



Recibido: 21 de diciembre de 2009
Aceptado: 24 de marzo de 2010

Estandarización del procedimiento de toma de muestra y cultivo para estudio citogenético de tejido de abortos del primer trimestre del embarazo

Javier Castro-Llamas,* Isabel Llano-Rivas,* Mónica Aguinaga-Ríos,* Juan Carlos Ibáñez-Salvador,* Juana Manuela Segundo-Juan,* Jorge Jesús Beltrán-Montoya,‡ Elsa Romelia Moreno-Verduzco,§ Alberto Jorge González-Estrada,|| Mauricio Domínguez-Castro*

* Departamento de Genética.

‡ Departamento de Tococirugía y Urgencias.

§ Departamento de Anatomía Patológica.

|| Médico residente del Curso de Especialización en Ginecología y Obstetricia.

Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes.

RESUMEN

Objetivo: Estandarizar una técnica para la selección y recolección sistemática de tejidos de aborto del primer trimestre de gestación para realizar el análisis citogenético. **Material y métodos:** Se utilizaron cultivos derivados de vellosidades coriales provenientes de productos de aborto. Se compararon resultados del cultivo entre la técnica rutinaria utilizada y la propuesta actual. Se hicieron las siguientes adaptaciones: 1) Tiempos y medios de recolección del tejido de aborto, 2) Proceso de selección del tejido a evaluar (vellosidades coriales o membranas amnióticas), 3) Pruebas de esterilidad en medio de cultivo con antibióticos, 4) Técnicas de maceración del tejido seleccionado. **Resultados:** Se encontró diferencia significativa en la tasa de éxito de crecimiento de cultivos con la técnica actual con respecto a la anterior (OR = 0.54; I.C. 95% [0.33 – 0.89]; $p < .05$). Se logró aumentar el número de muestras procesadas de 165 en 12 años a 155 en un año. Se encontró diferencia significativa entre los sexos en la técnica actual con respecto a la anterior, con una disminución de los cariotipos 46,XX (OR = 4.51; I.C. 95% [2.66-7.64]; $p < .05$). **Conclusiones:** Con este trabajo logramos la estandarización del procedimiento de recepción, selección de muestra y cultivo de tejidos de aborto del primer trimestre, mejorando el procedimiento para obtener una mayor tasa de éxito en tejidos anormales en un 30%, aunque se observó una disminución en la tasa de éxito (54.8%) con la técnica propuesta respecto a la técnica anterior (69%).

Palabras clave: Aberraciones cromosómicas numéricas, cariotipo, cultivo de tejidos, pérdida gestacional recurrente.

ABSTRACT

Objective: The aim of this work was to standardize the reception, selection, and systematic culture techniques of first-trimester-of-gestation abortion tissues in order to perform the cytogenetic analysis. **Material and methods:** Cultures obtained from villi from products of conception were used. Results obtained by using the previous routine technique and the current proposed one were compared. The following adaptations were done: 1) Timing and collection media for the tissues of abortion, 2) Selection procedure of the tissue to be evaluated (villi or amniotic membranes), 3) Sterility tests on culture medium supplemented with antibiotics, and 4) Maceration of the selected tissue. **Results:** A statistically significant difference was found in the rate of success of culture growth of tissues cultured with the current proposed technique compared to the previous routine one (OR = 0.54; CI 95% [0.33 – 0.89]; $p < .05$). We could increase the number of tissues processed from 165 samples in 12 years with the previous routine technique to 155 in one year with the current proposed one. A statistically significant difference was also found between sexes with the current proposed technique compared to the previous routine one, with a decrease of 46,XX karyotypes (OR = 4.51; CI 95% [2.66-7.64]; $p < .05$). **Conclusions:** We could standardize the collection and selection of the samples, and also the tissue culture procedures with the present work. Furthermore, we got a better success rate (30%) in our abnormal cultures; although a lower success rate (54.8%) with the current proposed technique compared to the previous routine one (69%) was observed.

Key words: Numerical chromosome aberrations, karyotype, culture tissue and recurrent pregnancy loss.

