



100
100

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Metodología para el Estudio y Cultivo de
Células de Líquido Amniótico.

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

p r e s e n t a :

Nina A. del Vecchio Carranza

Director de Tesis: DR. ANTONIO VELAZQUEZ A.

México, D. F.

6433

1979



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A MI ESPOSO

LIC. JUAN CRESPO POZUELO

POR SU APOYO Y ENTUSIASMO SINCERO

A MIS HIJOS:

JUANIN Y SANTIAGO

A MIS PADRES
CON PROFUNDO CARINO Y GRATITUD

A MIS HERMANOS:

EUGENE FRANCIS

MARIA COLORES

JOSE MARIA

MICHAEL ALFRED

RAFAEL JUAN

EN TESTIMONIO DE AGRADECIMIENTO

AL DR. ANTONIO VELAZQUEZ ARELLANO
JEFE DEL LABORATORIO DE GENETICA CELULAR
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS U.N.A.M.
QUIEN ME BRINDO SU TIEMPO, CONOCIMIENTOS, Y EXPERIENCIA.

A LA DRA. OFELIA NIÑO DE RIVERA
LABORATORIO DE GENETICA CELULAR
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS U.N.A.M.

AL DR. EDUARDO LOEWENBERG-FAVELA
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PERINATOLOGIA
C.H. "20 DE NOVIEMBRE" I.S.S.S.T.E.

A LA DRA. ALESSANDRA CARNEVALE
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE GENETICA
HOSPITAL DEL NIÑO D.I.F.

A LA D.F.B. JULIETA CASTILLO
DEPARTAMENTO DE GENETICA
HOSPITAL DEL NIÑO D.I.F.

A TODAS AQUELLAS PERSONAS
QUE DE ALGUNA MANERA CON-
TRIBUYERON PARA HACER PO-
SIBLE ESTE TRABAJO.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN:
EL LABORATORIO DE GENETICA CELULAR
DEL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INDICE

INTRODUCCION	1
REVISION DE LA LITERATURA.	
CAPITULO I	
A.- Diagnóstico Prenatal y Consejo Genético	4
B.- Amniocentesis	4
1.- Indicaciones	5
2.- Técnica y Complicaciones	7
3.- Aspectos Emocionales, Sociales, y Legales	10
CAPITULO II	
A.- Líquido Amniótico	15
1.- Procedencia	15
2.- Composición	16
3.- Citología	16
B.- Cultivo de Células de Líquido Amniótico	18
1.- Factores que Determinan el Éxito del Cultivo	19
a) Viabilidad	20
i) Edad Gestacional	20
ii) Tiempo de Siembra	21
iii) Congelación	21
iv) Centrifugación	21
b) Células Muertas	22
c) Tamaño y Tipo de Recipiente	22
d) Medios de Cultivo	23
e) Tipo y Concentración de Suero	23
f) Contaminación Microbiana	25
g) Adición de Sustancias que Incrementan el Índice Vitótico ..	26

2.- Métodos para Determinar el Exito del Cultivo	27
a) Número de Colonias	27
b) Tiempo Necesario para Efectuar Estudios Cromosómicos	28
c) Índice Mitótico	28
3.- Tipos Celulares que se Establecen en Cultivo	29
C.- Cariotipo de Células de Líquido Amniótico	31
1.- Métodos	31
a) Cariotipo <u>in situ</u>	31
b) Cariotipo de Células en Suspensión	32
c) Cariotipo de Células no Cultivadas	32
2.- Interpretación del Cariotipo	33
a) Poliploidías	33
b) Hiperdiploidías e Hipodiploidías	33
c) Mosaicismo	34
3.- Errores en el Diagnóstico Citogenético Prenatal	36
a) Contaminación Materna	36
b) Causa Desconocida	37

ESTUDIOS EXPERIMENTALES.

CAPITULO III

A.- Material	39
1.- Soluciones Empleadas en la Preparación de los Medios de Cultivo	39
2.- Medios de Cultivo	40
3.- Soluciones Empleadas para Desprender las Células	41
4.- Soluciones Empleadas para la Inmovilización, Expansión, Fijación, y Tinción de los Cromosomas	42
5.- Material Empleado para el Cultivo, Manipulación, y Observación de las Células	43
6.- Lavado de Material	44
7.- Pacientes	46

B.- Metodología	46
1.- Cultivo de Células	46
a) Procedimiento I	47
b) Procedimiento II	47
2.- Conteo de Células	50
3.- Determinación del Cariotipo	50

CAPITULO IV

Resultados	52
1.- Aparición de Colonias	55
a) Procedimiento I	55
b) Procedimiento II	55
2.- Número y Visibilidad de las Células	55
3.- Medios de Cultivo	60
4.- Procedencia del Suero	60
5.- Tipo de Colonias	65
6.- Tiempo Necesario para Determinar el Cariotipo	73
a) Procedimiento I	73
b) Procedimiento II	77

CAPITULO V

Discusión	83
-----------------	----

CAPITULO VI

Conclusiones	88
--------------------	----

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	99
----------------------------------	----

INTRODUCCION.

A partir del presente siglo se han registrado avances inesperados en medicina gracias a los descubrimientos realizados en otras ciencias como: Genética, Citología, Bioquímica, Inmunología, Serología, y otras muchas. Así, - en la actualidad no sólo es posible efectuar el diagnóstico correcto de muchos padecimientos, sino que se han elucidado los mecanismos involucrados en su manifestación y transmisión, lo cual facilita en gran parte su tratamiento y prevención.

En Genética, fue Gregorio Mendel quien en 1864 postuló la teoría de la herencia mediante la transmisión de "unidades" (genes) que se encuentran en las células reproductoras y que se distribuyen y transmiten a la descendencia siguiendo las Leyes de la Segregación. Su trabajo, a pesar de haber sido publicado en los anales de la Sociedad de Historia Natural de Brno en 1865, no fue debidamente valorado sino hasta 1900. En 1902 W. J. Sutton y Teodoro Boveri concluyeron simultánea e independientemente que los genes se encuentran en los cromosomas y que los alelos se separan durante la meiosis, división celular necesaria para la reducción del número cromosómico en los gametos masculinos y femeninos de plantas y animales. ⁶⁷

Posteriormente, muchos otros realizaron estudios sobre los mecanismos de transmisión de la herencia. Descubrieron fenómenos como: alelismo, pleiotropía, poligenia, expresividad, penetración, herencia ligada al sexo, entrecruzamiento, mutación, etc., y observaron el comportamiento de los cromosomas durante la meiosis, registrando fenómenos anormales como: monosomías, trisomías, deleciones, duplicaciones, translocaciones, etc., que resultan en la formación de productos anormales.

En Citología, también se han registrado grandes avances, principalmente en lo relacionado al cultivo de células y tejidos. En 1965 Tjio y Levan ⁷⁶ observaron por vez primera el cariotipo humano y demostraron que podía estudiarse éste en cultivos celulares. Posteriormente, Fuck y sus colaborado-

res ⁵⁸ demostraron que es posible iniciar una línea celular de cualquier donador, que sus células son capaces de dividirse in vitro y formar colonias - que continuarán reproduciéndose por muchas generaciones. Al mismo tiempo, - Eagle ¹⁶ y otros investigadores determinaron algunos de los requisitos nutricionales para el cultivo in vitro de células de mamíferos. Además, en 1960 Krooth y Weinberg ⁴³ demostraron por vez primera que algunos defectos metabólicos hereditarios continúan expresándose en cultivos celulares derivados del paciente. Se inició así una nueva ciencia: La Genética de Células Somáticas.

Gracias a estos avances se ha superado una de las principales barreras que retrasaban el progreso de la Genética Humana. El cultivo de las células para el estudio del genoma humano permite no sólo el empleo de casi todos - los experimentos bioquímicos, inmunológicos, y de hibridación, sino que además hace posible manipular el medio ambiente que rodea a estas células con - gran facilidad. Obviamente, no sería factible o deseable realizar algunos - de estos experimentos en seres humanos. De esta manera se pretende lograr - un mejor entendimiento de la genética humana, en la misma forma en que la ge- nética microbiana ha contribuido al conocimiento de la estructura y funciona- miento de los genes en general. ⁷⁸

Durante los últimos 15 años, los médicos, genetistas, y citólogos han iniciado una nueva etapa: el estudio del feto. El feto, que representa la - fase inicial y más importante en el crecimiento y desarrollo del individuo, había permanecido inaccesible a los avances científicos; pero esta situación ha cambiado, y ahora, es ya posible realizar estudios diversos que nos permi- tan determinar ciertos aspectos del feto en gestación. ²² Emery ¹⁷ clasificó las técnicas empleadas para el estudio del feto de la siguiente manera:

A.- Directas.

- 1.- Radiografía, Amniografía, y fetografía: para el estudio del esque- leto, el contorno, y los tejidos blandos del feto.
- 2.- Sonografía: para el estudio de la forma y posición del feto.
- 3.- Electrocardiografía: para el estudio de padecimientos cardíacos, especialmente en etapas avanzadas del embarazo.
- 4.- Fetoscopia: para la observación directa del feto a través de una lente.

