

DIAGNOSTICO PRENATAL DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN COSTA RICA

Dra. Isabel Castro* y Dra. Judith Jiménez**

INTRODUCCION

En Costa Rica, los problemas de desnutrición, diarrea, enfermedades infecto-contagiosas y otros, han dejado de ser causas importantes de morbi-mortalidad infantil (13) y han sido sustituidos por patología propia de países más desarrollados, como las malformaciones congénitas (13,2). En efecto, en nuestro país son la segunda causa de muerte en el primer año de vida (Departamento de Estadística del Ministerio de Salud). Es por lo tanto, un problema de salud importante, cuya etiología es variada y muchas veces oscura, pero se ha podido demostrar que alrededor del 6% de las malformaciones serias en niños recién nacidos vivos, se asocian con aberraciones cromosómicas groseras (11).

Después de analizar las medidas preventivas de malformaciones congénitas, adoptadas hasta la fecha, Fraser concluye que: "en un futuro cercano, nuestro principal progreso en reducir la carga de los defectos congénitos, será en asesoramiento genético, pero la disminución no será grande, a menos que vaya aparejado con la difusión del diagnóstico prenatal y prevención post-concepción" (8).

El diagnóstico prenatal de aberraciones cromosómicas es la determinación del cariotipo del feto, generalmente antes de la vigésima semana de gestación. Este procedimiento es usado cuando hay una razón para sospechar que el feto pueda tener una anormalidad detectable. El diagnóstico fetal fue introducido a finales de los años sesenta y se ha establecido como una práctica rutinaria dentro de la atención prenatal en muchos países. Se ha ganado mucha experiencia con su uso en la última década y se ha demostrado que es un procedimiento seguro y confiable (10).

El diagnóstico prenatal tiene muchas ventajas; en la mayoría de los casos, el diagnóstico fetal precoz libera de preocupaciones a los padres en relación a la salud de su futuro hijo, pues por lo general, el resultado es normal. Como

* Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) Universidad de Costa Rica

** Hospital México, CCSS, San José, Costa Rica.

dice Martin d' A Crawford: "Una consecuencia afortunada del diagnóstico prenatal precoz, es que permite que muchos embarazos lleguen a término, con el parto de un niño normal, que de otro modo hubieran sido interrumpidos en base a riesgo sustancial" (4). Por otra parte, entre las numerosas anomalías fetales que pueden ser ahora detectadas, muchas conducen a padecimientos incapacitantes y muchas causan la muerte a una edad temprana. Otras causan retardo mental tan severo que imposibilitan una vida normal. Es importante conocer el diagnóstico, para que tanto los padres como los médicos, se preparen para el nacimiento de un niño afectado. Desde el punto de vista clínico, el manejo prenatal y del parto, puede variar según el feto sea normal o anormal. En los países donde existe el derecho al aborto terapéutico, la evidencia de los beneficios económicos de la prevención para la pareja y la sociedad en general, es clara (14).

Las indicaciones para intentar el diagnóstico prenatal se establecen de acuerdo a los factores de riesgo asociado. En cuanto a las aberraciones cromosómicas, se considera que por razones morales, técnicas y económicas, el riesgo debe ser superior al 1% (1). En esta situación se encuentran las madres mayores de 35 años, las que tienen el antecedente de un hijo anterior con Síndrome de Down u otro tipo de anomalía cromosómica, las parejas en las cuales uno de sus miembros es portador de una reestructuración cromosómica y las madres portadoras de un trastorno ligado al cromosoma X (7).

El diagnóstico prenatal de aberraciones cromosómicas se vale del hecho de que en el líquido amniótico se encuentran células descamadas por el feto, las cuales se cultivan y una vez que se han reproducido en cantidad suficiente, se detienen en un período de la mitosis en el cual los cromosomas se hallan condensados y se pueden analizar. Por varias razones técnicas, la amniocentesis no se puede realizar antes de la décimosexta semana de gestación y se tarda de 3 a 4 semanas en obtener el diagnóstico final. La extracción del líquido amniótico por amniocentesis transabdominal se realiza guiada por ultrasonido. Este es un procedimiento ambulatorio, relativamente sencillo (17).

