



I. Castro Volio

Médico especialista en genética médica (Hospital Karolinska, Suecia), subdirectora del Instituto de Investigaciones en Salud de la Universidad de Costa Rica, coordinadora de la Sección de Genética Humana. Líneas de investigación: citogenética humana general, diagnóstico prenatal, tamizaje poblacional del síndrome del cromosoma X frágil, citogenética molecular y asesoramiento genético.

Cordocentesis para diagnóstico fetal citogenético en Costa Rica

I. Castro Volio
F. Ortiz Morales

Instituto de Investigaciones en Salud (INISA)
Universidad de Costa Rica
San José (Costa Rica)

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue identificar cromosopatía fetal en voluntarias con embarazos de alto riesgo genético, brindar adecuada atención obstétrica y pediátrica y asesoramiento genético. Desde el año 1992 hasta el 2001 inclusive se estudiaron 103 embarazos mediante cordocentesis y cariotipo fetal. La indicación en todos los casos excepto cinco fue examen ultrasonográfico anormal, ya sea porque éste detectó al menos una malformación fetal, poli-oligoamnios, retardo simétrico del crecimiento intrauterino, marcadores sonográficos de cromosopatía, higroma quístico o hidropesía fetal. Las cordocentesis se realizaron desde la semana 15 hasta la semana 38 de gestación. Para los análisis citogenéticos se utilizaron preparaciones cromosómicas con bandas G, el nivel de resolución fue de 300-400 bandas y se estudiaron 20 figuras mitóticas por caso en promedio. El cariotipo se obtuvo en 90 casos; fue normal en 76 embarazos y anormal en 14, a saber: trisomía 18 en ocho casos, trisomía 13 en dos fetos y un caso cada uno de 45,X (síndrome de Turner), 92,XXYY (tetraploidía), 46,XY,der21 (cromosoma 21 anormal) y 46,XX,t(8;21)mat (translocación heredada de la madre). El diagnóstico prenatal de cromosopatía permitió el asesoramiento genético y el manejo obstétrico y pediátrico de los casos de manera adecuada. En los embarazos con cariotipo normal esta información alivió la preocupación de muchos de los padres.

Palabras clave:

Diagnóstico prenatal. Cordocentesis. Defectos cromosómicos. Ultrasonografía. Costa Rica.

Cordocentesis for cytogenetic fetal diagnosis in Costa Rica

SUMMARY

The objective of this study was to identify fetal abnormal chromosomes in high risk pregnancies and to allow proper pediatric and obstetric management of the cases as well as genetic counseling. The results of 103 genetic percutaneous

umbilical cord samplings from 1992 to 2001 are reported. Almost all procedures were performed due to abnormal ultrasound findings (fetal malformation, poly-oligoamnios, symmetrical intrauterine growth retardation, sonographic markers of aneuploidy, cystic hygroma or hydrops fetalis) from gestational week 15 to 38. G banded (300-400 bands resolution) chromosomes from 20 independent cells were karyotyped in each case. In 90 cases, fetal chromosomes were normal in 76 and abnormal in 14 cases, that is, eight cases of trisomy 18, two fetuses with trisomy 13, and one case each of 45,X (Turner syndrome), 92,XXYY (tetraploidy), 46,XY,der21 (abnormal structure of chromosome 21) and 46,XX,t(8;21)mat (translocation inherited from the mother). The prenatal diagnosis of abnormal chromosomes allowed genetic counseling and adequate obstetric and pediatric management of the cases. In the pregnancies with normal karyotype, this information provided reassurance to the parents.

Key words:

Prenatal diagnosis. Percutaneous umbilical cord sampling. Chromosomal defects. Ultrasonography. Costa Rica.