- 5.- Biopsias de las Membranas, Placenta y Feto: para detectar anomalías particulares de los diferentes tejidos (en fase experimental)
- 6.- Amniocentesis: para el estudio de algunos metabolitos del líquido amniótico, y el estudio cromosómico y bioquímico de las células provenientes del feto y suspendidas en el líquido amniótico.
- 7.- Muestreo de Sangre Fetal: para estudios de anomalías que ocurren en la síntesis y estructura de las hemoglobinas, y para la determinación de la concentración de la enzima creatina fosfoquinasa, cuando la madre es portadora del gen que ocasiona la distrofia muscular de Duchenne. ⁵⁴

E.- Indirectas.

- 1.- Cultivo de Linfocitos de Sangre Materna: para el estudio de linfocitos fetales que han pasado a la circulación materna (en fase experimental).
- 2.- Análisis de la Orina Materna: para la detección de ciertos productos de excreción, como ocurre en casos de acidemia metilmalónica. ⁵⁴

El presente trabajo tiene como finalidad estudiar sólo una de las técnicas que se están empleando en la actualidad para facilitar el diagnóstico prenatal. Se intentó el cultivo de las células fetales suspendidas en el líquido amniótico, obtenidas mediante amniocentesis transabdominal entre las semanas 12 a 22 de gestación, y se estudió el efecto de varios factores que era posible que tuvieran influencia sobre el cultivo; con el objeto de encontrar cuál método es el que permite obtener un número suficiente de células para realizar un estudio citogenético de las mismas en el menor tiempo posible y en el mayor porcentaje de los líquidos amnióticos sembrados.

CAPITULO I

A.- Diagnóstico Prenatal y Consejo Genético.

Se estima ⁹ que en una población suficientemente grande, uno de cada dos cigotos presenta aberraciones cromosómicas, aunque la mayoría de éstos ni siquiera se implantan. Algunos otros (60%) son abortados espontáneamente durante el primer trimestre del embarazo, y al nacimiento se detecta una aberración cromosómica en aproximadamente cada 200 neonatos. Estos datos, aunque válidos para la población en general, no son aplicables a parejas en las que han ocurrido abortos repetidos o han tenido productos con alguna anomalía cromosómica. En estos casos el riesgo puede ser mayor, dependiendo del tipo de aberración involucrada.

Se observa que la naturaleza ha diseñado un mecanismo que impide el desarrollo de la mayoría de los cigotos anormales, pero a pesar de ello, algunos llegan a completar su desarrollo embrionario. Actualmente, mediante técnicas que ofrecen la posibilidad de detectar defectos cromosómicos y algunos padecimientos genéticos, es posible efectuar un diagnóstico prenatal y evitar el nacimiento de fetos anormales.

Así, los genetistas ya no están limitados al cálculo de las probabilidades teóricas de que alguna pareja a riesgo concibe un hijo anormal, sino que puede desempeñar un papel más activo al poder determinar con un alto grado de seguridad si el futuro bebé está o no afectado.

B.- Amniocentesis.

Es la técnica mediante la cual se obtiene líquido amniótico introduciendo una aguja en la cavidad amniótica. Se comenzó a practicar a fines del siglo pasado para retirar líquido en casos de polihidramnios. Posteriormente se practicó en el tercer trimestre del embarazo para de

terminar la madurez fetal y para evaluar los casos con posible izoimunización materno-fetal.

En 1949 cuando Barr y Birtman⁴ descubrieron la cromatina sexual, varios investigadores como Serr, Sachs, y Dannon en 1955,⁶² Fuchs y Riis en 1956,²⁰ y Shettles en 1956,⁶³ utilizaron la técnica para el diagnóstico del sexo fetal en casos de padecimientos ligados al cromosoma X. Este procedimiento que implica sacrificar al 50% de los varones normales, presenta un margen de error considerable.³⁸

En 1961 Fuchs y Phillo²¹ cultivaron las células de líquido amniótico, pero fue hasta 1965 en que Steels y Berg⁶⁸ describieron una técnica para el cultivo de estas células, obteniendo suficientes para determinar su cariotipo. Ellos sólo obtuvieron resultados en 12 de 62 intentos, es decir en 19% de los casos. Otros investigadores han introducido modificaciones en la técnica, mejorando el porcentaje de éxito. Así, en 1970 Nadler y Cercle⁵⁰ reportaron un 97% de aciertos en el cultivo de células de 160 pacientes. Los más recientes estudios colaborativos efectuados en Europa,²³ Canadá,⁶⁵ y Estados Unidos,⁵² reporten los siguientes porcentajes de éxito: 96,5%, 94,5%, y 99,4% respectivamente.

1.- Indicaciones.

Es más conveniente practicar la amniocentesis cuando el riesgo de que el feto esté afectado sea mayor que el 1%. El riesgo de la amniocentesis misma es considerablemente menor que 1% (vide infra). Los padres deberán ser informados sobre el riesgo del procedimiento, la probabilidad de encontrar un resultado positivo, la gravedad del padecimiento, y los factores emocionales a que están sometidos, incluyéndose la opción del aborto en caso de que el feto — esté afectado.⁴⁶

Se recomienda practicar la amniocentesis en casos en los que se sospecha de anomalías cromosómicas o cuando existe un antecedente familiar que incluya padecimientos ligados al cromosoma X o padecimientos metabólicos hereditarios que puedan estudiarse en las células fetales. H. A. Lubs y M. L. A. Lubs resumen en los siguientes cuadros el riesgo para los portadores de translocaciones balanceadas de tener un hijo anormal, y las indicaciones clínicas para amniocentesis. 46

Riesgo para los Portadores de Translocaciones Balanceadas, de Tener un Hijo Anormal.		
	Madre Portadora	Padre Portador
Hamerton:		
t(Dq Gq)	10.9% - 33.3%	2.4% - 7.4%
t(Dq Dq)	1.4% - 3.4%	0% - 1.6%
t(21q 22q)	14.3% - 31.6%	0% - 5.6%
Ford y Clegg:		
Translocación Recíproca:	7.8% - 40.5%	0% - 35.7%

Indicaciones Clínicas para Amniocentesis en Alteraciones Cromosómicas.
<p>Alto Riesgo 5%</p> <p>Todas las translocaciones (madre portadora) excepto t(Dq Gq).</p> <p>Algunas translocaciones (padre portador).</p>
<p>Riesgo Moderado 1% a 5%</p> <p>Translocaciones restantes.</p> <p>Edad materna mayor de 35 años.</p> <p>Antecedentes de hipertiroidismo materno.</p>
<p>Riesgo Bajo 1%</p> <p>Producto trisómico previo.</p> <p>Ansiedad materna.</p>

Indicaciones Clínicas para Amniocentesis
en Algunos Padecimientos Bioquímicos
Autosómicos Recesivos, y
Padecimientos Ligados al Cromosoma X.

Alto Riesgo 5%

Ambos padres heterocigotos (riesgo 25%).

Parientes femeninas de un paciente con un padecimiento ligado al cromosoma X, y con una probabilidad de 25% o mayor de ser portadora del gen anormal (haste primas hermanas del paciente).

Riesgo Moderado 1% a 5%

Si la madre tiene algún pariente más lejano con un padecimiento ligado al cromosoma X, y su probabilidad de ser portadora es de 8% a 24%.

Riesgo Bajo 1%

Cuando existen parientes cercanos con los más comunes padecimientos bioquímicos.

Cuando hay parientes más lejanos con algún padecimiento ligado al cromosoma X.

2.- Técnica y Complicaciones.

La técnica más aceptada para efectuar la amniocentesis consiste en la inserción de una aguja a través de la pared abdominal. Esta deberá atravesar el peritoneo, el miometrio, y la decidua, penetrando hasta el saco amniótico de donde se aspira el líquido. También se puede hacer una punción a través de la vagina, la cual permitiría la obtención de líquido antes de las 12 semanas de gestación, pero implica mayores dificultades técnicas y aumenta la posibilidad de infección.

Como cualquier procedimiento médico, la amniocentesis tiene sus riesgos, por lo que es necesario saber cuáles son éstos y así intentar reducirlos a un mínimo.

Los riesgos para la madre pueden ser: hemorragia, infección, sensibilización a grupo sanguíneo, y perforación de víceras. Los riesgos para el feto son: traumatismo, infección, y aborto espontáneo. ²

Emery ¹⁷ reporta sólo una muerte materna en 21,000 amniocentesis - decidua a infección; y un índice de muerte fetal menor de 0.6 por - 1,000 amniocentesis. La incidencia de infecciones es muy baja ya que se ha comprobado que el líquido amniótico no favorece el desarrollo de bacterias. ^{18, 48}

Robinson et. al. ⁵⁹ y Golostein y Dumars ²⁵ reportan la presencia de un hundimiento en la región glútea de un neonato, atribuida a una marca de aguja. Cook et. al. ¹⁴ reportan un caso de muerte fetal por pneumotórax.

En la actualidad se ha demostrado que mediante el uso adecuado de sono-placentografía en el tiempo gestacional adecuado y con la intervención de personal experimentado, el riesgo de la amniocentesis es ínfimo. Recientemente se realizaron estudios colaborativos en Estados Unidos, Canadá, y en 8 países de Europa Occidental con el fin de proporcionar información estadística sobre los riesgos - que implica la amniocentesis para la madre y el feto.

