguientes: 45,X0[15%] / 46,XY[85%] y 46,XY (92%) / 47,XY,+8(8%).

De las posibles variaciones del cariotipo que se pueden encontrar además de las cromosomopatías, sólo hay registrado un polimorfismo, consistente en la inversión de un cromosoma 9 en un feto femenino.

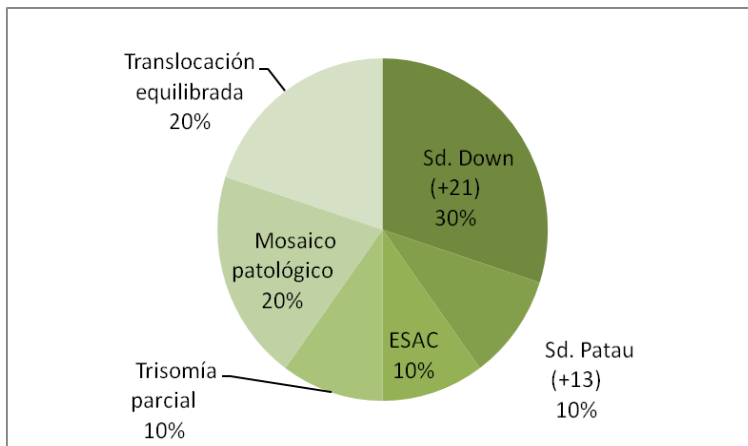
**Tabla 19 Resultados citogenéticos de las muestras de SC**

Resultados diagnosticados	58	92%
<b>Cariotipo normal</b>	<b>48</b>	<b>76´14%</b>
<b>Casos masculinos (46, XY)</b>	16	23´80%
<b>Casos femeninos (46, XX)</b>	32	47´62%

<b>Cariotipo con cromosomopatía</b>	<b>10</b>	<b>15´86%</b>
Sd. Down (+21)	3	4´76%
Sd. Patau (+13)	1	1´59%
ESAC	1	1´59%
Trisomía parcial	1	1´59%
Mosaico patológico	2	3´17%
Translocación equilibrada	2	3´17%
<b>Sin resultado</b>	<b>5</b>	<b>8%</b>
<b>Cariotipo con polimorfismo</b>	<b>1</b>	<b>1´59%</b>
<b>Amniocentesis previa</b>	<b>33</b>	<b>52´38%</b>
<b>No concordantes LA/SC</b>	<b>17</b>	<b>27%</b>
<b>Contaminación materna</b>	<b>2</b>	<b>3´17%*</b>

LA: líquido amniótico, SC: sangre de cordón, +21: trisomía 21, +13: trisomía 13, ESAC: extra small abnormal chromosome (cromosoma marcador o cromosoma adicional estructuralmente anormal), \*contaminación materna calculada sobre n=26 fetos masculinos o patológicos

**Gráfica 24 Proporciones de las cromosomopatías detectadas en SC (16%)**



### 4.3.3 Concordancia de los resultados de SC con las LA previas

La funiculocentesis es una técnica que puede usarse aisladamente como método de diagnóstico o después de haber realizado una amniocentesis

previamente. En este estudio, 33 de los 63 casos presentan esta situación, lo cual representa el 52´38% de los datos. En ellos se ha revisado si coinciden o no los resultados de ambos tipos de muestras, líquido amniótico y sangre de cordón.

**Tabla 20 Resultados no concordantes entre las amniocentesis y las funiculocentesis (n=17)**

LA	SC
<b>46,XY (n=7)</b>	46, XX
<b>92,XXYY</b>	46, XX
<b>46,XX/92,XXXX</b>	46, XX
<b>46,XX/47,XX,+21</b>	
<b>46,XX/47,XXX/48,XXXX</b>	
<b>46,XY/46,XXY</b>	
<b>46,XY/46,XX (n=2)</b>	46, XY
<b>46,XX(65%)/46,XY,t(5;10)(q31;p15)(35%)</b>	46,XY,t(5;10)(q31;p15)
<b>46,XY/92,XXYY</b>	46, XY
<b>46,XY(95%)/47,XY,+21(5%)</b>	46,XX(85%)/46,XY(15%)

De esos 33 casos, se ha observado concordancia en 16 ocasiones y diferencias en 17 resultados, lo que supone el 27% del total de SC.

La mayoría de los casos no concordantes (n=12) correspondían a crecimiento de células femeninas en cultivo, presentando en la amniocentesis cariotipos masculinos o patológicos (tabla 20).

El resto de los casos no concordantes (n=5): tres sirvieron para descartar contaminación de células maternas en la amniocentesis y dos de ellos para determinar dos falsos mosaicismos en las amniocentesis de fetos varones, a pesar de que en uno de ellos se detectara también contaminación de células maternas en la muestra de funiculocentesis.

#### 4.4 Tasa de datos desconocidos

#### 4.4.1 Biopsia de Vellosidades Coriales

Se revisaron las historias clínicas de 102 de las 115 muestras de BVC. En el resto (n=13) no se tuvo acceso a las mismas por proceder de otro centro hospitalario, por desconocer el número de dicha historia o por no estar disponible en el HUC. Por lo tanto, de ellas sólo se tiene la información remitida a la sección de citogenética y los resultados en ella obtenidos. Además se hizo un contacto telefónico con las gestantes para comprobar los desenlaces de dichas gestaciones. Se ha registrado mucha ausencia de información en las variables estudiadas. Se recoge el número de datos desconocidos de cada variable y sus porcentajes (tabla 21).

**Tabla 21 Información ausente en cada variable de BVC**

	n=115
<b>Edad materna</b>	1 (0´87%)
<b>Semana gestacional</b>	5 (4´35%)
<b>Número de historia clínica</b>	2 (1´74%)
<b>Indicación</b>	42 (36´52%)
<b>FIV</b>	66 (57´4%)
<b>Embarazos previos</b>	57 (49´57%)
<b>IVEs previas</b>	61 (53´04%)
<b>Abortos previos</b>	60 (52´17%)
<b>Desenlace gestación</b>	36 (31´30%)

FIV: fecundación *in vitro*, IVE: interrupción voluntaria del embarazo

#### 4.4.2 Hibridación *in situ* fluorescente

Entre las variables estudiadas, hay información que no ha sido recogida en la base de datos, a causa de no haber sido facilitada por el servicio remitente o porque no haya sido correctamente registrada (tabla 22).

**Tabla 22 Información ausente de las variables revisadas de las amniocentesis con FISH**

n= 967	
<b>Edad materna</b>	93 (9´62%)
<b>Semana gestacional</b>	419 (43´3%)
<b>Indicación</b>	311 (32´2%)

#### 4.4.3 Amniocentesis

La proporción de datos ausentes de cada variable se encuentra en un rango entre 10 y 15% (tabla 23).

**Tabla 23 Información ausente en las variables revisadas de las amniocentesis**

n= 9119	
<b>Edad materna</b>	978 (10´72%)
<b>Semana gestacional</b>	1310 (14´37%)
<b>Indicación</b>	1363 (14´95%)

#### 4.4.4 Funiculocentesis

Para las muestras de sangre de cordón los porcentajes de datos ausentes son bastante altos (tabla 24).

**Tabla 24 Información ausente para las variables revisadas de funiculocentesis**

n= 63	
<b>Edad materna</b>	32 (50´80%)
<b>Semana gestacional</b>	51 (80´95%)
<b>Indicación</b>	24 (38´10%)

## **4.5 Comparación de los casos cromosómicamente normales frente a los patológicos**

### **4.5.1 Edad materna y cromosomopatías**

#### **4.5.1.1 Patología en mayores y menores de 38 años**

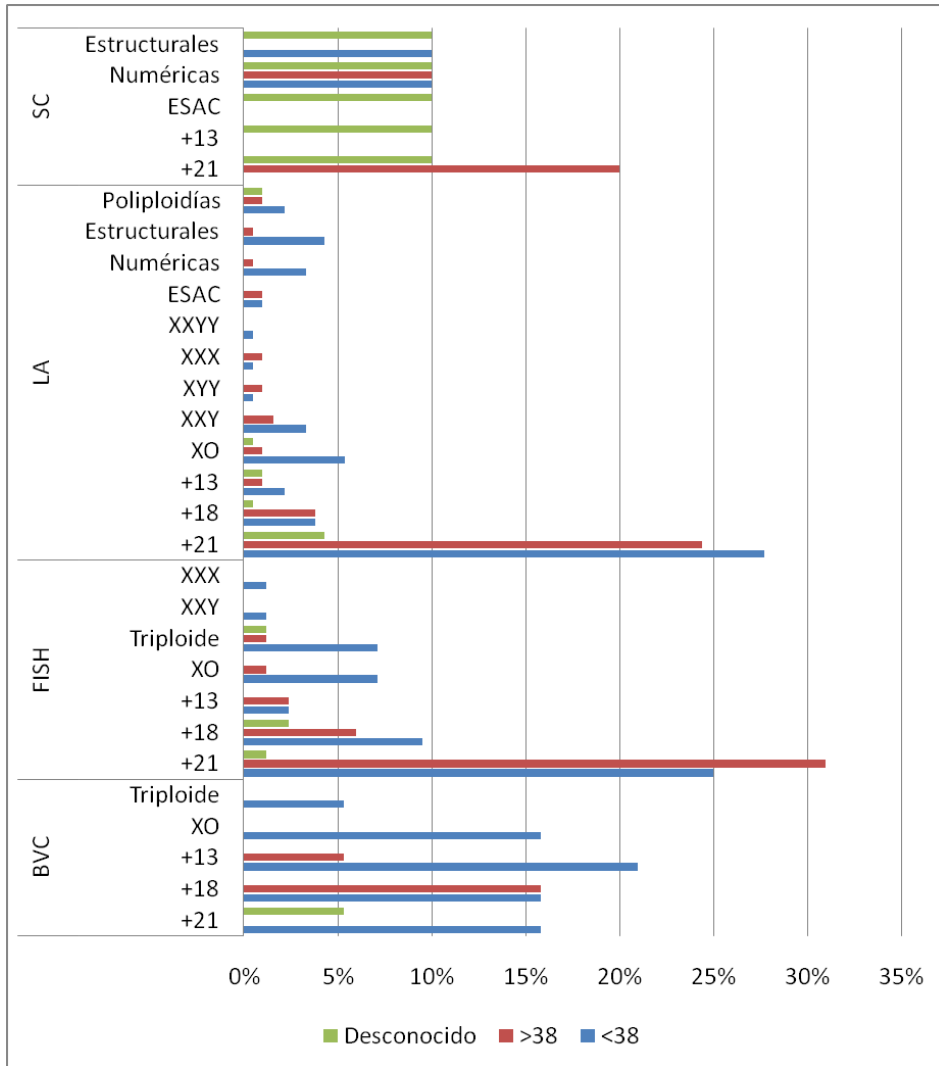
Se realiza una comparación entre cada tipo de resultado patológico de cada una de las pruebas invasivas según la edad materna sea mayor o menor de 38 años (gráfica 25).

La mayoría de los diagnósticos patológicos presentan mayor frecuencia en gestantes menores de 38 años. Si se observa conjuntamente, 18 de los 29 diagnósticos presentan una mayor frecuencia de gestantes menores de 38 años, lo cual representa un 62% de las patologías. En 4 de esos 29 diagnósticos la frecuencia de mayores de 38 años es superior y en otros 4 las frecuencias son iguales en ambos. Detalladamente, la trisomía 21 detectada mediante FISH o funiculocentesis viene asociada a una edad materna superior a los 38 años. En cambio, mediante biopsia corial y amniocentesis el mayor porcentaje corresponde a una edad menor de 38 años.

Para la Biopsias de Velloidades Coriales todas las aneuploidías presentan mayor frecuencia en gestantes menores de 38 años, salvo la trisomía 18 que presenta igual frecuencia en ambos rangos de edad.

En el FISH se observa que la trisomía 21 presenta mayor frecuencia en gestantes mayores de 38 años. La trisomía 13 presenta igual frecuencia y en el resto de los casos, la frecuencia de menores de 38 años es la mayoritaria o incluso, a veces, la única.

**Gráfica 25 Resultados patológicos según sean gestantes mayores o menores de 38 años**



BVC: Biopsia de Vellosidades coriales, FISH: Hibridación *in situ* con fluorescencia, LA: muestra de líquido amniótico, SC: muestra de sangre de cordón, +21: trisomía 21, +13: trisomía 13, +18: trisomía 18, XO: Monosomía del cromosoma X, XYY: síndrome de Klinefelter, XXX: triplo X, ESAC: extra small abnormal chromosome (cromosoma marcador o cromosoma adicional estructuralmente anormal), Numéricas: otras anomalías numéricas, Estructurales: reordenamientos estructurales, Desconocido: edad desconocida de la gestante, >38: gestantes con edad superior a los 38 años, <38: gestantes con edad inferior a los 38 años

En las amniocentesis la trisomía 18 presenta igual frecuencia entre ambos grupos de edad así como los ESAC. Son más abundantes las gestantes mayores de 38 años que las menores en los casos de triplo X y duplo Y. En el resto, es más frecuente las menores de 38 que las mayores.

Para las funiculocentesis, con alta tasa de desconocidos, la trisomía 21 es la más frecuente en mayores de 38 años. Los reordenamientos en menores de 38 años y las otras alteraciones numéricas presentan igual frecuencia en ambos.

#### 4.5.1.2 Relación de la edad materna con las cromosomopatías: Chi-cuadrado

Se utiliza el test de asociación de variables cualitativas o chi-cuadrado para analizar la relación que existe entre la edad materna y la patología detectada. Para ello, ambas variables se transforman en dicotómicas: ser mayor o no de 38 años y que el resultado del estudio haya sido patológico o no. El valor del estadístico ( $\chi^2$ ) se calcula mediante tablas de contingencia (no mostradas) para cada tipo de prueba invasiva (tabla 25).

**Tabla 25 Cálculo del  $\chi^2$  en el análisis de la relación entre la edad patología**

Prueba invasiva	Probabilidad del $\chi^2$	Interpretación
<b>BVC</b>	$p=0'499, p>0.05$	No hay relación
<b>FISH</b>	$p= 0'000, p<0'05$	Hay relación
<b>LA</b>	$p=0'018, p<0'05$	Hay relación
<b>SC</b>	$p=0'001, p<0'05$	Hay relación

BVC: Biopsia de Vellosidades coriales, FISH: Hibridación *in situ* con fluorescencia, LA: muestra de líquido amniótico, SC: muestra de sangre de cordón,  $\chi^2$ : Chi-cuadrado

Los casos en los que la probabilidad que da el estadístico sea menor que nuestro nivel de confianza, se consideran como poco probable que se cumpla la hipótesis planteada, en este caso que ambas variables sean



independientes. Por lo tanto, con estos datos se encuentra relación estadísticamente significativa entre la edad materna y la patología detectada al 95% de confianza para los diagnósticos realizados mediante amniocentesis, hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y las funiculocentesis. Sin embargo, no se puede afirmar que haya relación entre ambas variables cuando se trata de biopsias coriales. Si variamos el nivel de confianza al 99%, es decir, disminuimos el porcentaje de error, sólo afectaría a la amniocentesis ( $p=0.018 > 0.01$ ), no detectando en este caso relación estadísticamente significativa entre la edad materna y la patología.

Ya en el apartado 4.4 se registraron las cantidades de datos de edad materna que faltaban en este estudio para cada una de las pruebas. Por ello, este hecho se ha tenido en cuenta a la hora de realizar el test del chi-cuadrado.

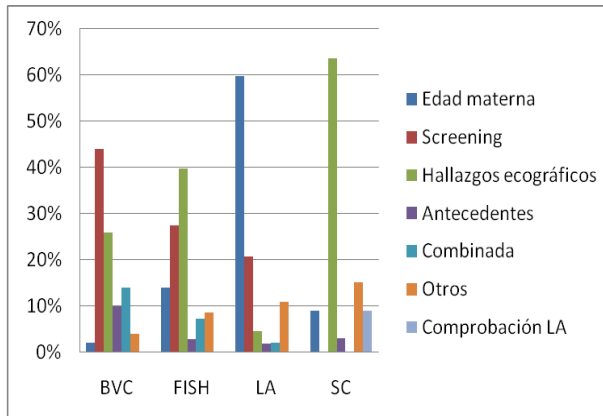
#### **4.5.2 Indicaciones en los casos cromosómicamente normales y patológicos**

Se comparan las indicaciones que han sido más frecuentes en cada tipo de prueba invasiva según si el resultado citogenético fue normal (gráfica 26) o patológico (gráfica 27).

Entre los resultados que cromosómicamente fueron normales (gráfica 26) la indicación más frecuente fue el cribado de aneuploidías para la Biopsia de Vellosidades Coriales, los hallazgos ecográficos para el FISH y la funiculocentesis y la edad materna en las amniocentesis.

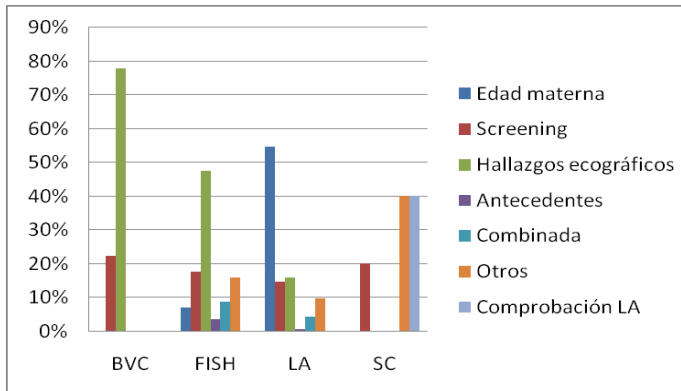
Dentro de los resultados patológicos (gráfica 27), la Biopsia de Vellosidades Coriales y el FISH presentan mayor frecuencia de los hallazgos ecográficos. Para la amniocentesis sigue siendo la edad materna la principal indicación. La funiculocentesis se reparte entre la comprobación de resultados previos y otro tipo de indicaciones.

**Gráfica 26 Frecuencia de indicaciones en el grupo de resultados cromosómicamente normales**



BVC: Biopsia de Vellosidades coriales, FISH: Hibridación *in situ* con fluorescencia, LA: muestra de líquido amniótico, SC: muestra de sangre de cordón

**Gráfica 27 Frecuencia de indicaciones en el grupo de resultados patológicos**



BVC: Biopsia de Vellosidades coriales, FISH: Hibridación *in situ* con fluorescencia, LA: muestra de líquido amniótico, SC: muestra de sangre de cordón

Para cada una de las indicaciones con resultado de cromosopatía patológica se calculó el valor predictivo positivo (VPP) que es la probabilidad de que se obtenga un resultado patológico una vez que dicha indicación ha dado positiva (tabla 26).

**Tabla 26 Valor predictivo positivo (VPP) de las indicaciones para cada prueba**

Indicaciones	BVC	FISH	LA	SC
<b>Edad materna</b>	-	9´3%	1´9%	-
<b>Screening</b>	15´4%	5´8%	1´5%	100%
<b>Hallazgos ecográficos</b>	52%	10´3%	7%	-
<b>Antecedentes</b>	-	10´5%	0´72%	-
<b>Combinada</b>	-	10´4%	4´24%	-
<b>Otros</b>	-	15%	1´89%	40%
<b>Comprobación LA</b>	-	-	-	28´6%

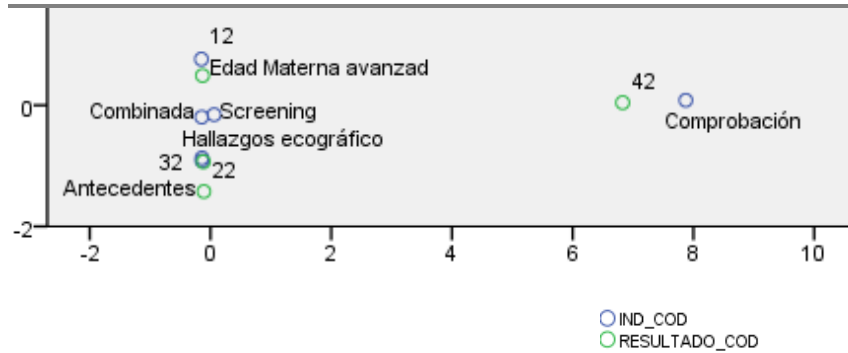
BVC: Biopsia de Velloidades coriales, FISH: Hibridación *in situ* con fluorescencia, LA: muestra de líquido amniótico, SC: muestra de sangre de cordón,

En esta serie, los hallazgos ecográficos tienen fuerte valor predictivo en BVC (tabla 25). El resto de los cálculos presentan valores más bajos. Para la realización de un FISH es similar el valor predictivo que tienen las indicaciones edad materna, hallazgos ecográficos, antecedentes familiares y combinación de varias indicaciones. El mayor valor predictivo en el caso de las amniocentesis es la combinación de varias indicaciones. Las funiculocentesis indicadas por cribado de aneuploidías fueron todas patológicas, y los valores calculados para otro tipo de indicaciones y para comprobación de resultados previos fueron relativamente altos.

