



DIAGNOSTICO PRENATAL DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN CULTIVO DE LIQUIDO AMNIOTICO MEDIANTE TINCION DE BANDAS G

¹ Moises Polo, ² Carlos Ramos y ¹ Luis Sotillo

¹ Centro Nacional de Genética Médica de Panamá

² Universidad de Panamá, Departamento de Genética y Biología Molecular
e-mail cramos@ancon.up.ac.pa

RESUMEN

Se extrajeron muestras de líquido amniótico de 31 mujeres con embarazos considerados de alto riesgo con el propósito de realizar un diagnóstico prenatal de aberraciones cromosómicas mediante tinción de bandas G. La avanzada edad materna y los bajos niveles de alfafetoproteína en suero materno fueron considerados como factores de alto riesgo. De las 31 muestras obtenidas se logró el diagnóstico en 23, de las cuales 14 fueron niñas normales con cariotipo 46, XX, 6 niños normales con cariotipo 46, XY y tres niños con aberraciones cromosómicas. Las aberraciones cromosómicas observadas fueron trisomía del 21 con cariotipo 47, XY, + 21, una translocación no recíproca entre el cromosoma 8 y 18 con delección en el brazo corto del cromosoma 9 con cariotipo 45, XY, t(8:18) (p ter : p ter), del 9p ter y una inversión pericéntrica del cromosoma 9 con cariotipo 46, XY inv(9). El porcentaje de aberraciones cromosómicas observadas en este estudio en muestras obtenidas de madres con avanzada edad materna fue de 12.5% (2/16).

PALABRAS CLAVES

Amniocentesis, Diagnóstico prenatal, Cariotipo, Bandas G.

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico prenatal (DPN) se define como el conjunto de acciones prenatales que tienen por objeto determinar antes del nacimiento cualquier defecto congénito o anomalía de desarrollo ya sea morfológica, estructural, numérica, funcional o molecular. El DPN es un importante componente de los programas de medicina preventiva, ya que permite la detección de anomalías en la vida fetal y ofrece la

opción del aborto selectivo cuando se detectan defectos que no pueden ser corregidos. El DPN permite, además, la detección en el feto de algunos errores innatos del metabolismo, de manera que puedan ser tratados antes de que se desarrolle la condición (Golberg y Golbus, 1988). El DPN se practica principalmente a madres embarazadas consideradas de alto riesgo. Los indicadores de alto riesgo más comúnmente utilizados en nuestro país son la avanzada edad materna, bajos niveles de alfafetoproteína (AFP) en suero materno, antecedentes familiares y riesgos de defectos en el tubo neural.

La citogenética constituye una herramienta frecuentemente utilizada en el diagnóstico prenatal, ya que el 50 % de todas las pérdidas de embarazo reconocidas clínicamente son resultado de errores citogenéticos (Simpson, 1990). Los errores citogenéticos pueden ser evidenciados mediante la obtención del cariotipo a partir de las células fetales. La amniocentesis (Fig. 1a) y el muestreo de vellosidades coriónicas (Fig. 1b) constituyen dos de los procedimientos utilizados para la obtención de las células fetales. La tinción de bandas G es la técnica utilizada para la tinción de los cromosomas en este tipo de diagnóstico, ya que hace posible la detección de aberraciones cromosómicas que afectan tanto el número como la estructura de los cromosomas.

Las aberraciones cromosómicas numéricas más comunes en nuestro país son las aneuploidías, dentro de las cuales el Síndrome de Down o trisomía del 21 es una de las más frecuentes. Registros obtenidos en el Centro Nacional de Genética entre octubre de 1998 y marzo de 2001 indican que 28 de las 33 aneuploidías reportadas en este período fueron diagnosticadas como Síndrome de Down. Los registros sobre aberraciones cromosómicas estructurales son menos frecuentes, ya que algunas aberraciones de este tipo pasan desapercibidas por no generar un fenotipo asociado (Thompson y Thompson, 1996).