La importancia de establecer el diagnóstico prenatal como un instrumento seguro y confiable, para el beneficio de los embarazos de alto riesgo, surgió en nuestro país no sólo como consecuencia del cambio en los patrones de morbi-mortalidad sino también a causa del avance tecnológico en el campo de la perinatología, particularmente el ultrasonido, que ha permitido detectar malformaciones congénitas estructurales precozmente y que facilita mucho la amniocentesis, y la creciente demanda de este servicio tanto por los obstetras como por las pacientes mejor informadas.

Por este motivo, se estableció en el INISA y en el Hospital México un plan piloto tendiente a demostrar la factibilidad del diagnóstico fetal de anomalías cromosómicas, a partir de 1984.

MATERIALES Y METODOS

En el Hospital México se ha extraído a la fecha catorce líquidos amnióticos por vía transabdominal y bajo control ultrasonográfico. Los tres primeros fueron

líquidos tardíos, circunstanciales, y los once restantes son muestras tomadas en el segundo trimestre de gestación, con una excepción, por indicación genética, Cuadro 1. Previa amniocentesis, el obstetra informó a los padres acerca del riesgo de estar gestando un producto anormal, de la posibilidad de diagnóstico fetal precoz, de las características de la amniocentesis, sus riesgos y secuelas posibles, de las limitaciones diagnósticas, del hecho de que ocasionalmente se cometen errores y de los potenciales problemas técnicos que impiden llegar a un diagnóstico. Las pacientes accedieron voluntariamente a la punción y firmaron un consentimiento informado.

CUADRO 1

Causas que motivaron la Amniocentesis y Semana Gestacional en que fue realizada

Muestra No.	Indicación o diagnóstico clínico	Semana de gestación
1	Polihidramnios y sospecha de malformaciones por ultrasonido	32
2	Anencefalia	30
3	Anencefalia	33
4	Anencefalia recurrente	17
5	Antecedente de Síndrome de Down	16
6	Malformación letal en producto anterior. Polihidramnios en embarazo actual.	16
7	Antecedente de 3 mortinatos varones, 3 niñas sanas.	19
8	Anencefalia	17
9	Polihidramnios. Antecedente de dos mortinatos anteriores con polihidramnios.	28
10	Edad materna avanzada (36 años)	18
11	Edad materna avanzada (42 años)	19
12	Edad materna avanzada (40 años)	19
13	Edad materna avanzada (43 años)	24
14	Síndrome de Down en un hijo previo	17

La técnica de amniocentesis es la recomendada por la escuela americana (9): en estrictas condiciones de asepsia se extraen, por punción transabdominal, guiada por ultrasonido, 15 a 30 ml de líquido amniótico, con una jeringa plástica desechable de 10 a 20 ml, en forma seriada, descartando las gotas iniciales. Se transfiere el líquido en 2 ó 3 tubos plásticos de centrifuga de 15 ml, dependiendo del volumen. Los tubos se trasladan rápidamente al laboratorio,

procurando no someterlos a temperaturas extremas. **Cultivo:** el líquido se centrifuga y bajo estricta asepsia, el botón de células se resuspende en un medio de cultivo compuesto de Mc Coy's 5 A y suero fetal bovino al 30% (GIBCO). La suspensión de células se inocula en 3 a 6 tubos de Leighton con laminilla incluida, dependiendo de la cantidad. Los tubos se gasifican con una mezcla de 95% de aire y 5% de CO₂ durante cerca de 15 segundos para adecuar el pH. Se incuban a 37°C en incubadoras convencionales.

Una vez transcurridos 5 a 7 días, se examinan los tubos para valorar crecimiento, se les proporciona medio fresco, se gasean y se reincuban. Se reexaminan y se les cambia el medio cada 2 ó 3 días y cuando las células han crecido en cantidad suficiente se cosechan. **Cosecha:** tres y media horas antes de cosechar se agrega al cultivo 0,1 ml de una solución stock de colcemid de 4 ug/ml de agua estéril como concentración final. Una vez verificado en el microscopio la cantidad de células en mitosis, se tripsinizan para despegarlas del tubo con 1 ml de una solución de tripsina al 0,25% diluida 2:5 en solución salina balanceada sin calcio ni magnesio. La suspensión de células se centrifuga y el botón se resuspende en 5 ml de solución salina al 0,3% de pH neutro calentada a 37°C. Pasados 10 minutos se centrifuga de nuevo y se resuspenden las células en 0,5 ml de sobrenadante residual para proceder a fijarlas con 5 ml de una solución 1:3 de ácido acético y metanol absoluto por espacio de una hora. Por último, se vuelve a centrifugar y se hace una suspensión celular con un par de gotas de fijador fresco. Luego se colocan una o dos gotas de la suspensión celular en el centro de un porta-objetos perfectamente limpio y húmedo. Las láminas se secan al aire, se tiñen dos o tres con tinción convencional de Giemsa y el resto se reservan para bandeos G y Q de rutina y otros tipos de bandeos en caso necesario.