Se realiza un análisis de correspondencia para las variables cualitativas "indicación de prueba invasiva" y "resultado patológico de cada una de las pruebas". Es una descripción gráfica que muestra las relaciones de dependencia e independencia entre los atributos de las variables. La indicación "otros" no está representada por no ser informativa.

Según esta gráfica se puede estimar una clara asociación entre los resultados patológicos de la amniocentesis y la edad materna avanzada, así como entre la comprobación de resultados previos y los de la funiculocentesis.

**Gráfica 28 Análisis de correspondencia entre las indicaciones de cromosopatías y las pruebas realizadas**



Se pueden establecer también buenas asociaciones entre las Biopsias Coriales y FISH con el resto de las indicaciones. Pero sin duda, la más clara asociación que se puede establecer es entre la patología detectada mediante técnica de FISH y las indicaciones de hallazgos ecográficos, así como con los antecedentes, ya que estas tres modalidades se superponen.

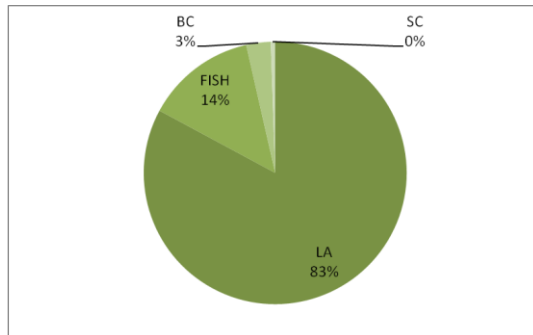
### 4.5.3 Comparación de tres años de patología

De los tres últimos años de cada una de las muestras y técnicas, se seleccionan los casos patológicos detectados. Interesa comparar este periodo porque es cuando se realizan las Biopsias Coriales, teniendo de este modo registros de todos los tipos de pruebas.

Como ya se vio anteriormente fueron 115 BVC analizadas y 19 casos patológicos. Durante este periodo se realizaron 521 FISH en muestras de líquido amniótico sin cultivar, de las que se detectaron 48 aneuploidías, 3177 cariotipos en líquido amniótico con 83 cromosopatías patológicas y un total de 21 funiculocentesis con 1 caso patológico.

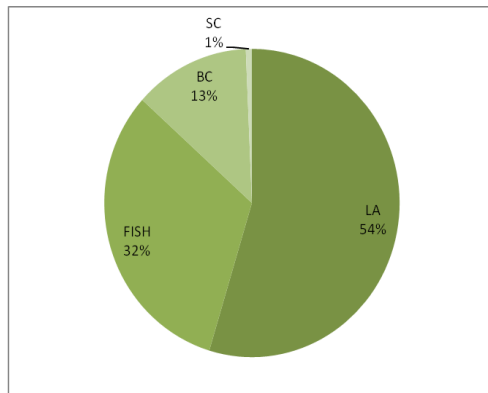
De manera que la metodología más empleada fue la amniocentesis (gráfica 29) con un 83% de frecuencia. También por ello es la prueba que mayor patología detecta, ya que en conjunto fueron registrados 151 casos patológicos durante estos tres años y ésta ha sido detectada principalmente tras amniocentesis (54%) (gráfica 30).

**Gráfica 29 Distribución de las pruebas realizadas entre 2007-2009**



BVC: Biopsia de Vellosidades coriales, FISH: Hibridación *in situ* con fluorescencia, LA: muestra de líquido amniótico, SC: muestra de sangre de cordón

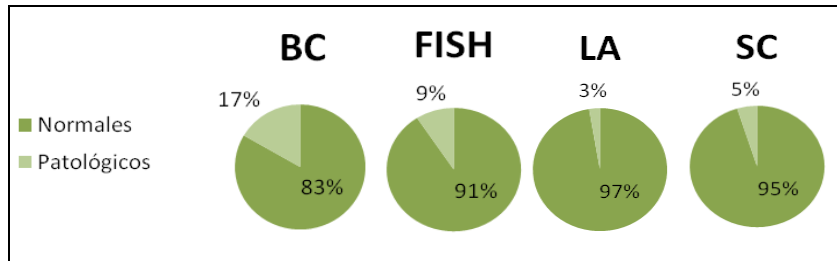
**Gráfica 30 Distribución de la patología detectada entre 2007-2009 según prueba realizada**



BVC: Biopsia de Vellosidades coriales, FISH: Hibridación *in situ* con fluorescencia, LA: muestra de líquido amniótico, SC: muestra de sangre de cordón

De forma individual, es la técnica de BVC con un 17% la que mayor porcentaje de casos patológicos detecta (gráfica 31), es decir la que mejor relación presenta entre casos realizados y casos positivos.

**Gráfica 31 Porcentaje de patología detectada entre 2007 y 2009**



BVC: Biopsia de Vellosidades coriales, FISH: Hibridación *in situ* con fluorescencia, LA: muestra de líquido amniótico, SC: muestra de sangre de cordón

Durante estos tres años, la patología detectada en amniocentesis (n=83) podía haberse detectado mediante FISH en un 85% de los casos. Sin embargo, se detectó un 36% (n=30). Esto representa un 0'9% de las amniocentesis durante este periodo. El resto, es patología detectada una vez se obtiene el cariotipo (n=53). Hubo dos casos en que se había realizado la técnica de FISH con resultado normal y posteriormente se observaron anomalías en cromosomas diferentes a los estudiados, es decir un 2'4% de la patología en amniocentesis es no detectable mediante FISH.

## 5 Discusión

---

## 5.1. Biopsia de Vellosidades Coriales

### 5.1.1 Descripción de la serie

En los tres años que se ha realizado el estudio citogenético en Biopsia de Vellosidades Coriales, se ha mantenido un **número de muestras por año** similar, entre 30 y 45, observando una ligera reducción durante el último año (gráfica 1), aunque sólo con 3 años es muy poco tiempo para considerar variaciones con valor significativo. Sobre todo si se compara con otros estudios como el de Mademont-Soler *et. ál.*, 2011 del Hospital Clínic de Barcelona que en 12 años estudiaron 5591 muestras de BVC.

La media de **edad gestacional** a la que se realizaron las Biopsias de Vellosidades Coriales fue de 12 semanas. Esto coincide con algunos autores (tabla 27), sin embargo hay otros que publican edades superiores o inferiores. Si se sigue la estrategia de screening del primer trimestre planteada por Nicolaidis en 2005, en la que la medida de la translucencia nucal debe hacerse entre las semanas 11 y 13+6, la biopsia corial por consiguiente no debe realizarse antes de la semana 11.

**Tabla 27 Comparación de edades gestacionales a las que se realizan la biopsia de vellosidades coriales según varios autores**

Autores	Media y/o rangos de edad gestacional (semanas)
Martinville <i>et. ál.</i> , 1984	7-12
Leschot <i>et. ál.</i> en 1987	8-11
Bryndorf <i>et. ál.</i> , 1996	10 (7-24)
Tóth <i>et. ál.</i> , 2001	10-12
Quilter <i>et. ál.</i> , 2001	10-12
Zhang <i>et. ál.</i> 2010	10-12
Toutain <i>et. ál.</i> en 2010	13

En nuestro caso, el mayor porcentaje de las muestras se tomaron entre las semanas 10-12 (56´5%). Un alto porcentaje (36´5%) se tomaron entre las



semanas 12 y 16 de gestación, lo cual se solapa con el periodo de amniocentesis tempranas. En varios estudios se comparan las ventajas e inconvenientes de las técnicas de BVC y amniocentesis durante el mismo periodo de tiempo, y presentan resultados algo ambiguos sobre el riesgo de pérdida fetal. Rooney y colaboradores publicaron en el año 1989 que ambas son técnicas igual de seguras. Al igual que Tóth *et. ál.*, 2001 que exponen que existe el mismo riesgo en ambas, estimando un riesgo del 1%. En cambio, Evans y Andriole, 2008 registran mayor riesgo en la amniocentesis temprana que en la BVC.

La media de **edad materna**, 34 años, está por debajo de la edad considerada como indicación para el diagnóstico prenatal, que son los 38 años. Hay experiencias en otros hospitales (Corral *et. ál.*, 2006) donde la media de la edad materna es de 35 años, 37 años (Chitty *et. ál.*, 2006) y también casos publicados con medias de 31 años (Quiroga *et. ál.*, 2008).

Esto confirma el actual desuso de la edad materna como única **indicación** de cromosomopatía (Mademont-Soler *et. ál.*, 2011). La mayoría de las pruebas en nuestra serie se realizan tras detectar marcadores ecográficos o tras un resultado positivo del screening del primer trimestre. Así ocurre en trabajos como los de Corral *et. ál.*, 2006 o Toutain *et. ál.*, 2010, en el que los hallazgos ecográficos constituyen la indicación más frecuente. En el año 1987 Leschot y colaboradores publicaban un trabajo realizado sobre 500 gestaciones, cuya principal indicación era todavía la edad materna por encima de los 36 años. Siguen habiendo grupos de trabajo cuya indicación más frecuente es la edad materna (Park *et. ál.*, 2001 y Zhang *et. ál.*, 2010).

Con la **vía de obtención** abdominal se han obtenido hasta la fecha buenos resultados. Ésta ha sido la más usada, lo cual coincide con la mayoría de las publicaciones en las que se usa la vía transabdominal principalmente. Se le atribuye un menor riesgo de aborto, menor riesgo de infección y mayor rango en edad gestacional (Brambati *et. ál.*, 1986, Brun *et. ál.*, 2003, Quiroga *et. ál.*, 2008). Por otro lado estudios como el de Alfirevic y Von Dadelszen en

2003 o Evans y Andriole en 2008, aceptan que no hay evidencias suficientemente fuertes para el uso de una u otra vía. Tóth *et. ál.*, 2001 prefieren la vía transabdominal y si esta opción no es posible se decantan por la amniocentesis. Además para este último grupo la BVC transabdominal es la técnica de elección incluso durante el 2º y 3º trimestre debido a la obtención del cariotipo en pocos días por análisis directo. En 1984 Martinville y colaboradores publicaban un trabajo sobre análisis de DNA para establecer un test de detección de contaminación de células maternas y todas las biopsias se realizan mediante vía transcervical, al igual que el grupo de Leschot en 1987 con su revisión sobre 500 gestaciones.

Los datos sobre pérdida fetal tras Biopsia Corial y número de punciones realizada en cada extracción de muestra, no están recogidos en este trabajo. Así que para posteriores estudios se plantea su recogida, e incluso el intentar relacionar ambos parámetros.

Para intentar solucionar las ocasiones en las que la muestra obtenida vía transabdominal llega con aspecto hemático, se plantea la alternativa de la vía transcervical. Hasta el momento sólo se ha probado en dos ocasiones, de modo que cuando se tenga mayor número de casos propios, se podrán hacer comparaciones de ambas vías de extracción.

La cantidad de muestra extraída es un factor limitante (Chen *et. ál.*, 2008) para comenzar a trabajar el cultivo a largo plazo. En pocas ocasiones se pesó la muestra (aproximadamente 20mg), la mayoría de las veces se recurrió a una estimación a simple vista. Por tanto, hemos incluido también para un futuro en nuestro protocolo el registro de este parámetro ya que se ha visto este dato en otros autores: Quilter *et. ál.*, 2001, trabajan con un mínimo de 20mg, dividiendo aproximadamente la mitad para cada tipo de estudio, Brun *et. ál.*, 2003 estimaron una media de  $15'2 \pm 6$ mg, Zhang *et. ál.*, 2010 trabajan con cantidades menores, entre 8 10mg, y Toutain *et. ál.*, 2010 son los que trabajan con mayores cantidades, extrayendo en torno a 25-26mg y dividiendo

5mg para la técnica de FISH, 15mg para el cultivo a largo plazo y 5mg para el cultivo a corto plazo.

Cuando llega material escaso, no se pueden realizar todas las determinaciones. Por lo tanto se intenta asegurar el diagnóstico de las aneuploidías más frecuentes mediante FISH, siendo la técnica que mejores resultados ha dado desde el principio.

### 5.1.2 Descripción de los resultados de las Biopsias de Vellosidades Coriales

Consideramos que se están obteniendo buenos resultados mediante la técnica de FISH en Biopsia Corial, ya que en un 97´4% de los casos se obtuvo resultado informativo, porcentaje que se encuentra en la línea de lo que ocurre en otros estudios (tabla 28).

La técnica de FISH en diagnóstico prenatal es capaz de detectar el 65% de las anomalías cromosómicas que pueden afectar al feto (Tóth *et. ál.*, 2001). Bryndorf *et. ál.*, en su trabajo de 1996 consideran que la técnica de FISH es capaz de detectar un 79% de las anomalías detectadas por citogenética convencional en BVC, a excepción de las translocaciones equilibradas y las inversiones, sin embargo si se acota la detección exclusivamente de anomalías numéricas, la tasa de detección aumenta hasta el 82% de ellas.

**Tabla 28 Publicaciones de tasas de éxito en obtención de resultados en BVC**

<b>Autores</b>	<b>Resultados informativos</b>
Leschot <i>et. ál.</i> , 1987	96´2%
Leschot <i>et. ál.</i> , 1989	96´4%
Bryndorf <i>et. ál.</i> , 1996	93%
Van den Berg <i>et. ál.</i> , 2000	99´5%
Brun <i>et. ál.</i> , 2003	99´93%
Zhang <i>et. ál.</i> , 2010	91´45%

En este estudio, mediante la técnica de FISH en BVC se ha detectado prácticamente un 17% de cromosomopatías, dato que resulta variable en las series revisadas de la bibliografía (tabla 29).

**Tabla 29 Tasas de detección de aneuploidías por FISH en BVC**

Autores	Tasa de detección
Leschot <i>et. ál.</i> , 1989	4´8%
Quilter <i>et. ál.</i> , 2001	12%
Zhang <i>et. ál.</i> , en 2010	5´92%
Toutain <i>et. ál.</i> , en 2010	22%

La única aneuploidía de los cromosomas sexuales detectada fue el Síndrome de Turner. El Síndrome de Klinefelter, Duplo Y y Triplo X con incidencias de 1/1000 recién nacidos, no se han detectado en esta serie.

La incidencia de trisomías 21 encontrada (3´57%) es menor que la de trisomías 18 (5´36%) y 13 (4´46%). La monosomía del X presenta el menor porcentaje (2´68%). El hecho de que la trisomía 21 sea menos frecuente que la trisomía 18 y la 13, es una situación no habitual aunque se ha visto también en la serie de Quilter *et. ál.* en 2010 con un 2% de trisomía 21, 4% para la trisomía 18 y 3% para la trisomía 13 y monosomía del X. La frecuencia de trisomía 21 en esta serie coincide con la presentada por Tóth *et. ál.* en 2001 (3´5%) y es superior a la de Zhang *et. ál.* en 2010 (1´9%).

Publicaciones como la de Hahnemann y Vejerslev en 1997(2) estiman para BVC un 0´03% de falsos negativos y resultados ambiguos en un 1´5%. En nuestros resultados, sólo en una ocasión tuvimos un falso mosaicismo considerado como un resultado ambiguo (0´89%), por lo tanto menor proporción que la estimada. Como ya se comentó, fue interpretado como un posible mosaico, que quedó descartado gracias a la comprobación mediante una segunda punción, esta vez de líquido amniótico. El resultado observado en un principio se atribuye por lo tanto a la inespecificidad de la técnica y

posiblemente, con una mayor experiencia del observador, este hallazgo se hubiera descartado desde el primer momento.

Hasta la fecha no se tiene registrado ningún caso de **falso negativo**, ni tampoco de **falsos positivos**. Por lo que las estimaciones de sensibilidad y especificidad para esta técnica se estiman del 100% en ambas, porque todos los casos patológicos resultaron patológicos sin existir registro de ningún falso positivo. Al igual que todos los casos normales resultaron normales sin haber registro de ningún caso de falso negativo. Esto mismo ocurre con la series publicada por Tóth *et. ál.* en 2001. Leschot *et. ál.* en 1989 no registran tampoco ningún caso de falso negativo, sí detectando una tasa de falsos positivos del 2´3%. La tasa de falsos negativos en cultivo directo publicadas por Toutain *et. ál.* en 2010 fue del 0´77%.

Simoni y Sirchia en 1994 publican unas tasas de falsos positivos del 1-2% y de falsos negativos del 0´04% para trabajos realizados de forma directa sobre BVC, es decir trabajando con células del citotrofoblasto.

Hay incluso autores que, debido al riesgo de falsos positivos y falsos negativos, recomiendan que se realice la amniocentesis o funiculocentesis preferiblemente, antes que la BVC (Kennerknecht *et. ál.*, 1993). En cambio, otros autores como Van den Berg, en el año 2000, publican que la primera opción como modo de diagnóstico prenatal es la Biopsia Corial siempre que se estudien resultados de forma directa y tras cultivo a largo plazo, debido a su alta calidad y exactitud.

Brun *et. ál.* en 2003 recoge una tasa de **mosaicismo confinado a la placenta** entre 0´73-1´08% así como de mosaicos verdaderos del 0´03%. Debido a dicho riesgo de mosaicismo que presenta este tejido, se recomienda por parte de la AEDP (2004) y de algunos autores como Miny *et. ál.* en 1991, que cuando se detecte alguna cromosomopatía se compruebe mediante otras técnicas invasivas, amniocentesis o funiculocentesis, o con un exhaustivo estudio ecográfico. Sin embargo, lo más importante es conseguir realizar con éxito en un mismo laboratorio las tres aproximaciones al diagnóstico

citogenético de BVC: el análisis directo de cariotipo (para estudiar las células del citotrofoblasto), el FISH y el cultivo a largo plazo (células del mesénquima) (Tóth *et. ál.*, 2001 y Van Den Berg *et. ál.*, 2006). Se obtendrán resultados más fiables, a pesar de ser más caro el cultivo a largo plazo y retrasar el resultado 2-3 semanas. Se supone que con el uso de la técnica de FISH deben quedar descartados los pseudomosaicismos (generados *in vitro*) y se favorece la detección de los mosaicos verdaderos frente al estudio del cariotipo tras cultivo.

En 1996 el grupo de Bryndorf determina que la **contaminación materna** afecta a un 0´5-2% de las muestras según la AEDP, lo cual coincide con el porcentaje menor al 1% que determinan Brun *et. ál.* en 2003. Estos son valores considerablemente inferiores al detectado en los datos revisados, que se acerca al 13%. Para evitar dicha contaminación materna sería ideal que la muestra llegase sin coágulos, ya que provienen de la sangre materna, a la que se accede en la placenta. A pesar de ello y como ya se comentó, se trabaja haciendo un minucioso proceso de limpiado y aclarado con suero fisiológico, similar al descrito por Martinville *et. ál.*, 1984 y Quilter *et. ál.*, 2001. Los casos de contaminación materna en fetos masculinos o patológicos son fácilmente identificables, no siendo así cuando el feto es femenino, ya que sus células son indistinguibles de las maternas (n=42). Por lo tanto no se puede descartar un mayor número de casos de contaminación no detectados en los que se podría estar estudiando sólo las células maternas o células maternas y fetales, de manera que no se puede distinguir si se trata de una contaminación materna o un mosaico. Sería conveniente en estos casos contar con técnicas que permitiesen distinguir el origen materno o fetal de las células antes o durante el análisis, como la comparación de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción o RFLPs (Martinville *et. ál.*, 1984).