INTRODUCCIÓN

Desde los años 60 se ha observado una relación entre las anormalidades cromosómicas y los abortos espontáneos. Esta relación se reforzó en los 70 cuando Boue y colaboradores¹ publicaron uno de los primeros grandes estudios citogenéticos en tejido de abortos del primer trimestre. En este trabajo se realizó estudio a casi 1,500 muestras de tejido fetal y embrionario y se encontró una tasa de anormalidad del 60%. A mediados de los 80 surgió un cambio en las técnicas citogenéticas, ya que comenzaron a surgir en la literatura estudios que utilizaban vellosidades coriales de los productos de aborto.²⁻⁶ Estos estudios tenían una tasa mucho menor de falla en el cultivo y una tasa de anormalidad mayor. Esta mejora en la metodología, junto con los avances en la detección temprana del embarazo, apoyó la creencia de que la incidencia de anormalidades cromosómicas es mayor que la estimada anteriormente. Sin embargo, ciertas tendencias siguen sin cambiar: las aneuploidías explicando aún la mayor proporción de las anormalidades observadas en los productos de aborto del primer trimestre.

La distribución de las anormalidades parece bastante constante: en relación a las trisomías 64%, triploidías 11%, monosomía del X 10%, aneuploidías múltiples 6%, anormalidades estructurales 4%, tetraploidías 4% y monosomías autosómicas 1% (principalmente la monosomía del cromosoma 21).⁷

Los investigadores que utilizan el cultivo de tejido de abortos mencionan que la monosomía del X es responsable de aproximadamente el 15 al 20% de los abortos cromosómicamente anormales. Basados en la revisión de los estudios más recientes, la incidencia de la monosomía del X parece ser comparable con la proporción de triploidías, cada una con alrededor del 10%. Los cromosomas que con mayor frecuencia están involucrados en las aneuploidías múltiples son el 7, 14, 15, 16, 21 y 22.^{1,8-14}

En coincidencia con otros estudios, las trisomías 16, 21 y 22 continúan siendo las anormalidades más comunes en los abortos.^{3,8,9,15} Los cromosomas que se encuentran con poca frecuencia (1 y 19) son los que provocan los abortos tempranos que no se detectan o que no logran establecer un embarazo viable. La trisomía 1 sólo se ha reportado dos veces en la literatura y la trisomía 19 en una ocasión utilizando técnicas de citogenética molecular.^{16,17} Se sabe que

el cromosoma 19 es particularmente rico en genes críticos que requieren de una dosificación exacta para el desarrollo normal.⁷

La evidencia epidemiológica muestra un incremento pronunciado en la proporción de abortos esporádicos en las mujeres de 36 años o más. Este riesgo relacionado con la edad se debe a un mayor número de aneuploidías, principalmente trisomías. La elevada proporción de abortos trisómicos relacionada con el incremento de la edad materna, y el aborto de repetición como su manifestación, se debe a una recurrencia de anormalidades cromosómicas esporádicas. Las mujeres con abortos de repetición y edad de 36 años o más tienden a tener una frecuencia menor de abortos euploides.¹⁸

El origen de las trisomías autosómicas se ha investigado y varios estudios que utilizaron los polimorfismos del DNA han revelado la presencia de una no disyunción durante la meiosis materna, asociada en general con la edad materna.¹⁹ Un comportamiento meiótico similar podría ser el responsable de las monosomías y las trisomías autosómicas encontradas entre los embriones de pre-implantación de parejas con abortos de repetición. El origen de un solo cromosoma X en la monosomía para este cromosoma en general es materno (80%), lo que implica un error durante la meiosis paterna.²⁰ Lo mismo que en el 50% de los casos 47,XXY y en 100% de los casos 47,XYY.^{21,22}

Las condiciones adecuadas de obtención y procesamiento del material de aborto son muy importantes para obtener un resultado citogenético óptimo.

Se ha demostrado que las mejoras en la técnica de laboratorio llevan a la reducción en la contaminación por bacterias y por células maternas, así como falla en el crecimiento de los productos de aborto, independientemente de la edad materna. Además, estas mejoras han llevado a la obtención de una proporción cariotipo masculino: femenino más balanceado y a la detección de un número mayor de casos anormales.²⁻⁵ La edad materna continúa teniendo un papel importante y consistente para determinar la distribución de las anormalidades cromosómicas.