Con el propósito de determinar la presencia de aberraciones cromosómicas antes del nacimiento, se procedió a realizar el DPN, mediante amniocentesis, a un grupo de 31 mujeres embarazadas consideradas de alto riesgo. Se presentan los resultados del estudio y el cariotipo de los casos con aberraciones cromosómicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomó un total de 31 muestras de líquido amniótico de mujeres con embarazos considerados de alto riesgo. Las mujeres embarazadas utilizadas en el estudio presentaron tamizaje positivo para el Síndrome de Down (niveles anormales de alfafetoproteína en suero materno y de β -hormona gonadotropina coriónica y/o avanzada edad materna (AEM).

Se colectaron en tubos estériles de 3 a 10 mililitros (ml) de líquido amniótico. Las muestras fueron centrifugadas a 800 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y el botón celular resultante fue resuspendido en 1.5 ml de medio de cultivo Amniomax y transferido a una botella de cultivo. Las células fueron incubadas a 37° C en un ambiente de 5% de CO₂ durante 4-5 días. Una vez completada esta etapa se procedió a cambiar el medio por medio fresco y se continuó el crecimiento hasta que se obtuvieran de 5 a 6 colonias grandes de amniocitos o fibroblastos con buena refringencia.

Una vez culminado el período de incubación, se añadió a cada cultivo 0.5 ml de solución de Colcemid (10 μ g/ml), con el objeto de detener los cromosomas en metafase. Los cultivos fueron incubados nuevamente por un período de 30 minutos. Posteriormente se añadió a cada cultivo 10 ml de una solución de tripsina/EDTA a 37° C, con el objeto de desprender las células adheridas a la botella. Una vez desprendidas las células, fueron transferidas a un tubo y colectadas mediante centrifugación a 500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y las células fueron tratadas con solución hipotónica (0.075 M KCl) precalentada a 37° C durante 15 minutos. La suspensión celular fue concentrada mediante centrifugación y el exceso de sobrenadante descartado. Se dejaron caer sobre un portaobjeto limpio con la ayuda de una pipeta pasteur 3-4 gotas de la suspensión celular. Los portaobjetos se dejaron secar y se rotularon con el número de caso. Una vez culminada esta etapa se procedió con la tinción de bandas G utilizando el protocolo descrito por Seabright (1971).

Las preparaciones fueron observadas bajo el microscopio y las mejores metafases fueron fotografiadas y utilizadas para la confección del cariograma.

RESULTADOS

De las 31 muestras de líquido amniótico obtenidas a partir de mujeres embarazadas, solamente se logró confeccionar el cariotipo para 23 de las muestras. No se obtuvo crecimiento celular "in vitro" a partir de las muestras (casos) LA-13 y LA-16. En las muestras LA-06, LA-07, LA-16, LA-26, LA-27 y LA-28, a pesar de que se observó crecimiento celular, el número de metafases observadas fue de 0-3; muy por debajo del número aceptado para confeccionar un cariotipo (Barch, 1991).

De los 23 cariotipos confeccionados, los casos LA-01, LA-03, LA-04, LA-05, LA-08, LA-10, LA-11, LA-14, LA-15, LA-17, LA-20, LA-21, LA-24, LA-29, LA-30 y LA-31 correspondieron a muestras obtenidas de madres con avanzada edad materna como indicador de alto riesgo para anomalías cromosómicas. Los casos LA-03 y LA-31 se obtuvieron de madres que además presentaron tamizaje positivo para el Síndrome de Down (T. P. S. D.). Las madres de los casos LA-02, LA-09, LA-18, LA-19, LA-22 y LA-23 presentaron únicamente T. P. S. D. La madre del caso LA-25, a pesar de no presentar ninguno de los indicadores antes mencionados, fue referida para diagnóstico citogenético debido a que en el ultrasonido se detectó un producto con malformación.