No se han conseguido resultados con el **cultivo directo** y además no están registrados el número de intentos. La no obtención de resultados en esta técnica puede ser debido a una incorrecta manipulación de la muestra que haga que se pierda el bastón celular que se encuentra en la parte apical de cada vellosidad y de donde se estima obtener metafases de forma directa. Es

posible que sea erosionada en el interior de la aguja y de la cánula durante el aspirado y la colocación de la muestra en el vial de transporte, por lo que sería aconsejable probar la vía transcervical también para comprobar si así la muestra permanece más intacta. Además de seguir intentándolo, es fundamental registrar las ocasiones en que se hace, así como la descripción de la metodología empleada.

En nuestros datos se obtuvo sólo un 30% de resultados tras **cultivo a largo plazo**. Porcentaje inferior a lo que se espera conseguir y a lo obtenido por otros laboratorios, como es el caso del 84'9% publicado por Van den Berg *et. ál.* en el año 2000.

Se tiene mayor información en cuanto a la **historia reproductiva** de las gestantes que no portaban aneuploidías que de las patológicas, faltando aún así bastantes datos. La historia reproductiva puede dar una idea orientativa de la existencia de anomalías cromosómicas en alguno de los padres. Por consiguiente, de aquella pareja que haya tenido embarazos previos no se sospecha *a priori* que puedan ser portadores de cromosomopatías. En cambio un historial de abortos de repetición hace pensar que alguno de los dos porte una cromosomopatía que sea la responsable de tales embarazos fallidos. Esta información es realmente valiosa cuando se obtienen cariotipos, ya que entonces se pueden estudiar las anomalías estructurales.

En cuanto al **desenlace de la gestación** parece que en general todos los estudios coincidimos en que cuando se detecta una anomalía cromosómica, se interrumpe dicha gestación. Además de ser lo que ocurre en esta serie de datos, está registrado en estudios como los de Tóth *et. ál.*, 2001 y Zhang *et. ál.*, 2010.

### **5.1.3 Concordancia de los resultados obtenidos por FISH en Biopsias de Vellosidades Coriales**

#### **5.1.3.1 Con el cariotipo por cultivo a largo plazo**

En la literatura se encuentran resultados discordantes entre los resultados de las vellosidades de forma directa y a largo plazo. Las principales causas atribuidas son: la contaminación con células maternas y el mosaicismo placentario o fetal (Quiroga *et. ál.*, 2008). Éste puede detectarse si los resultados entre las células estudiadas de forma directa (FISH en este caso, pero también podrían darse por cultivo directo) (citotrofoblasto), y las células que crecen tras cultivo a largo plazo (mesénquima) presentan diferente composición cromosómica (Simoni y Sirchia, 1994). Por ello no se recomienda considerar como definitivo un resultado directo, sino esperar al cultivo (Hahnemann y Vejerslev, 1997-1,2).

Kennerknecht *et. ál.* publicaron en 1998 una tasa de falsos negativos de 1/1000 si consideraban únicamente los resultados directos y una tasa de 1/3000 combinando los resultados directos con los del cultivo a largo plazo. En la bibliografía revisada se encuentran con frecuencia casos de discordancia, de manera que parece que queda claro la importancia de combinar ambos resultados (Brisset *et. ál.*, 2003) y lo necesario que es el éxito que se está obteniendo con los cultivos. A pesar de ello, se suelen tomar decisiones con el resultado de un FISH directo siempre que venga acompañado de hallazgos ecográficos claros, serios e indicativos de la patología detectada.

Trascurrió algo más de un año desde que se comenzaron a obtener resultados directos mediante FISH y comenzaron a obtenerse resultados tras cultivo directo. Esta forma gradual de conseguir progresos, también se ha observado en otros autores (Brun *et. ál.*, 2003).

La concordancia entre los resultados del FISH y del cariotipo es alta, del 88% si comparamos los resultados exitosos (n=29) dentro del grupo de los que se obtuvo resultado (n=33) y del 25´2% con respecto al total de muestras (n=115). Aunque se debe prosperar tanto en el número de cultivos como en la concordancia.

Casos no concordantes como los mostrados en el apartado 4.1.3.1, son los que representan mayor dificultad a la hora de su interpretación, y de los



que además no se cuenta con comprobación mediante amniocentesis, ni mediante el conocimiento del desenlace de la gestación. A pesar de que se puede hacer una clara suposición de que las células crecidas en cultivo son de origen materno, la realidad es que no se puede asegurar que haya sido contaminación materna ni descartar un mosaico.

#### **5.1.3.2 Con las amniocentesis posteriores**

La concordancia fue del 100% en todos los casos en los que se realizó una amniocentesis posterior a la biopsia de vellosidades coriales. De los casos en los que hubo resultado mediante ambas pruebas, se pueden descartar resultados de falsos negativos.

#### **5.1.3.3 Con el desenlace de la gestación**

Es positivo el no haber encontrado ningún dato “no concordante” entre los resultados emitidos por la Sección de Citogenética y lo observado tras el desenlace de la gestación. De cualquier manera, el número de muestras cuyo desenlace es conocido es demasiado bajo e impide usar esta información como control de calidad, así que uno de los objetivos de este trabajo es la futura mejora de este aspecto, bien sea con la información del Servicio de Anatomía Patológica en los casos de IVEs y abortos espontáneos o en caso de parto con la historia clínica o contacto telefónico.

## **5.2 Amniocentesis o muestras de líquido amniótico**

### **5.2.1 Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) en líquido amniótico sin cultivar**

#### **5.2.1.1 Descripción de la serie de FISH**

Entre el año 2002 y 2009 ha aumentado considerablemente la demanda de la técnica de FISH en muestras de líquido amniótico sin cultivar.

Resulta evidente el marcado aumento de dicho volumen a partir del año 2004 (gráfica 7), que se cree debido a la propia estandarización de la técnica.

La **edad gestacional** recomendada es la semana 16. En nuestra serie, la media calculada es ligeramente superior, 17´87 semanas, teniendo el 52% de los datos entre las semanas 14 y 22 de gestación. Este hecho se puede explicar teniendo en cuenta que es una técnica utilizada en casos urgentes, como ocurre por ejemplo cuando se detecta alguna sospecha clínica en etapas avanzadas del embarazo, de manera que esto puede hacer desplazarse dicha media hacia semanas superiores. De hecho, series estudiadas por otros autores presentan datos similares: la media de edad gestacional para realizar FISH según D´Alton y colaboradores en 1997 era de 20´6 semanas y Eiben y colaboradores en 1999 analiza los resultados del FISH de amniocentesis realizadas desde la semana 12 hasta el tercer trimestre.

La media **edad materna**, con algo más de 32 años (tabla 11), no representa por sí sola índice de riesgo de cromosomopatía. Prácticamente el 60% de la muestra se distribuye entre las edades de 30 a 40 años. Tampoco indica riesgo la media estimada por el grupo de D´Alton en 1997 que fue de 30´7 años, cuyo rango abarcaba 17-48 años.

El hecho de que las principales **indicaciones** para realizar esta técnica sean los hallazgos ecográficos y el screening, relega la edad materna al tercer puesto en frecuencia. Al igual que ocurría con las biopsias coriales, esto coincide con la tendencia actual de no usar la edad materna como un único indicador de cromosomopatía. En cambio para Eiben *et. ál.* en 1999 sigue siendo la edad materna la indicación más frecuente (46%); en segundo lugar el resultado del screening (40%) y luego los hallazgos ecográficos (14%). Luquet *et. ál.*, 2002 analizan una serie en la que las frecuencias coinciden con las nuestras. Para ellos el 69% de los FISH se realizan por indicarse tras los hallazgos ecográficos, el 17% son debidos al screening y el 14% por edades maternas avanzadas.

### 5.2.1.2 Descripción de los resultados del FISH

El total de las muestras que llegaron a la Sección de Citogenética (n=967), representa un 13´3% de las muestras de líquidos amnióticos que llegaron durante el mismo periodo, es decir 7247 entre los años 2002 y 2009. Dicho porcentaje es mayor que el recogido por Weremowicz y cols., 2001 en el que realizan la técnica de FISH al 8´1% de las amniocentesis realizadas durante un periodo de 8 años.

La mayoría de las publicaciones estiman el porcentaje de resultados informativos en torno al 90% (tabla 30). En nuestra serie se obtuvieron resultados informativos en el 97% de las ocasiones, coincidiendo con el porcentaje estimado por Weremowicz y cols., 2001.

**Tabla 30 Porcentajes de resultados informativos publicados para la técnica de FISH**

Autores	Resultados informativos
Hume <i>et. ál.</i> , 1995	69%
D´Alton <i>et. ál.</i> , 1997	80´6%
Eiben <i>et. ál.</i> , 1999	96´1%
Ulmer <i>et. ál.</i> , 2000	85%
Bink <i>et. ál.</i> 2000	93%
Weremowicz <i>et. ál.</i> , 2001	97%
Luquet <i>et. ál.</i> , 2002	98´4%

En el propio laboratorio, además del FISH, se obtuvo resultado por cariotipo en el 70% de los casos. El resto pudo ser por fallo del cultivo o por realizarse en un laboratorio diferente. Aunque no se ha calculado, esta última situación es la más frecuente y corresponde a las muestras procedentes del HUNSC, que hasta marzo de 2008 sólo se remitían al HUC para realizar el FISH y el cariotipo se enviaba a otro centro.

Sólo en 4 ocasiones hemos registrado que se detectara **contaminación por células maternas** (0´75%). En relación a dato, las

cifras encontradas son muy variables. En 1994, Nuss y colaboradores estiman que uno de cada dos muestras de líquido amniótico puede contener células maternas, lo cual, comentan, es fácilmente distinguible por FISH. D'Alton en 1997 estiman un 10'8% de contaminación por células maternas, resultados que consideran no deben ser informados. En el año 2000 Ulmer *et. ál.* publican un 17'4% y Bink *et. ál.* un porcentaje mayor del 10%. En el año 2002 Luquet y colaboradores estiman una media del 17% de muestras con contaminación materna. En este mismo año el grupo de Witters publican una tasa de contaminación por células maternas del 1'27%, considerablemente más próxima a la estimada con nuestros datos.

En este estudio no se ha registrado ningún caso de **falso negativo** o **falso positivo**, por lo que se estiman los valores de especificidad y sensibilidad del 100% en ambos casos. Este hecho se encuentra también en las series revisadas por D'Alton *et. ál.*, 1997, Eiben *et. ál.*, 1999 y Wang *et. ál.*, 2008. En cambio, sí hay publicaciones donde muestran algún caso con este tipo de resultados. Philip *et. ál.*, 1994 explicó haber encontrado bajas tasas de falsos positivos y falsos negativos. Tepperberg *et. ál.*, 2001 estimó un 0'003% de falsos positivos y un 0'024% de falsos negativos y Luquet *et. ál.* en el año 2002 muestran una tasa de falsos positivos del 0.15% al igual que la de falsos negativos.

Una de las principales ventajas del FISH es poder reducir el tiempo de espera para un resultado de 15 a 3 días. Esto se debe a que se puede trabajar con núcleos en interfase, sin necesidad de esperar al crecimiento del cultivo y ni de obtener células en mitosis. Así se reduce la técnica a 24-48 horas. Además con relativamente poco volumen de muestra (aproximadamente 5ml) se obtiene suficiente cantidad de núcleos para emitir un diagnóstico. De todos los casos analizados, se detectó un **8'7% con cromosopatías** mediante los resultados del FISH. Este valor representa la contribución que esta técnica hace al diagnóstico citogenético de las amniocentesis. La tasa de detección varía según los autores aunque no suele superar el 10% (tabla 31).

Cada una de las gestantes con un feto portador de cromosopatías (n=84) conoce dicha situación con un menor tiempo de espera que si el FISH no se hubiera realizado. Esto, además de reducir la ansiedad de los progenitores por conocer el resultado, en caso de interrupción de la gestación, facilita el proceso, al ocurrir en edades gestacionales previas.

**Tabla 31 Tasa de detección de aneuploidías por FISH**

Autores	Tasa de detección
Evans <i>et. ál.</i> , 1994	3´4%
D´Alton <i>et. ál.</i> , 1997	6´6%
Evans, <i>et. ál.</i> , 1999	2,85%
Luquet <i>et. ál.</i> , 2002	10´7%

La distribución de **frecuencias** relativas de cada cromosopatía dentro de los resultados patológicos, coincide aproximadamente con lo visto en otros autores, siendo las trisomías 21 y 18 las más frecuentes (tabla 32).

La trisomía 21 es la más frecuente, con un 5% de incidencia frente al total de casos diagnosticados, 3´2% publican D´Alton y colaboradores en 1997, 1´8% fue lo publicado por el grupo de Eiben en 1999, 0´97% para Evans *et. ál.*, 1999 y el grupo de Luquet estima en 2002 un 5´5% de incidencia de la trisomía 21.

Los FISH con sondas específicas para **síndromes de microdelección** realizadas porque existía sospecha clínica previa, fueron todos negativos (tabla 13). Dicha sospecha se basaba en hallazgos ecográficos ya que por ejemplo, el Síndrome de Di George se suele asociar a determinadas anomalías cardíacas, como la tetralogía de Fallot, y no cardíacas, como anencefalia, hidrocefalia, espina bífida, polidactilia o labio leporino (Tao *et. ál.*, 2010).

**Tabla 32 Comparación de frecuencias de cromosopatías detectadas mediante FISH**

Autores	Cromosopatías
Nuestros datos	57% trisomía 21 18% trisomía 18 5% trisomía 13 8% monosomía X 10% poliploidías 2% otros gonosomas
D'Alton <i>et. ál.</i> , 1997	20% trisomía 21 8% trisomía 18 8% trisomía 13 4% monosomía X 2% Sd. Klinefelter
Eiben <i>et. ál.</i> , 1999	37'25% trisomía 21 16'34% trisomía 18 2% trisomía 13 9'15% gonosomas 7'2% poliploidías
Evans <i>et. ál.</i> , 1999	50'18% trisomía 21 20'6% trisomía 18 7'15% trisomía 13 18% gonosomas 4'2% poliploidías
Luquet <i>et. ál.</i> , 2002	53'14% trisomía 21 16'4% trisomía 18 8'7% trisomía 13 12% monosomía X 5'8% gonosomas 3'4% triploidía

La sospecha del Síndrome de Miller-Dieker sobretodo a lisencefalia y ventriculomegalia, aunque también se asocia a retraso de crecimiento intrauterino y defectos cardíacos congénitos (Chen *et. ál.*, 2010). El Síndrome de Cri-du-chat puede sospecharse al detectar por ecografía hydrops fetalis, edema en la piel, defectos en el septo ventricular y otras malformaciones como vieron Aoki *et. ál.*, en 1999 o por hueso nasal hipoplásico, hipoplasia cerebelar, quiste en plexos coroideos y arteria umbilical única según Teoh *et. ál.*, 2009.

La mayoría de los autores consideran la **técnica de FISH** como un método de diagnóstico rápido, seguro y de gran exactitud. Eiben *et. ál.*, 1999 la consideran una técnica valiosa y fiable, especialmente importante en casos urgentes pero dependiente en todo momento del cariotipo ya que no puede detectar todo lo que éste detecta. Además de ser muy útil en el diagnóstico de mosaicismos. Luquet *et. ál.*, 2002 la consideran también una técnica muy específica y sensible, sin embargo establecen que no se debe dar una información parcial sino completa obteniendo siempre el cariotipo. Valoran especialmente los resultados de FISH durante el tercer trimestre, considerándolo de gran utilidad debido a la baja probabilidad de que un feto portador de cromosomopatías patológicas alcance edades gestacionales tardías. Nuestra opinión coincide con estas publicaciones, a pesar de no poder estimar los valores de especificidad y sensibilidad propia de nuestro centro por desconocer las indicaciones de diagnóstico prenatal que resultaron negativas o los nacidos con cromosomopatías no diagnosticadas. Este tipo de estudios se podrían plantear para un futuro en colaboración con los servicios de Ginecología y Pediatría de ambos hospitales.

A pesar de tales consideraciones, en general no se toman decisiones exclusivamente con un diagnóstico citogenético patológico obtenido como resultado de un FISH, sino que se debe contar con un apoyo clínico o una confirmación mediante cariotipo. Esta es también la recomendación de la American College of Medical Genetics (ACMG, 2000). En publicaciones como la de D'Alton *et. ál.*, 1997 se tomaban decisiones con un FISH positivo y una ecografía alterada si se encontraban al límite legal de interrupción, situación

que desde la nueva Ley del Aborto en 2010 ya no se plantea en España. Eiben *et. ál.*, 1999 llevaban a cabo interrupciones del embarazo con los resultados del FISH y de la ecografía sin esperar al cariotipo si éstos estaban alterados, sin embargo esperaban al resultado completo si el registro ecográfico era normal.

En ocasiones se pueden presentar casos de difícil interpretación. Las principales causas de ésta pueden ser la escasa celularidad, una mala calidad de hibridación o variabilidad en los tamaños de las señales de hibridación. Ésta es una situación bastante habitual también comentada por Luquet y colaboradores en el año 2002, que usan también el kit Aneuvysion de Vysis® y en el que uno de los tipos de sondas hibridan en secuencias alpha satélites centroméricas de longitud variable, concretamente en el cromosoma 18 y del X, que provoca variaciones de los tamaños de las señales de hibridación. Esto puede llegar a generar falsos negativos, falsos positivos o resultados no informativos.

### **5.2.1.3 Concordancia de los resultados del FISH con los obtenidos en cariotipo tras cultivo**

La tasa de concordancia estimada para nuestros datos fue inicialmente del 99´1%, ya que se habían detectado 9 casos cuyos resultados de FISH no coincidían con los del cariotipo. Tras evaluar las diferencias se notificó que la mayoría de los casos correspondían a contaminaciones por células maternas, hibridaciones inespecíficas o anomalías producidas *in vitro*. Por consiguiente, sólo se obtuvo un caso en el que los resultados de FISH y de cariotipo fueron diferentes, lo que haría variar la tasa de concordancia a un 99´9%.

Cualquiera de las dos tasas estimadas, son bastante similares a las publicadas por otros autores. Philip *et. ál.*, 1994 estimaron una tasa de concordancia superior al 99´5%, Tepperberg *et. ál.*, 2001 obtuvieron un 99´8% y Liu *et. ál.*, 2010 un 100%.

- **Alteraciones citogenéticas no detectables por FISH**



La principal limitación que presenta esta técnica es la estar acotada a las aneuploidías más frecuentes entre los cromosomas 13, 18, 21, X e Y, obteniendo por lo tanto una información parcial. Esto significa que pueden ocurrir alteraciones citogenéticas numéricas que impliquen a otros cromosomas o alteraciones estructurales, y pasar desapercibidas para el FISH. Este otro tipo de alteraciones podrán tener carácter patológico o no. Se registraron 24 casos de polimorfismos cromosómicos no patológicos (tabla 14) y 12 alteraciones estructurales, que como ya se ha comentado no fueron detectadas hasta que se estudió el cariotipo (tabla 15).

El 50% alteraciones estructurales eran aparentemente equilibradas. De ellas, en tres ocasiones se comprobó el origen paterno de tales alteraciones, con lo que se puede considerar que éstas no tendrán efecto en el fenotipo del portador y sólo podrán originar anomalías en la descendencia de los mismos por posibles errores en la disyunción meiótica. En las otras tres ocasiones, tras realizar el cariotipo a los padres, se determinó el origen *de novo* de tales reordenamientos. En estas situaciones, se suele actuar de la misma manera que las anteriores, pero debido a que sólo son alteraciones equilibradas hasta donde la resolución de la técnica nos permite observar, no se puede garantizar que no se haya visto afectada alguna región del genoma y esto produzca efectos en el fenotipo del portador. La AEDP estima que el 2-5% de los individuos con anomalías estructurales equilibradas *de novo* presentan alteraciones fenotípicas que dependen del tipo de anomalía observada.

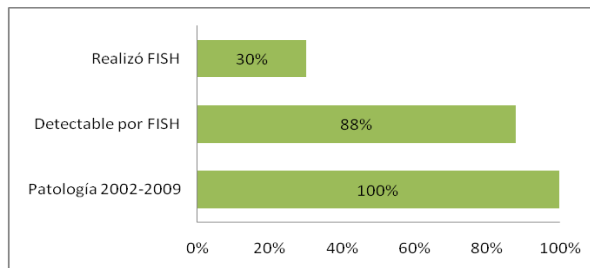
El otro 50% de las alteraciones estructurales detectadas tienen carácter patológico por presentar material genético ausente o en exceso. De ellos, en 5 casos se comprobó el origen *de novo*. Sólo en una ocasión, que implicaba al cromosoma 3, la alteración era producto de la recombinación de un cromosoma paterno que ya portaba una inversión, y como consecuencia se generó una duplicación en el feto.