En Estados Unidos, el National Institute of Child and Health Development (NICHD) ⁵² inició la colaboración de 9 centros de diagnóstico prenatal para realizar un estudio en el cual por cada paciente sometida a amniocentesis, se escogió una paciente de la misma - condición en cuanto a raza, edad \pm 2 años, número de embarazo, y - situación socio-económica, que serviría como control durante todo el embarazo. Se registraron los datos de las 1,040 pacientes y de les 992 controles en tres ocasiones: durante e inmediatamente después de la amniocentesis para detectar complicaciones de la misma, al momento del parto para evaluar dificultades en el nacimiento o malformaciones congénitas, y al cumplir el niño un año de edad para valorar cualquier problema en su desarrollo o crecimiento.

Después de la amniocentesis se presentaron pocas complicaciones: - en 12 casos pérdida de líquido amniótico, en 11 casos sangrado vaginal, en 2 casos contracciones prematuras, en 1 caso aborto espontáneo, y en 1 caso amniotitis. Estas complicaciones representan riesgos reales, pero su ocurrencia es muy baja; no depender de la edad materna, número de embarazo, semanas de gestación, diámetro de la aguja empleada (cuando es menor que # 18), volumen de líquido obtenido, y localización de la placenta mediante ultrasonido. No se observó relación entre el número de amniocentesis realizadas en diferentes ocasiones y la pérdida fetal (aborto espontáneo, muerte fetal in utero o nacimiento de fetos muertos), pero sí se observó una correlación positiva entre el número de inserciones de la aguja durante la amniocentesis con sangrado vaginal y/o pérdida fetal. Sin embargo, los casos de pérdida fetal (3.5% en el grupo experimental y 3.2% en el grupo control), no representan una diferencia estadísticamente significativa.

La evaluación realizada en los neonatos no reveló la presencia de marcas de aguja en ningún caso, y se observaron anomalías físicas diversas en la misma proporción en los dos grupos, sin existir un patrón que pudiera relacionar la amniocentesis con cualquiera de éstas.

La mortalidad infantil durante el primer año no representó una diferencia estadísticamente significativa. Los resultados de la prueba Denver Screening Development Test aplicada a 872 niños del grupo experimental y a 329 niños del grupo control al año de edad, reveló que el grupo control presentaba mayor número de anomalías - en su movimiento grueso, fino, lenguaje, y personalidad (quizá por que se incluyó a 7 niños con trisomía 21).

En Canadá, Simpson et. al.⁶⁵ recolectaron datos procedentes de 13 centros de diagnóstico prenatal que efectuaron 1,223 amniocentesis,

y compararon los resultados de las variables estudiadas con datos estadísticos proporcionados por otras instituciones.

Después de la amniocentesis se observaron las siguientes complicaciones: en 16 casos pérdida de líquido, y en 17 casos contracciones, sangrado vaginal, o aborto espontáneo. Se registró un mayor número de complicaciones (7.3%) cuando se efectuó la amniocentesis antes de la semana 15, y un número menor (2.8%) cuando se efectuó después de la semana 16 de gestación. Mediante la localización previa de la placenta por ultrasonografía, se efectuó una sola punción en 86% de los casos, y en el 76% sin emplear esta técnica. Los casos de pérdida fetal representaron un 3.2% en nacimientos de fetos muertos o muerte neonatal, y un 1% en abortos espontáneos, de un total de 1,020 amniocentesis. La primera cifra resultó ser mayor que las cifras reportadas para mujeres mayores de 35 años, pero la segunda fue menor que las cifras estadísticas reportadas.

Se concluyó que la amniocentesis es un procedimiento seguro y confiable cuando se realiza a las 14 semanas de gestación, utilizando agujas del # 21 ó # 22, previa localización de la placenta mediante ultrasonografía, y por un médico experimentado.

En Europa Occidental, Galjaard²³ reportó los resultados de 20 centros de diagnóstico prenatal. En 3,462 casos no se observaron complicaciones maternas, y los abortos o nacimientos de fetos muertos representaron el 1.4% del total. El porcentaje indicado representa una cifra considerada dentro de los límites de aborto espontáneo que puede ocurrir en cualquier embarazo.

3.- Aspectos Emocionales, Sociales, y Legales.

Anteriormente se mencionó que si se ha de efectuar la amniocentesis, la pareja deberá estar de acuerdo en proceder al aborto profiláctico en caso de obtenerse un resultado positivo. No obstante,

deberá respetarse cualquier decisión que ellos tomen una vez conocido el resultado, aún sabiendo que el producto está afectado.

El aborto ha sido un tema de controversia durante muchos años.⁸⁰ Antes de existir la posibilidad del diagnóstico in utero, se efectuaba como medio de control natal, o en casos en los que la vida de la madre estaba en peligro. Ahora que la Genética y la Citología nos facilitan la oportunidad de conocer la normalidad del feto en ciertos aspectos, es conveniente reconsiderar la situación.

Un aborto por razones genéticas no es fácilmente aceptado aún por personas no religiosas, y para muchas parejas implica una situación emocional difícil de sobrellevar. Bloomberg et. al.⁷ y Robinson et. al.⁵⁹ han hecho estudios psicológicos a un grupo de parejas que decidieron optar por el aborto debido al resultado de la amniocentesis. La mayoría de las madres y en ocasiones los esposos sufrieron depresión, ansiedad, y tuvieron sentimientos de culpa. Se observó que estas perturbaciones emocionales disminuían conforme pasaba el tiempo, aunque a veces se presentaban recurrencias meses después del aborto. Generalmente los abortos en estado de gestación más avanzado producían un impacto emocional mayor; el período de tiempo que resultaba crítico era el tiempo en el cual la madre sentía por vez primera los movimientos fetales.

Sin embargo, a pesar de su rechazo al aborto, la mayoría de las parejas aceptaron recurrir nuevamente al procedimiento en caso de ser necesario.

Erauer¹⁰ analizó el problema y expuso tres factores que influyen en una persona que se enfrenta a la toma de una decisión de este tipo:

- a) La decisión individual: aunque la decisión tomada por la pareja se basa en razones lógicas, ocurren reacciones emocionales pro-

fundas y personales que son producto de su tradición religiosa, cultura, sociedad, etc.

- b) La influencia del médico: la forma en que el médico o genetista presenta el problema y valora la evidencia es muy importante en ayudarles emocionalmente a sobrellevar la situación.
- c) La cuestión legal: en muchos países (incluyendo el nuestro) no está legalizado el aborto, aunque en la práctica puede estar tolerado.

Bloomberg et. al.⁷ sugieren que para aminorar estos trastornos — emocionales se deberá:

- a) Realizar la amniocentesis lo antes posible.
- b) Acortar el tiempo de 4 semanas requerido para el cultivo y estudio del cariotipo de las células fetales.
- c) Desarrollar técnicas alternativas para el aborto que no sean — tan traumáticas para la madre.
- d) Proporcionar consejo genético previo a la amniocentesis, incluyendo una explicación de las posibles reacciones psicológicas — que puedan presentarse.
- e) Proporcionar a las parejas que lo requieran algunas sesiones de higiene mental antes y después del proceso.

Otros investigadores han estudiado los aspectos sociales relacionados con la posibilidad de seleccionar cuáles fetos deberán continuar su desarrollo. Dorfman¹⁵ asegura que la amniocentesis como método diagnóstico de anomalías cromosómicas y genéticas tendría poca repercusión en la composición del género humano si se realiza sólo en embarazos a riesgo de dar a luz un niño afectado.

También deben analizarse los aspectos económicos y emocionales de aquellas parejas que ya tienen un hijo anormal. Un estudio realizado recientemente por Allen et. al.¹ indica que de 80 a 90% de —

los niños anormales son hijos de 5 a 10% de familias con algún factor que los predispone a estos padecimientos, y sugieren concertar la investigación en estas familias. Bloomberg et. al.⁷ afirman que aquellas parejas que han tenido un hijo anormal sienten vergüenza y culpabilidad así como una pérdida de la estimación a sí mismos. Para estas personas, el nacimiento de un niño sano representa un cambio total en su estado de ánimo y los ayuda a sobreponerse ante estos graves problemas emocionales.

En México, se calcula que 1 de cada 537 nacimientos resulta en un niño con Síndrome de Down,⁶⁹ Desgraciadamente nos enfrentamos ya no a un problema de alto costo para la educación de estos niños, - sino además a la falta de instituciones y de personal especializado para el manejo adecuado de estos casos.

En muchos países, principalmente en aquellos donde la industrialización ha alcanzado un gran desarrollo, el aborto se ha legalizado y se recurre a éste principalmente con fines de control natal. Es en estos países donde se iniciaron y se están aplicando las técnicas para el diagnóstico prenatal, por consiguiente, no han tenido que enfrentarse ante un problema legal al practicar abortos profilácticos, pero en otros países la cuestión legal sigue siendo un tema de controversia.

En México, el Lic. Núñez Castañeda⁵³ realizó una investigación sobre la situación legal del aborto profiláctico. Este no ha sido considerado por la legislación, y por consiguiente se le considera un acto punible, aunque generalmente no se persigue cuando se practica a solicitud de la madre y por especialistas facultados, en una institución de salud, debido a razones eugenésicas, de miseria, de familia numerosa, etc. Además, se sabe que miles de abortos se practican en forma clandestina, o que las mujeres llegan a hospitales de emergencia por haberse ellas mismas provocado el aborto, y no son denunciadas.