Se observaron anomalías cromosómicas en 3 de los 23 casos analizados. De los 20 casos con cariotipo normal, catorce fueron niñas y seis varones. Todos los casos con anomalías cromosómicas fueron diagnosticados varones. De los 21 casos cuyas madres presentaron avanzada edad materna como único indicador (Tabla N° 1), ocho fueron niñas normales (46, XX), cinco varones normales (46, XY), un varón con síndrome de Down (47, XY,+21), caso LA-04 (Fig. 2) y siete casos sin diagnóstico.

Con relación a los seis casos de madres con tamizaje positivo para el síndrome de Down como único indicador, no se observaron en éstos anomalías cromosómicas. De los tres casos en donde las madres presentaron más de un indicador sólo uno (LA-31) resultó ser un niño, con una inversión pericéntrica (46, XY, inv(9)) (Fig. 3). El caso LA-25, en el cual el ultrasonido reveló un producto con malformación, resultó ser un niño que presentaba una translocación y delección (45, XY, t(8:18) (p ter : p ter), del 9p ter) (Fig. 4).

DISCUSIÓN

Se lograron diagnosticar 74.1% (23/31) de los casos utilizados en el estudio. El 25.9 % de los casos no pudieron ser diagnosticados, ya sea porque el crecimiento, celular "in vitro" no progresó o porque a pesar de que se observó crecimiento no se lograron observar metafases o se observaron pocas. Rooney & Czepulkowski, (1981) reportan que en adición a problemas técnicos que pueden surgir durante el período de cultivo, la ausencia o presencia de poca cantidad de células del líquido amniótico y la presencia de grandes cantidades de eritrocitos pueden ser la razón por la que no se obtiene crecimiento "in vitro" de amniocitos. En el caso (LA- 13), la presencia de una considerable cantidad de eritrocitos en la muestra, como pudo evidenciarse por el aspecto sanguinolento del botón celular, puede explicar la ausencia de crecimiento. Otros factores, como el estado del colcemid y la agitación inadecuada durante el tratamiento hipotónico, pudieron haber incidido sobre aquellos casos en los cuales se observó crecimiento, pero no se observaron o se observaron muy pocas metafases (Barch, 1991).

De las tres alteraciones cromosómicas observadas, las muestras de los casos LA-04 y LA-31 se obtuvieron de madres con A.E.M., lo cual pudiera ser la causa de la formación de éstas alteraciones. La incidencia de alteraciones cromosómicas asociadas a la A.E.M. fue de 12.5% (2/16). Este porcentaje es mayor que el 2% reportado por Thompson & Thompson (1996) para alteraciones cromosómicas asociadas a la A.E.M.

La avanzada edad materna no necesariamente es la causa de la alteración cromosómica, como pudo observarse en el caso LA-25, ya que la madre sólo tenía 17 años. Es probable que la alteración se relacione con otros indicadores de riesgo como los niveles de A.F.P., β -hGC e incluso alteraciones de origen paterno. A pesar de esta posibilidad, se recomendó asesoría genética constante, ya que en madres menores de 30 años, con historia de niños con malformación, el riesgo de tener otro hijo afectado es 20 veces mayor que en aquellas que no han tenido hijos con alteraciones cromosómicas (Hsu, 1998).

No se observaron alteraciones cromosómicas en los niños de madres con T.P.S.D. Es probable que estos resultados se deban al reducido número de casos (7) con T.P.S.D. analizados, ya que Christiansen et al.

(1999) reportan un valor predictivo positivo (probabilidad de predicción) entre 1:21 y 1:30 en madres con T.P.S.D. A pesar de que el T.P.S.D. ha demostrado ser útil como indicador predictivo, la inclusión del estriol conjugado como un marcador adicional (Huderer-Duric et al., 2000) y la ultrasonografía (Roberts et al., 2000) aumentan significativamente el nivel de predicción del Síndrome de Down.

CONCLUSIONES

23 cariotipos se pudieron obtener de las 31 muestras de líquido amniótico sembradas, de las cuales 16 de estos cariotipos procedieron de madres con avanzada edad materna, seguido de 6 casos con tamizaje positivo para el Síndrome de Down y 1 caso con producto con malformación. De los 23 cariotipos obtenidos, 14 fueron niñas normales (46, XX), 6 varones normales (46, XY) y 3 varones con alteraciones cromosómicas.