Cabe destacar que en tres de los casos, la patología viene dada por translocaciones robertsonianas, entre cromosomas 21 (n=2) y entre los

cromosomas 13 y 14 (n=1). Se considera que el 50% de las translocaciones robertsonianas se originan *de novo* (Bandyopadhyay *et. ál.*, 2002) como en este caso. La t(21;21) o rob(21;21) pertenece al grupo más raro mientras que la t(13;14) o rob(13;14) al grupo más común. De hecho, prácticamente el 95% de los casos *de novo* implican a los cromosomas 13-14 o 14-21 y se originan durante la meiosis materna.

Se calculó que desde que se implantó la técnica de FISH, en el año 2002, la mayoría de la patología detectada mediante cariotipo era detectable mediante FISH (gráfica 32), sólo el 12% de la patología se escapa de esta técnica. Sin embargo, de ese porcentaje sólo el 30% fue realizado por ambas técnicas, lo que equivale al 0'55% de las muestras durante ese periodo de tiempo.

**Gráfica 32 Capacidad de la técnica de FISH para detectar cromosomopatías**



Thein *et. ál.*, 2000 detecta 111 cromosomopatías en un estudio de 1687 casos (tasa de detección del 6'5%) y de ellas 14 fueron no detectables por FISH (12'6% de las patologías y 0'83% del total de muestras). Este grupo considera razonable el uso de la técnica de FISH como alternativa para indicaciones como edad materna avanzada y screening positivo, siempre que se haga un extenso análisis ecográfico. Sin embargo, sólo usan dicha técnica como método adicional a la citogenética convencional para otras indicaciones, especialmente cuando las anomalías se detectan mediante ecografía. Ya que con malformaciones ecográficas graves, el resultado de un FISH normal no será determinante.

**Tabla 33 Tasa de detección del FISH para las anomalías cromosómicas**

Autores	Tasa de detección
D´Alton <i>et. ál.</i> , 1997	73%
Evans <i>et. ál.</i> , 1999	69´4%
Weremowicz <i>et. ál.</i> , 2001	84%
Luquet <i>et. ál.</i> , 2002	87´7%
Witters <i>et. ál.</i> , 2002	85´6%

Algunos autores estiman que con la técnica de FISH se detectan la mayoría de las anomalías cromosómicas. Dichos porcentajes se muestran en la tabla 33.

## 5.2.2 Cariotipo en amniocentesis

### 5.2.2.1 Descripción de la serie de amniocentesis

Hasta el año 2007, se realizaban aproximadamente 800 análisis citogenéticos en líquidos amnióticos por año. En el 2008, se experimentó un aumento que se debe al hecho de haber asumido los cariotipos de las amniocentesis del Hospital Universitario Nuestra Señora de La Candelaria, de los que ya se realizaba la técnica de FISH. Por el contrario, trabajos como el de Han *et. ál.*, 2008 presentan un constante aumento en el número de casos al año, comenzando en 58 en 1994 y alcanzando los 4502 en 2007.

La **edad gestacional** a la que se realiza la prueba coincide en su mayoría con lo recomendado que es en la semana 16. Hay series en la bibliografía donde la media de edad gestacional es superior e incluso inferior (tabla 34).

La media de **edad materna**, 35 años, está por debajo del límite recomendado para el diagnóstico citogenético prenatal actual. Sin embargo, es lógico que coincida con el límite empleado hasta el año 2008 debido a la cantidad de años en los que éste fue utilizado. El valor de la media va en concordancia con que el 30% de las gestantes pertenezcan al rango de edades

entre los 35 y 38 años. En las series revisadas de la bibliografía, se recogen edades maternas inferiores (tabla 35).

**Tabla 34 Medias y/o rangos de las edades gestacionales de las amniocentesis**

Autores	Edades gestacionales (semanas)
Crossley <i>et. ál.</i> , 2002	12 (11-12)
Corral <i>et. ál.</i> , 2006	20 (16-31)
Karaoguz <i>et. ál.</i> , 2006	18
Zhang <i>et. ál.</i> , 2010	16-28

**Tabla 35 Medias y rangos de las edades maternas en las amniocentesis**

Autores	Edades materna (años)
Crossley <i>et. ál.</i> , 2002	29 ' 9 ≥35 (15 ' 4%)
Avgidou <i>et. ál.</i> , 2005	34 (15-49) >35 (48 ' 5%)
Corral <i>et. ál.</i> en 2006	30 (19-46)
Karaoguz <i>et. ál.</i> , 2006	33 ' 9
Han <i>et. ál.</i> , 2008	30-34 (35 ' 4%) 35-39 (30%)

Se muestra entre paréntesis y con letra gris el porcentaje de gestantes que se encuentran en determinados rangos de edad

Contrariamente con lo que se ha visto hasta ahora, es la edad materna avanzada la **indicación** más frecuente. Esto se debe a que durante muchos años estuvo esta técnica asociada casi exclusivamente a esta indicación. En cambio, a partir del año 2008 se implanta en el Servicio de Ginecología del HUC el screening combinado del primer trimestre como cálculo de riesgo de aneuploidías en la gestación. Se observa en la gráfica 14 cómo ha aumentado bruscamente la indicación de amniocentesis por resultado del screening y ha ido disminuyendo la indicación de edad materna avanzada. Este es el cambio de tendencia comentado anteriormente, que quizá sea más fácilmente

observable con las amniocentesis debido al gran tamaño muestral que tiene en esta serie (n=9119). Para Tseng *et. ál.*, 2006 la indicación en la que más aneuploidías se detectaron fue en las realizadas tras ecografía (8´86%), posteriormente otras indicaciones, screening y edad materna avanzada.

Gunduz *et. ál.*, 2004 también obtienen la edad materna avanzada como indicación más frecuente, pero detectan un cambio de tendencia contrario al detectado en nuestros datos. Para este estudio realizado entre los años 1998 y 2001 la frecuencia de la indicación de diagnóstico prenatal por edad materna avanzada ha ido aumentando y la del screening y ecografía ha ido disminuyendo. A su vez, las tasas de detección han disminuido del 3´83% al inicio del estudio hasta el 2´48% al final.

**Tabla 36 Frecuencia de amniocentesis realizadas según la indicación sea la edad materna avanzada, el resultado del screening o los hallazgos ecográficos**

Autores	Edad materna avanzada	Screening	Hallazgos ecográficos
Park <i>et. ál.</i> , 2001	51´6%	20%	9´5%.
Chen <i>et. ál.</i> , 2005	58´85%	26´17%	4´5%
Karaoguz <i>et. ál.</i> , 2006	53%	33´3%	8´1%
Tseng <i>et. ál.</i> , 2006	57´3%	21´34%	7´9%
Han <i>et. ál.</i> , 2008	18´4%	70%	5´7%
Zhang, <i>et. ál.</i> , 2010	37´74%	32´08%	26´42%

En otras publicaciones como las recogidas en la tabla 36 se observa que la edad materna avanzada es la indicación más frecuente seguida del screening y en tercer lugar por los hallazgos ecográficos. Esto no ocurre en el caso del trabajo de Han y colaboradores en 2008 donde la indicación más frecuente es el screening y en segundo lugar la edad materna avanzada.

Publicaciones como las de Hörmansdörfer *et. ál.*, 2010 y Mademont-Soler *et. ál.*, 2011 realizadas sobre centros españoles coinciden que el uso de la edad materna como indicación única para detectar aneuploidías fetales es un

concepto obsoleto. En España en los años 80 se implantó el screening prenatal del segundo trimestre que tenía en cuenta la edad materna junto con los niveles séricos de la alfafetoproteína y la fracción libre de la gonadotropina coriónica humana. Este método de screening se asociaba con una tasa de detección de trisomías 21 del 60-80%. Durante la última década se ha ido implantando en este país el screening del primer trimestre, que considera además de la edad materna, los niveles séricos de la fracción libre de la gonadotropina coriónica humana y la proteína A del plasma asociada al embarazo, así como la medida de la translucencia nucal, como parámetro ecográfico. Con este método publicado por Nicolaides en 2005, se están consiguiendo tasas de detección de trisomía 21 del 90% (Mademont-Soler *et. ál.*, 2011).

### 5.2.2.2 Descripción de los resultados de amniocentesis

La amniocentesis es una técnica que presenta un alto grado de éxito. En el 99% de los casos analizados se obtuvo un resultado informativo, lo cual es esperable después de llevar tanto tiempo establecida y el gran volumen de trabajo que representa. Esto indica que los 76 casos en los que no se pudo emitir un informe es una cantidad relativa pequeña y aceptable para los 11 años de estudios. Estos datos son similares a los recogidos en la bibliografía actual, mostrando una mayor diferencia con la publicación del año 1973 (tabla 37).

**Tabla 37 Resultados informativos de las amniocentesis**

Autores	Resultados informativos
Hsu <i>et. ál.</i> , 1973	84%
Karaoguz <i>et. ál.</i> , 2006	99´7%
Mademont-Soler <i>et. ál.</i> , 2011	99´5%

El estudio refleja un 3´5% de diagnósticos con **polimorfismos**, siendo un valor que *a priori* pensamos que no es del todo cierto. En una serie como ésta se esperaría mayor número de casos con polimorfismos. En muchas

ocasiones éstos no se informan en diagnóstico prenatal para evitar malas interpretaciones por parte de la gestante o del clínico, evitando así ansiedad innecesaria debido a la común falta de información que sobre ellos posee la población general y facultativos clínicos no relacionados habitualmente con este campo. Aunque otros autores publican valores incluso inferiores, como Hume *et. ál.*, 1995 quien estima un 0´44% de polimorfismos en una serie de 12454 estudios prenatales. Se pueden agrupar en tres tipos (gráfica 18): satélites, aumento de heterocromatina e inversiones, siendo estas últimas las más abundantes, constituyendo el 51% de todos los polimorfismos registrados. El origen de éstos será siempre paterno o materno, no generándose *de novo* y sin presentar efecto en el fenotipo del portador.

Entre las **alteraciones estructurales** detectadas (n=45), las más frecuentes son las alteraciones recíprocas equilibradas (n=29), que representan un 64% de este grupo de alteraciones y un 0´32% del total de las amniocentesis. Van Dyke *et. ál.*, 1983 y Jacobs *et. ál.*, 1992 estiman entre un 0´16-0´20% las translocaciones recíprocas equilibradas, incidencia inferior a la registrada en nuestra serie.

Del total de las alteraciones estructurales, se ha podido comprobar que el 60% de consideran *de novo* por no haberse hallado en el cariotipo de los padres. Por lo tanto no se tiene tanta garantía de que no implican patología en el feto, como en las que han sido heredadas (40%). Hume y colaboradores en 1995 registran 118 alteraciones estructurales, de las que el 45% resultan heredadas y el 55% *de novo*. Yaegashi *et. ál.*, 1998 registran alteraciones estructurales en un 0´5% del total lo que hace un 23% de las cromosopatías. Tseng *et. ál.*, 2006 reporta translocaciones equilibradas en un 0´41% del total, entre las cuales aproximadamente el 80% tenía un origen parental. Han *et. ál.*, 2008 reportan que un 38´8% de la patología pertenece a alteraciones estructurales y detectando un 0´5% de translocaciones recíprocas, de las que un 81% tienen un origen parental. Zhang *et. ál.*, 2010 detecta un 39´62% de anomalías estructurales entre toda la cromosopatía.

Se detecta un 2% de casos **patológicos**. Este valor es el que justifica el gran volumen de trabajo que representa esta prueba. La tasa de detección estimada para esta serie de datos es algo inferior a las revisadas en la bibliografía (tabla 38) que como se ha podido ver oscilan de 1´08-5%.

**Tabla 38 Tasas de detección de cromosomopatías en amniocentesis**

<b>Autores</b>	<b>Tasa de detección</b>
Hume <i>et. ál.</i> , 1995	5%
Yaegashi <i>et. ál.</i> , 1998	2´1%
Chen <i>et. ál.</i> , 2005	2´53%
Avgidou <i>et. ál.</i> , 2005	1´08%
Tseng <i>et. ál.</i> , 2006	2´9%
Karaoguz <i>et. ál.</i> , 2006	3%
Han <i>et. ál.</i> , 2008	3´1%
Zhang <i>et. ál.</i> , 2010	2´26%,
Mademont-Soler <i>et. ál.</i> , 2011	2´9%

Las frecuencias de anomalías cromosómicas patológicas de esta serie de datos vuelve a estar en concordancia con lo observado en otros autores. La trisomía 21 implica el 57% de la patología detectada mediante cariotipo. Este valor es mayor que todos los encontrados en la bibliografía salvo el registrado por Avgidou y colaboradores en 2005 (tabla 39). Si se comparan las frecuencias de las otras cromosomopatías detectadas con los publicados en la bibliografía (tabla 39), se observa que se mantiene constante el hecho de que la trisomía 21 es siempre la más frecuente. Tras ella, le sigue la trisomía 18, la monosomía X y la trisomía 13.

**Tabla 39 Comparación de las alteraciones cromosómicas en amniocentesis**

<b>Autores</b>	<b>Cromosomopatías</b>
Nuestros datos	57% trisomía 21 8% trisomía 18 4% trisomía 13



	6% monosomía X 4% poliploidías 9% otros gonosomas
Hume <i>et. ál.</i> , 1995	24´7% trisomía 21 7% trisomía 18 4´6% trisomía 13 12´2% monosomía X 5´7% poliploidías
Yaegashi <i>et. ál.</i> , 1998	35´8% trisomía 21 11´1% trisomía 18 6% trisomía 13
Chen <i>et. ál.</i> , 2005	30´28% trisomía 21
Avgidou <i>et. ál.</i> , 2005	60% trisomía 21
Tseng <i>et. ál.</i> , 2006	27,54% trisomía 21 11´59% trisomía 18 4´35% trisomía 13
Han <i>et. ál.</i> , 2008	37% trisomía 21 10% trisomía 18 1´23% trisomía 13 5´4% monosomía X
Zhang <i>et. ál.</i> , 2010	49% trisomía 21 9´43% gonosomas 1´89% poliploidías
Mademont-Soler <i>et. ál.</i> , 2011	38% trisomía 21 7´8% trisomía 18 2´4% trisomía 13 5% monosomía X

En nuestra serie, sólo en el 5´4% de los casos, el origen de las cromosopatías se debe a alguna alteración heredada del padre o de la madre. En nuestra serie, 93´5% de la patología registrada es *de novo*. En ocasiones se pueden llegar a originar reordenamientos estructurales *de novo* (Carrasco Juan *et. ál.*, 1989). Sin embargo lo más frecuente es que este tipo de

alteraciones se produzcan *de novo*. En la trisomía 21, aproximadamente el 90% de los casos se deben a errores en la disyunción meiótica (Gardner y Sutherland, 2003). De ellos, en torno a un 5% son de origen paterno y el resto materno. En el caso del origen paterno, el 75% de los errores se producen durante la meiosis II. Cuando el origen es materno, el 75% se producen en meiosis I. El resto de los casos de trisomías 21 se atribuye un 5% a errores mitóticos, un 4% a translocaciones robertsonianas (75% familiares y 25% *de novo*) y un 1% con otro origen.

En el apartado 4.2.1.3 se especificó un caso en el que no se obtuvo concordancia entre los resultados del FISH y del cariotipo. Además, el resultado del cariotipo de líquido amniótico no correspondía con lo observado posteriormente mediante funiculocentesis y cariotipo en sangre de cordón, con lo que se ha considerado como un caso de falso positivo para amniocentesis. De tal manera, que se estima una sensibilidad para esta técnica del 99%. Así como una especificidad del 100%, ya que no se ha registrado ningún caso de falso negativo, con lo que todos los diagnósticos citogenéticos normales han sido verdaderos.

## **5.3 Sangre de cordón (SC) o funiculocentesis**

### **5.3.1 Descripción de la serie de funiculocentesis**

El tamaño muestral de las funiculocentesis es mucho menor ( $n=63$ ) que cualquier otro, sobre todo si se compara con el volumen de las amniocentesis ( $n=9119$ ) durante el mismo periodo. Esto apunta a unos datos poco representativos, pero sin embargo de ellos se obtiene información de utilidad. Casi todas las series, como se verá en el apartado 5.4.3, presentan un menor número de pruebas de SC en relación a las demás, a excepción de la presentada por Corral *et. ál.* en 2006 donde las funiculocentesis fue la prueba más realizada en un 78% de las ocasiones. En el año 2007 se observa un

llamativo incremento del número de determinaciones, para lo cual no se ha encontrado relación con algún hecho concreto (gráfica 21).

La obtención de sangre de cordón (funiculocentesis o SC) para el estudio del cariotipo viene ligada a un estadio posterior del embarazo, con lo que es lógico que la media de **semana gestacional**, algunos días pasada la semana 22, sea posterior a la obtenida para otras pruebas. A pesar de esto, se encuentra en el límite superior de lo recomendado que es entre las semanas 18 y 22. En otros centros (tabla 40) la media de edad gestacional ha sido todavía mayor, pero también hay medias de edades gestacionales inferiores. En el caso de Tongsong y colaboradores (2000) presenta casi el 80% entre las semanas 19-21.

**Tabla 40 Relación de edades gestacionales a las que se realizan las funiculocentesis de la bibliografía revisada**

Autores	Media y/o rangos de edad gestacional (semanas)
Den Hollander, <i>et. ál.</i> , 1994	28 (17-37)
Tongsong <i>et. ál.</i> , 2000	19´8 (16-24)
Corral <i>et. ál.</i> , 2006	27 (18-38)
Acar <i>et. ál.</i> , 2007	17-28
Liao <i>et. ál.</i> , 2007	24-34
Zhang <i>et. ál.</i> , 2010	16-37

La media de **edad materna** en la población es bastante baja, de 29 años, pero con un rango de variación amplio, entre los 16 y 42 años. Este dato es similar al de otras series que estiman la media de edad materna, o incluso algo superior (tabla 41).

**Tabla 41 Relación de edades maternas a las que se realizan las funiculocentesis en la bibliografía revisada**

Autores	Media y rangos de edad materna (años)
Den Hollander <i>et. ál.</i> , 1994	28 (18-42)
Tongsong <i>et. ál.</i> , 2000	31 (15-49)
Corral <i>et. ál.</i> , 2006	26 (14-43)
Acar <i>et. ál.</i> , 2007	27´85 (17-43)

Las principales **indicaciones** para realizar una funiculocentesis en este estudio son en primer lugar observar anomalías ecográficas, generalmente a estas alturas de la gestación se asocian con la ecografía selectiva de la semana 20 o con embarazos no controlados. Y en segundo lugar a la comprobación de resultados citogenéticos previos. De manera que la población estudiada es bastante heterogénea. La tabla 42 muestra la comparación de frecuencias de indicaciones para realizar una funiculocentesis entre diferentes autores, ninguno de ellos plantean la comprobación de resultados como una indicación de funiculocentesis.

**Tabla 42 Comparación de las principales indicaciones para realizar las funiculocentesis**

Autores	Edad materna avanzada	Screening	Hallazgos ecográficos
Boulot <i>et. ál.</i> , 1992	100%	-	-
Park <i>et. ál.</i> , 2001	20%	11´34%	49´5%
Acar <i>et. ál.</i> , 2007	6%	4%	77´6%
Liao <i>et. ál.</i> , 2007	-	-	100%
Zhang <i>et. ál.</i> , 2010	7´15%	7´15%	75%

El estudio de Tongsong *et. ál.*, 2000 se centra fundamentalmente en estudiar el diagnóstico de la talasemia. Aún así, en el 27% de sus punciones interesaba realizar el cariotipo. Dentro de estas funiculocentesis, la indicación

de mayor frecuencia fue la edad materna avanzada, seguida de antecedentes citogenéticos y hallazgos ecográficos.

### 5.3.2 Descripción de los resultados de funiculocentesis

La **tasa de éxito** de la funiculocentesis es bastante alta, un 92%. Esto aporta fiabilidad, a pesar de las dificultades que presenta. Los datos publicados por otros autores son similares a lo encontrado en nuestra serie (tabla 43).