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico prenatal es hoy un elemento fundamental de la atención obstétrica y los servicios genéticos en muchos países. Como consecuencia de los avances de la ultrasonografía y de la tecnología del ADN, actualmente es posible la identificación en el feto de casi todas las patologías de origen genético que se diagnostican en el adulto. Existen cuatro métodos diagnósticos principales, de los cuales el único no invasivo es la ecografía. La toma de muestras de vellosidades coriónicas, la amniocentesis y la toma de muestras de sangre fetal o cordocentesis, son métodos invasivos de obtención de células o tejidos fetales para su análisis de laboratorio.

En Costa Rica tenemos suficiente experiencia con las técnicas de ecografía y de amniocentesis. En 842 embarazadas se obtuvo células fetales mediante amniocentesis, la indicación del 48% de las punciones fue el examen ecográ-

Correspondencia:

Isabel Castro Volio
INISA. Universidad de Costa Rica
2060 San José (Costa Rica)

Correo electrónico:

icastro@carlari.ucr.ac.cr

fico anormal y el 35% fue por edad materna avanzada. El 66% de las veces el estudio se realizó en el segundo trimestre del embarazo y el 34% en el tercer trimestre. De los 625 cariotipos fetales obtenidos, el 9% fueron anormales¹.

La técnica de cordocentesis guiada por ecografía se introdujo en 1983 por Daffos et al. y se ha modificado poco desde entonces². La técnica se caracteriza por una tasa de éxito superior al 95%, se demora 3-4 días en obtener el cariotipo fetal y la fiabilidad es muy alta. Sólo se pueden obtener muestras de sangre fetal de manera inocua a partir de las 17 ó 18 semanas de gestación. Las cordocentesis son transabdominales y guiadas sonográficamente. Cuando interviene un operador adecuadamente preparado, a mediados del segundo trimestre, el promedio de pérdidas fetales es del 1-2%².

Nuestra experiencia con cordocentesis, sobre la que versa este trabajo, fue inicialmente para el diagnóstico de trastornos hemolíticos, pero a partir del año 1992 la técnica además se utiliza para la determinación rápida del cariotipo de linfocitos fetales, cuando hay motivos para pensar en alta probabilidad de cromosomopatía fetal, generalmente al detectarse una o varias malformaciones mediante ecografía.

El objetivo de este estudio fue identificar cromosomopatía fetal en voluntarias con embarazos de alto riesgo genético, brindar adecuada atención obstétrica y pediátrica y asesoramiento genético.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se reclutaron 103 voluntarias de manera no aleatoria desde 1992 hasta 2001 inclusive. Todas las cordocentesis excepto una se realizaron en un mismo hospital clase A de la Seguridad Social.

La edad gestacional, calculada por ultrasonografía, en que se realizó la cordocentesis más temprana fue 15 semanas y la más tardía fue 38 semanas. Entre 15 y 27 semanas inclusive se realizaron 34 punciones y de 28 a 38 semanas la cifra es 47. En 23 casos no se informó la edad gestacional al momento de la cordocentesis.

El motivo para realizar la cordocentesis más frecuente fue por defectos en la estructura fetal identificados mediante ecografía (n = 49), hidropesía fetal fue la segunda causa más frecuente (n = 18), seguida por los defectos del tubo neural (n = 15), los casos de poli/oligoamnios (n = 7), retardo del crecimiento intrauterino (n = 4), para confirmar o descartar un diagnóstico citogenético dudoso obtenido mediante amniocentesis (n = 3), higroma quístico (n = 2), marcadores sonográficos de aneuploidía (n = 2) y un caso cada uno de edad materna de 41 años junto con oligoamnios y retardo del crecimiento intrauterino, antecedente de un producto polimalformado anterior y por una translocación balanceada materna.