Por otro lado, se ha reportado que hay un aumento significativo del riesgo de tener un aborto espontáneo cromosómicamente normal después de tener un aborto con un cariotipo normal.²³ Parece ser común que los cariotipos normales están asociados con abortos recurrentes, pero existe información limitada acerca del cariotipo embrionario en series de pacientes que

tienen abortos recurrentes. En las pacientes con pérdida gestacional recurrente se ha reportado que del 1 al 5% de los casos la pérdida se debió a alguna alteración cromosómica en los abortos.

Se ha reportado que no hay ninguna diferencia en la frecuencia de cariotipos anormales entre las mujeres con un solo aborto y las abortadoras recurrentes. También se ha observado que un cariotipo normal es posible que pronostique abortos subsecuentes con cariotipo normal. Por otro lado, la proporción de cariotipos normales aumentó significativamente con el número de abortos previos.²³

El objetivo de este estudio fue estandarizar la metodología para realizar un estudio citogenético en los tejidos de aborto y comparar los resultados con la técnica utilizada previamente en nuestra institución.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo fue realizado con la autorización de los Comités de Ética y de Investigación del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes (INPer) y consentimiento informado por escrito de las participantes. La obtención de las muestras por legrado uterino instrumentado (LUI) o aspiración manual endouterina (AMEU) se realizó como máximo en la semana 14 de gestación, ya que las características histopatológicas y el origen de estas pérdidas son diferentes a las pérdidas del segundo trimestre debidas a la insuficiencia placentaria, el síndrome antifosfolípidos, el lupus eritematoso generalizado (LES), hipoxia, etc. Para el ingreso al estudio se invitaron a participar a pacientes que hubiesen presentado: aborto, huevo muerto retenido, óbito fetal entre las 2-14 semanas de gestación por fecha última de menstruación, muestras con menos de 48 horas en solución salina, muestras con tejido fetal identificable (vellosidades coriales o membranas amnióticas). Las que no se incluyeron fueron: muestras en formol, muestras congeladas, muestras sin rotular y las muestras que no pasaban la prueba de esterilidad.

Las muestras obtenidas se procesaron en el Laboratorio de Citogenética del Departamento de Genética. Las muestras se colocaron en recipientes de plástico estériles de 100 mL con tapa de rosca, los cuales contienen solución salina fisiológica estéril (0.9% NaCl). Una vez tomada la muestra, se dio

atención especial al transporte de la misma. Cada tejido se trabajó en un periodo máximo de 48 horas después de obtenido (cuando las muestras se obtenían en fin de semana); si esto no ocurría se procesaban en el momento. La muestra permaneció almacenada a 4° C constantes, evitando cualquier cambio brusco de temperatura. En el laboratorio de citogenética, la muestra fue transferida a medio fresco de MEMH con 20% de suero fetal bovino, 2.5 µg/mL de amfotericina B, penicilina-estreptomicina 100 UI/mL y 50 µg/mL de gentamicina. El tejido en estas condiciones se almacenó durante toda la noche a temperatura ambiente dentro de la campana de extracción antes de su procesamiento para observar si cumplía la prueba de esterilidad y así poder continuar el proceso, evitando contaminación dentro de la incubadora.^{24,25}

TÉCNICA ANTERIOR

Una vez obtenida la muestra del tejido de aborto, la cual no era seleccionada por el Departamento de Genética, se realizaba el proceso de la misma de la siguiente manera:

1. Colocar un fragmento del tejido directamente en una caja Petri que contenga una pequeña cantidad de medio del cultivo RPMI (RPMI medium 1640, Gibco) suplementado con suero fetal de bovino (20/100 mL de medio) y L-glutamina (0.7/100 mL medio)
2. Cortar finamente el tejido con bisturí estéril y afilado, de tal manera que se forme una suspensión de pequeños explantes.
3. Transferir la suspensión a cada frasco de cultivo (dos frascos de cultivo de 25 mL) con la ayuda de una pipeta Pasteur. Distribuir la suspensión en la superficie de crecimiento del frasco.
4. Dejar que los fragmentos se adhieran al fondo del frasco de cultivo.
5. Transferir los frascos de cultivo a la incubadora (37° C, 5% CO₂, 97% de humedad).
6. Con un microscopio invertido, revisar los cultivos para observar si existe crecimiento o posible contaminación después de tres o cuatro días. No mover los cultivos antes de que transcurra este tiempo.
7. Se cambiará el medio cuando las células inicien el crecimiento fuera de los fragmentos de tejido.