Nos enfrentamos entonces a una situación en la que lo que dice la ley que se debe de hacer, es muy diferente de lo que se está haciendo, ⁴⁹ Esto se atribuye principalmente a que las leyes vigentes no se han modificado de acuerdo a nuestra realidad. Sin embargo, se observa que el estado Mexicano permite el uso de medicamentos y dispositivos que impiden la implantación del óvulo; y que recientemente se ha modificado el artículo 4o. Constitucional que expresa: "Toda persona tiene derecho a decidir de manera libre, responsable e informada sobre el número y espaciamiento de sus hijos".

Así, el Lic. Núñez Castañeda ⁵³ afirma que el delito del aborto es inconstitucional si se interpreta este artículo en forma extensiva, y que el derecho de ejercer esta facultad debe ser por medios lícitos. Finalmente sugiere que además se debe establecer el número de personas que deben intervenir en la decisión (además de los padres), las normas relacionadas con la edad del feto, y otros detalles pertinentes.

CAPITULO II

A.- Líquido Amniótico.

Desde los primeros meses del embarazo el embrión flota en el líquido amniótico y su único contacto con el exterior es el cordón umbilical. Así, el embrión mantiene su forma y continúa moldeando su figura protegido por un "colchón" de agua que absorbe los golpes, iguala las presiones, evita la adherencia del saco amniótico, y le permite cambiar de posición.

1.- Procedencia.

No se ha determinado con certeza el sitio de procedencia del líquido amniótico ni los mecanismos involucrados en su formación. Antiguamente se pensaba que el líquido procedía del organismo materno y que su composición era muy similar al líquido extracelular de la madre. Estudios recientes en monos rhesus⁵⁶ demostraron que al inyectar Dioxrast I¹³¹ a la circulación de un feto vivo in utero, al poco tiempo se registra radioactividad en el líquido amniótico y ésta disminuye gradualmente; este fenómeno no se observa en fetos muertos in utero. Suponiendo que el iodo se elimina al igual que en adultos, por el riñón, estos datos sugieren que la microcirculación fetal contribuye en gran parte a la formación de líquido amniótico.

Lind et. al.⁵⁴ comprobaron que durante la primera mitad del embarazo el volumen de líquido amniótico guarda estrecha relación con el peso del feto y que su contenido de sodio y urea es más similar al del plasma fetal que al del plasma materno. Sugieren además que durante este tiempo la piel del feto actúa como una superficie que permite la difusión, y que el líquido amniótico no es sino una extensión del líquido extracelular del feto. A partir de las 20 ~~se~~

manas aproximadamente, desaparece la relación peso fetal-volumen de líquido amniótico y la piel del feto se hace impermeable al quedar constituidas todas las capas que la forman. El feto comienza a deglutir el líquido y su composición cambiará dependiendo de la absorción que se efectúa en los tractos intestinal y naso faríngeo, y de la regulación de líquidos que ocurre en los riñones fetales y en la placenta.

2.- Composición.

El líquido amniótico es una mezcla heterogénea formada por 98 a 99% de agua y por 1 a 2% de sólidos. La mitad de éstos son orgánicos, y de éstos la mitad son proteínas. Entre los sólidos restantes se encuentran dos tipos: sólidos organizados (células), y sólidos no organizados (productos derivados de la lisis celular, y sustancias derivadas del cordón umbilical, placenta, y amnios).

Cuando se toma una muestra de líquido amniótico, éste es representativa sólo en lo que se refiere al líquido que existe en ese momento y a las sustancias disueltas, pero no lo es en cuanto a las células y sustancias no disueltas. Estas se distribuyen en función de su densidad, peso específico del líquido amniótico, la posición y actividad anterior de la madre, los movimientos fetales, y el sitio de la punción. ^B

3.- Citología.

El líquido amniótico contiene células procedentes de la reposición celular que ocurre tanto en el feto como en la membrana del amnios y del cordón umbilical. Antes de 14 a 16 semanas se observan pocas células pero su número aumenta gradualmente hasta el final de la gestación.

Hoyes³³ describe dos tipos principales de células en el intervalo de 16 a 21 semanas de gestación.

- a) Células Tipo 1: aparecen a las 16 semanas, son redondas, con depósitos de glucógeno, nucleadas y tienen vellosidades en la superficie de la membrana celular. Posteriormente, sus membranas se vuelven dentadas, pierden glucógeno, su núcleo se hace picnótico y finalmente desaparece. Supone que éstas se derivan de la peridermis o capa superficial de la epidermis en formación, y del cordón umbilical.
- b) Células Tipo 2: son células más pequeñas, redondas, con núcleo excéntrico y aparato de Golgi bien desarrollado; en ocasiones se encuentran en grupos. Se observan algunas en división mitótica. Posteriormente, pueden presentar formas muy variables, su aparato de Golgi degenera y no se observan mitosis. No se conoce su origen pero se cree que son macrófagos de origen emi-
nético, capaces de dividirse in vitro.

Casadei et. al.¹¹ realizaron una descripción más detallada de los tipos celulares presentes entre las semanas 16 y 21 de gestación, y trataron de determinar su sitio de origen comparándolas con células obtenidas mediante frotis celulares de diversas partes del feto, placenta, amnios, y cordón umbilical.

- a) Células sin núcleo, poligonales y ovoides, con citoplasma translúcido.
- b) Células superficiales, muy parecidas a las anteriores pero con núcleo pequeño y picnótico.
- c) Células intermedias, poligonales y ovoides, con núcleo grande y citoplasma denso.
- d) Células parabasales, ovoides o cuboides, de citoplasma denso, con muchas vacuolas y núcleo grande.

e) Células amnióticas, que incluyen 6 tipos morfológicos pero cuyo núcleo es característico. Son núcleos pequeños, ovoides o irregulares, con pequeños hundimientos en su membrana. Estas células se encuentran aisladas, formando láminas, sincicios, o racimos.

Las células de los tipos a, b, y c, proceden de la mucosa oral. Las células de los tipos e, y b, que se encuentran formando láminas proceden de la piel del feto. Las células de los tipos d, y u, proceden de diferentes superficies del epitelio amniótico que reviste el saco amniótico. (Se considera que el epitelio amniótico cubre también el cordón umbilical).

Churchouse y Lanstone¹³ describen la presencia de unas "células - Satélite" que se encuentran sólo entre las semanas 16 y 37 de gestación, con una mayor concentración entre las semanas 24 y 29. Son células de descamación, con superficie irregular o con protuberancias lobulares. Su aparición coincide con el reemplazo de la epidermis aproximadamente durante la semana 26. Después se observa un gran número de células degeneradas con escasos organelos y en proceso de queratinización.

Bartman⁵ realizó estudios en los que utilizó el microscopio electrónico para observar las células cultivadas de líquido amniótico, con el fin de establecer si éstas son producto de una diferenciación fibroblástica o si son fibroblastos que provienen de las capas mesodérmicas y migraron hacia la cavidad amniótica. Aunque concluyó que es más probable que se trate de células ectodérmicas que durante el cultivo adquirieron características fibroblásticas, la evidencia a favor de esta hipótesis es altamente cuestionable.

B.- Cultivo de Células de Líquido Amniótico.

El cultivo de las células fetales que se encuentran suspendidas en el líquido amniótico es un proceso delicado. Se requiere trabajar

en condiciones adecuadas de temperatura, humedad, y pH durante un periodo de 2 a 4 semanas, para que aquellas pocas que se han adherido a la superficie de los frascos se reproduzcan en número suficiente para permitir el estudio que se pretende realizar.

El cultivo de estas células se ha realizado en diferentes instituciones en Estados Unidos y Europa desde que Steele y Berg ⁶⁸ y Thiede et. al. ⁷⁵ reportaron un método que permita cultivarlas para estudiar sus cromosomas. Todos estos laboratorios han desarrollado técnicas — particulares con variantes específicas para llegar a un objetivo: lograr un mayor éxito en cuanto a la obtención de un resultado válido para todos los líquidos procesados, en el menor tiempo posible entre la amniocentesis y la obtención de suficientes células en mitosis para la interpretación de su cariotipo.

En México, es la primera vez que se intenta hacer un estudio sobre las condiciones que permitan lograr el objetivo citado, y establecer una técnica estándar, confiable, y adecuada a nuestros recursos y necesidades. Los resultados preliminares de este estudio fueron publicados recientemente. ⁷⁹

1.- Factores que Determinan el Éxito del Cultivo.

A pesar de someter un número determinado de muestras de líquido amniótico a las mismas condiciones de cultivo, cada una de ellas se comportará de manera diferente. Esto depende de una serie de factores iniciales muchos de los cuales están hasta ahora fuera de control.

Sutherland y Bain ⁷⁰ y Hnsolt ²⁸ reportaron que este comportamiento diferente depende de la composición del líquido en cuanto a tipo y número de células, así como a las condiciones ambientales a las que es sometido. Entonces, es importante observar el comportamiento de las células procedentes de diferentes líquidos para intentar establecer los límites de variabilidad.

A continuación se expondrán algunos de los factores que se consideran importantes en la iniciación y proliferación de los cultivos - de las células de líquido amniótico.

a) Viabilidad.

Aunque los investigadores están de acuerdo en que el número total de células de origen fetal aumenta conforme progresa el embarazo, es difícil comparar las cifras proporcionadas para las células viables, ya que se emplean diferentes métodos para contarlas. El número de células viables puede variar en función - de los siguientes factores.

1) Edad Gestacional.

La cantidad de células viables es variable de paciente a - paciente, aún de la misma edad gestacional; sin embargo se reportan datos diversos al respecto.