Se analizan un mínimo de dos cultivos de cada caso y 10 figuras mitóticas de cada uno, al menos 5 de las cuales estarán bandeadas.

Una vez determinado el cariotipo fetal se comunica el resultado al obstetra a la mayor brevedad. Si el resultado es anormal, se cita a la madre o a la pareja para comunicarles el resultado y explicarles las características fenotípicas que se asocian con la aberración cromosómica en cuestión, y las posibilidades de terapia o rehabilitación en caso de haberlas.

Se ha realizado además un seguimiento cuidadoso de los casos para evaluar desenlace obstétrico y condición del recién nacido.

RESULTADOS

De las catorce muestras de líquido amniótico recibidas, se cultivaron con éxito y se realizó el cariotipo fetal en seis casos, permanecen en cultivo cuatro muestras y fracasaron en crecer otras cuatro, una de las cuales no creció debido a que por error, la muestra fue recogida en tubos de vidrio (las células viables se adhieren al vidrio). El aspecto de las muestras del líquido amniótico fue normal en once casos, sanguinolento en dos ocasiones y turbio en una, esto último debido a la presencia de gran número de células, por tratarse de

una edad gestacional más avanzada. La cantidad de líquido fue de alrededor de 30 ml, solamente en dos oportunidades se recibieron muestras de 15 y 18 ml.

El cariotipo fetal fue normal en todos los casos excepto uno, Cuadro 2, Figura 1.

El tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y la cosecha de las células se ilustra en el Cuadro 3, lo mismo que el tiempo que demoró en obtenerse el resultado citogenético.

No se detectó ningún mosaico ni pseudomosaico en las muestras analizadas. Tampoco se puede especular con respecto a contaminación con células maternas, pues todos los cariotipos resultaron ser masculinos.

Los casos de fracaso del cultivo son 3 pues el líquido recolectado en tubos de vidrio no prosperó por este motivo y no por deficiencias en las técnicas de cultivo.

Aparte de los embarazos con malformaciones diagnosticadas in utero, en el resto de los casos la evolución del embarazo y parto fue normal o transcurre sin tropiezos con excepción de un caso. La paciente tiene riesgo de recidiva de Síndrome de Down y por esta razón accedió a la amniocentesis. No fue posible extraer líquido por lo que se repitió la punción varios días después, con éxito. A los once días de esta segunda sesión de amniocentesis fue internada por presentar amniorrea moderada que cedió con reposo absoluto. No fue necesario administrar antibióticos profilácticos y tanto la paciente como el producto evolucionan favorablemente. Este ha sido el único caso en que se debió repetir la punción por fracaso en aspirar líquido a primera intención.

En todos los embarazos llegados a término se ha comprobado el diagnóstico fetal precoz. El recién nacido con diagnóstico de trisomía 18 murió pocas horas después de nacer con las características clínicas propias de este síndrome de manera muy evidente. El diagnóstico antenatal se corroboró también en los tres anencéfalos que han nacido y el quinto nacimiento que se ha producido en el estudio es el de un varón normal completamente sano.

CUADRO 2

Resultados del Análisis Citogenético en seis casos estudiados en el INISA

Muestra No.	Cariotipo
1	47, XY +18 (Síndrome de Edwards)
2, 3, 4, 6, 8	46, XY (Normal)