El caso LA-04 fue de un niño con Síndrome de Down, el cual es una alteración cromosómica numérica (47, XY, +21).

El caso LA-31 presentó un niño con inversión pericéntrica en el cromosoma 9 con cariotipo 46, XY inv(9).

El caso LA-25 fue de un niño con una translocación no recíproca entre el cromosoma 8 y 18, y una delección en el brazo corto del cromosoma 9. Estas fueron dos alteraciones cromosómicas estructurales, cuyo cariotipo es 45, XY, t(8:18) (p ter : p ter), del 9p ter.

El cultivo de líquido amniótico y la tinción de bandas G permitió determinar la mayoría de los casos, descubriéndose alteraciones cromosómicas de diversa índole; por la cual es una herramienta útil para el diagnóstico prenatal de aberraciones cromosómicas.

ABSTRACT

Amniotic fluid was collected from 31 high risk pregnancy women in order to conduct prenatal diagnosis of chromosomal aberrations by chromosome G banding technique. Maternal age and low levels of alpha fetoprotein in maternal serum was used as a high risk factors. The diagnosis was achieved in twenty three of the thirty one samples. Fourteen was normal girl with karyotype 46 XX, six was normal kids with karyotype 46, XY and three with chromosoamal aberrations. The chromosomal aberrations observed was 21 trisomy with karyotype 47, XY+21, non reciprocal

translocation between chromosome 8 and 18 with deletion in the short arm of chromosome 9 with karyotype 45, XY, t(8:18) (p ter : p ter), del 9p ter and a pericentric inversion of chromosome 9 46, XY inv(9). The percentage of chromosomal aberrations observed in samples from mother with advanced maternal age was 12.5 % (2/16).

KEYWORDS

Amniocentesis, Prenatal diagnosis, Kariotype, G bands.

REFERENCIAS

Barch, M.J. 1991. The Act cytogenetics laboratory manual. Segunda edición: Raven Press; págs. 149-156.

Christiansen, M., P.L. Petersen, M. Permin, L.A. Larsen, & B. Norgard-Pedersen. 1999. Maternal serum screening for congenital abnormalities and D syndrome in Sonderjylland County. Eight years of experience. *Ugeskr Laeger*, 161(50), 6928-6934.

Golberg, J.D. & M. S. Golbus. 1988. Chorionic Villus Sampling. *Adv. Hum. Genet.*, (17), 1-25.

Huderer-Duric, K., S. Skrablin, I. Kuvacic, Z. Sonicki, D. Rubala, & E. Suchanek. 2000. The triple-marker test in predicting fetal aneuploidy: a compromise between sensitivity and specificity. *Eur. J. Obstet. Gynecol Reprod. Biol.*, 88(1), 49-55.

Hsu, L.Y.F. 1998. Prenatal Diagnosis of Chromosomal Abnormalities through Amniocentesis. *Milunsky: Genetics Disorders a the Fetus. Cuarta Edición*; 179-248.

Jorde, L.B., J.C. Carey & R.L White. 1996. *Genética Médica. Editorial Mosby*; págs. 102-127 y 218-225.

Roberts, D., S.A Walkinshaw, M.J. McCormack, & J. Ellis. 2000. Prenatal detection of trisomy 21: combined experience of two British hospitals. *Prenat. Diagn.*, 20 (1), 17-22.

Rooney, D.E. & B. H. Czepulkowski. 1987. *Human cytogenetics: A practical approach. B. H. IRL Press Ltd.*; págs. 12-33.

Seabright, M. 1971. G- banding chromosome. *Lancet* (11), 971-975.

Simpson, J.L. 1990. Incidence and timing of pregnancy losses: Relevance to evaluating safety of early prenatal diagnosis. *Am. J. Med. Genet.*, (35), 165-173.