Es muy variable el tiempo en que ocurre esto: de 3 a 14 días; además, depende del origen del tejido. El medio usado se puede decantar o quitar con pipeta Pasteur. Agregar tres mililitros de medio fresco.

8. El medio se cambiará dos veces por semana durante el tiempo que se mantenga el cultivo hasta que 2/3 del fondo del frasco estén cubiertas con células. Esto puede tomar hasta tres semanas. Con cada cambio de medio, el cultivo se analiza con el microscopio invertido para observar si hay células adheridas y éstas empiezan a formar colonias para más adelante poder realizar el análisis citogenético y observar que no haya contaminación de las mismas por alguna bacteria u hongo.

TÉCNICA ACTUAL

Personal del laboratorio de citogenética recogió, todos los días hábiles (lunes a viernes), las muestras y se seleccionó el tejido embrionario (vellosidades coriales, tejido fetal y/o membranas amnióticas) bajo un microscopio estereoscópico para tener la certeza de que era tejido fetal.

Posteriormente se inició el cultivo del tejido por la técnica de explante con las siguientes adaptaciones hechas en el Laboratorio de Genética y se aplicó la siguiente metodología:

- Se recibe todo el tejido de aborto y no sólo un fragmento.
- El tejido de aborto se coloca en solución salina fisiológica.
- Se seleccionan las vellosidades coriales bajo el microscopio estereoscópico exclusivamente.
- Las vellosidades seleccionadas se colocan en un medio con antibióticos y fungicida durante 24 horas (prueba de esterilidad); si el tejido no está contaminado se realizan los siguientes pasos:

1. Se coloca un fragmento del tejido (previamente identificado) directamente en una caja Petri que contenga una pequeña cantidad de medio del cultivo RPMI (RPMI medium 1640, Gibco) suplementado con suero fetal de bovino (20 mL/100 mL de medio) y L-glutamina (0.7 mL/100 mL medio).

2. Se corta finamente el tejido con bisturí estéril y afilado de tal forma que se forme una suspensión de pequeños explantes.
3. Se transfiere la suspensión del tejido a cada frasco de cultivo (dos frascos de cultivo de 25 mL) con la ayuda de una pipeta Pasteur. Se distribuye la suspensión en la superficie de crecimiento del frasco.
4. Se transfieren los frascos de cultivo a la incubadora (37° C, 5% CO₂ y 97% de humedad).
5. Con un microscopio invertido, se revisan los cultivos para observar si existía crecimiento o posible contaminación después de tres o cuatro días.
6. En caso de observar contaminación por algunas bacterias, se trata de salvar el cultivo celular, lavándolo con solución salina y antibiótico (HANKS + 2.5 µg/mL de amfotericina B, penicilina-estreptomicina 100 UI/mL y 50 µg/mL de gentamicina) y agregando medio nuevo con antibiótico; si aun así no era posible rescatar de la contaminación el cultivo celular, lo desecharmos, para evitar una mayor contaminación de nuestros demás tejidos.
7. Se cambia el medio cuando las células inician el crecimiento fuera de los fragmentos de tejido. Es muy variable el tiempo en que ocurre esto: de 3 a 14 días; además, depende de la formación de agregados celulares (colonias) y del origen del tejido (vellosidades coriales, tejido fetal y/o membranas amnióticas). El medio usado se decanta o se quita con pipeta Pasteur. Se agregan tres mililitros de medio fresco.
8. El medio se cambia dos veces por semana durante el tiempo que se mantiene el cultivo hasta que 2/3 del fondo del frasco se cubre con células. Esto toma hasta tres semanas. Con cada cambio de medio, el cultivo se analiza con el microscopio invertido para observar las células y la posible contaminación de las mismas.
9. Finalmente, se preparan estas muestras para el análisis citogenético.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizan porcentajes para describir los datos de la muestra. Además, se asocian las variables, técnica empleada y el éxito, definido este último como mues-

tras no contaminadas y con material suficiente para realizar el análisis citogenético. Se realiza la prueba de χ^2 y la estimación de razón de momios (OR), con un intervalo de confianza del 95%. Un valor de $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo, realizando una comparación entre los grupos de los diferentes tipos de aborto obtenidos en el estudio.