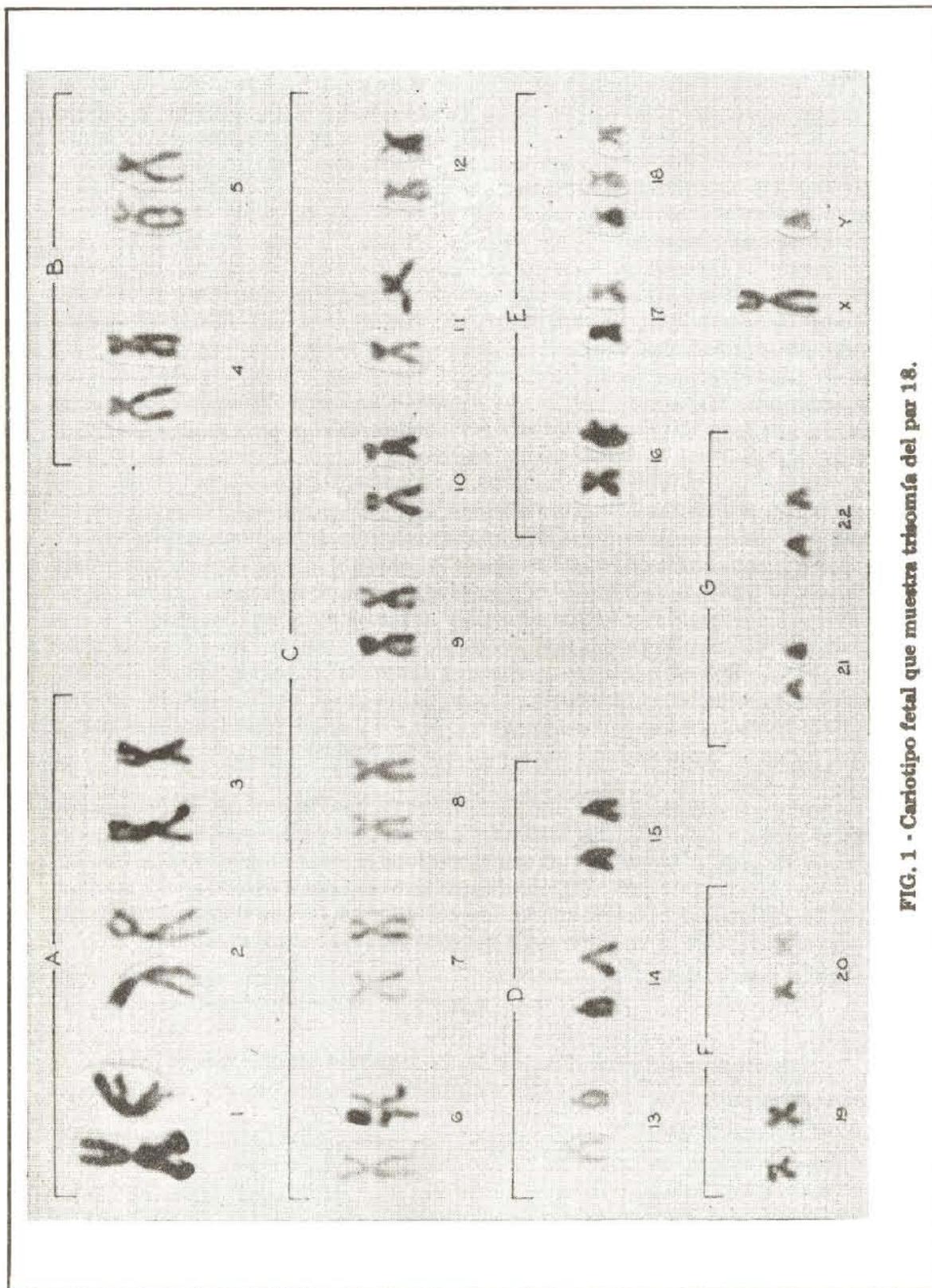


FIG. 1 - Cariotipo fetal que muestra trisomía del par 18.

CUADRO 3

Tiempo transcurrido entre el inicio del Cultivo y el Diagnóstico Final

Muestra No.	Días de cultivo	Días que tardó el análisis citogenético	Total
1	15	5	20
2	15	7	22
3	13	10	23
4	14	10	24
6	19	7	26
8	16	8	24