Thompson & Thompson. 1996. *Genética en Medicina*. Cuarta Edición: Editorial Masson, S.A.; págs. 191-208 y 395-409.

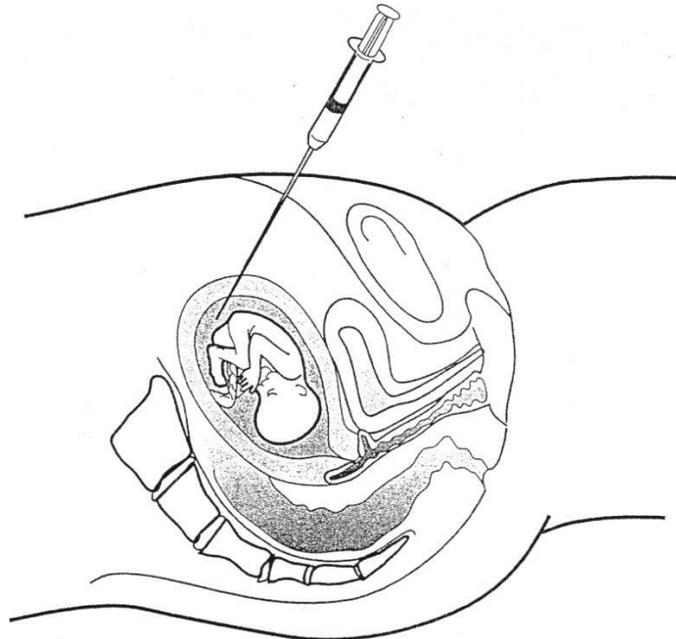
Recibido diciembre del 2001, aceptado febrero del 2002.

ANEXO

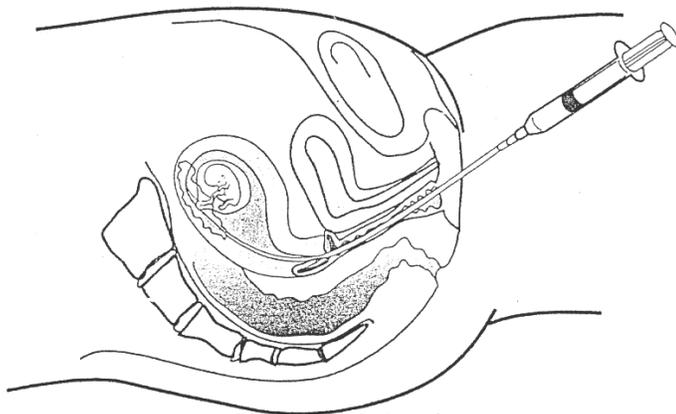
Tabla N° 1. Datos de los casos utilizados para el diagnóstico prenatal (DPN) de LA.

Caso	Indicación	Edad(años)	Gestación (semanas)	Cariotipo
LA-01	AEM	41	11.0	46, XX
LA-02	TPSD	27	20.0	46, XX
LA-03	TPSD/AEM	35	17.4	46, XX
LA-04	AEM	39	20.0	47, XY, +21
LA-05	AEM	41	18.3	46, XY
LA-06	AEM	35	17.6	S.D.
LA-07	AEM	36	17.0	S.D.
LA-08	AEM	39	17.3	46, XY
LA-09	TPSD	24	17.3	46, XY
LA-10	AEM	41	14.0	46, XY
LA-11	AEM	36	16.4	46, XX
LA-12	AEM	39	18.3	S.D.
LA-13	AEM	35	19.5	S.D.
LA-14	AEM	36	17.6	46, XY
LA-15	AEM	39	18.1	46, XX
LA-16	AEM	37	18.6	S.D.
LA-17	AEM	41	16.0	46, XX
LA-18	TPSD	22	18.2	46, XX
LA-19	TPSD	32	18.3	46, XX
LA-20	AEM	38	15.3	46, XX
LA-21	AEM	39	17.0	46, XX
LA-22	TPSD	29	17.0	46, XX
LA-23	TPSD	34	18.6	46, XX
LA-24	AEM	36	17.1	46, XX
LA-25	PMF	17	19.1	45, XY, t(8:18)(p ter ter), del 9p ter
LA-26	AEM	37	17.6	S.D.
LA-27	AEM/DG	39	18.3	S.D.
LA-28	AEM	37	15.5	S.D.
LA-29	AEM	38	16.4	46, XY
LA-30	AEM	40	16.5	46, XX
LA-31	AEM/AM	35	17.2	46, XY, inv(9)