**Tabla 43 Tasas de éxito de las funiculocentesis de la bibliografía revisada**

Autores	Tasa de éxito
Hickok y Mills, 1992	93´7%
Den Hollander <i>et. ál.</i> , 1994	90%
Acar <i>et. ál.</i> , 2007	92´8%
Zhang <i>et. ál.</i> , 2010	100%

La **incidencia de cromosopatías** detectada es del 24%, superior a todas las encontradas en la bibliografía revisada (tabla 44). Durante los tres años que duró el estudio del equipo de Tongsong publicado en el año 2000, se realizaron 1430 funiculocentesis, entre las cuales se detectaron anomalías cromosómicas en el 0´8% de los casos. Este resultado varía si recordamos que el objetivo principal del estudio era diagnosticar la talasemia, así que si nos centramos sólo en las 357 funiculocentesis en las que se quería estudiar el cariotipo, la incidencia de cromosopatías asciende al 3´3%.

La **frecuencia** de trisomía 21 detectada está en relación con lo observado en otros estudios, ya que está próxima al 5% del total de muestras analizadas. Si se observa únicamente los casos patológicos, la trisomía 21 representa el 30% de toda la patología detectada. Cuando se comparan estos resultados con los de otros autores (tabla 45) se ven cifras similares como los estudios de Den Hollander y Acar. En cambio, las cifras publicadas por Liao son bastante inferiores (17´6%) y las de Zhang son muy superiores (85%), este último grupo detecta un 12% de patología en las funiculocentesis.

**Tabla 44 Tasa de incidencia de cromosomopatías detectadas en funiculocentesis**

<b>Autores</b>	<b>Incidencia de cromosomopatías</b>
Den Hollander <i>et. ál.</i> , 1994	16´1%
Acar <i>et. ál.</i> , 2007	5´17%
Liao <i>et. ál.</i> , 2007	17´34%
Zhang <i>et. ál.</i> , 2010	12´02%

**Tabla 45 Comparación de cromosomopatías detectadas en funiculocentesis**

<b>Autores</b>	<b>Cromosomopatías</b>
Nuestros datos	30% trisomía 21 10% trisomía 13 20% translocaciones equilibradas 10% ESAC 10% trisomías parciales
Den Hollander <i>et. ál.</i> , 1994	23% trisomía 21 34´6% trisomía 18 27% estructurales
Acar <i>et. ál.</i> , 2007	33´3% trisomía 21 33´3% trisomía 18 8´3% trisomía 13 8´3% poliploidía 16´67% inversiones
Liao <i>et. ál.</i> , 2007	17´6% trisomía 21 41´2% trisomía 18 6% trisomía 13
Zhang <i>et. ál.</i> , 2010	85% trisomía 21 7´14% gonosomas 3´57% triploidía 3´57% reordenamientos estructurales

Las tasas de **contaminación materna** publicadas por otros autores son tan dispares como el 2% para Tongsong *et. ál.*, 2000 y el 12´3% para Mathur *et. ál.*, 2002. En nuestro estudio se calcula un 3´17%. Esta estimación está hecha basándose en los resultados del cariotipo donde es observable dicha contaminación, es decir en los fetos masculinos y portadores de cromosomopatías.

Entre los resultados normales, un 76% del total, se observa una mayor proporción de cariotipos femeninos (47´62%). Esto pensamos que puede estar en relación con la alta tasa de contaminación materna debida a la dificultad de extraer sangre de cordón y la facilidad de errar en la punción. A pesar de ello, no se tiene notificación de ningún caso con desenlace diferente al informado tras la funiculocentesis. Con lo que no se registran casos de falsos positivos ni falsos negativos, de manera que las estimaciones de sensibilidad y especificidad son de 100% en ambos casos. Den Hollander *et. ál.*, 1994 no registraron casos de falsos negativos ni falsos positivos. Para Morrison y Rodereck, 1997 la funiculocentesis se considera una prueba de alta sensibilidad aunque baja especificidad dados sus propios resultados.

### **5.3.3 Concordancia de los resultados de funiculocentesis con las amniocentesis previas**

En los casos de funiculocentesis realizadas para comprobación de una amniocentesis previa (n=33), se compararon los resultados de ambas pruebas, obteniendo una tasa de concordancia del 48´5%. Tras revisar posteriormente cada uno de los casos no concordantes (n=17), se observó que en su mayoría la no concordancia era debida al crecimiento de células femeninas, interpretadas como maternas, en la funiculocentesis (n=12) o en la amniocentesis (n=3). El resto de los casos (n=2), la no concordancia sirvió para descartar falsos mosaicismos detectados previamente.

Si los 12 casos de funiculocentesis en los que crecieron exclusivamente células femeninas se consideran contaminaciones maternas. Éstos se pueden

sumar a los ya mencionados y se incrementaría la tasa de contaminación por células maternas en funiculocentesis a un 22'2%, dato superior a lo encontrado en la bibliografía.

## **5.4 Tasa de datos desconocidos**

### **5.4.1 Biopsia de vellosidades coriales**

El porcentaje de datos ausentes que tienen las variables edad materna (n=1) y semana gestacional (n=5) se consideran bajos aunque deberían poder evitarse. En cambio hay faltas considerablemente superiores, como la indicación, el tipo de concepción, la historia reproductiva o el desenlace de la gestación, en los que llega a faltar más de la mitad de la información. Tenerla resultaría útil a la hora de realizar el diagnóstico.

### **5.4.2 Hibridación *in situ* fluorescente**

Datos como la edad materna de la gestante o la indicación para la prueba invasiva, de las que ha faltado el 9'62% y el 32'2% respectivamente, no deberían faltar dado su interés informativo y demográfico. En cambio, el dato de la edad gestacional es de especial relevancia para la realización de la técnica y ha estado ausente en el 43'3% de los casos. En función de las semanas de gestación se aplica a la muestra diferente tiempo de digestión enzimática con pepsina, con lo que se puede ver afectado el resultado.

### **5.4.3 Amniocentesis**

El porcentaje de información ausente en el caso de las amniocentesis es menor si se compara con lo ocurrido con otro tipo de muestras. Sin embargo se considera todavía un valor alto por el que se debería dedicar un esfuerzo a mejorar el flujo de información entre los diferentes servicios y reducir así tales porcentajes, para conseguir series de datos de mayor fiabilidad.



#### **5.4.4 Funiculocentesis**

Para futuros estudios conviene evitar la considerable falta de información que se tiene de esta prueba. Porque, junto con el pequeño tamaño muestral, dificulta la interpretación de los datos y hace que éstos sean aún menos representativos de lo que serían sólo por el escaso número de muestras.

#### **5.4.5 Aportación a la mejora del flujo de información**

Se recomienda ser más estricto en el registro de datos dentro de la propia sección de Citogenética. Tanto en las modificaciones necesarias para poner a punto las nuevas metodologías diagnósticas, como en el registro de los datos pertenecientes a cualquiera de las pruebas.

Para solventar la ausencia de datos y de historias clínicas en el caso de las biopsias coriales se realizó un contacto telefónico con la gestante. Se puede seguir realizando con ésta y otras pruebas, incluso con el facultativo que la indica, a pesar de lo tedioso y lento que pueda resultar este modo de trabajo.

También se debe corregir la ausencia de datos en las peticiones remitidas desde el Servicio de Ecografía del HUC, así como del HUNSC. Por lo que, se plantea la necesidad de un trabajo conjunto entre Ginecología y Citogenética, con el fin de crear una base de datos útil para poder posteriormente analizar los resultados.

La situación ideal, que se espera conseguir en un futuro no muy lejano, es que la base de datos de la Sección de Citogenética esté unificada con la del resto del hospital. De esta manera, se podrá tener acceso directo a toda la información de los pacientes. Por lo tanto, lo deseable sería además que existiera unificación con la base de datos del HUNSC y el resto de centros del Servicio Canario de Salud (SCS). Con lo que sólo haría falta el compromiso del personal para conseguir una fuente de datos útil para futuros estudios, en los que se podrán plantear comparaciones entre centros, islas o incluso provincias. De esta manera, la base de datos estaría completa y en un único lugar. Con el

paso del tiempo se obtendría una valiosa información, nada comparable con lo que se ha podido recoger en este estudio, donde ha sido evidente la escasez de datos. Para todo ello es fundamental que la recogida de datos se haya finalmente estandarizado.

### **Petición de Ginecología**

#### **DATOS PERSONALES**

Nombre y apellidos:

Nº historia:

DNI:

Dirección:

Teléfono:

#### **REMISIÓN DE LA MUESTRA**

Hospital:

Dr/a:

Indicación:

#### **EXTRACCIÓN Y ENVÍO**

Fecha y hora:

Vía de extracción:

Nº punciones:

#### **GESTACIÓN**

Edad materna:

Semana de gestación:

Historia reproductiva: (embarazos, IVE o abortos previos y causa)

FIV:

Enfermedades previas de la gestante:

Antecedentes familiares:

### **Historia de la Sección de Citogenética**

#### **MUESTRA**

Cantidad (mg):

Aspecto:

Cultivo directo: (si/no, cómo y resultado)

FISH: (si/no, cómo y resultado)

Cultivo a largo plazo: (si/no, cómo y resultado)

Incidencias:

### **EVOLUCIÓN DE LA GESTACIÓN:**

Comprobación con otras técnicas: (amniocentesis, cordocentesis)

Desenlace y semanas:

Comprobación del diagnóstico citogenético en autopsia, parto o por sangre periférica:

Para contribuir a que dicha unificación de información sea útil, se proponen 3 plantillas, a rellenar por los distintos servicios, en los que quedaría recogido incluso algunos parámetros que hasta ahora no se recogían. La primera parte es la petición de la muestra, que se debe rellenar por el médico que la realiza, generalmente en la Unidad de Ecografía. En segundo lugar, los datos que deben ser completados por la Sección de Citogenética. Y la tercera parte es la información, del desenlace de la gestación. Esta última resulta útil para comprobar las sospechas y resultados, y puede ser rellena en paritorio o en el Servicio de Anatomía Patológica según el caso.

Hasta que llegue el momento de dicha unificación de base de datos, se puede hacer un registro en un ordenador externo o incluso en formato papel, mientras que esas 3 partes estuvieran localizadas en un mismo lugar, bien la Sección de Citogenética o en las historias del archivo central de cada hospital.

## **5.5 Comparación de los casos patológicos frente a los normales**

### **5.5.1 Edad materna y cromosomopatías**

#### **5.5.1.1 Patología en mayores y menores de 38 años**

Un 62% de los diagnósticos patológicos se han detectado las anomalías cromosómicas en gestantes menores de 38 años (gráfica 25). Si esto ocurriera solamente en los últimos años se podría pensar que se debe a los nuevos programas de cribado prenatal de aneuploidías, pero no es así, se ha observado a lo largo de todo el estudio.

Incluso es un efecto observado también por otros autores. Wesllesley *et. ál.*, 2004 publican un 64% de las trisomías 21 diagnosticadas prenatalmente, corresponden a gestantes menores de 35 años. La serie presentada por Acar *et. ál.*, 2007 tiene un 66'67% de las patologías

pertencientes a gestantes menores de 35 años y el 33'33% restante sobrepasa esa edad. En el estudio presentado por Offerdal *et. ál.*, 2008, 63 de los 88 casos de trisomías 21 estudiados pertenecían a gestantes con menos de 38 años, es decir un 72%. El total de casos estudiados fue de 49314. En cambio, Hönmansdörfer *et. ál.*, 2010 registran un 57'5% de las trisomías 21 en gestantes mayores de 35 años y el 42'5% en menores de 35 años.

La mayoría de los estudios sobre edad materna están dirigidos a la trisomía 21 y de ella se extrapolan muchas veces al resto de las cromosopatías. Si nos fijamos exclusivamente en dicha aneuploidía en la gráfica 25, las biopsias coriales y las amniocentesis presentan mayor frecuencia de gestantes menores de 38 años, y el FISH y la funiculocentesis pertenecen mayoritariamente a gestantes mayores de 38 años.

El hecho de encontrar dicho porcentaje de resultados citogenéticos patológicos en menores de 38 años, apoya la tendencia de restar importancia a la edad materna avanzada como causa de cromosopatía y justifica la realización de este tipo de pruebas en el grupo de gestantes hasta la fecha considerados de menor riesgo.

#### **5.5.1.2 Relación de la edad materna con las cromosopatías: chi-cuadrado**

Interesa conocer si para esta serie de datos se observa o no relación entre las variables edad materna y patología. Los valores obtenidos para la prueba de  $\chi^2$  revelan una asociación esperada para las amniocentesis, estudiadas por FISH y por cariotipo, y para las funiculocentesis. Siendo una relación estadísticamente significativa entre la edad de la gestante y la patología detectada, con un 95% de confianza. En cambio, este hecho no se refleja en los datos obtenidos en Biopsias Coriales. Esto puede ser debido a lo que ya se ha comentado sobre que con el cribado del primer trimestre la edad materna avanzada tenga menos valor. De hecho la media de edad materna

para la Biopsia Corial era de 34 años (tabla 6) y presentaba una gran mayoría de sus casos patológicos con gestantes menores de 38 años (gráfica 25).

Si se aumentara el nivel de confianza al 99%, el caso de las amniocentesis dejaría de presentar relación estadísticamente significativa. Lo cual hace pensar también que, a pesar de que la edad materna avanzada predisponga para las cromosopatías, quizá no haya una relación tan directa como se pensaba hasta ahora.

Se puede considerar que se ha utilizado una muestra lo suficientemente representativa en todos los casos salvo en la funiculocentesis, en la que el contraste se realizó con  $n=31$  que corresponde al 50% de datos ausentes.

### **5.5.2 Indicaciones en los casos normales y patológicos**

Consideramos que la indicación más frecuente en el caso de resultados patológicos (gráfica 26) es la que será más indicativa de cromosopatía. Para cuantificar esta idea se calculó el valor predictivo positivo de cada una de estas indicaciones (tabla 27). Con estos datos, los hallazgos ecográficos que indicaron realizar biopsia corial tienen un poder de predicción del 52%. De manera aproximada, 1 de cada 2 Biopsias Coriales que se realizan bajo la indicación de hallazgos ecográficos es de un feto portador de cromosopatías.

Para la técnica de FISH, la indicación de mayor poder de predicción fue la agrupada bajo el nombre de "Otros" en donde se engloba multitud de indicaciones de baja frecuencia cada una, así que no lo consideraremos. En el siguiente valor de predicción, en torno a un 10%, coinciden los hallazgos ecográficos, los antecedentes y la combinación de varias indicaciones. Es decir, que 1 de cada 10 amniocentesis que se les indique FISH por alguno de estos motivos, resultará patológica.

El poder de predicción para las indicaciones de las amniocentesis presenta unos valores más bajos. El mayor valor es el 7% que corresponde a la predicción de los hallazgos ecográficos.

Todas las funiculocentesis que se realizaron indicadas por screening resultaron ser patológicas, de manera que en teoría se podría considerar que el screening tiene un valor predictivo del 100%. Pero es necesario considerar que el tamaño muestral fue insuficiente como para llegar a tales conclusiones.

Los valores predictivos positivos (VPP) publicados por otros autores (tabla 46) son aproximados a los de nuestra serie de amniocentesis, salvo los que publican para edad materna avanzada Meagher y colaboradores en 1994 y el de los hallazgos ecográficos que publicó el grupo de Castro Volio en 2001. Estos bajos valores de predicción son concordantes con las bajas tasas de incidencia de las cromosomopatías. Aunque también son indicativos de que los métodos de cribado podrían ser mejorables.

**Tabla 46 Valores predictivos positivos (VPP) de otros autores**

Autores	Prueba	Indicación	VPP
Meagher <i>et. ál.</i> , 1994	LA+BVC+SC	Edad materna avanzada	12%
		Hallazgos ecográficos	1'5%
Castro Volio <i>et. ál.</i> , 2001	LA	Edad materna avanzada	2'5%
		Hallazgos ecográficos	17%
Tseng <i>et. ál.</i> , 2006	LA	Edad materna avanzada	2'31%
		Screening	2'6%,
		Hallazgos ecográficos	8'86%
		Otras	2'74%
Han <i>et. ál.</i> , 2008	LA	Edad materna	3'4%
		Screening	2'8%
		Hallazgos ecográficos	6%
Mademont-Soler <i>et. ál.</i> , 2011	LA+BVC	Edad materna avanzada	2'4%
		Screening	2'2%
		NT aumentada	9.2%

Otros	hallazgos	6´6%
ecográficos		3´7%
Antecedentes		

BVC: Biopsia de Vellosidades coriales, LA: muestra de líquido amniótico, SC: muestra de sangre de cordón

El análisis de correlación entre las indicaciones y los resultados patológicos según la prueba realizada está en concordancia con lo observado en la gráfica 27. Se establece una asociación fuerte entre la patología detectada mediante FISH en líquido amniótico y la indicación de hallazgos ecográficos. También se observa esta asociación con los antecedentes. Sin embargo, estimamos que ésta se debe a que es la prueba que más casos patológicos se realizan por antecedentes como indicación, aunque no existen muchos casos de estos.

Relaciones establecidas en menor grado entre la edad materna avanzada y la patología mediante amniocentesis, y la comprobación de resultados con la funiculocentesis, son esperables y coherentes con los resultados observados.

### 5.5.3 Comparación de tres años de patología

Las frecuencias observadas en nuestra serie de datos van en concordancia con lo publicado por otros autores (tabla 47) salvo Corral y colaboradores (2006) quienes trabajan mucho más sobre muestras de sangre de cordón. Por lo demás todos coincidimos en que la amniocentesis es la prueba mayoritaria. Debido al gran volumen que presenta, resulta lógico que sea también la prueba que mayor cantidad de patología detecta.

Las anomalías cromosómicas detectadas en el trabajo de Corral *et. ál.*, 2006 fueron principalmente en sangre fetal (57%) como es lógico por el volumen realizado de este tipo de muestras. En segundo lugar en líquido amniótico (31%) y por último en células trofoblásticas (12%). En nuestra serie fue la amniocentesis, por cariotipo (54%) y FISH (32%), y luego las BVC (13%).

Sin embargo, fue la Biopsia de Vellosidades Coriales la metodología que más casos patológicos diagnosticó en función del número de casos realizados, lo que demuestra el éxito de la incorporación de ella a nuestro centro.

**Tabla 47 Porcentajes de determinaciones citogenéticas en función del tipo de prueba realizada**

<b>Autores</b>	<b>Prueba</b>	<b>Frecuencia</b>
Meagher <i>et. ál.</i> , 1994	LA	52%
	BVC	40´5%
	SC	7´5%
Park <i>et. ál.</i> , 2001	LA	78´7%
	BVC	16´3%
	SC	4%
Corral <i>et. ál.</i> , 2006	LA	16%
	BVC	3%
	SC	78%
Zhang <i>et. ál.</i> , 2010	LA	84´3%
	BVC	5´5%
	SC	8´4%

BVC: Biopsia de Vellosidades coriales, LA: muestra de líquido amniótico, SC: muestra de sangre de cordón



## **6 Conclusiones**

---

1. Hemos puesto a punto en la Sección de Citogenética del Hospital Universitario de Canarias la técnica del estudio citogenético de vellosidades coriales, utilizando la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y el cariotipo de células cultivadas. En los 115 casos estudiados correspondientes a Biopsias de Vellosidades Coriales, la media de edad materna fue de 34 años, lo que confirma el actual desuso del criterio de la edad materna avanzada como único indicador de cromosomopatía, siendo las principales indicaciones para esta prueba los hallazgos ecográficos y el cribado de aneuploidías.

2. A pesar de no haber conseguido resultados en el cultivo directo de biopsias de vellosidades coriales, se diagnosticó un 17% de cromosomopatías con la técnica de hibridación *in situ* fluorescente, lo que hace que la técnica de Biopsia Corial sea de gran utilidad en el diagnóstico citogenético prenatal, obteniéndose siempre concordancia con el cariotipo en los casos en los que se realizó una amniocentesis posterior. Se obtiene además cariotipo tras cultivo a largo plazo en un 30% de los casos, observando en su mayoría concordancia con los resultados del FISH. Sin duda, es necesario ampliar la experiencia en el cultivo directo y a largo plazo.