Jacobson y Berter¹⁹ afirman que la viabilidad celular está relacionada con el tiempo de gestación y que los mejores cultivos se obtienen cuando se efectúa la amniocentesis entre las semanas 18 y 20 de gestación.

Warchant⁴⁷ reporta que el período gestacional en que se obtiene un mejor número de colonias es entre las semanas - 14 y 19.

Emery¹⁷ reporta la aparición de 2,000 a 3,000 células viables a partir de la semana 12 de gestación, registrándose un aumento significativo entre las semanas 13 y 16 (quizás correlacionado con los cambios que ocurren en la piel del feto), y después de la semana 20 (en que aparecen células cedentes del tracto urinario). Finalmente alcanzan un total de 160 a 180 x 10³ células totales, y de 25 a 30 x 10³ células viables. Esta observación se realizó sistemáticamente en 500 casos.

Wahlström⁸¹ reporta la observación de células viables entre las semanas 11 y 34; sin embargo, las cifras que presenta son muy variables y sólo se basa en 26 muestras de líquido amniótico.

Félix et. al.¹⁹ reportan que el número de colonias que se establecen en cultivo es independiente de la edad gestacional, y que de 2,000 células aproximadamente sólo una es capaz de proliferar in vitro.

ii) Tiempo de Siembra.

El tiempo que transcurre entre la toma de la muestra y la siembra afecta la viabilidad de las células. Estas no sufren alteraciones durante las primeras 24 horas; a los 5 días su viabilidad se reduce un 50%; y a los 12 días sólo quedan unas cuantas viables.⁸¹

iii) Congelación.

No parece existir en la literatura información a este respecto.

iv) Centrifugación.

Se centrifuga el líquido amniótico con el fin de concentrar en una menor superficie un número mayor de células. Cada laboratorio sigue uno de dos criterios: no centrifugar por temor a dañar las células viables, ó centrifugar a diferentes velocidades y tiempos que van desde 25 a 1,000 rpm por 5 a 10 minutos.

Gray et. al.²⁷ realizaron un estudio y demostraron que el proceso de centrifugación puede afectar la viabilidad de las células. Sometieron 35 muestras de líquido amniótico a 1,000 rpm x 10 min. y en 14 casos no obtuvieron crecimiento satisfactorio. Centrifugaron 50 muestras a 65 g x 5 min. y las sembraron en tres medios de cultivo; obtuvieron buen crecimiento en todos los casos. Sembraron 35

muestras sin centrifugar y obtuvieron buen crecimiento en - todas ellas, aún utilizando el mismo líquido amniótico como medio de cultivo. Sin embargo, la mayoría de los investigadores sí centrifugan sin encontrar disminución en la viabilidad celular.

b) Células Muertas.

Las células muertas que se encuentran en el líquido amniótico — producen sustancias tóxicas como resultado de procesos de autólisis. Mahistrón ⁸² afirma que aunque las células viables se acohieren a la superficie en presencia de células muertas, las células viables no se reproducen. Por eso es conveniente retirar — las células muertas al menor tiempo posible, especialmente si se observan en grandes cantidades.

c) Tamaño y Tipo de Recipientes.

Al iniciarse el cultivo de células se utilizaron recipientes de vidrio, pero ahora se utilizan con mayor frecuencia recipientes de plástico desechable en diferentes tamaños, que han sido tratados especialmente para facilitar la adherencia de células a la superficie.

Marchant ⁴⁷ y Nelson y Emery ⁵¹ realizaron experimentos utilizando ambos tipos de recipientes, y no encontraron relación entre el tipo de recipiente y el crecimiento celular. Marchant observó que los sistemas cerrados (frascos Falcon, tubos Leighton, o frascos de vidrio con tapón), son preferibles a los sistemas abiertos (cajas de petri), porque disminuyen la posibilidad de contaminación. Nelson y Emery obtuvieron mejores resultados utilizando sistemas abiertos.

d) Medios de Cultivo.

Los medios de cultivo empleados para las células de líquido amniótico son muy diversos. Algunos investigadores como Gray et. al. ²⁷ utilizan el mismo líquido amniótico como medio de cultivo, y al compararlo con otros tres (F₁₀, MEM, y RPMI₁₆₄₀ suplementados con suero bovino fetal), obtienen mejores resultados - utilizando el líquido amniótico libre de células y esterilizado por ultrafiltración. Reportan además la observación de suficientes mitosis en 5 a 10 días, y el establecimiento de 23 cultivos de fibroblastos que fueron subcultivados de 1 a 12 veces, se congelaron y se volvieron a cultivar, observándose buen crecimiento.

La mayoría de los investigadores utilizan una variedad de medios comerciales, algunos de éstos modificados por la adición de otros elementos y suplementados con suero bovino fetal. Entre los medios más utilizados figuran: MEM, F₁₀, Dulbecco's, - Dulbecco-Vogt, y Mc Coy.

e) Tipo y Concentración de Suero.

El tipo de suero más utilizado para el cultivo de células es el suero bovino fetal, en concentraciones que van de 10 a 30%. Sin embargo, algunos investigadores como Harvill ²⁸ han utilizado suero humano y reportan resultados favorables en cuanto al tiempo en que se obtienen suficientes mitosis para el estudio del cariotipo, pero no reportan un incremento en la densidad celular. Gray et. al. ²⁷ utilizan suero humano al 10% agregándole un filtrado de embrión de becerro, pero no obtienen resultados significativamente superiores. Nelson y Emery ⁵¹ reportan no encontrar diferencias al utilizar suero bovino fetal, suero de neonatos, caldo de fosfato con triptosa, o extracto de embrión de pollo, como suplementos al medio de cultivo.

Además, se han hecho estudios para determinar la concentración óptima de suero bovino fetal para promover el crecimiento rápido de las células fetales suspendidas en el líquido amniótico. Marchant ⁴⁷ no registró diferencias significativas al utilizar 5%, 7.5%, y 15% de este suero.

Félix et. al. ¹⁹ realizaron un estudio sistemático en el que se contó el número de colonias y se midieron sus diámetros para determinar de manera cuantitativa la concentración óptima de suero bovino fetal. Reportaron no haber observado diferencias importantes al utilizar concentraciones de 15%, 20%, y 30%, pero sí registraron una diferencia significativa entre 5% y 10%, así como entre 10% y 15% de suero bovino fetal. Establecieron que un 15% de éste es suficiente para promover buen crecimiento celular.

Se ha dudado además de la similitud de lotes diferentes de suero bovino fetal respecto a su capacidad de promover crecimiento celular. Debido a que éstos se derivan de fetos que no son genéticamente idénticos, resultaría razonable pensar que pueden existir diferencias que se manifiesten en la estimulación desigual de las células fetales de una misma muestra de líquido amniótico.

Se reportan en la literatura comentarios diferentes al respecto: Nelson y Emery ⁵¹ afirman que no se conoce si los factores promotores del crecimiento celular están en la cantidad y calidad deseadas en todos los lotes de suero. Félix et. al. ¹⁹ afirman también que no todos los lotes de suero bovino fetal promueven adecuadamente el crecimiento celular, y utilizan para sus cultivos sólo aquellos que hubieran sido probados anteriormente en células diploides humanas. Rodiger ⁶⁰ también observa que cada lote de suero bovino fetal es diferente, por lo cual las

comparaciones en cuanto a crecimiento celular resultan difíciles si no se toma en cuenta esta variable.

En cambio Hesholt ²⁸ no encontró diferencias significativas en el crecimiento celular que pudieran relacionarse con el lote de suero empleado.

Gospodarowicz et. al. ²⁶ reportan que la diferencia en la efectividad al promover el crecimiento celular puede ser debida a la proporción en que los factores de crecimiento (Fibroblast — Growth Factor y Epidermal Growth Factor) se encuentran en cada lote de suero bovino fetal.

Horn et. al. ³² realizaron un análisis químico de los constituyentes del suero bovino fetal en lotes diferentes de un mismo proveedor y en sueros de diferentes proveedores. Encontraron una gran variabilidad en la concentración de un número considerable de elementos y compuestos, en todos los casos. Sugieren una cuidadosa evaluación de los resultados cuando se utilizan diferentes lotes de suero.

f) Contaminación Microbiana.

Este es otro factor que influye en forma importante en el éxito del cultivo. Aunque se ha demostrado que el líquido amniótico posee propiedades antibacterianas, ^{18, 48} los medios de cultivo, tan ricos en nutrientes y conteniendo suero bovino fetal, permiten la rápida multiplicación de una amplia gama de microorganismos, principalmente Mycoplasma (P.P.O.), bacterias y hongos.

La presencia de Mycoplasma es difícil de detectar en cultivos, aunque se ha demostrado que pueden producir alteraciones en los cromosomas. Schneider et. al. ⁶¹ describen rupturas, separaciones, aneuploidías, poliploidías, translocaciones, etc., —

sin observar alteraciones en el crecimiento o la morfología celular.

Las bacterias y hongos si producen alteraciones que limitan o impiden la división celular, debido a la gran cantidad de sustancias tóxicas que liberan al medio de cultivo.

El uso de antibióticos y fungicidas ayudan a prevenir la contaminación, pero debido a su uso en tan pequeñas cantidades para no producir toxicidad celular, resulta inútil emplearlos cuando existe un gran número de estos organismos. Además, su uso presenta un inconveniente porque pueden "enmascarar" la presencia de Mycoplasma que no es susceptible a la mayoría de los antibióticos. Este organismo contaminante puede además alterar las características bioquímicas de las células fetales.