Se realizaron cultivos de linfocitos fetales para obtener preparaciones cromosómicas de la siguiente manera: el medio de cultivo fue RPMI 1640 (Gibco 12376-018) complementado con suero fetal bovino (Gibco 16000-044) al 10%, penicilina/estreptomocina (Gibco 15140-122) 10.000 UI/ml/10.000 µg/ml al 1%, a-glutamina (Gibco 21051-024) 200 mM al 1% y fitohemaglutinina (10576-015) al 2%. Este medio se conserva como máximo 4 semanas a 4° C. Se alícuota en tubos plásticos estériles de centrifugar, 5 ml por tubo. El pH debe estar entre 6,8-7,4. Se inoculan 0,4 ml de sangre venosa total recolectada en tubos heparinizados (heparina de sodio o litio sin preservantes) por triplicado. Se incuban a 37° C por 72 horas. Una hora antes de la cosecha se les agrega 50 µl de colcemid (Gibco 15210-040) a cada tubo y se mantienen en incubación. Transcurrida la hora se centrifugan 10 minutos a 3.500 rpm y se descarta el sobrenadante. Se resuspende el botón celular con KCl 0,075 M calentado previamente a 37° C y se incuba a esa temperatura por 15 minutos. Transcurridos los 15 minutos en este choque hipotónico se centrifugan los tubos por 10 minutos a 3.500 rpm y se descarta el sobrenadante. Se resuspende el botón celular con solución modificada de Ibraimov como fijador y al cabo de 1 hora se fija de nuevo con fijador estándar (metanol/acético glacial en una proporción 3:1) enfriado previamente a -20° C. Antes de gotear las láminas se debe hacer al menos tres fijaciones. Las preparaciones cromosómicas se dejan secar a temperatura ambiente. Antes del bandedo (GTG) las láminas se hornean durante toda la noche a 65° C. Al día siguiente las preparaciones cromosómicas se bandean y se analizan según la nomenclatura y las normas internacionales³.

RESULTADOS

En 13 casos no se obtuvo el diagnóstico, pues las preparaciones cromosómicas no rindieron figuras mitóticas en suficiente cantidad o calidad. Esto se debió en la mitad de los casos a dilución de la muestra de sangre con líquido amniótico y en la otra mitad a problemas con el anticoagulante usado en el tubo de recolección.

En 90 casos encontramos 14 cariotipos anormales (tabla 1) para un 15,6% de cromosomopatía fetal. Detectamos además un pseudomosaico con cariotipo 46,XY/46,XX.

DISCUSIÓN

La mayoría de los centros de diagnóstico prenatal en el mundo, en los casos de riesgo fetal de cromosomopatía predecible, se proponen conseguir el cariotipo antes de la vigésimo cuarta semana de gestación, límite usual para la edad gestacional en la cual la interrupción del embarazo por patología fetal es legalmente permitida. En consecuencia, la indicación de amniocentesis más del 80% de las veces es edad materna avanzada y la frecuencia de cromosomopatía fetal es alrededor de 5% o menos⁴. Por el contrario, en la segunda mitad del embarazo la principal indicación de amniocentesis, cor-

Tabla 1

Cariotipos fetales obtenidos mediante 90 cordocentesis

Indicación*	Cariotipo	Comentario
Ultrasonograma anormal	46,XX (n = 40)	Cariotipo femenino normal
Ultrasonograma anormal	46,XY (n = 36)	Cariotipo masculino normal
Hidropesía fetal	45,X (n = 1)	Monosomía X o síndrome de Turner
Malformaciones fetales	47,XX,+18 (n = 3)	Trisomía 18 o síndrome de Edwards
Malformaciones fetales	47,XY,+18 (n = 5)	Trisomía 18
Malformaciones fetales	47,XX,+13 (n = 2)	Trisomía 13 o síndrome de Patau
Malformaciones fetales	92,XXYY (n = 1)	Tetraploidía
Malformaciones fetales	46,XY, der 21 (n = 1)	Cromosoma 21 derivado
Translocación materna balanceada (8;21)	46,XX, t (8;21) mat (n = 1)	Translocación fetal idéntica a la de su madre

* Ultrasonograma anormal comprende malformaciones fetales, poli-oligoamnios, retardo del crecimiento intrauterino, marcadores sonográficos de cromosomopatía, higroma quístico e hidropesía fetal.