3. Para las 967 muestras de líquido amniótico a las que se realizó la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH), coincide que las dos indicaciones más frecuentes fueron los hallazgos ecográficos y el método de cribado, quedando la edad materna en un tercer lugar. La tasa de detección de cromosomopatías en dichas muestras aumenta hasta un 87%, superior a la que se obtiene sólo mediante cariotipo (2%). La prevalencia de la trisomía 21 es del 57%, el índice de resultados informativos del 97% y la concordancia entre el cariotipo y el FISH del 99,1%.

4. Consideramos la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en diagnóstico prenatal como un método rápido, seguro y de gran fiabilidad, a pesar de que sólo se estudian las aneuploidías de los cromosomas X, Y, 13, 18 y 21 y no otras alteraciones numéricas ni estructurales. Por ello han de tenerse

---

siempre en cuenta los datos clínicos y/o el cariotipo completo antes de tomar cualquier decisión terapéutica.

5. En los cariotipos efectuados en líquido amniótico, el 99% de los casos tuvieron resultado informativo. Se detecta un 6% de las cromosopatías, de las que, como se acaba de indicar, un 2% producen patología. El resto son polimorfismos en su mayoría y un bajo porcentaje (0'5%) corresponden a alteraciones citogenéticas que no producen efecto en el fenotipo del portador pudiendo originar anomalías en la descendencia. Considerando los 9119 casos estudiados, la indicación más frecuente para realizar una amniocentesis fue la edad materna avanzada. Sin embargo se ha observado un cambio de tendencia en los últimos años en los que el método de cribado fue la indicación más frecuente.

6. Las funiculocentesis presentan un volumen de trabajo considerablemente menor que el resto de las pruebas (n=63). Una gran mayoría de las gestantes sometidas a esta prueba eran menores de 30 años. Los resultados fueron informativos en el 92% de los casos con una tasa de detección de cromosopatías del 24% aproximadamente. La principal indicación son los hallazgos ecográficos y en segundo lugar la comprobación de resultados previos.

7. Se establece una asociación estadísticamente significativa entre la edad materna y la patología detectada cuando se realiza Amniocentesis, por cariotipo y por Hibridación *in situ* Fluorescente, o Funiculocentesis. Esta relación no se pudo determinar en el caso de las Biopsias de Vellosidades Coriales.

8. Analizando la edad materna, los datos ecográficos y el cribado de aneuploidías como indicaciones para el diagnóstico citogenético prenatal, se comprueba que los hallazgos ecográficos tienen un poder predictivo del 52% en las Biopsias de Vellosidades Coriales, de manera que aproximadamente una de cada dos pruebas que se realizan por esta indicación, corresponde a un feto portador de cromosopatías.

9. Seleccionando los tres últimos años de cada una de las muestras estudiadas, es la técnica de Biopsia de Vellosidades Coriales la que mayor tasa de detección presenta, con un 17%. Este dato, apoya, junto a los señalados anteriormente, la aportación positiva que hace al diagnóstico citogenético prenatal. Así mismo, parece indicar que la aplicación del cribado prenatal del primer trimestre donde se evalúan la edad materna, los marcadores ecográficos y los marcadores bioquímicos, consigue definir mejor qué gestaciones deben someterse a una prueba invasiva de diagnóstico prenatal.

10. El flujo de información existente entre las Unidades de Diagnóstico Prenatal y la Sección de Citogenética es mejorable, en vistas a obtener mayor y mejor número de datos de cada muestra con el fin de disponer de una base de datos centralizada más fiable y de mayor calidad a la hora de realizar futuros estudios estadísticos y epidemiológicos.

## **7 Nomenclatura y designación**

---

En la descripción de un cariotipo lo primero es anotar el número total de cromosomas, seguido por una coma y los cromosomas sexuales. A continuación se describen las anomalías cromosómicas que llevan el siguiente orden: primero las anomalías en cromosomas sexuales, luego los autosomas según orden numérico, para cada cromosoma primero se escriben las anomalías numéricas, luego las estructurales y si hay varias estructurales en el mismo par de homólogos, éstas se ordenan alfabéticamente.

El tipo de reordenamiento se designa con letras, que se describen a continuación. Los paréntesis indican el cromosoma implicado en dicho reordenamiento, el cual se indica inmediatamente antes. Si están implicados dos o más cromosomas se utiliza el punto y coma [;] como ocurre en el caso de una translocación. En caso de presentar varias líneas celulares, se añade tras la descripción de cada una de ellas el tanto por ciento entre paréntesis. Al final de la descripción se añade el origen materno, paterno o *de novo* si éste se determina.

( )	engloba el cromosoma implicado en una anomalía estructural o rotura
,	separa los números de los cromosomas, los cromosomas sexuales y las anomalías cromosómicas
:	indica rotura cromosómica
;	indica rotura y unión cromosómica
.	denota sub-bandas
/	separa líneas celulares
-	pérdida de material
+	exceso de material
<i>add</i>	material adicional de origen desconocido
<i>cen</i>	centrómero
<i>chr</i>	cromosoma
<i>cht</i>	cromátida/e

---

<i>del</i>	delección o pérdida de un segmento
<i>der</i>	cromosoma derivativo
<i>dic</i>	cromosoma dicéntrico
<i>dis</i>	distal
<i>dn</i>	<i>de novo</i>
<i>dup</i>	duplicación de un segmento
<i>h</i>	heterocromatina constitutiva
<i>i</i>	isocromosoma
<i>ins</i>	inserción del segmento
<i>inv</i>	inversión del segmento
<i>mar</i>	cromosoma marcador
<i>mat</i>	origen materno
<i>mos</i>	mosaico
<i>p</i>	brazo corto del cromosoma
<i>pat</i>	origen paterno
<i>Ph</i>	cromosoma Philadelphia
<i>ps</i>	satélites en el brazo corto del cromosoma
<i>q</i>	brazo largo del cromosoma
<i>qs</i>	satélites en el brazo largo del cromosoma
<i>r</i>	cromosoma en anillo
<i>rçp</i>	recíproco
<i>rec</i>	cromosoma recombinante
<i>rob</i>	translocación robertsoniana
<i>s</i>	satélites
<i>t</i>	translocación
<i>ter</i>	parte terminal del cromosoma

- upd* disomía uniparental
- var* variante o región variable
- wcp* pintado cromosómico



## **8 Índices de imágenes, gráficas y tablas**

---

NOTA: todas las imágenes, gráficas y tablas son fuente y elaboración propia salvo que específicamente se indique lo contrario.

## IMÁGENES

Imagen 1 Arriba: metafase con bandas G (47, XY, +21), las flechas señalan los 3 cromosomas 21. Abajo: cariotipo con bandas G (46, XX).....	25
Imagen 2 Cariotipo 45, XY, der (13;14)(q10;q10).....	28
Imagen 3 Representación de un cuadrivalente de una translocación equilibrada.....	30
Imagen 4 Representación de un trivalente de una translocación robertsoniana (Gardner y Sutherland, 2003) y sus posibles segregaciones: alternante o adyacente.....	32
Imagen 5 Representación del emparejamiento, entrecruzamiento y segregación de una pareja de cromosomas, uno de los cuales porta una inversión pericéntrica (izqda.) o paracéntrica (dcha.) (Griffiths <i>et. ál.</i> , 2000).....	34
Imagen 6 Esquema de una vellosidad corial (Koulischer <i>et. ál.</i> , 1985).....	50
Imagen 7 Mosaicismo generalizado en placenta y feto (Kalousek y Vekemans, 1999) ..	53
Imagen 8 Mosaicismo confinado a placenta (izqda.) o feto (dcha.) (Kalousek y Vekemans, 1999).....	53
Imagen 9 Mosaicismo confinado a la placenta (Kalousek y Vekemans, 1999) .....	53
Imagen 10 Llegada de la muestra al laboratorio y separación para ambos tipos de estudio.....	81
Imagen 11 Pasos de parada del ciclo celular en metafase, tratamiento hipotónico y fijación.....	82
Imagen 12 Disgregación mecánica y química y extensión de la muestra.....	83
Imagen 13 Disgregación mecánica e inclusión de la muestra.....	84
Imagen 14 Deshidratación y desnaturalización .....	86
Imagen 15 Añadir sondas a la preparación, cubrir y envolver con Parafilm® .....	87

Imagen 16 Lavado y contratinción de la preparación ..... 87

Imagen portada: tomada de los Premios Aspid de Publicidad Iberoamericana de Salud y Farmacia XV Edición

### GRÁFICAS

Gráfica 1 Evolución anual del número de muestras de BVC por año (n=115)..... 93

Gráfica 2 Distribución de frecuencias para las edades a las que se ha realizado la BVC (n=114)..... 94

Gráfica 3 Frecuencias de las indicaciones de BVC (n=73)..... 94

Gráfica 4 Resultados patológicos obtenidos mediante FISH en BVC (19/115; 16´5%).. 96

Gráfica 5 Comparación del desenlace de las gestaciones entre los grupos con y sin anomalía cromosómica ..... 98

Gráfica 6 Porcentajes de resultados de cariotipo en BVC concordantes y no concordantes con el FISH (n=33) ..... 99

Gráfica 7 Evolución anual del volumen de muestras de FISH .....101

Gráfica 8 Distribución de frecuencias para la edad materna en amniocentesis con FISH (n=874).....102

Gráfica 9 Frecuencia de las indicaciones de las amniocentesis para realizar FISH (n=656) .....102

Gráfica 10 Patología detectada por FISH en las amniocentesis (84/967; 8´7%) .....104

Gráfica 11 Evolución anual de la frecuencia de amniocentesis .....109

Gráfica 12 Distribución de frecuencias para la edad materna en amniocentesis (n=8141) .....109

Gráfica 13 Frecuencia de las indicaciones para amniocentesis (n=7757) .....110

Gráfica 14 Evolución anual de las tres principales indicaciones para realizar una amniocentesis .....110

---

Gráfica 15 Frecuencia absoluta de amniocentesis realizadas por un resultado de screening positivo y diagnosticados como patológicos.....	111
Gráfica 16 Porcentajes de las patologías detectadas en las amniocentesis (2%) .....	113
Gráfica 17 Porcentajes de las alteraciones cromosómicas sin repercusión en el fenotipo del portador detectadas en las amniocentesis (0´5%) .....	113
Gráfica 18 Porcentaje de los polimorfismos cromosómicos (3´5%) .....	114
Gráfica 19 Porcentaje del origen de las cromosomopatías detectadas en amniocentesis (n=184).....	114
Gráfica 20 Porcentaje del origen de las anomalías cromosómicas sin repercusión en el fenotipo del portador detectadas en las amniocentesis (n=45) .....	115
Gráfica 21 Frecuencia anual de las muestras de SC.....	116
Gráfica 22 Distribución de frecuencias para la edad materna en las funiculocentesis (n=31).....	116
Gráfica 23 Frecuencia de las indicaciones para funiculocentesis (n=39).....	117
Gráfica 24 Proporciones de las cromosomopatías detectadas en SC (16%).....	118
Gráfica 25 Resultados patológicos según sean gestantes mayores o menores de 38 años .....	123
Gráfica 26 Frecuencia de indicaciones en el grupo de resultados cromosómicamente normales.....	126
Gráfica 27 Frecuencia de indicaciones en el grupo de resultados patológicos.....	126
Gráfica 28 Análisis de correspondencia entre las indicaciones de cromosomopatías y las pruebas realizadas.....	128
Gráfica 29 Distribución de las pruebas realizadas entre 2007-2009 .....	129
Gráfica 30 Distribución de la patología detectada entre 2007-2009 según prueba realizada .....	129
Gráfica 31 Porcentaje de patología detectada entre 2007 y 2009 .....	130

Gráfica 32 Capacidad de la técnica de FISH para detectar cromosopatías .....	151
--	-----

## TABLAS

Tabla 1 Incidencias de las aneuploidías más frecuentes (Gardner y Sutherland, 2003). 38	
Tabla 2 Imágenes de núcleos hibridados mediante FISH con las sondas del Kit prenatal de Aneuvysion (Vysis).....	46
Tabla 3 Tipos de mosaicismos confinados a la placenta según el tejido en el que se localizan (Kalousek y Vekemans, 1999).....	55
Tabla 4 Riesgos de trisomía 21 y otras cromosopatías según la edad materna (Hook, 1981, Cuckle, 1987 ) .....	64
Tabla 5 Resumen de los principales marcadores bioquímicos, su origen y lo que ocurre para que sea indicativo de patología (Bach <i>et. ál.</i> , 2004) .....	66
Tabla 6 Descripción poblacional de las muestras de BVC.....	93
Tabla 7 Resumen de los resultados de BVC.....	95
Tabla 8 Relación del resultado de la BVC con la historia reproductiva previa de las gestantes.....	98
Tabla 9 Casos concordantes entre los resultados del FISH y del cariotipo tras cultivo celular (n=29).....	99
Tabla 10 Casos no concordantes entre los resultados del FISH y el cariotipo en BVC (n=4) .....	100
Tabla 11 Descripción poblacional de las muestras a las que se les realizó FISH .....	102
Tabla 12 Resultados obtenidos por FISH en amniocentesis .....	103
Tabla 13 Síndromes de Microdelección .....	104
Tabla 14 Polimorfismos de las amniocentesis a las que se les realizó FISH previo al cariotipo (n=24).....	106
Tabla 15 Alteraciones estructurales detectadas en las amniocentesis a las que se les realizó FISH previo al cariotipo (n=12) .....	107

---

Tabla 16 Descripción de la serie de datos de las amniocentesis .....	109
Tabla 17 Resumen de los resultados de las amniocentesis.....	111
Tabla 18 Datos generales sobre la serie de muestras de SC .....	116
Tabla 19 Resultados citogenéticos de las muestras de SC.....	117
Tabla 20 Resultados no concordantes entre las amniocentesis y las funiculocentesis (n=17).....	119
Tabla 21 Información ausente en cada variable de BVC .....	120
Tabla 22 Información ausente de las variables revisadas de las amniocentesis con FISH .....	121
Tabla 23 Información ausente en las variables revisadas de las amniocentesis .....	121
Tabla 24 Información ausente para las variables revisadas de funiculocentesis.....	121
Tabla 25 Cálculo del $\chi^2$ en el análisis de la relación entre la edad patología .....	124
Tabla 26 Valor predictivo positivo (VPP) de las indicaciones para cada prueba.....	127
Tabla 27 Comparación de edades gestacionales a las que se realizan la biopsia de vellosidades coriales según varios autores.....	133
Tabla 28 Publicaciones de tasas de éxito en obtención de resultados en BVC .....	136
Tabla 29 Tasas de detección de aneuploidías por FISH en BVC.....	137
Tabla 30 Porcentajes de resultados informativos publicados para la técnica de FISH..	144
Tabla 31 Tasa de detección de aneuploidías por FISH.....	146
Tabla 32 Comparación de frecuencias de cromosopatías detectadas mediante FISH .....	147
Tabla 33 Tasa de detección del FISH para las anomalías cromosómicas .....	152
Tabla 34 Medias y/o rangos de las edades gestacionales de las amniocentesis .....	153
Tabla 35 Medias y rangos de las edades maternas en las amniocentesis .....	153

---

Tabla 36 Frecuencia de amniocentesis realizadas según la indicación sea la edad materna avanzada, el resultado del screening o los hallazgos ecográficos .....	154
Tabla 37 Resultados informativos de las amniocentesis.....	155
Tabla 38 Tasas de detección de cromosopatías en amniocentesis .....	157
Tabla 39 Comparación de las alteraciones cromosómicas en amniocentesis .....	157
Tabla 40 Relación de edades gestacionales a las que se realizan las funiculocentesis de la bibliografía revisada .....	160
Tabla 41 Relación de edades maternas a las que se realizan las funiculocentesis en la bibliografía revisada .....	161
Tabla 42 Comparación de las principales indicaciones para realizar las funiculocentesis .....	161
Tabla 43 Tasas de éxito de las funiculocentesis de la bibliografía revisada .....	162
Tabla 44 Tasa de incidencia de cromosopatías detectadas en funiculocentesis.....	163
Tabla 45 Comparación de cromosopatías detectadas en funiculocentesis.....	163
Tabla 46 Valores predictivos positivos (VPP) de otros autores .....	171
Tabla 47 Porcentajes de determinaciones citogenéticas en función del tipo de prueba realizada.....	173

## 9 Bibliografía

---



- Acar A., Balci O., Gezginc K., Onder C., Capar M., Zamani A., Acar A. *Evaluation of the results of cordocentesis*. Taiwan J. Obstet. Gynecol., 2007, 46 (4): 405-409.
- Afonso Hernández S., Álvarez de la Rosa M., Rodríguez Rodríguez R.N., Otero Gómez A., Padilla Pérez A., Esquivel Vázquez B., Correa Rancel M., García Miranda J.L., *Síndrome de Wolf-Hirschhorn (4q-). Diagnóstico prenatal de un caso asociado a oligoamnios y cardiopatía*, Progr. Diag. Trat. Prenatl, 2007, 19(2): 59-63.
- Afonso Hernández S., García Suárez P., Correa Rancel M. Troyano Luque J.M., Otero Gómez A., Clavijo Rodríguez M., Correa Ceballos B., García Miranda J.L., *Diagnóstico prenatal de una trisomía parcial del cromosoma 1 (q25-qter) por translocación paterna*, Prog. Obstet. Ginecol., 2006, 49(6):329-332.
- Afonso S. Esquivel B., Hernández-Leon N., Álvarez.Rodríguez M., Otero A., Pérez-Pérez A., Padilla A. I., Troyano J.M., García-Miranda J.L., *Diagnóstico prenatal de una trisomía parcial 5p asociada a Hipercogenicidad instestinal*, Clínica e investigación en Ginecología y Obstetricia, 2010, In Press, Corrected Proof.
- Alfirevic Z., et. ál., *Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis*, Cochrane database of systematic reviews, 2003, (3):CD003252.
- Alfirevic Z., Von Daddelsen P., *Instruments for chorionic villus sampling for prenatal diagnosis*, Cochrane database of systematic reviews, 2003, (1):CD000114.
- Allen E., Freeman S.B., Druschel C., Hobbs C.A., O'Leary L.A., Romitti P.A., Royle M.H., Torfs C.P., Sherman S., *Maternal age and risk for trisomy 21 assessed by the origin of chromosome nondisjunction: a report from the Atlanta and National Down Syndrome Projects*, Hum. Genet., 2009, 125(1):41-52.

- 
- Altman G. D., Bland J. M., *Diagnostic test1: sensitivity and apecificity*, BMJ, 1994, 308: 1552.
- American College of Medical Genetics (ACMG), *Technical and clinical assessment of fluorescence in situ hybridization: an ACMG/ASHG position statement. I. Technical considerations*. Genetics in medicine, 2000, 2(65): 356-361.
- Anshan, *Fetal sex prediction by sex chromatin of chorionic villi cells during early pregnancy*, Department of Obstetrics and Gynecology, Tietung Hospital of Anshan, Chin. Med. J., 1975, 1:117-126.
- Aoki S., Hata T., Hata K., Miyazaki K. *Antenatal sonographic features of Cri-Du-Chat Syndrome*, Ultrasound Obstet. Gynecol., 1999, 13:216-221.
- Avgidou K., Papageorghiou A., Bindra R., Spencer K., Nicolaides K.H. *Prospective first-trimester screening for trisomy 21 in 30564 pregnancies*, American Jorunal of Obstetrics and Gynaecology, 2005, 192: 1761-1767.
- Bach C., Torrent S., Cabrero D., Sabriá J., Cribado bioquímico-ecográfico de las aneuploidías en el primer trimestre. Metodología y resultados. Pro Bostet Ginecol, 2004; 47 (1): 5-19.
- Bandyopadhyay R., Heller A., Knox-DuBois, McCaskill, Berend S. A., Page S. L., Shaffer L.G. *Parental Origin and timing of de novo robertsonian translocation formation*, Am. J. Hum. Genet. 2002, 71: 1456-1462.
- Barber J.C.K., *Directly transmitted unbalanced chromosome abnormalities and euchromatic variants*, J. Med. Genet., 2005, 42: 609-629.
- Baty B.J., Blackburn B.L. and Carey F.C., *Natural history of trisomy 18 and trisomy 13: I. Growth, physical assessment, medical histories, survival and recurrence risk*, Am. J. Med. Genet., 1994, 49, 175-188.