5) Adición de Sustancias que Incrementan el Índice Mitótico.

Algunos investigadores han intentado agregar sustancias que pudieran aumentar significativamente el número de mitosis en los cultivos de cultivo. Knorr-Carter y Parle⁴² y Haholt²⁸ emplean rutinariamente altas concentraciones de glutamina en el medio de cultivo MEM. Wilson y Imery⁵¹ demostraron que tanto la suero como la orina dializada de pacientes leucémicos, y el mismo líquido amniótico, no producen diferencias en el crecimiento celular; la orina dializada sólo produjo la adherencia de un mayor número de células.

Rudiger⁶⁰ reportó que mediante la adición de 5% de orina concentrada de individuos normales es posible estimular el crecimiento celular.

Por último, Gospodarowicz et. al.²⁶ observaron que al aislar un factor de crecimiento del cerebro de bovinos (Fibroblast

Growth Factor), y un factor de crecimiento de las glándulas submaxilares de ratones sometidos a tratamiento con testosterona - (Epidermal Growth Factor), y agregarlos al medio de cultivo en pequeñas cantidades, se produce un incremento considerable en la actividad mitótica de las células fetales de cultivos ya establecidos. También observaron este efecto en cultivos primarios, y aunque estos factores no influyen sobre el número de células que se adhieren, una vez adheridas, se reproducen más rápidamente. Sugiere que las diferencias observadas por otros investigadores, respecto a la estimulación producida por los diferentes lotes de suero bovino fetal, se debe a la concentración desigual de estos factores en cada lote de suero, y que no es posible determinar cuantitativamente. Supone además que estos factores reducen el tiempo necesario para que se lleve a cabo el período G₁ del ciclo celular. Cabe señalar que este trabajo no ha sido aún reproducido por investigadores diferentes.

2.- Métodos para Determinar el Éxito del Cultivo.

Debido a que cada líquido amniótico presenta características particulares y variables en cuanto al tipo de células presentes, al tiempo necesario para el establecimiento de colonias en cultivos primarios, al tiempo en que se obtienen suficientes mitosis para subcultivar o efectuar estudios cromosómicos o bioquímicos, se ha intentado evaluar el éxito de un cultivo en base a tres criterios:

a) Número de Colonias.

Morgan²⁷ mejora la eficiencia de sus cultivos en base al número de colonias observadas a los 7 días. Moehn et. al.³⁰ registran el número de colonias establecidas en 10 a 11 días. Félix et. al.¹⁹ determinan el éxito de sus cultivos el día 14 mediante la fijación con metanol y tinción con azul de toluidina, para contar el número de colonias, medir sus diámetros, y obtener una cifra por cada mililitro de líquido amniótico.

En general, se observa la aparición de células aisladas en 1 ó 2 días, y la aparición de colonias en 3 a 6 días después de la siembra; aunque Hesholt ²⁸ reporta la aparición de colonias en un período de 5 a 15 días.

b) Tiempo Necesario para Efectuar Estudios Cromosómicos.

Este método resulta un tanto más difícil de aplicar ya que el tiempo que transcurre entre la siembra y la observación de suficientes mitosis para el estudio del cariotipo dependerá del tipo predominante de colonias que se establezcan, y del método utilizado para la expansión y tinción de los cromosomas. Si se efectúa in situ, no es necesario esperar a tener un número considerable de mitosis, sino al contrario: para obtener una buena expansión y separación entre los cromosomas, es preferible que las colonias no hayan llegado a confluencia.

Gray et. al. ²⁷ reportan haber observado cariotipos in situ en 5 a 7 días después de la siembra, Cederqvist et. al. ¹² en 4 días, y Hoenn et. al. ³¹ en 11 días.

Prevott et. al. ⁵⁷ reportan la observación de cariotipos de células en suspensión en un lapso de 14 a 44 días con un promedio de 26.9 días. Singh et. al. ⁶⁶ emplean el mismo método y observan cariotipos a los 12 días después de la siembra, pero utilizaron para el cultivo de las células fetales los pozos 'Microtest II'.

c) Índice vitótico.

Es un método que se basa en contar el número de mitosis por cada 100 células, en las laminillas en las que se ha efectuado la expansión y tinción de los cromosomas.

3.- Tipos Celulares que se Establecen en Cultivo.

Como se mencionó anteriormente, el líquido amniótico contiene una variedad de células, la mayoría de las cuales no son visibles. Independientemente de que las muestras de líquido amniótico se centrifuguen o no, y que se utilice uno u otro medio de cultivo, o de suero en concentraciones de 15% a 30%; la mayoría de los investigadores están de acuerdo en que se establecen colonias de tres tipos: fibroblásticas, epitelioideas, y un tipo mixto denominado "célula de líquido amniótico" (AF) cuya morfología es intermedia entre las dos primeras.³¹

Es posible diferenciar estos tipos celulares no sólo por su morfología que es muy característica, sino también por la proporción de colonias que de cada tipo se establecen, por su velocidad de división, por su facilidad para ser subcultivadas, por el número de pasajes o subcultivos que se pueden efectuar, e inclusive por algunas diferencias bioquímicas.

Además de estos tres tipos celulares, también se ha reportado la presencia de macrófagos⁷¹ que degeneran rápidamente y que en ocasiones pueden ser de origen materno.

Mercant⁴⁷ relacionó el tipo de células que predominaron en sus cultivos con la edad gestacional. Afirma que en muestras de líquido amniótico obtenidas entre las 12 y 14 semanas predominan las colonias de fibroblastos y es fácil establecer líneas celulares. A partir de las 14 semanas se establecen colonias de células epitelioideas y mixtas, de las 16 a las 19 semanas predominan las colonias de células mixtas, y de las 22 semanas en adelante se encuentran los tres tipos.

Sutherland et. al.⁷¹ describieron 5 tipos celulares: Macrófagos, Epitelioide I, Epitelioide II, Epitelioide III, y Fibroblastoide.

Las células Epitelioides II y Epitelioides III corresponden por su morfología al tipo "célula de líquido amniótico" (AF) descrito anteriormente. Además, afirman que el tipo celular que predomina no está relacionado con la edad gestacional sino que depende del sitio de procedencia de las células, y que el éxito del cultivo dependerá del diferente potencial de sobrevivencia de cada uno de los tipos celulares.

Por lo que respecta a los porcentajes en que se establecen cada uno de los tipos celulares, los investigadores coinciden en que los cultivos primarios contienen una menor proporción de fibroblastos, pero debido a su facilidad para ser subcultivados y a su velocidad de división, éstos pronto superan a las colonias de otros tipos.

Moern et. al. ³⁰ reportaron los siguientes porcentajes: colonias de células mixtas (AF) 66.5%, colonias de células epitelioides — 24.7%, y colonias de fibroblastos 8.8% en 20 muestras de líquido amniótico. En otro estudio que incluyó 418 muestras de líquido ³¹ se observaron proporciones similares; las células mixtas (AF) aparecieron en todos los cultivos y constituyeron el 60.8% de las colonias, las células epitelioides aparecieron en el 31.3% de los cultivos y constituyeron el 33.7% de las colonias, los fibroblastos sólo aparecieron en una tercera parte de los cultivos y formaron un número reducido de colonias.

Hasholt ²⁸ no proporcionó cifras, pero reportó la predominancia de células epitelioides en todos sus cultivos primarios (no reconoció el tipo mixto), seguida por la predominancia de fibroblastos después de 1 ó 2 subcultivos.

Con respecto a las enzimas producidas por estas células, Gerbie et. al. ²⁴ encontraron diferencias en la síntesis de dos enzimas. Pero las células epitelioides reportaron la presencia de histidasa,

y para los fibroblastos una mayor cantidad de cistationina sintética. Reportaron además que los fibroblastos contienen una mayor cantidad de proteína y que los niveles específicos de actividad enzimática varían conforme avanza la edad gestacional. Además, esta actividad varía significativamente en las células suspendidas en el líquido amniótico, en las células de la piel del feto, y en las células de la piel materna.

C.- Cariotipo de las Células de Líquido Amniótico.

La observación y estudio del cariotipo representan la fase final del proceso de Diagnóstico Citogenético Prenatal cuando se sospecha que el feto pueda presentar alguna anomalía cromosómica.

1.- Métodos.

Un cariotipo es la constitución cromosómica de una célula y se determina en la metafase del ciclo celular. Para la observación del cariotipo se agrega una sustancia (colomicina) que es capaz de evitar la migración de los cromosomas homólogos hacia los polos durante la anafase, por la destrucción del huso acromático. Posteriormente, mediante la adición de una solución hipotónica se logra que la célula absorba agua, lo cual permite a los cromosomas ocupar un mayor espacio y separarse unos de otros. En esta forma es posible contarlos e identificarlos según la clasificación establecida en Denver en 1960, así como estudiarlos en detalle por métodos que hacen aparecer bandas características para cada cromosoma.

Para la inmovilización y expansión de los cromosomas de las células suspendidas en el líquido amniótico, y que han sido cultivadas, se utilizan principalmente dos métodos:

a) Cariotipo In Situ.