RESULTADOS

Una revisión del periodo que corresponde del año 1994 al 2005 mostró que se procesaron 165 muestras (*Cuadro I*).

En el Departamento de Genética del INPer se realizó el análisis cromosómico en 165 casos procesados de 1994 al 2005.

- 69% de éxito en el cultivo.
- 80% de cariotipos normales: 88% femeninos y 12% masculinos.
- 19% de cariotipos anormales: 59% femeninos y 41% masculinos.

A diferencia del periodo de junio de 2008 a junio de 2009, en donde se recibieron 466 tejidos de aborto en el Laboratorio de Genética, de los cuales 311 (66.7%) se excluyeron por problemas en la recepción de la muestra, tales como: tejidos congelados, tejidos en formol, tejidos con más de 48 horas después de realizado el legrado o la aspiración, tejidos sin hojas de identificación, tejidos contaminados que no pasaron la prueba de esterilidad y tejidos en los que no se encontraron vellosidades coriales reconocibles. Por lo tanto, el número de muestras procesadas fue de 155 tejidos (33.3%) (*Cuadro II*).

Cuadro I. Resultados de cultivo de tejidos del año 1994 al 2005 en donde se procesaron 165 muestras en total con un 69% de éxito. En estos cultivos no se tomaban en cuenta las semanas de gestación de tejidos sembrados y no se seleccionaba la muestra de manera microscópica, sino a simple vista.

Tipo	Sin crecimiento	Normal	Anormal	Total
Espontáneo	34	63	16	113
Anembriónico	4	17	3	24
HMR	13	12	3	28
Total	51	92 m:f 11:88	22 m:f 9:13	165

Abreviaturas. f = femenino; m = masculino; HMR = Huevo Muerto Retenido.

Cuadro II. Cultivo de tejidos de los diferentes tipos de aborto sin crecimiento, en los cuales no se pudo obtener resultado ya que no hubo crecimiento o se contaminaron; debido a alguna de estas causas no fue posible realizar el análisis citogenético.

Tipo de aborto	Sin crecimiento	Contaminados	Total
Espontáneo	15	5	20
Anembriónico	13	5	18
HMR	18	13	31
Total	46	23	69*

* Más un embarazo molar contaminado, siendo un total de 70.
HMR = Huevo Muerto Retenido.

De los 155 tejidos procesados, en 85 (54.8%) se obtuvo resultado, de los cuales 26 (30.5%) tuvieron cariotipo anormal y 59 (69.4%) presentaron cariotipo normal.

De los tejidos con cariotipo normal, 37.2% tuvieron un cariotipo 46,XY. En 62.7% se encontró un cariotipo 46,XX. 50.8% correspondieron al primer aborto, 30.5% al segundo aborto, 11.8% al tercer aborto, 5% al cuarto aborto y 1.7% al quinto aborto.

De los tejidos con cariotipo anormal, 42.3% correspondieron al primer aborto, 26.9% al segundo aborto, 7.7% al tercer aborto, 15.4% al cuarto aborto, 3.8% al sexto aborto y 3.8% al séptimo aborto.

De los tejidos con cariotipo anormal, 9 (34.6%) correspondieron a trisomías autosómicas, 6 (23%) a monosomía del X, 5 (19.2%) a tetrasomías en mosaico, 2 (7.7%) a trisomías de autosomas en mosaico, 2 (7.7%) a triploidías, 1 (3.8%) a tetraploidías y 1 (3.8%) a tetraploidía más trisomía autosómica.

Se encontró una diferencia significativa en la tasa de éxito en el crecimiento de los cultivos con la técnica actual con respecto a la anterior (OR = 0.54; I.C. 95% [0.33 – 0.89]; $p < 0.05$). Se logró aumentar el número de muestras procesadas de 165 en 12 años a 155 en un año. También se encontró diferencia significativa entre los sexos en la técnica actual respecto a la anterior, con una disminución de los cariotipos 46,XX (OR= 4.51; I.C. 95% [2.66-7.64]; $p < 0.05$).