docentesis o biopsia placentaria es el hallazgo inesperado de examen ultrasonográfico anormal en una embarazada sin factores de riesgo predecibles⁵. Las anomalías sonográficas son usualmente por retardo del crecimiento fetal, poli u oligohidramnios, feto hidrópico y malformaciones fetales⁴. En estas circunstancias cabe esperar frecuencias mayores de cariotipos defectuosos, tales como 11⁴, 13³, 14⁶ y 23%⁷. Encontramos casi un 16 % de cromosomopatía fetal en este estudio, cifra comparable con estos informes.

Además de cuantitativas, las diferencias entre una población estudiada primordialmente por edad materna avanzada y otra con predominio de anomalías fetales son también cualitativas. En 36.754 estudios prenatales en mujeres mayores que 38 años, la trisomía 21 fue responsable del 1,5 % de los cariotipos anormales, la trisomía 18 del 0,4 % y la trisomía 13 del 0,1 %, mientras que la frecuencia de estos defectos en estudios por ultrasonido anormal fue del 3,2 (+21), 3 (+18) y 1 % (+13)⁴. En comparación con este y otros informes⁵ vemos que no encontramos trisomías 21, pero sí un 9 % de trisomía 18 y un 2 % de trisomía 13 (tabla 1). Esto se explica, pues en nuestro caso la escogencia de la cordocentesis por sobre la amniocentesis se basa en la mayor cantidad o severidad de las anomalías sonográficas, las cuales se asocian a las trisomías que más alteraciones fenotípicas causan.

Las trisomías 13 y 18 diagnosticadas en 10 fetos (tabla 1) son de mal pronóstico; la sobrevida promedio de la trisomía 18 es de 4 días; el 45 % sobreviven hasta una semana, el 3-9 % so-

breviven hasta 6 meses y el 0-5 % alcanzan el año de edad^{8,9}. Los sobrevivientes tienen un promedio de dos operaciones al cumplir su primer año y se desenvuelven en los ámbitos de retardo severo y profundo^{10,11}.

El pseudomosaico encontrado es el resultado de dos poblaciones celulares con cariotipos diferentes; en nuestro caso células femeninas y masculinas que podrían indicar hermafroditismo verdadero o simplemente contaminación de la muestra con sangre materna, que fue lo que realmente sucedió.

En cuanto a la tetraploidía (92 cromosomas) se ha documentado la existencia de personas con tetraploidía pura y en mosaico, con graves consecuencias fenotípicas^{12,13}.

Otro tipo de defecto cromosómico de número, esta vez por déficit, es la monosomía del cromosoma X que produce el síndrome de Turner. El 99% de los fetos afectados mueren antes de cumplir 28 semanas gestacionales. Los casos que se presentan como abortos del segundo trimestre o como mortinatos muestran edema fetal, hidropesía y una masa nucz llamada higroma quístico del cuello¹⁴. Nuestro diagnóstico de 45,X mostró hidropesía en el ultrasonograma (tabla 1). En el asesoramiento genético de estos casos, además de informar sobre la alta posibilidad de muerte fetal, los futuros padres deben saber que en caso de sobrevivir la etapa perinatal las niñas muestran mucha variabilidad fenotípica y es imposible predecir el pronóstico de cada una. Por lo general no se espera el retardo mental como secuela; la talla será pequeña, la infertilidad es muy probable; puede acompañarse de malformaciones congénitas tales como coartación de la aorta, cuello alado y nefropatías. Las niñas tienen más riesgo de presentar retrasos en el lenguaje y en habilidades neuromotoras y de aprendizaje¹⁴.