DISCUSION

Los resultados preliminares de este estudio piloto demuestran la factibilidad del diagnóstico fetal precoz citogenético. Los datos obtenidos a la fecha son comparables con los divulgados por varios centros de diagnóstico prenatal en diferentes países (3,5,6,12,15,16) aunque, por supuesto, a muchísimo menor escala. La única excepción son los casos de fracaso del cultivo y que se atribuyen probablemente a deficiencias en el medio de cultivo. Para superar este problema se sustituirá el medio Mc Coy's 5 A por el Dulbecco (DMEM, Flow Laboratories) que es un medio más rico en factores de crecimiento y se ejercerá un control aún más estricto de la calidad del suero fetal bovino. En la mayoría de los Centros de Diagnóstico Prenatal en muchos países, se acostumbra repetir la amniocentesis si después de transcurridos 10 a 15 días desde el inicio del cultivo no hay señales de crecimiento satisfactorio. Generalmente este segundo líquido crece favorablemente pero en este estudio preferimos no puncionar por segunda vez, pues aunque la morbilidad como consecuencia de la segunda amniocentesis aumenta poco (9), consideramos preferible no correr ningún riesgo dado el carácter experimental del estudio.

El problema de ruptura de membranas que presentó una de nuestras pacientes, se ha presentado en todos los estudios de diagnóstico prenatal en el mundo. La evidencia acumulada es de que los factores que intervienen para que se presente esta complicación son el grosor de la aguja de punción y el número de punciones por sesión de amniocentesis (10). Se recomienda por lo tanto no usar agujas más gruesas que la número 19 y no efectuar más de dos punciones en cada ocasión (10).

En el caso de nuestra paciente, se acataron estos consejos, pues se usó una aguja N° 20 y se realizaron dos punciones en cada una de las dos fechas de amniocentesis. La amniorrea se presentó hasta once días después de efectuado el procedimiento, y aunque no es posible excluir la amniocentesis como predisponente de la ruptura de membranas, tampoco se le puede responsabilizar con seguridad absoluta.

En base a los resultados obtenidos en este estudio piloto y con miras a establecer el diagnóstico fetal como un procedimiento confiable y seguro para el beneficio de los embarazos de alto riesgo de nuestro país, se pretende desarrollar un proyecto que incluya un mínimo de 100 embarazos con alto riesgo de anomalía cromosómica con el fin de:

- a. Establecer la frecuencia de aberraciones cromosómicas.
- b. Correlacionar los hallazgos fetales citogenéticos con las características clínicas y constitución genética del recién nacido.
- c. Evaluar el desenlace obstétrico y condición del recién nacido, mediante seguimiento de casos y testigos equiparados, a los cuales no se les realizó amniocentesis.
- d. Detectar precozmente los embarazos con alto riesgo de ocurrencia o recurrencia de trastorno genético y proporcionar asesoramiento genético a la pareja.

De esta manera, esperamos conocer a plenitud el grado de certeza diagnóstica y los riesgos y secuelas que podría acarrear la amniocentesis genética en manos nuestras.

AGRADECIMIENTO

Los fondos para este estudio han provenido de la Vicerrectoría de Docencia y del Centro de Desarrollo Internacional para la Investigación del Canadá (IDRC).

Los autores agradecen al Dr. Leonardo Mata, Director del INISA, y al Dr. Cecilio Aranda, Jefe de Sección de Ginecología y Obstetricia, Hospital México, el apoyo dispensado. También agradecen al Dr. Sharaga Rottem el adiestramiento de uno de los autores (J.J.) y la coordinación de actividades entre el Hospital y el INISA y a la Lic. Patricia Cuenca del INISA, por su colaboración en el análisis cromosómico.

RESUMEN

El diagnóstico prenatal de aberraciones cromosómicas se basa en la determinación del cariotipo del feto, en células del líquido amniótico cultivadas in vitro. El diagnóstico generalmente se realiza antes de la vigésima semana de gestación.

Durante el curso del año 1984 se iniciaron actividades de laboratorio tendientes al cultivo de líquido amniótico en los laboratorios del INISA, de acuerdo a un protocolo previamente aprobado. Así se han obtenido muestras de líquido amniótico recolectadas mediante amniocentesis bajo inspección por ultrasonido. El material correspondió a embarazos de alto riesgo por sospecha de trastorno cromosómico. Las muestras se obtuvieron la mayoría en el segundo trimestre de gestación y el procedimiento se acompañó de consejo genético y seguimiento de los casos para vigilar el desenlace obstétrico y condición del recién nacido.

Los resultados preliminares demostraron la factibilidad de realizar estos procedimientos en Costa Rica. Los cultivos fueron viables lográndose establecer el diagnóstico citogenético *in utero* y corroborando la certeza diagnóstica en la casi totalidad de los casos con mínimos riesgos y secuelas derivadas de la amniocentesis genética.