LA: líquido amniótico; AEM: avanzada edad materna; AM: ansiedad materna; TPSD: tamizaje positivo para el Síndrome de Down; PMF: producto con malformaciones; DG: diabetes gestacional; SD: sin diagnóstico.



(a)



(b)

Fig. 1. Amniocentesis (ACT) y biopsia de vellosidades coriónicas (BVC). (a) En la ACT se extraen por vía transabdominal de 20 a 30 ml de líquido amniótico (bajo control ecocardiográfico) en la semana 15-17 de gestación. (b) En la BVC bajo control ecográfico se inserta un catéter y se aspiran varios miligramos de tejido veloso. (Tomado de Jorde et al., 1996).

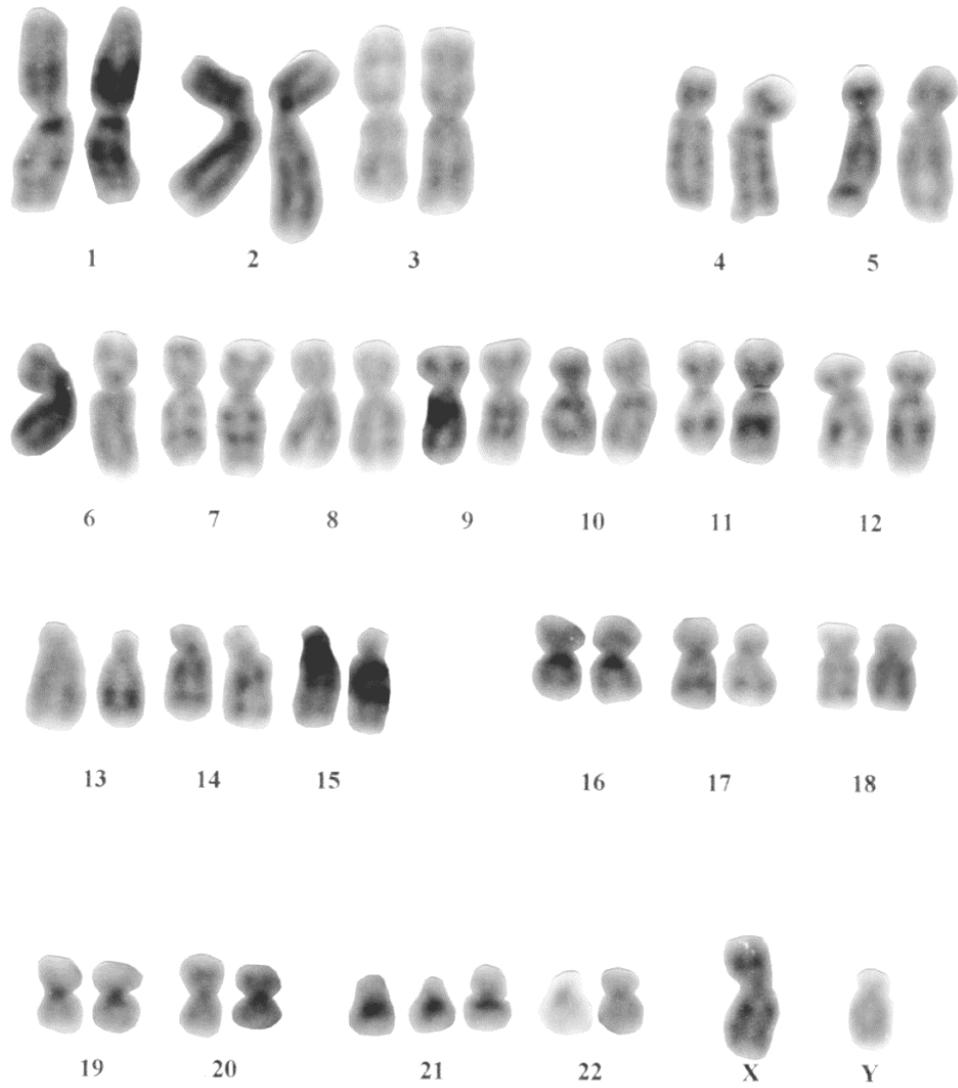


Fig. 2. Cariograma del caso LA-04 con cariotipo 47, XY, + 21

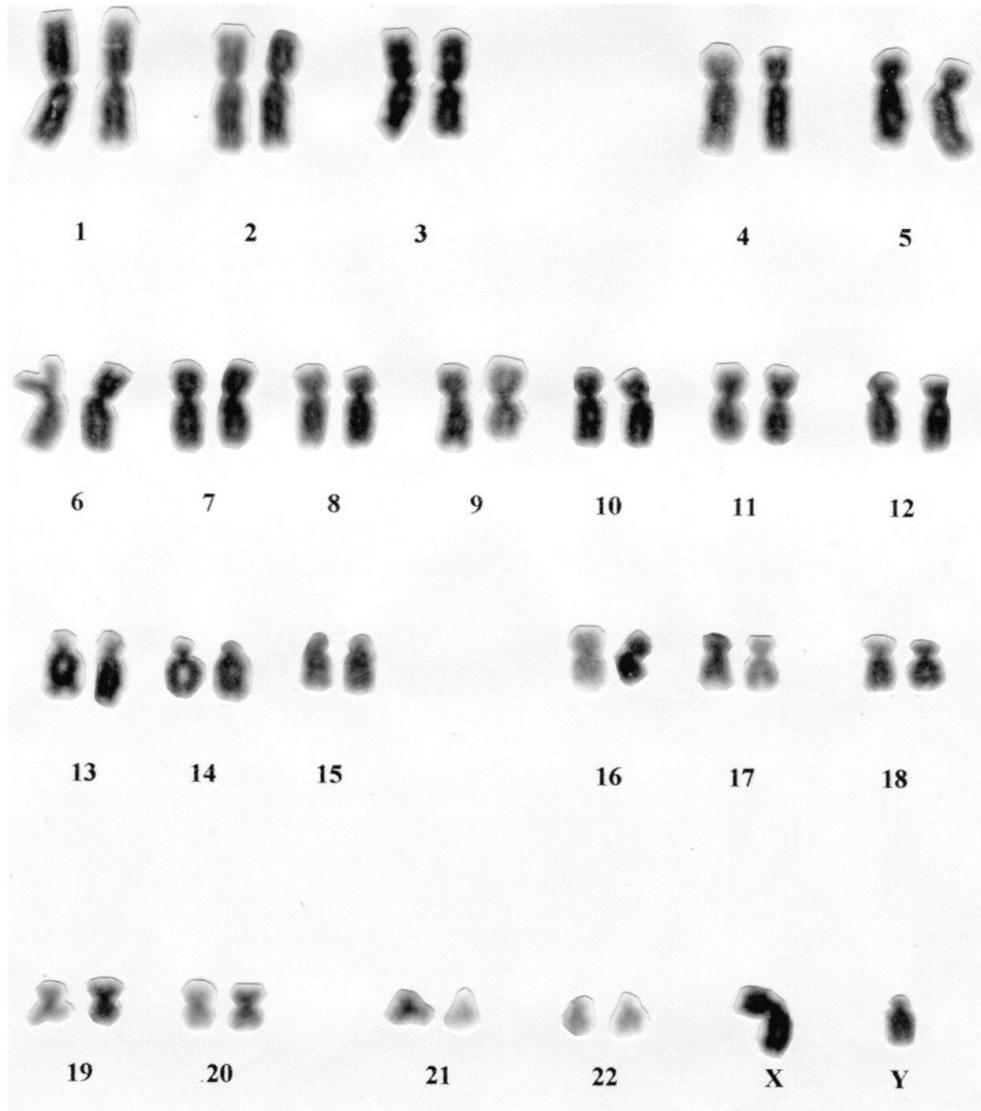


Fig. 3. Cariograma del caso LA-31 con cariotipo 46, XY inv (9)