De los 155 tejidos procesados, en 70 de ellos (45.1%) no se obtuvo un resultado debido a que 46 (65.7%) no crecieron y 24 (34.2%) se contaminaron.

En el cuadro III se especifica el cariotipo en relación al tipo de aborto de los tejidos en que se obtuvo resultado.

DISCUSIÓN

Con lo anterior se puede decir, que por medio de la selección de las vellosidades coriales de las muestras, impedimos que nuestros cultivos se contaminaran con células maternas y pudimos determinar las anomalías cromosómicas numéricas, que podrían explicar la pérdida del embarazo y comparar nuestros resultados con los reportados en la literatura internacional.

Debido a la mejor selección de tejidos de aborto procesados por año, también aumentó considerablemente el porcentaje de detección de cariotipos anormales en nuestro protocolo (30%) con respecto al histórico (19%); este aumento se debe a la mejor selección de tejido de origen embrionario y al diagnóstico más temprano (primer trimestre) ya que en la técnica anterior se procesaban los tejidos que no eran seleccionados por el Departamento de Genética y sin importar las semanas de gestación o el trimestre. Las anomalías cromosómicas encontradas concuerdan en gran medida con las reportadas en la bibliografía: 35% trisomías, 23% monosomía del X y 35% poliploidías. Se detectaron trisomías y tetraploidías en mosaico con complemento 46,XX. Estos mosaicos podrían deberse a contaminación de los cultivos con células maternas debido al plazo (15 a 30 días) que se mantuvieron los tejidos en cultivo. Por esta razón, sugerimos que se disminuya a dos semanas el tiempo que se da a los tejidos para que se adhieran células a la superficie de las cajas de cultivo. De no suceder esto en ese tiempo, se sugiere descartar las cajas de cultivo. Aunque los abortos pueden resultar de un mosaicismo,²⁶ el mosaicismo verdadero es causa

Cuadro III. Resultado de los diferentes tipo de cultivo de tejidos y los diferentes tipos de aborto con éxito en la obtención de resultado debido a la nueva técnica de estandarización y selección de cultivo de tejidos de aborto en el primer trimestre de gestación.*

Tipo de aborto	Normal	Anormal	Total
Espontáneo	21	8	29
Anembriónico	15	4	19
HMR	21	14	35
Total	57	26	83

* Más dos embarazos molares con cariotipo normal. 85 tejidos en total.
HMR: Huevo Muerto Retenido

sólo de aproximadamente el 0.12-0.2% de los abortos tempranos.^{27,28} Los factores que llevan a la obtención de un cariotipo erróneo incluyen la cantidad de tejido materno contaminante, la calidad y preservación de las vellosidades y, tal vez, la constitución genética y la velocidad de crecimiento del producto. Es posible que algunos productos genéticamente anormales tengan una desventaja significativa en el crecimiento, comparada con las células maternas normales.²⁹

Estudios previos han mostrado que la contaminación de los cultivos con células maternas va desde el 4.7% hasta el 11.8%.^{29,30} Sin embargo, Jarret y colaboradores encontraron, con el uso de análisis de microsatélites, que la contaminación con células maternas se presenta en el 89.7% de los tejidos de aborto de los que se obtuvieron resultados concluyentes.³¹ Zhang y colaboradores realizaron análisis genético en abortos del primer trimestre con una combinación de cariotipo citogenético, genotipificación por microsatélites y CGH (Comparative Genomic Hybridization) y encontraron que para caracterizar con mayor precisión los factores genéticos causantes de los abortos espontáneos del primer trimestre, el cariotipo citogenético de rutina se debe realizar junto con otras técnicas de genética molecular.³²

Cabe mencionar que se tuvo un porcentaje elevado de tejidos que no se procesaron (66.7%) debido a varias situaciones: problemas en el envío de la muestra desde la Unidad Tocoquirúrgica hasta el Laboratorio de Genética, tejidos congelados, tejidos en formol, tejidos con más de 48 horas después de realizado el legrado o la aspiración, tejidos sin hojas de identificación, tejidos contaminados que no pasaron la prueba de esterilidad, tejidos de abortos realizados en fin de semana, tejidos en los que no se encontraron vellosidades coriales reconocibles. Por lo anterior, proponemos que haya más personal debidamente preparado entre los involucrados en la toma y preservación de las muestras dentro del área tocoquirúrgica.