SUMMARY

Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities stands upon karyotype analysis of amniotic fluid cells grown *in vitro*, usually prior to the 20th week of gestation.

Laboratory activities began during the year of 1984 aiming to culture amniotic fluid cells at INISA laboratories, according to a previously approved protocol. Amniotic fluid samples have been collected through ultrasound guided amniocentesis in pregnancies with elevated risk for chromosomal abnormalities. Most of the samples were drawn during the second trimester of gestation. The procedure included genetic counseling prior to it and pregnancy outcome and neonatal follow-up.

Preliminary results demonstrate the feasibility of genetic amniocentesis in Costa Rica. Cells grew well in culture enabling accurate *in utero* cytogenetic diagnosis with a minimum of risks and sequelae related to the procedure.

BIBLIOGRAFIA

1. Aymé, S., J-F Mattei, M.G. Mattei & F. Giraud: Anomalies chromosomiques: facteurs de risque actuellement connus. *J. Génét. Hum.* 28: 155, 1980.
2. Barrantes, R: Las malformaciones congénitas en Costa Rica I. Mortalidad, registro y vigilancia. *Act. Méd. Cost.* 23: 119, 1980.
3. Crandall, B.F., T.B. Leberherz, L. Rubinstein, R.D. Robertson, W.F. Sample, D. Sarti & J. Howard: Chromosome findings in 2.500 second trimester amniocentesis. *Amer. J. Med. Genet.* 5: 345, 1980.
4. Crawford, M. d'A: Ethical and legal aspects to early prenatal diagnosis. *Brit. Med. Bull.* 39: 310, 1983.

5. Cruikshank, D.P., M.W. Varner, J.E. Cruikshank, S.S. Grant & E. Donnelly: Midtrimester amniocentesis. An analysis of 923 cases with neonatal follow-up. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 146: 204, 1983.
6. Daniel, A., L. Stewart, T. Saville, R. Brookwell, H. Paull, S. Purvis-Smith & P.R.L.C. Lam-Po-Tang.: Prenatal diagnosis in 3.000 women for chromosome, X-linked and metabolic disorders. *Amer. J. Med. Genet.* 11: 61, 1982.
7. Ferguson-Smith, M.A.: Prenatal chromosome analysis and its impact on the birth incidence of chromosome disorders. *Brit. Med. Bull.* 39: 355, 1983.
8. Fraser, F.C.: Prevention of birth defects: how are we doing? *Teratology.* 17: 193, 1978.
9. Gerbie, A.B. & S. Elias: Technique for midtrimester amniocentesis for prenatal diagnosis. *Seminars in Perinatology.* 4: 159, 1980.
10. International Workshop on Prenatal Diagnosis of Genetic Disease: Prenatal diagnosis-Past, Present and Future. (November, 1979, Quebec, Canada). *Prenatal Diagn. Sp. Iss. Wiley Med. Publ.* J.L. Hamerton & N.E. Simpson (eds.), 1980.
11. Kalter, H. & J. Warkany.: Congenital malformations. *New Engl. J. Med.* 308: 424, 1983.
12. Larget-Piet, L. & A. Larget-Piet.: Diagnostic prenatal des affections génétiques. A propos de 1061 amniocenteses précoces. *J. Génét. Hum.* 28: 223-1980.
13. Mohs, E.: Infectious diseases and health in Costa Rica: the development of a new paradigm. *Pediat. Inf. Dis.* 1: 212, 1982.
14. Savodnick, A.D. & P.A. Baird.: A cost-benefit analysis of prenatal detection of Down syndrome and neural tube defects in older mothers. *Amer. J. Med. Genet.* 10: 367, 1981.
15. Squire, J.A., L. Nauth, M.A.C. Ridler, S. Sutton & C. Timberlake.: Prenatal diagnosis and outcome of pregnancy in 2036 women investigated by amniocentesis. *Hum. Genet.* 61: 215, 1982.
16. Stengel-Rutkowski, S.: Le diagnostic antenatal: Resultats et risques, experience de l'Allemagne de l'Ouest. *J. Génét. Hum.* 28: 73, 1980.
17. Verp, M.S. & A.B. Gerbie: Amniocentesis for prenatal diagnosis. *Clin. Obstet. Gynecol.* 24: 1007, 1981.