Aproximadamente 1:500 nacidos vivos es portador de un reacomodo balanceado de la estructura cromosómica, lo cual no afecta su salud, pero sí reduce su posibilidad de tener descendencia cromosómicamente normal. Tal es el caso de la madre del feto que mostró un cromosoma 21 derivado (tabla 1), la cual resultó ser portadora de una translocación entre los cromosomas 8 y 21 al estudiar el cariotipo conyugal posterior a este hallazgo. Identificamos un intercambio de material cromosómico entre ambos que produjo un cromosoma 8 más chico y un 21q+, o sea, con el brazo largo de mayor tamaño. El feto heredó un par 8 y un cromosoma 21 normales, el otro 21 era q+, a expensas del material adicional del cromosoma 8 materno, de manera que tenía una trisomía 8 parcial. En un embarazo posterior la cordocentesis arrojó un cariotipo fetal idéntico al de la madre (tabla 1).

En vista de que la mayoría de las cromosomopatías obedecen a mutaciones frescas o de novo, y tomando en cuenta que son de diagnóstico relativamente fácil, pero de tratamiento inexistente (a lo sumo rehabilitación), la prevención en materia de genética surge como una de las acciones de salud más importantes. Las herramientas con las que se cuenta actualmente en países desarrollados para lo-

gar esta prevención son principalmente el tamizaje prenatal de toda la población de embarazadas, el diagnóstico prenatal de las gestaciones de alto riesgo, el aborto selectivo de los casos afectados, el asesoramiento genético y la identificación de grupos de mayor riesgo. En el tamizaje prenatal de trisomías se utilizan tanto marcadores bioquímicos como sonográficos. Cabe esperar que con el aumento siempre creciente de la resolución de los equipos, con el incremento en la utilización de los mismos por parte de cada vez más obstetras y con la ganancia concomitante de experiencia y pericia aumente paralelamente la cantidad y variedad de defectos fetales diagnosticados *in útero*. En estos casos es imprescindible estudiar el cariotipo fetal puesto que el abordaje del problema dependerá fundamentalmente de la normalidad o no del mismo. Por ejemplo, la cirugía fetal para corregir o contrarrestar las secuelas de una malformación, que ya se ha practicado en Costa Rica con éxito, estaría contraindicada en caso de defecto cromosómico.

La alta frecuencia de anomalías cromosómicas en presencia de defectos estructurales fetales y la alta mortalidad fetal enfatizan la necesidad de obtener el cariotipo. En presencia de cromosomopatía se puede evitar cirugía fetal innecesaria. Por otro lado, el conocimiento del cariotipo y del fenotipo fetal permite a los padres y al personal de salud discutir alternativas y escoger el momento, el modo y el lugar más adecuados para el nacimiento. Aún más, dada la alta probabilidad de muerte intrauterina y maceración fetal consiguiente, el diagnóstico citogenético posparto resulta poco práctico y por tanto el asesoramiento genético a fin de evitar recurrencia se dificulta.

En Costa Rica, con referencia al diagnóstico prenatal, tenemos dos problemas fundamentales: 1) la capacidad del único laboratorio en el país que realiza cariotipos fetales es, por motivos económicos, restringida y definitivamente insuficiente para atender a toda la población de embarazadas con indicación para amniocentesis o cordocentesis genética, y 2) las trabas legales para interrumpir embarazos por defecto fetal. Es así como surge una situación de injusticia: en el nivel privado se ofrece el diagnóstico prenatal a las embarazadas mayores que 35 años, asumiendo su capacidad económica para el aborto selectivo fuera de nuestras fronteras. A las aseguradas se les realiza el estudio fundamentalmente cuando el examen ultrasonográfico es anormal para determinar la posible etiología cromosómica del problema y ofrecer asesoramiento genético para preparar el núcleo familiar para el mejor recibimiento del niño y con miras a futuros embarazos.