- Benzacken B., Monier-Gavelle, Siffroi J.P., Agbo P., Chalvon A. and Wolf J.P., *Acrocentric chromosome polymorphisms: beware of cryptic translocations*, Prenat. Diagn. 2001b, 21, 96-98.
- Bevis D.C.A., Manc M.B. *The antenatal prediction of hemolytic disease of the newborn*, Lancet, 1952, 21 (4): 395-398.
- Bink K., Pauer H.U., Bartels I. *Interphase FISH test as a rapid test for trisomies in amniotic fluid-results of a prospective study*, Z. Geburtshilfe Neonatol., 2000, 204 (1): 8-13.
- Bland J.M., Altman D.G., *Statistics Notes: The use of transformation when comparing two means*, BMJ, 1996; 312 : 1153.
- Bloom SE y Goodpasture C. *Human Genetic*, 34, 199. 1976
- Bojesen A., Juul S., Gravholt C.H. *Prenatal and postnatal prevalence of Klinefelter síndrome: a national registry study*, J. Clin. Endocrinol.Metab., 2003, 88 (2): 622-626.
- Borrell A., Fortuny A., Lazaro L., Serés A., Papa S., Costa D., Soler A., *Biopsia corial transcervical versus amniocentesis: evaluación de la pérdida fetal en un estudio randomizado*, Prog. Obstet. Ginecol., 2000, 43 (4): 169-175.
- Boulot P., Lefort G., Bachelard B., Humeau C., Hedon B., Laffargue F., Viala J.L. *Cordocentesis versus amniocentesis for rapid fetal karyotyping in cases of late referral of women*. J. Perinat. Med. 1992, 20 (2): 159-161.
- Brambati B. , Simoni G., Fabro S., *Chorionic Villus Sampling: fetal diagnosis of genetic diseases in the first trimester*, Ed. Marcel Dekker, New York, 1986.
- Brambati B., L. Tului, *Chorionic villus sampling and amniocentesis*, Current Opinion Obstetrics and Gynecology, 2005, 17:197-201.

- Brisset S., Aboura A., Audibert F., Costa J.M., L'Herminé A.C., Gautier V., Frydman R., Tachdjian G. *Discordant prenatal diagnosis of trisomy 21 due to mosaic structural rearrangements of chromosome 21*, Prenat. Diagn., 2003, 23 (6): 461- 469.
- Brun J.L., Mangione R., Gangbo F., Guyon F., Taine L., Roux D. Maugey-Laulom B. Horovitz J., Saura R. *Feasibility, accuracy and safety of chorionic villus sampling: a report of 10741 cases*, Prenat Diagn, 2003; 23 (4): 295-301.
- Bryndorf T. Christensen B., Vad M., Parner J, Carelli M. P., Ward B. E., Klinger K. W., Bang J., Philip J. *Prenatal detection of chromosome aneuploidies in uncultured chorionic villus samples by FISH*, Am. J. Hum. Genet., 1996, 59: 918-926.
- Carrasco Juan J.L., Otero Gómez A., Vilar Mesa M.C., García Miranda J. L., Troyano Luque J.M., López Ramón y Cajal C., Parache Hernández J., *Small Marker chromosomes in a series of 1000 prenatal diagnoses by amniocentesis*, Ann. Génét., 1990, 33(1):40-42.
- Carrasco Juan J.L., Otero Gómez A., Vilar Mesa M.C., García Miranda J.L., Troyano Luque J.M., Morales Ruiz O., Parache Hernández J., *A rare case of de novo structural rearrangement of X chromosome diagnosed by amniocentesis*, Prenatal diagnosis, 1989, 9: 443-445.
- Carrera J.M. & Kurjak A., *Ecografía en Diagnóstico Prenatal*, Colección Materno-Fetal, Elsevier Masson, 2008, 494p.
- Carrera J.M. y colaboradores, *Diagnóstico Prenatal: genética, ecografía, bioquímica, medicina fetal*, Salvat Editores, Barcelona, 1987.
- Castro Volio I., Sander Mangel K., Vargas Prado M., Sánchez Chaves L., Escalante López G. *Cytogenetical prenatal diagnosis by amniocentesis during the II and III gestation trimesters in Costa Rica*. Rev. Biol. Trop. 2001, 49 (3-4): 1227-1236.

- CEMAT group: The Canadian Early and Mid-Trimester Amniocentesis Trial, *Randomized trial to assess safety and fetal outcome of early and midtrimester amniocentesis*, Lancet 1998; 351: 242-247.
- Chen C.P. *Prenatal diagnosis and genetic counseling for mosaic trisomy 13*, Taiwan J. Obstet Gynecol., 2010, 49 (1): 13-22.
- Chen C.P. *Prenatal sonographic features of fetuses in trisomy 13 pregnancies (I)(II)* Taiwan J. Obstet. Gynecol., 2009, 48 (3):210-217, 218-224.
- Chen C.P., Chien S. C., *Prenatal Sonographic Features of Turner Syndrome*, J Med Ultrasound 2007;15(4):251–257.
- Chen C.P., Chien S.C., *Prenatal sonographic features of trisomy 18*, J. Med. Ultrasound, 2007, 15 (2):67-76.
- Chen C.P., *et. ál.*, *Balanced reciprocal translocations detected at amniocentesis*, Taiwan J. Obstet. Gynecol., 2010, 49 (4): 455-467.
- Chen C.P., Lin C.J., Wang W. *Impact of second-trimester maternal serum screening on prenatal diagnosis of down syndrome and the use of amniocentesis in the Taiwanese Population*, Taiwanese J. Obstet. Gynecol., 2005, 44 (1): 31-35.
- Chen C.P., Liu Y.P., Lin S.P., Chen M., Tsai F.J., Chen Y.T., Chen L.F., Hwang J. K., Wang W., *Ventriculomegaly, intrauterine growth restriction, and congenital heart defects as salient prenatal sonographic findings of Miller –Kieker lissencephaly syndrome associated with monosomy 17p (17p13.2→pter) in a fetus*, Taiwan J. Obstet. Gynecol., 2010, 49(1):81-86.
- Chen M., *et. ál.*, *The effect of volume of chorionic villi on long-term cell culture*, Fetal diagnosis and therapy, 2008, 24(4):409-412.
- Chitty L. S., Kagan K. O., Molina F. S., Waters J. J., K. H. Nicolaides, *Fetal nuchal translucency scan and early prenatal diagnosis of chromosomal*

*abnormalities by rapid aneuploidy screening: observational study*, BMJ, 2006, 332 (7539): 452-455.

Corral E., Moreno R. S., Pérez N. R., Ojeda M. E. B., Campusano L. C., Sepúlveda W. L., *Diagnóstico citogenético prenatal: experiencia de 10 años en el Hospital Regional de Rancagua*, II International Scientific Meeting of International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, Santiago de Chile, 2006.

Crossley J.A., Aitken D. A., Cameron A. D., McBride E., Connor J.M. *Combined ultrasound and biochemical screening for Down's Syndrome in the first trimester: a Scottish multicentre study*, BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology, 2002, 109: 667-676.

Cuckle H.S., Wald N.J., Thompson S.G. *Estimating a woman's risk of having a pregnancy associated with Down's syndrome using her age and serum alpha-fetoprotein level*, Br. J. Obstet. Gynaecol.. 1987, 94(5):387-402.

D'Alton M. E., Malone F.D., Chelmow D., Ward B.E., Bianchi D.W. *Defining the role of fluorescence in situ hybridization on uncultured amniocytes for prenatal diagnosis of aneuploidies*, Am. J. Obstet. Gynecol., 1997, 176 (4): 769-776.

Daffos F. Capella-Pavlovsky M., Forestier F., *Fetal blood sampling during pregnancy with use of a needle guided by Ultrasound: a study of 606 consecutive cases*, Am. J. Obstet. Gynecol., 1985, 153 (6): 655-660.

De Grouchy J., Turleau C. *Clinical Atlas of Human Chromosomes*, Second Edition, John Wiley Medical, New York, 1984.

De Lange C., *Sur un type nouveau de generation (typus Amstelodamensis)[On a new type of degeneration (type Amsterdam)]*, Arch. Med. Enfants., 1933, 36:713.

Den Hollander N.S., Cohen-Overbeek T.E., Heydanus R., Stewart P.A., Brandenburg H., Los F.L., Jahoda M. G.J., Wladimiroff J.W.,

*Cordocentesis for rapid karyotyping in fetuses with congenital anomalies or severe IUGR*, European Journal of Obstetrics & Gynaecology, 1994, 53, 183-187.

Dexeus, S., Carrera J.M., *et. ál.*, *El riesgo de nacer. El desafío del diagnóstico prenatal*, Editorial Labor, Barcelona, 1989.

Down J.L. H., *Observations on an ethnic classification of idiots*, 1866, Clin. Lect. Rep. London Hosp., 3, 259.

Driscoll D. A., Gross S.J., *Screening for fetal aneuploidy and neural tube defects*, ACMG Practice Guidelines, Genetics in Medicine, 2009, 11 (11): 818-821.

Driscoll D.A., Gross S.J., *First trimester diagnosis and screening for fetal aneuploidy*, ACMB Practice Guidelines, Genetics in Medicine, 2008, 10 (1): 73-75.

Edwards J. H., Harnden D. G., Cameron A. H., Crosse V.M., Wolff O. H., *A new trisomic syndrome*, Lancet, 1960, 1, 787-790.

Egozcue J., Antich J., *et. ál. Genética Médica*, Editorial Espaxs, Barcelona, 1978.

Eiben B., Trawicki W., Hammans W., Goebel R., Pruggmayer, Epplen J.T. *Rapid prenatal diagnosis of aneuploidies in uncultured amniocytes by fluorescence in situ hybridization. Evaluation >3000 cases*. Fetal Diagn. Ther., 1999, 14: 193-197.

España. Ley Orgánica 2/2010, de 3 de marzo, *de salud sexual y reproductiva y de la interrupción voluntaria del embarazo*, Boletín Oficial del Estado, 4 de marzo de 2010, núm. 55, p. 21001.

Esquivel Vázquez B., Afonso Hernández M.S., Otero Gómez A., Clavijo Rodríguez M., García C. C., Rancel Torres M.N., Pérez Pérez A., García Miranda J.L., *Diagnóstico prenatal de un caso de trisomía 8 mosaico*,

*asociado a la existencia de un quiste unilateral de plexos coroideos*, Diagn. Prenat. 2011. doi:10.1016/j.diapre.2009.06.001.

Evans M. I., S. Andriole, *Chorionic villus sampling and amniocentesis in 2008*, Current opinion in Obstetrics and Gynecology, 2008, 20: 164-168.

Evans M.I., Ebrahim S.A., Berry S.M., Holzgreve W., Isada N.B., Quintero R.A., Johnson M.P. *Fluorescent in situ hybridization utilization for high-risk prenatal diagnosis: a trade-off among speed, expense, and inherent limitations of chromosome-specific probes*. Am. J. Obstet. Gynecol. 1994, 171 (4): 1055-1057.

Evans M.I., Henry G.P., Miller W. A., Bui T.H., Snidjers R. J., Wapner R.J., Miny P., Johnson M.P., Peakman W., Johnson A., Nicolaides K., Holzgreve W., Ebrahim S.A.D., Babu R., Jackson L. *International, collaborative assessment of 146000 prenatal karyotypes: expected limitations if only chromosome-specific probes and fluorescent in situ hybridization are used*, Human Reproduction, 1999, 14 (5): 1213-1216.

Ford C.E., *A sex chromosomal anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome)*, Lancet, 1959, 1, 711-713.

Fortuny A. *Novedades en diagnóstico prenatal. Screening del primer trimestre*. 13ºCurso intensivo de formación continuada. Medicina materno-fetal. Prof. L. Cabero Roura, Prof. V. Cararach Ramoneda, pp199-207, 2006.

Fortuny A., Gómez M.L., *et. ál.*, *Propuesta de screening combinado de cromosopatías en el primer trimestre de la gestación para todo el territorio nacional*, SEGO, Madrid, 2005.

Fuchs F., Riis P. *Antenatal sex determination*, Nature, 1956, 177, 330.

García Erce J. A., *Estudio epidemiológico del diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas en la comunidad autónoma canaria*, Tesis Doctoral, Facultad de Medicina, Departamento de Anatomía, Anatomía Patológica e Histología, Universidad de La Laguna, 1997.



- 
- García Erce J. A., *Estudio epidemiológico del diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas en la comunidad autónoma canaria*, Tesis Doctoral, Facultad de Medicina, Departamento de Anatomía, Anatomía Patológica e Histología, Universidad de La Laguna, 1997.
- Gardner R. J. M., Sutherland G. R., *Chromosome Abnormalities and Genetic Counselling*, Oxford University Press, Oxford, 2003.
- Gersen S. L., Keagle M. G., *The Principles of Clinical Cytogenetics*, Second Edition, Humana Press, New Jersey, 2005.
- Ghosh S., Feingold E., Dey S.K., *Etiology of Down Syndrome: evidence for consistent association among altered meiotic recombination, nondisjunction and maternal age across populations*, Am. J. Med. Genet. A., 2009, 149<sup>a</sup>(7): 1415-1420.
- Golbus M. S., Bachman R., Wiltse S., Hall B.D. *Tetraploidy in a liveborn infant*. J. Med. Genet. 1976, 13(4):329-32.
- Gosden C.M., *Amniotic fluid cell types and culture*, Br. Med. Bull., 1983, 39 (4):348-354.
- Gravholt C. H., Juul S., Naeraa R.W., Hansen J. *Prenatal and postnatal prevalence of Turner´s síndrome: a registry study*, BMJ, 1996, 312: 16-21.
- Gravholt CH, Friedrich U. *Molecular cytogenetic study of supernumerary marker chromosomes in an unselected group of children*. Am J Med Genet. 1995, 13;56(1):106-11.
- Griffiths A. V. F., Gelbart W. M., Miller J. H., Lewontin R. C. *Genética moderna*, Mc Graw-Hill Interamericana, Madrid, 2000.
- Guía clínica ecográfica: 11+0/13+6 semanas, Unidad de Medicina Fetal, Hospital Universitario Materno Infantil de Canarias, 2008.

- Gunduz C., Cogulu O., Cankaya T., Bora E., Karaca E., Alpman A., Sagol S., Onay H., Ozkinay F., Ozkinay C. *Trends in cytogenetic prenatal diagnosis in a reference hospital in Izmir/Turkey: a comparative study for four years.* Genet. Couns., 2004, 15 (1): 53-59.
- 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 Diang. 1997;17(9): 801-20. (2)
- Hahnemann JM, Vejerslev LO. *European collaborative research on mosaicism in CVS (EUCROMIC)—fetal and extrafetal cell lineages in 192 gestations with CVS mosaicism involving single autosomal trisomy.* AM J Med Genet. 1997 May 16;70(2): 179-87. (1)
- Han S. H., An J.W., Jeong G.Y., Yoon H.R. Lee A., Yang Y.H., Lee KP., Lee K.R. *Clinical and cytogenetic findings on 31615 mid-trimester amniocenteses,* Korean J. Lab. Med., 2008, 28: 378-385.
- Harrison K. B., *X-chromosome inactivation in the human cytotrophoblast,* Cytogenet. Cell Genet., 1989, 52, 37-41.
- Hassold T., Hunt P., *Maternal age and chromosomally abnormal pregnancies: what we know and what we wish we knew,* Curr. Opin. Pediatr. 2009, 21(6): 703-708.
- Hassold T., Hunt P.A., Sherman S., *Trisomy in humans: incidence, origin and etiology,* Current Biology, 1993, 3:398-403.
- Hassold T., Merrill M., Adkins K., Freeman S., Sherman S., *Recombination and Maternal age-dependent nondisjunction: molecular studies of trisomy 16,* Am. J. Hum. Genet., 1995, 57: 867-874.
- Hickok D.E, Mills M. *Percutaneous umbilical blood sampling: results from a multicenter collaborative registry. The Western Collaborative Perinatal Group.* Am. J. Obstet. Gynecol. 1992, 166:1614-1617.

- Hook E. B. *Rates of chromosomal abnormalities at different maternal ages*, Obstet. Gynaecol., 1981, 58 (3), 282-285.
- Hörmansdörfer C., Corral A. Scharf A., Vaske B., Hillemanns P., Schmidt P. *Comparación de los métodos actuales de cribado prenatal del síndrome de Down*, Rev. Esp. Salud Pública, 2010, 84: 43-51.
- Hsu L.Y., Dubin E.C., Kerenyi T., Hirschhorn K. *Results and pitfalls in prenatal cytogenetic diagnosis*. J. Med. Genet. 1973, 10 (2): 112-119.
- Hultén M A., Patel S.D., Tankimanova M., Westgren M., Papadogiannakis N., Jonsson A.M., Iwarsson E., *On the origin of trisomy 21 Down Syndrome*, Molecular Cytogenetics, 2008, 1: 21.
- Hume R.F. Jr., Kilmer-Ernst P., Wolfe H.M., Ebrahim S.A., Treadwell M.C., Johnson M.P., Evans M.I. *Prenatal cytogenetic abnormalities: correlations of structural rearrangements and ultrasonographically detected fetal anomalies*, Am. J. Obstet. Gynecol., 1995, 173 (4): 1334-1336.
- Jacobs P. A., Browne C., Gregson N., Joyce C., White H., *Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding*, J. Med. Genet., 1992, 29, 103-108.
- Kalousek D. K., Vekemans M., *Confined placental mosaicism*, Journal of Medical Genetic, 1999, 33:529-533.
- Karaoguz M.Y., Bal F., Yakut T., Ercelen N.O., Ergun M.A., Gokcen A.B., Biri A.A., Kimya Y., Urman B., Gultomruk M., Egeli U., Menevse S. *Cytogenetic results of amniocentesis materials: incidence of abnormal karyotypes in the Turkish collaborative study*. Genet. Couns. 2006, 17 (2): 219-230.

- 
- Kazy Z., Rozovsky I. S., Bakharev V. A., *Chorion biopsy in early pregnancy: a method of early prenatal diagnosis for inherited disorders*, Prenatal Diagnosis, 1982, 2:39-45.
- Kennerknecht I., Barbi G., Djalali M., Mehnert K., Schneider M., Terinde R., Wogel W., *False-negative findings in chorionic villus sampling. An experimental approach and review of the literature*, Prenat. Diagn., 1998, 18 (12): 1276-1282.
- Kennerknecht I., Barbi G., Wolf M., Djalali M., Grab D., Terinde R., Wogel W., *Cytogenetic diagnoses after chorionic villus sampling are less reliable in very-high or very-low risk pregnancies*, Prenat. Diagn., 1993, 13 (10): 929-944.
- Klinefelter H. F. Jr., Refenstien E. C. Jr., Albright F., *Syndrome characterized by ginecomastia, spermatogenic without aleydigism and increased excretion of follicle-stimulating hormone*. J. Clin. Endocrinol. 1942, 2: 615-627.
- Koulischer L., Hustin J., Gillerot Y., *Histologic study of tritiated thymidine incorporation by trophoblastic Villi in the first trimester*, First trimester fetal Diagnosis. Ed. Fraccaro M., Simoni G and Brambati S. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1985.
- Kowalczyk M., Srebniak M., Tomaszewska A., *Chromosome abnormalities without consequences*, J. Appl. Genet., 2007, 48(2): 157-166.
- Lee M. D. K R., et al., *Clinical and Cytogenetic findings on 31615 mid-trimester amniocenteses*, Korean Journal of Laboratory Medicine, 2008, 28, 378-385.
- Lejeune J., Gautier M., Turpin R., *Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children*, 1959, D. R. Aca. Sci., 248, 1721-1722.
- Leschot N. J., Wolf H., Van Prooijen-knegt L. C., Van Asperen C. J., Verjaal M., Schuring-Blom G. H., Boer K., Kanhai H. H., Christiaens G. C.