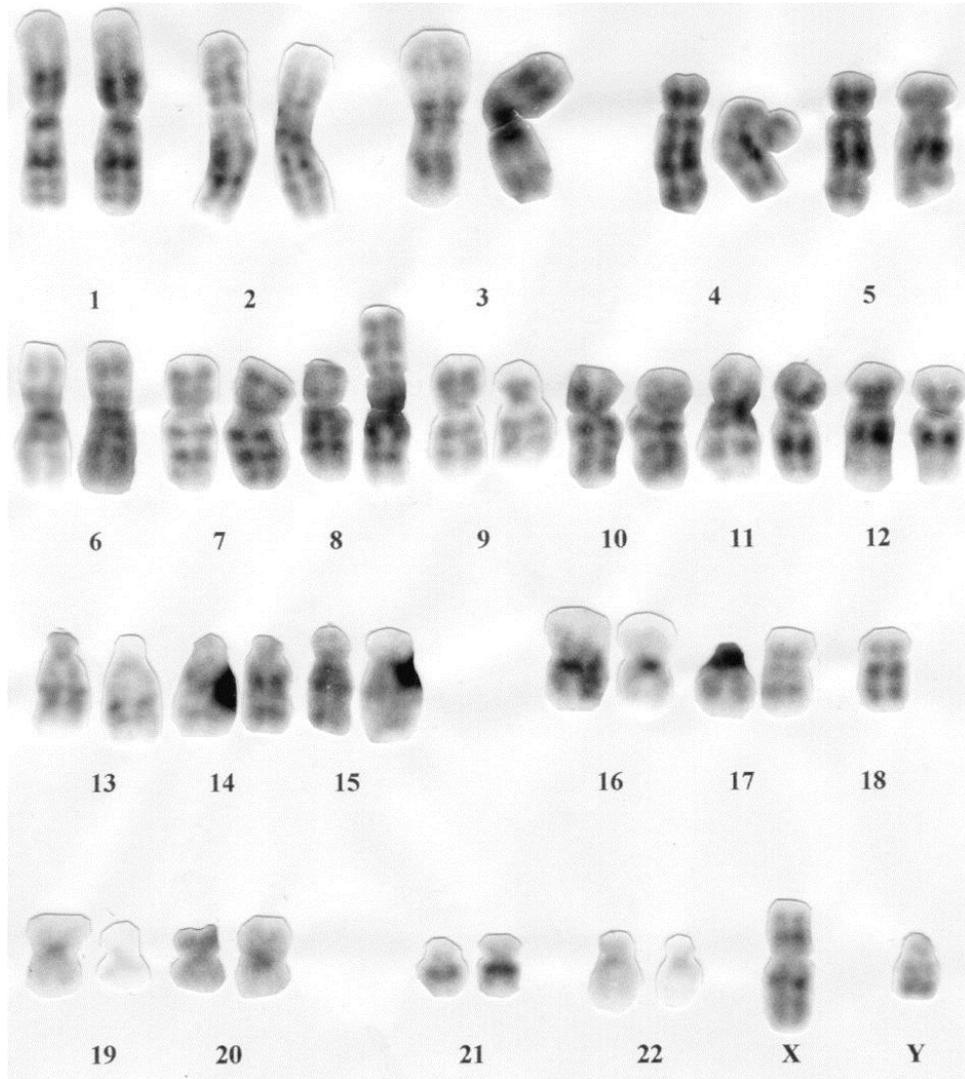


Fig. 4. Cariograma del caso LA-25 con cariotipo 45, XY, t(8:18)(p ter : p ter), del 9 p ter.