Este método consiste en someter a las células a todo el proceso

sin desprenderlas del sitio donde se han adherido. Presenta algunas ventajas como son: permite el análisis cromosómico de las células que formaron la colonia a partir de una o dos células iniciales, lo cual facilita el diagnóstico en casos de mosaicismos, se puede estudiar el cariotipo en un menor tiempo (4 a 14 días) porque se requiere un número menor de células, y éstas no sufren daño al ser desprendidas. La principal desventaja que presenta este método es que no siempre se obtienen metafases de buena calidad, porque al estar muy cerca las células entre sí, no permiten la expansión deseada de los cromosomas y su estudio resulta un tanto más difícil.

b) Cariotipo de Células en Suspensión.

Este método consiste en someter a las células a la colonicina cuando están aún adheridas al frasco de cultivo, luego se desprenden del mismo y se continúa el proceso utilizando la suspensión celular. Las ventajas de este método son: se obtienen metafases de mejor calidad que además de ser utilizadas en estudios rutinarios, pueden someterse a estudios más finos que permiten la observación de bandas G, C, F, G, etc. Las desventajas de este método son: se requiere un mayor tiempo para la obtención de suficientes células ya que muchas se pierden en el proceso, y resultaría más difícil la detección de un mosaico fetal porque no es posible identificar las células que formaron las diferentes colonias.

c) Cariotipo de Células no Cultivadas.

Hughes y Pink³⁷ intentaron estudiar los cariotipos de células no cultivadas de líquido amniótico. Reportaron resultados en 2 de 3 casos, pero no explican el método empleado, ni se encuentran reportes similares en la literatura a partir de ese fecha. Obviamente, en el líquido amniótico es posible encontrar algu-

nas células en mitosis, pero probablemente no las suficientes — para emitir un diagnóstico confiable.

2.- Interpretación del Cariotipo.

Si la muestra de líquido amniótico no presenta sangre materna, si — durante el cultivo las células fetales no sufrieron contaminación — microbiana, y todas las células examinadas rutinariamente presentan el mismo número y tipo de cromosomas, es difícil pensar que pudiera darse un diagnóstico equivocado; tanto para los fetos cromosómicamente normales como para los que presentan alguna aberración (principalmente trisomías, monosomías, translocaciones balanceadas y no balanceadas, etc.). Sin embargo en algunas ocasiones se ha reportado la presencia de un número variable de células que difieren de — las demás, pero cuyas anomalías no siempre reflejan la constitución genética del feto en gestación. Se han descrito las siguientes:

a) Poliploidías.

Las poliploidías (especialmente tetraploidías), son comunes en — células cultivadas de líquido amniótico y generalmente la presencia de éstas no se asocia a un feto anormal. Además, Walker et. al. ⁸³ estiman que es más común la observación de poliploidías — en células epitelioides ya que se requiere un mayor tiempo para la observación de su cariotipo. Tegenkamp y Hux ⁷⁴ en cambio, — reportan un mayor índice de células poliploides en los fibroblastos y además estiman que su número varía en relación al número — de estas colonias por cultivo.

b) Hiperdiploidías e hipodiploidías.

Rara vez se encuentran hiperdiploidías, es más común hallar hipodiploidías, ya que la pérdida de cromosomas puede ocurrir con cierta facilidad durante el proceso para obtener el cariotipo.

Atkins et. al.³ reportan la observación de 196 metafases con - 43 a 48 cromosomas en un estudio de 432 fetos cromosómicamente normales.

c) Mosaicismo.

El mosaicismo es un fenómeno que se ha observado en diversos -- cultivos de células fetales, y continúa manifestándose al aumentar el número de amniocentesis practicadas. Resulta difícil estimar la posibilidad de la existencia de un verdadero mosaico fetal cuando aparecen algunas células aneuploides en el cultivo.

Sutherland et. al.⁷² afirman que cuando se descubren dos o más poblaciones celulares en un cultivo de líquido amniótico, existen las siguientes posibilidades:

- i) Se trata de un embarazo gemelar.
- ii) Si una de éstas es 46XX es posible que sean células maternas.
- iii) Que el feto no sea un mosaico pero por alguna razón se observó el cariotipo de una clona modificada.
- iv) Que el feto sea un verdadero mosaico.

En las publicaciones revisadas se describen algunos casos en los que se observó la presencia de líneas celulares que en última instancia no correspondían a la constitución fenotípica ni genotípica del feto.

Kardon et. al.⁴⁰ reportaron la observación de sólo una línea celular 45X0 en un primer cultivo de células de líquido amniótico. Mediante estudios de fluorescencia no fue posible identificar el cromosoma Y, pero se sospechó de una posible translocación de éste a los brazos cortos del cromosoma 13. Al efectuarse el aborto de un feto fenotípicamente normal, se cosecharon -

sólo células 46XY de un segundo cultivo. La técnica de fluorescencia no reveló la posible translocación D/Y, y no fue posible estudiar el cariotipo de los fibroblastos de la piel del feto.

Atkins et. al. ³ reportaron un mosaico 46XY/47XXY con dos cromosomas X anormales y un cromosoma Y normal en un primer cultivo de células de líquido amniótico. Al nacer un niño fenotípicamente normal, los estudios citogenéticos efectuados en linfocitos, y en fibroblastos revelaron la presencia de una sola línea celular 46XY.

Sin embargo, también ha sido posible la detección in utero de algunos casos de mosaicismo verdadero, los cuales fueron confirmados posteriormente.

Alom et. al. ⁶ reportaron el primer caso de mosaicismo total detectado in utero. Se trata de un mosaico 46XX/47XX + 13. El diagnóstico se confirmó al efectuar estudios citogenéticos en un feto fenotípicamente normal.

Gutherland et. al. ⁷² describieron 6 casos de mosaicismo en cultivos de células fetales suspendidas en el líquido amniótico, pero sólo en uno de ellos se pudo confirmar el diagnóstico. Se trata de un mosaico 46XY/47XY + var (cromosoma metacéntrico pequeño adicional). Al nacer un niño fenotípicamente normal, se confirmó el diagnóstico mediante estudios citogenéticos realizados en la piel, cordón umbilical, amnios, y sangre del cordón umbilical.

Hsu et. al. ³⁴ reportaron un caso de mosaicismo 45XO/46XY. Observaron el cariotipo 45XO en el 80% de las células cosechadas de dos frascos diferentes. Los estudios citogenéticos realizados en un neonato fenotípicamente normal revelaron la presencia de células aneuploides en 26% de los linfocitos observados, y en

56% de los fibroblastos cosechados de una biopsia de piel. Estudios fluorescentes de bandas Q demostraron la ausencia de la banda fluorescente del cromosoma Y, lo cual hace suponer que ésta estaba predispuesto a sufrir un retraso en la migración durante la anafase.

No se sabe por qué razones aparecen clones modificadas en las células cultivadas de líquido amniótico. Sutherland et. al. ⁷² observaron 6 casos de mosaicismo en un período de 2 meses. Podría ser una coincidencia o deberse a algún factor en el medio de cultivo que ocasionó estas aneuploidias (excepto un caso de mosaicismo 46XY/46XX atribuido a contaminación materna, y el verdadero mosaico descrito anteriormente), ya que en 200 amniocentesis practicadas en un período de 3 años no se había observado ningún caso similar.

3.- Errores en el Diagnóstico Citogenético Prenatal.

A pesar de que actualmente se logra un alto porcentaje de éxito en el Diagnóstico Citogenético Prenatal, se han reportado algunos errores que son causa de preocupación para los investigadores. Estos pueden ser debidos a:

a) Contaminación Materna.

Cuando al hacer una punción para obtener el líquido amniótico se atraviesa la placenta o algún vaso materno, la muestra de líquido puede contener células maternas (probablemente linfocitos o macrófagos) que en teoría podrían proliferar en el cultivo y causar confusiones; aunque en la práctica este factor de error parece casi nunca presentarse.

Hsu et. al. ^{35, 36} reportaron haber detectado la presencia de macrófagos (células muy grandes que se adhieren rápidamente y -

presentan capacidad fagocítica], en un cultivo de células de líquido amniótico. Se comprobó su presencia ya que al agregar tactolstex, se observó una fagocitosis masiva. Sin embargo, estudios más detallados revelaron que las células que crecieron en el cultivo y a las que se les determinó el cariotipo, eran fetales y no maternas.

Simpson et. al. ⁶⁵ reportaron dos casos en los que se diagnosticaron dos fetos 46XX cuando éstos eran 46XY. Se atribuyó este error a una posible contaminación con células maternas. Hauge et. al. ²⁹ describen una técnica para determinar en casos en los que existe duda, si los cromosomas estudiados son fetales o maternos. Se someten los cromosomas a mostaza de quinacrina, se observan marcas fluorescentes en ciertos sitios de determinados cromosomas, y aunque todos los fetos presentan la misma fluorescencia que sus madres en cada uno de los cromosomas homólogos, se observa una discrepancia mínima de 2 y máxima de 9 marcas entre los cromosomas fetales y maternos.

Peakman et. al. ⁵⁵ también reportan una técnica que es útil para esclarecer casos en los que se sospecha de contaminación materna. Se utiliza la técnica de fluorescencia para la identificación del cromosoma Y en las células no cultivadas de líquido amniótico. Si el resultado es Y positivo y sólo se cosechan células 46XY del cultivo celular, entonces se utiliza la técnica fluorescente de polimorfismo Q descrita por Hauge, y se comparan los cromosomas de las células cultivadas con los cromosomas de linfocitos maternos sometidos a la misma técnica.

b) Causa desconocida.