CONCLUSIONES

Con este trabajo se logró mejorar el procedimiento de selección y cultivo de tejido embrionario para estudio citogenético de tejidos de aborto del primer trimestre, así como la disminución de contaminación de tejido materno, observando una disminución en los casos de sexo femenino y un

aumento en los casos de sexo masculino; aunque se observó una disminución con respecto a la técnica anterior en un 14% pero se logró aumentar en un 11% la detección de resultados anormales, valorando así el éxito en la mejora de la técnica. Se propone aumentar la preparación y la cantidad de personal involucrado en la toma y preservación de las muestras dentro del área tocoquirúrgica para disminuir el número de muestras que se rechazan. Por otro lado, para evitar la contaminación materna es necesario disminuir a dos semanas el tiempo que se espera para observar células adheridas en la superficie de las cajas de cultivo. Es necesario hacer la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y otros estudios moleculares como Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa Fluorescente (QF-PCR), junto con el cariotipo, para aumentar la detección de las aneuploidías más comunes. Es probable que si se aumenta la probabilidad de éxito en el cultivo, también se logre observar alteraciones estructurales que en la bibliografía se reporta representan el 4% de los productos de aborto.⁷ Por último, es necesario el estudio de cariotipo y otras técnicas de biología molecular a todos los abortos para brindar un mejor asesoramiento genético a las parejas de las posibles causas de sus pérdidas gestacionales.³²

REFERENCIAS

1. Boue J, Bou A, Lazar P. Retrospective and prospective epidemiological studies of 1,500 karyotyped spontaneous human abortions. *Teratology* 1975; 12: 11-26.
2. Gueneri S, Betti D, Simoni G, Brambati B, Lanzani A, Fraccaro M. Prevalence and distribution of chromosome abnormalities in a sample of first trimester internal abortions. *Hum Reprod* 1987; 2: 735-39.
3. Eiben B, Bartels I, Bahr-Porsch S, Borgmann S, Batz G, Gellert G et al. Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage. *Am J Hum Genet* 1990; 47: 656-63.
4. Strom CM, Ginsberg N, Applebaum M, Bozorgi N, Shite M, Caffarelli M et al. Analyses of 95 first-trimester spontaneous abortions by chorionic villus sampling and karyotype. *J Assist Reprod Genet* 1992; 9: 458-61.
5. Sánchez JM, Franzi L, Colliá F, De Díaz SL, Panal M, Dubner M. Cytogenetic study of spontaneous abortions by transabdominal villus sampling and direct analysis of villi. *Prenat Diagn* 1999; 19: 601-3.
6. Philipp T, Phillip K, Reiner A, Beer F, Kolousek DK. Embryoscopic and cytogenetic analysis of 233 missed abortions: factors involved in the pathogenesis of developmental defects of early failed pregnancies. *Hum Reprod* 2003; 18: 1724-32.