Puesto que está demostrado que los niños con síndrome de Down en quienes se invierte en aceptación, amor, cuidados, estimulación temprana, terapia de lenguaje, terapia ocupacional, fisioterapia, integración en el sistema escolar, etc., pueden llegar a ser personas autosuficientes, resulta paradójico que las clases sociales con menos recursos económicos para costear todas estas terapias e intervenciones y con mayor cantidad de factores de riesgo asociados sean las que poseen menos posibilidades de prevención mediante aborto selectivo.

El diagnóstico prenatal de cromosomopatía permitió el asesoramiento genético y el manejo obstétrico y pediátrico de los casos de manera adecuada. En los embarazos con cariotipo normal esta información alivió la preocupación de muchos de los padres.

AGRADECIMIENTOS

Apoyo financiero de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica a través del programa # 742-90-913.

BIBLIOGRAFÍA

1. Castro-Volio I, Sander-Mangel K, Vargas-Prado M, Sánchez-Chaves L, Escalante-López G. Diagnóstico prenatal citogenético mediante amniocentesis durante los trimestres II y III de gestación en Costa Rica. *Rev Biol Trop* 2001;49:1227-36.
2. Romero R, Ghidini A, Santolaya J. Fetal blood sampling. En: Milunsky A, editor. *Genetic disorders and the fetus*, 3.^a ed. Baltimore, MD: Johns Hopkins, 1992; p. 649-82.
3. Anónimo. ISCN An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Mitelman F. editor. Basilea: Karger, 1995; p. 114.
4. Eydoux, P, Choiset A, Le Porrier N. Chromosomal prenatal diagnosis: study of 936 cases of intrauterine abnormalities after ultrasound assessment. *Prenat Diagn* 1989;9:255-68.
5. Boué A, Muller F. Ultrasound indications for laboratory testing. En: Boué A, editor. *Fetal medicine: prenatal diagnosis and management*. Oxford: Oxford Univ, 1995; p. 203-15.
6. Philip J. The prenatal diagnosis and management of congenital malformations in the third trimester of pregnancy. En: Milunsky A, editor. *Genetic disorders and the fetus, diagnosis, prevention, and management*. Baltimore: Johns Hopkins Univ, 1992; p. 683-719.
7. Nicolaidis KH, Snidjders RJ, Gosden CM, Berry C, Campbell S. Ultrasonographically detectable markers of fetal chromosomal abnormalities. *Lancet* 1992;340:1109-10.
8. Wilson RD, Chitayat D, McGillivray BC. Fetal ultrasound abnormalities: correlation with fetal karyotype, autopsy findings, and postnatal outcome-five year prospective study. *Am J Med Genet* 1992; 44:586-90.
9. Root S, Carey JC. Survival in trisomy 18. *Am J Med Genet* 1994; 49:170-4.
10. Baty BJ, Blackburn BL, Carey JC. Natural history of trisomy 18 and trisomy 13: I. growth, physical assessment, medical histories, survival, and recurrence risk. *Am J Med Genet* 1994;49: 175-88.
11. Baty BJ, Jorde LB, Blackburn BL, Carey JC. Natural history of trisomy 18 and trisomy 13: II. psychomotor development. *Am. J. Med Genet* 1994;49:189-94.
12. Tessier M, Gaucherrand P, Buenerd A. Prenatal diagnosis of a tetraploid fetus. *Prenat Diagn* 1997;17:474-78.
13. Meiner A, Holland H, Reinchenbach H, Horn LC, Faber R, Froster UG. Tetraploidy in a growth retarded fetus with a thick placenta. *Prenat Diagn* 1998;18:864-5.
14. Gardner RJM, Sutherland GR. Structural rearrangements and uniparental disomy. En: Gardner RJM, Sutherland GR, editores. *Chromosome abnormalities and genetic counseling*. Nueva York: Oxford, 1996; p. 259-93.
15. Robinson A, Bender BG, Linden MG. Prenatal diagnosis of sex chromosome abnormalities. En: Milunsky A, editor. *Genetic disorders and the fetus: diagnosis, prevention and treatment*. Baltimore: Johns Hopkins; 1992; p. 211-39.