- Cytogenetic findings in 1250 chorionic villus samples obtained in the first trimester with clinical follow-up of the first 1000 pregnancies*, Br. J. Obstet Gynaecol., 1989, 96 (6):663-670.
- Leschot N. J., Wolf H., Verjaal M., van Prooijen-knegt L. C.de Boer E. G., Kanhai H. H. H., Christianens G. C. M. L. *Chorionic villi sampling: cytogenetic and clinical findings in 560 pregnancies*, British Medical Journal, 1987, 295:407-410.
- Liao C., Pan M., Li D. *Fetal karyotyping and late sonographic abnormality detection in China*. Int. J. Gynaeco.l Obstet. 2008, 100 (2): 183-184.
- Liu H., Liao C., Huang Y., Pan M., Yi C., Yuan S., Hu S., Zhong H. *Application of fluorescence in situ hybridization to prenatal diagnosis of aneuploidy in 110 uncultured amniotic fluid samples*. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi. 2010 Aug;27(4):453-6.
- Luquet, I. *et. ál. French multi-centric study of 2000 amniotic fluid interphase FISH analyses from high-risk pregnancies and review of literature*, Annales de Génétique, 2002, 45, 77-88.
- Lyon M.F., *X-chromosome inactivation and the location and expression of X-linked genes*, Am. J. Hum Genet., 1988, 42, 8-16.
- Mademont-Soler I., Morales C., Clusellas N., Soler A., Sanchez A. *Prenatal cytogenetic diagnosis in Spain: analysis and evaluation of the results obtained from amniotic fluid samples during the last decade*, European Journal of Bostetrics &Gynecology and Reproductive Biology, Article in press (2011), doi: 10.1016/J.ejogrb.2011.03.016
- Martínez Cedres J. C., *Diagnóstico Prenatal de cromosomopatías mediante amniocentesis. Estudio comparativo en gestantes de alto y bajo riesgo por la edad*, Tesina de Licenciatura, Facultad de Medicina, Departamento de Anatomía, Anatomía Patológica e Histología, Universidad de La Laguna, 1988.

- 
- Martinville B., Blakemore K.J., Mahoney M. J., Francke U. *DNA Analysis of First-Trimester Chorionic Villous Biopsies: Test for Maternal Contamination*, AM. J. Hum. Genet, 1984, 36:1357-1368.
- Mathur R., Dubey S., Hamilton S., Singh G., Deka D., Kriplani A., Kabra M., Menon P.S. *Rapid prenatal karyotyping using foetal blood obtained by cordocentesis*. Natl. Med. J. India. 2002, 15(2): 75-77.
- McCormick M.K., Schinzel A. Petersen M.B., Stetten G., Driscoll D.J., Cantu E.S., Tranebjaerg L., Mikkelsen M., Watkins P.C., Antonarakis S.E. *Molecular genetic approach to the characterization of the "Down syndrome region" of chromosome 21*. Genomics. 1989; 5(2):325-31.
- Meagher S., Renshaw R., Smith A., Milligan J.. *Chromosomal abnormalities detected after an abnormal ultrasound in pregnancy*. Clin. Exp. Obstet. Gynecol. 1994, 21(4): 215-220.
- Medina Castellano M., *Protocolo de cribado de alteraciones cromosómicas y estructurales en el primer trimestre del embarazo*, U. Diagnóstico Prenatal, Comité Obstétrico, 2006.
- Menees T.O., Miller J.D., Holly L.E., *Amniography: preliminary report*, Am. J. Roentgen., 1930, 24: 363-366.
- Míguez Álvarez L., *Estudio citogenético en vellosidades coriales*, Tesis Doctoral, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Unidad de Biología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona, 1996.
- Miny P., Hammer P., Gerlach B., Tercanli S., Horst J., Holzgreve W., Eiben B., *Mosaicism and accuracy of prenatal cytogenetic diagnoses after chorionic villus sampling and placental biopsies*, Prenat. Diagn., 1991, 11 (8): 581-589.
- Molinero L., *Valoración de pruebas diagnósticas*, Alce Ingeniería, SEH, 2002.  
[www.seh-lelha.org/stat1.htm](http://www.seh-lelha.org/stat1.htm)

- Moreno-García M., Fernández Martínez F.J., Barreiro Miranda E., *Repercusión clínica de las anomalías cromosómicas*, An.Pediatr., 2004, 61(3):236-241.
- Morrison J.J., Rodeck C.H., *Fetal blood sampling: does it have a place?* Current Obstetrics & Gynaecology, 1997, 7, 93-97.
- Nagel H.T.C., Vanderbusche F.P.H., Keirse M.J., Oepkes D., Oosterwijk J.C., Kanhai H. *Amniocentesis before 14 completed weeks as an alternative to transabdominal CVS- A controlled trial with infant follow-up*, Prenat Diagn 1998; 18: 465-475.
- Naguib K.K., Al-Awadi S.A., Moussa M.A.A., Bastaki L., Gouda S., Redha M.A., Mustafa F., Tayel S.M., Abulhassan S.A., Murthy D.S.K. *Trisomy 18 in Kuwait*, International Journal of Epidemiology, 1999, 28: 711-716.
- Niazi M., Coleman D.V., Loeffler F. E., *Trophoblast sampling in early pregnancy. Culture of rapidly dividing cells from immature placental villi*, Br. J. Obstet. Gynaecol., 1981, 88, 1081-1085.
- Nicolaides K. H., *et. ál.*, *First-trimester ultrasound and biochemical markers of aneuploidy and the prediction of preterm or early preterm delivery*, Ultrasound Obstet Gynecol, 2008, 31(2):147-152.
- Nicolaides K. H., *First-Trimester Screening for Chromosomal Abnormalities*, Seminars in Perinatology, 2005, 29 (4): 190-194.
- Nicolaides K., H., *Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities*, American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2004, 191(1): 45-67.
- Normas y principios generales para los laboratorios de diagnóstico prenatal citogenético. Asociación Española de Diagnóstico Prenatal (AEDP), Madrid, 2004.

- 
- Novo Villaverde F. J., *Genética Médica: conceptos, mecanismos y aplicaciones de la Genética en el campo de la Biomedicina*, Pearson Educación-Prentice Hall, Madrid, 2007.
- Novo Villaverde F.J., *Genética Humana. Conceptos, mecanismos y aplicaciones de la Genética en el campo de la Biomedicina*, Pearson Educación, S. A., Madrid, 2007.
- Nuss S., Brebaum D., Grond-Ginsbach C. *Maternal cell contamination in amniotic fluid samples as a consequence of the sampling technique.* Hum. Genet. 1994, 93(2): 121-124.
- Offerdal K., Blaas H.G.K., Eik-nes S.HG. *Prenatal detection of trisomy 21 by second-trimester Ultrasound examination and maternal age in a non-selected population of 49314 births in Norway*, Ultrasound Obstet. Gynecol., 2008, 32: 493-500.
- Ogilvie C. M., *Prenatal diagnosis for chromosome abnormalities: past, present and future*, Pathologie Biologie, 2003, 51, 156-160.
- Oliver T.R., Feingold E., Yu k., Cheung V., Tinker S., Yadav-Shah M., Mase N., Sherman S.L., *New insights into human nondisjunction of chromosome 21 in oocytes*, Plos Genetics, 2008, 4: 3.
- Otero Gómez A., Troyano Luque J.M., Afonso Hernández S., Rancel Torres M.N., Correa Rancel M., Cigudosa García J.C., Mercé Alberto L.T., Bajo Arenas J., García Miranda J.L., *Diagnóstico prenatal y caracterización por SKY (cariotipo espectral multicolor) de cromosomas extra estructuralmente anormales (ESAC)*, Progr. Diag. Trat. Prenat., 2006, 18(2): 54-57.
- Ottesen A.M., Aksglaede L., Garn I., Tartaglia N., Tassone F., Gravholt C.H., Bojesen A., Sørensen K., Jørgensen N., Rajpert-De Meyts E., Gerdes T., Lind A.-M., Kjaergaard S., Juul A. *Increased number of sex chromosomes affects height in a nonlinear fashion: A study of 305*



- patients with sex chromosome aneuploidy*. 2010, Am. J. Med. Genet. Part A 152A:1206–1212.
- Pai G.S., Lewandowsky R. C., Borgaonkar D. S., *Handbook of Chromosomal Syndromes*, Wiley-Liss, United States of America, 2003.
- Papavassiliou P., York T.P., Gursoy N., Hill G., Nicely L.V., Sundaram U., McClain A., Aggen S.H., Eaves L., Riley B., Jackson-Cook C. *The phenotype of persons having mosaicism for trisomy 21/Down syndrome reflects the percentage of trisomic cells present in different tissues*. Am. J. Med. Genet. A. 2009, 15; 149(4):573-83.
- Park S.Y. *et. ál.*, *Frequencies of fetal chromosomal abnormalities at prenatal diagnosis: 10 years experiences in a single institution*, J. Korean Med. Sci, 2001, 16:290-293.
- Patau K., Smith D.W., Therman E. Inhorn S. L., Wagner H.P., *Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome*, Lancet, 1960, 1, 790-793.
- Peach E., R. Hopkin, *Advances in prenatal genetic testing: current options, benefits and limitations*, Newborn and infant nursing reviews, 2007, 7(4):205-210.
- Penrose L. S., *The relative effects of paternal and maternal age in mongolism*, J. Genet., 1933, 27, 219-224.
- Philip J, Bryndorf T, Christensen B. *Prenatal aneuploidy detection in interphase cells by fluorescence in situ hybridization (FISH)*, Prenat Diagn. 1994 Dec;14(13):1203-15.
- Pijpers L., Jahoda M.G.J., Reuss A., Wladimiroff J. W., Sachs E.S. *Transabdominal chorionic villus biopsy in second and third trimesters of pregnancy to determine fetal karyotype*, BMJ, 1988, 297(6652):822-823.

- Pita Fernández, S., Pértegas Díaz, S. *Metodología de la investigación: investigación cuantitativa y cualitativa* Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (España), Cad Aten Primaria 2003; 10: 120-124.
- Quilter C.R., Holman S., Al-Hammadi R.M.Y.A., Theodorides D., Hastings R.J., Delhanty J. D. A., *Aneuploidy screening in direct chorionic villus samples by fluorescence in situ hybridisation: the use of commercial probes in a clinical setting*, British Journal of Obstetrics and Gynaecology, 2001, 108, 215-218.
- Quiroga de Michelena M., Huertas E., Paredes D., Díaz A., *Discordancia entre cultivos de vellosidades coriónicas, de corto y largo plazo. Presentación de un caso y revisión del tema*, An Fac med, 2008; 69(1): 33-6.
- Redman C. W. G., Sargent I. L., Starkey P. M., *La placenta humana*, Ed. Masson, Barcelona, 1995.
- Ronne M., *Chromosome preparation and high resolution banding techniques. A review*. Journal of Dairy Science, 1989, 72, 1363-1377.
- Rooney D. E. MacLachlan N., J. Smith, Rebello M. T., Loeffler F. E., Beard R. W., Rodeck, Coleman D. V. *Early amniocentesis: a cytogenetic evaluation*, British Medical Journal, 1989; 299:25.
- Rooney D.E., Czepulkowski B.H., *Human Cytogenetics "A practical approach" Volume I: Constitutional Analysis, Volume II: Malignancy and Acquired Abnormalities*, Second Edition, IRL Press, Oxford, 1992.
- Ruoti C. M., González de Agüero Laborda R., Espinosa A., B. Peñaloza P., Gallo Vallejo M., F. Gonzalez E., *Ultrasound markers of chromosomal defects in the first trimester: nuchal translucency*. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 2008, 6 (1).
- Salvador Figueras, M. *Análisis de Correspondencias*, 5campus.com, Estadística, <http://www.5campus.com/leccion/correspondencias>, 2003.

- Sánchez-Caro J., Abellán F., *Medicina Genética Clínica del siglo XXI, Consideraciones científicas, éticas y legales, Colección Bioética y Derecho Sanitario*, Fundación Salud 2000, Madrid-Granada, 2009.
- Schmickel RD., *Contiguous gene syndromes: a component of recognizable syndromes*. J Pediatr. 1986;109(2):231-41.
- Schreck R.R., Falik-Borenstein Z., Hirata G., *Chromosomal mosaicism in chorionic villus sampling*, Clin Perinatol, 1990, 17(4):867-888.
- Schuring-Blom G.H., Boer D., Knecht A.C., Verjaal M., Leschot N.J. *Trisomy 13 or 18 (mosaicism) in first trimester cytotrophoblast cells: false-positive results in 11 out of 51 cases*, European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2002, 101: 161-168.
- Shaffer L. G., Slovak M. L., Campbell L. J., *ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Karger, Switzerland, 2009.
- Simoni G., Sirchia S. M., *Confined placental mosaicism*, Prenat. Diagn., 1994, 14(13): 1185-1189.
- Solari A. J. *Genética Humana: Fundamentos y aplicaciones en medicina*, 3ª Ed., Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 2004.
- Steele M.W., Breg W.R. *Chromosome analysis of human amniotic-fluid cells*, Lancet, 1966, 383-385.
- Strake H., Mrasek K., Liehr T., *Three cases with enlarged acrocentric p-arms and two cases with cryptic partial trisomies*, Histochem. Cytochem., 2005, 53: 359-360.
- Sundberg K., Bang J., Smidt-Jensen S., Brocks V., Lunsten C. *et. ál. Randomized study of fetal loss related to early amniocentesis vs chorionic villus sampling*, Lancet 1997; 350: 697-703.

- Tabor A., *et. ál.*, *Fetal loss rate after chorionic villus sampling and amniocentesis: an 11-year national registry study*, *Ultrasound in obstetrics and gynecology*, 2009, 34(1):19-24.
- Tabor A., Philip J., Madsen M., Bang J., Obel E.B., Norgaard-Pedersen B. *Randomized controlled trial of genetic amniocentesis in 4606 low risk women*. *Lancet* 1986; 1:287-1.289.
- Tao L., Qing L., Yi-xin W., Dong Y., Yi X., Zhen F., Shu-fang D., Jie-fu Y., *Use of amniocytes for prenatal diagnosis of 22q11.2 syndrome: a feasibility study*, *Chin. Med. J.*, 2010, 123(4):438-442.
- Teoh X.H., Tan T. Y.T., Chow K.K., Lee I.W., *Prenatal diagnosis of Cri-Du-Chat Syndrome: importance of ultrasonographical markers*, *Singapore Med. J.*, 2009, 50 (5):e181.
- Tepperberg J., Pettenati M.J., Rao P.N., Lese C.M., Rita D., Wyandt H., Gersen S., White B., Schoonmaker M.M. *Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): 2-year multi-center retrospective study and review of the literature*, *Prenat Diagn.* 2001 Apr;21(4):293-301.
- Tharapel S.A., Lewandowski, R.C., Tharapel A.T., Wilroy R. S. Jr. *Phenotype-karyotype correlation in patients trisomic for various segments of chromosome 13*, *J. Med. Genet.*, 1986, 23: 310-315.
- Thein A.T., Abdel-Fattah S.A., Kyle P.M., Soothill P.W. *An assessment of the use of interphase FISH with chromosome specific probes as an alternative to cytogenetics in prenatal diagnosis*. *Prenat. Diagn.* 2000, 20 (4): 275-280.
- Tjio J. H., Levan A., *The chromosome number of man*, *Hereditas*, Lund, 1956, 42:1.
- Tongsong T., *et. ál.*, *Cordocentesis at 16-24 weeks of gestation: experience of 1320 cases*, *Prenatal Diagnosis*, 2000, 20, 224-228.

- Tóth A., *et. ál.*, *Fluorescence in situ hybridization of chorionic interphase cells for prenatal screening of Down syndrome*, *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 2001, 94: 46-50.
- Toutain J., *et. ál.*, *First-trimester prenatal diagnosis performed on pregnant women with fetal ultrasound abnormalities: The reliability of interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) on mesenchymal core for the main aneuploidies*, *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 2010, 149: 143-146.
- Tseng J.J., Chou M.M., Lo F.C., Lai H.Y., M.H.C, Ho E.S.C. *Detection of chromosome aberrations in the second trimester using genetic amniocentesis: experience during 1995-2004*, *Taiwanese J. Obstet. Gynecol.*, 2006, 45 (1): 39-41.
- Turner H.H. *A syndrome of infantilism, congenital webbed neck and cubitus valgus*, *Endocrinology*, 1938, 23: 566-578.
- Ullrich O. *Über typische Kombinationsbilder multiples abartunge*, *Zschr. Kinderh.*, 1930, 49: 271-276.
- Ulmer R., Pfeiffer R.A., Kollert A., Beinder E. *Diagnosis of aneuploidy with fluorescence in situ hybridization (FISH); value in pregnancies with increased risk for chromosome aberrations*, *Z Geburtshilfe Neonatol.* 2000, 204(1):1-7.
- Valenti C., *Antenatal detection of hemoglobinopathies*, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1973, 115 (6): 851-853.
- Van Den Berg C., *et. ál.*, *(Potencial) false-negative diagnosis in chorionic villi and a review of the literature*, *Prenatal Diagnosis*, 2006, 26(5):401:408.
- Van den Berg C., Van Opstal D., Brandenburg H., Wildschut H.I., den Hollander N.S., Pijpers L., Galjaard R. J. H., Los F.J. *Accuracy of abnormal karyotypes after the analysis of both short- and long-term culture of chorionic villi*. *Prenat Diagn.* 2000; 20(12):956-69.

- Van Dyke D.L., Weiss L., Roberson J.R., Babu V. R., *The frequency and mutation rate of balanced autosomal rearrangements in man estimated from prenatal genetic studies for advanced maternal age*, Am. J. Hum. Genet., 1983, 35, 301-308.
- Van Zwieten M. C. B., *et. ál.*, *How unexpected are unexpected findings in prenatal cytogenetic diagnosis? A literature review*, European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2005, 120, 15-21.
- Vorsanova S. G., Yurov Y. B., Iourov I. Y., *Human interphase chromosomes: a review of available molecular cytogenetic technologies*, Molecular Cytogenetics, 2010, 3:1.
- Wang H., Li H., Wang H., Wang H., Xia Y., Wen J., Long Z., Dai H., Liang D., Xia J., Wu L. *Rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidies in 60 uncultured amniotic fluid samples by fluorescence in situ hybridization*, Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi. 2008 Oct;25(5):538-41
- Warburton D., *De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints*, Am. J. Hum. Genet., 1991, 49 (5):995-1013.
- Webb T., Hardy C.A., King M., Watkiss E., Mitchell C., Cole T. *A clinical, cytogenetic and molecular study of ten probands with supernumerary inv dup (15) marker chromosomes*. Clin. Genet. 1998;53(1):34-43.
- Wegner R. D., *Cytogenetic reliability of CVS: the German collaborative study in comparison to other multi-center studies*, Early prenatal diagnostics, 1995.
- Wellesley D., De Vigan D., Baena N., Cariatì E., Stoll C., Boyd P. A., Clementi M., Euroscan Group, *Contribution of ultrasonographic examination to the*

*prenatal detection of trisomy 21: experience from 19 European registers*, *Annales de Génétique*, 2004, 47: 373-380

Weremowicz S. Sandstrom D.J., Morton C.C., Niedzwiecki C.A., Sanstrom M.M., Bieber F.R. *Fluorescence in situ hybridization (FISH) for rapid detection of aneuploidy: experience in 911 prenatal cases*. *Prenat. Diagn.*, 2001, 21 (4): 262-269.

Witters I., Devriendt K., Legius E., Matthijs G., Van Schoubroeck D., Van Assche F.A., Fryns J.P.. *Rapid prenatal diagnosis of trisomy 21 in 5049 consecutive uncultured amniotic fluid samples by fluorescence in situ hybridisation (FISH)*, *Prenat Diagn.* 2002 Jan;22(1):29-33.

Xiao H.M., Tan Y.Q., Li L.Y., Lu G.X. *Prenatal diagnosis of common chromosomal aneuploidies on uncultured amniotic fluid cells by fluorescence in situ hybridization*, *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2004 ;21(6):608-10.

Yaegashi N., Senoo M., Uehara S., Suzuki H., Maeda T., Fujimori K., Hirahara F., Yajima A., *Age-specific incidences of chromosome abnormalities at the second trimester amniocentesis for Japanese mothers aged 35 and older: collaborative study of 5484 cases*, *Journal of Human Genetics*, 1998, 43 (2): 85-90.

Zhang L., Zhang X., Liang M. Ren M., *Prenatal cytogenetic diagnosis study of 2782 cases of high-risk pregnant women*, *Chinese Medical Journal*, 2010, 123, 4, 423-430.