7. Menasha J, Levy B, Hirschhorn K, Kardon N. Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: New insights from a 12-year study. *Genet Med* 2005; 7 (4): 251-63.
8. Kajji T, Ferrier A, Niikawa N, Takahara H, Ohama K, Avirachan S. Anatomic and chromosomal anomalies in 639 spontaneous abortuses. *Hum Genet* 1980; 55: 87-98.
9. Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuerl B, Matsura J et al. A cytogenetic study of 1,000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet* 1980; 44: 151-78.
10. Warburton D, Stein Z, Kline J, Susser M. Chromosome abnormalities in spontaneous abortion: Data from the New York City study. In: Porter IH, Hook EB, editors. *Embryonic and fetal death*. New York: Academic Press; 1980. p. 261-83.
11. Hassold T, Chiu D. Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet* 1985; 70: 11-17.
12. Linn CC, De Braekeleer M, Jamro H. Cytogenetic studies in spontaneous abortion: the Calgary experience. *Can J Genet Cytol* 1985; 27: 565-70.
13. Kline J, Stein Z. Epidemiology of chromosomal anomalies in spontaneous abortion: prevalence, manifestation and determinants. In: Bennett MJ, Edmonds DK, editors. *Spontaneous and Recurrent Abortion*. Chicago: Oxford Blackwell Scientific 1987. p.29-50.
14. Dejmek J, Vojtassak J, Malova J. Cytogenetic analysis of 1,508 spontaneous abortions originating from South Slovakia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1992; 46: 129-36.
15. Hassold T, Abruzzo M, Adkins K, Griffin D, Merrill M, Millie E et al. Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28: 167-75.
16. Dunn TM, Grunfeld L, Dardon NB. Trisomy 1 in a clinically recognized IVF pregnancy. *Am J Med Genet* 2001; 99: 152-3.
17. Hanna JS, Shires P, Matile G. Trisomy 1 in a clinically recognized pregnancy. *Am J Med Genet* 1997; 68: 98.
18. Goddijn M, Joosten JHK, Knecht AC, Van der Veen F, Franssen MTM, Bonsel GJ, Leschot NJ. Clinical relevance of diagnosis structural chromosome abnormalities in couples with repeated miscarriage. *Hum Reprod* 2004; 19: 1013-17.
19. Nicolaidis P, Petersen M. Origin of nondisjunction in human autosomal trisomies. *Hum Reprod* 1998; 13: 313-9.
20. Chandley AC. The origin of chromosomal aberrations in man and their potential for survival and reproduction in the adult human populations. *Ann Benet* 1981; 24: 5-11.
21. Jacobs PA, Hassold TJ. The origin of numerical chromosome abnormalities. *Adv Genet* 1995; 33: 101-33.
22. Rubio C, Simón C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohí J, Pellicer A. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod* 2003; 18: 182-8.
23. Ogasawa M, Aoki K, Akada S, Suzumori K. Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertility and Sterility* 2000; 73: 300-4.
24. Barch MJ, editor. *The ACT cytogenetics laboratory manual*. 2nd ed. New York: Raven Press; 1991: 107-149.
25. Wegner RD. Cytogenetic reliability of CVS: the German collaborative study in comparison to other multicenter studies. In: Sengel-Rutkowskis. *Early prenatal diagnostics*. Hamburg 1995.
26. Fritz B, Hallermann C, Olert J et al. Cytogenetic analysis of culture failures by comparative genomic hybridization (CGH): reevaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous miscarriage. *Eur J Hum Genet* 2001; 9: 539-47.
27. Wang BB, Rubin CH, William J. Mosaicism in chorionic villus sampling: An analysis of incidence and chromosomes involved in 2,612 consecutive cases. *Prenat Diagn* 1993; 13: 179-90.
28. Henderson KG, Shaw TE, Barret IT et al. Distribution of mosaicism in human placentae. *Hum Genet* 1996; 97: 650-4.
29. Bell KA, Van Deerlin P, Haddad BR and Feinberg RF. Cytogenetic diagnosis of "normal 46,XX" karyotypes in spontaneous abortions frequently may be misleading. *Fertility and Sterility* 1999; 71: 334-41.
30. Lomax B, Tang S, Separovic E et al. Comparative genomic hybridization in combination with flow cytometry improves results of cytogenetic analysis of spontaneous miscarriage. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1516-21.
31. Jarret KL, Michaelis RC, Phelan MC, Vincent VA, Best RG. Microsatellite analysis reveals a high incidence of maternal cell contamination in 46,XX products of conception consisting of villi or a combination of villi and membranous material. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185: 198-203.
32. Zhang, YX, Zhanf YP, Gu Y et al. Genetic analysis of first-trimester miscarriages with a combination of cytogenetic karyotyping, microsatellite genotyping and array CGH. *Clin Genet* 2009; 75: 133-40.

Correspondencia:

Biól. Exp. Mauricio Domínguez Castro
Tercer piso. Torre de Investigación.
Departamento de Genética, Subdirección de Investigación Biomédica. Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes. Montes Urales 800, Col. Lomas de Virreyes. C.P. 11000, México, D.F.
Tel. 5520-9900 Ext. 346 ó 316.
Correo electrónico: madoca03@yahoo.com.mx