Katayama et. al. ⁴¹ reportaron dos errores en el diagnóstico Citogenético Prenatal. El primero fue un resultado falso negativo; se observaron sólo células 46XY en el cultivo, pero nació -

una niña $47XX + G_{21}$. Los autores reportaron haber descartado como posibles fuentes de error el intercambio de muestras de líquido amniótico, la pérdida de un cromosoma X aunada a la confusión de un cromosoma Y por un G (estudios posteriores revelaron la existencia de cromatina Y fluorescente). Katayama⁴¹ sugiere que se haya tratado de un embarazo gemelar no detectado en el que el feto cromosómicamente normal fuera reabsorbido, ya que la probabilidad de que se lleve a cabo una modificación en el cariotipo mismo de un cultivo celular es muy remota. El segundo fue un resultado falso positivo; se observaron dos líneas celulares $46XX/47XX + C$ en el cultivo primario y nació una niña normal cuyo genotipo se confirmó al estudiar las células de sangre periférica y de piel. Se cree que la línea celular $47XX + C$ apareció como consecuencia de una contaminación fungal ocurrida en el cultivo, ya que este cariotipo es letal.

CAPITULO III

A.- Material.

1.- Soluciones Empleadas en la Preparación de los Medios de Cultivo.

a) Antibióticos de Eagle. (100x)

Penicilina G. Potásica (Squibb)	1 x 10 ⁶ U.I.
Estreptomicina SO ₄ ^m (Sovito)	1.2 g.
Aureomicina (Cyanamid)	0.025 g.
H ₂ O D ³	100.0 ml.

b) Nucleósidos sin Guanosina. (100x)

Adenosina (Calbiochem)	1.5 g.
Tiridina (Calbiochem)	1.5 g.
Uridina (Calbiochem)	1.5 g.
Citidina (Calbiochem)	1.5 g.
Paja Fenol 1% (Merck)	0.15 ml.
H ₂ O C ²	1,000.0 ml.

c) Guanosina. (33x)

Guanosina (Calbiochem)	0.5673 g.
Paja Fenol 1% (Merck)	0.125 ml.
H ₂ O C ²	1,000.0 ml.

d) Acido Ascórbico 1%

Acido Ascórbico (Sigma de México)	1.0 g.
H ₂ O D ²	100.0 ml.

e) Piruvato de Sodio. (200 m³)

Piruvato de Sodio (Calbiochem)	2.2 g.
H ₂ O D ²	200.0 ml.

Preparación: Cada solución se prepara y filtra separadamente. - En un matraz Erlenmeyer se colocan los reactivos sólidos, se agrega el agua y el indicador. Se coloca una barra magnética y con agitación suave se mezcla bien. Se filtra a presión (o vacío para los antibióticos) a través de un filtro Millipore estéril con poros de 0.22 μ de diámetro, y se conservan en condiciones estériles en refrigeración. Los antibióticos y el ácido ascórbico se protegen de la luz con papel estaño y se congelan.

2.- Medios de Cultivo.

a) Medio de Dubbecco con 20% de Suero Bovino Fetal.

Medio de Dubbecco en polvo (Gibco)	10.0 g.
NaHCO ₃ (Mallinkrodt)	2.2 g.
Antibióticos de Eagle (100x)	10.0 ml.
Suero Bovino Fetal (Microbiological Associates o Biocel, S.A.)	200.0 ml.
H ₂ O D ²	790.0 ml.

b) Medio Mínimo de Eagle Modificado con 20% de Suero Bovino Fetal.

MEM en polvo (NABI)	9.8 g.
NaHCO ₃ (Mallinkrodt)	2.2 g.
Piruvato de Sodio (200 mM)	5.0 g.
Nucleósidos sin Guanosina (100x)	10.0 ml.
Guanosina (33x)	30.0 ml.
Antibióticos de Eagle (100x)	10.0 ml.
Suero Bovino Fetal (Microbiological Associates o Biocel, S.A.)	200.0 ml.
H ₂ O D ²	750.0 ml.

Preparación: En un matraz Erlenmeyer se coloca el agua y se agregan los reactivos sólidos excepto el NaHCO₃. Se agregan - (en condiciones estériles) las soluciones que han sido preparadas previamente y calentadas en baño de agua a 37 °C. En la -

misma forma se agrega el suero bovino fetal. Se coloca una barra magnética y se agita a velocidad baja por 10 min. Se agrega el NaClO_3 y se continúa agitando suavemente hasta que éste se disuelva. Se ajusta el pH a 7.2, se filtra por presión a través de un filtro Millipore estéril de 0.22 μ de diámetro, y se conserva en condiciones estériles en refrigeración.

c) Control Microbiológico.

De cada frasco con medio de cultivo se toman 2 ml (por duplicado) y se colocan en tubos respectivos con medio de Cerebro Corazón. Se incuban a 37 °C por 15 días antes de emplear el medio, para comprobar que éste no contenga bacterias y/u hongos. Este procedimiento se puede repetir en cualquier ocasión en que se dude de la esterilidad de los medios de cultivo o de otras soluciones.

Medio de Cerebro Corazón.

Brain Heart Infusion (Gibco)	37.0 g.
H ₂ O Q	1,000.0 ml.

Preparación: Se coloca el medio en un matraz Erlenmeyer y se agrega el agua. Se agita suavemente utilizando una barra magnética hasta que éste se disuelva. Con una jeringa Corneall o con una pipeta se colocan de 5 a 7 ml del medio en tubos de vidrio con tapón. Se esterilizan éstos en autoclave y se conservan a temperatura ambiente hasta ser utilizados.

3.- Soluciones Empleadas para Desprender Células.

a) Solución de Verseno.

EDTA (Sigma de México)	1.006 g.
NaCl (Mallinkrodt)	4.0 g.
KCl (Mallinkrodt)	2.0 g.

Tris Base (Sigma de México)	1.5 g.
Rojo Fenol 1% (Merck)	0.50 ml.
H ₂ O D ²	500.0 ml.

b) Solución de Tripsina.

Tripsina (Merck)	0.63 g.
Solución de Versano	250.0 ml.

Preparación: En un matraz Erlenmeyer se colocan los reactivos sólidos (para la solución de Versano), se agrega el agua y el indicador. Se coloca una barra magnética y se agita suavemente hasta que se disuelva bien. En otro matraz Erlenmeyer se colocan 250 ml de la solución de Versano, se agrega la Tripsina, se disuelve ésta en la misma forma. Se ajusta el pH de las soluciones a 7.8. Se filtra primero el Versano y después la Tripsina por presión a través de un filtro Millipore estéril con poros de 0.22 μ de diámetro, y se conservan en condiciones estériles en refrigeración.

c) Control Microbiológico.

Se sigue el mismo procedimiento indicado para los medios de cultivo.

4.- Soluciones Empleadas para la Inmovilización, Expansión, Fijación, y Tinción de los Cromosomas.

a) Colcemid (Gitco 10 mcg/ml)	0.05 ml.
-------------------------------	----------

Se toma una jeringa de 0.5 ml con aguja # 27 y en condiciones estériles se extrae 0.05 ml. de Colcemid por cada mililitro de medio de cultivo.

b) Solución Hipotónica. (3:1 Citrato de Sodio 0.9% y KCl 0.07 N).

Citrato de Sodio (Merck)	0.270 g.
H ₂ O D	30.0 ml.
KCl (Mallinkrodt)	0.0522 g.
H ₂ O D	10.0 ml.

Preparación: Se coloca cada reactivo en un matraz Erlenmeyer diferente y se agrega el agua. Se preparan estas dos soluciones y se mezclan en la proporción 3:1. Es preferible preparar la solución pocas horas antes de ser utilizada y mantenerla en baño de agua a 37 °C.

c) Fijador Carnoy. (3:1 Metanol y Acido Acético).

Metanol (Baker Analyzed)	30.0 ml.
Acido Acético (Baker Analyzed)	10.0 ml.

Preparación: Se colocan en una probeta los reactivos y se mezclan bien. Se usa el fijador preparado el mismo día.

d) Giemsa 5x

Giemsa (Merck)	5.0 ml.
H ₂ O D	95.0 ml.

Preparación: Se disuelve el colorante en el agua y se pasa a través de un papel filtro (Whatman # 1).

5.- Material Empleado para el Cultivo, Manipulación, y Observación de las Células.

a) Pipetas de 0.1 a 10.0 ml.

Pipetas Pasteur con y sin algodón.

- vi) Poner en detergente para laboratorio Extrán (Merck) ó 7X por 24 horas.
 - vii) Enjuagar con agua de la llave por 2 horas en el pipetero de metal.
 - viii) Enjuagar bien en un pipetero con agua deionizada, 5 veces y repetir con un nuevo cambio de agua deionizada.
 - ix) Secar en el horno.
 - x) Poner algodón a las pipetas, colocarlas en bolsas, y sellarlas con papel indicador.
 - xi) Autoclavearlas por 30 min. en escape rápido y secado.
- b) Procedimiento para Lavar los Frascos de Cultivo y las Cajas de Petri.
- i) Lavar todas las superficies interiores y exteriores con agua de la llave.
 - ii) Llenar con Extrán ó 7X caliente y restregar en forma muy completa, hasta quedar bien limpios.
 - iii) Enjuagar 5 veces con agua de la llave.
 - iv) Autoclavearlos por media hora en una solución al 1% de Na_2EDTA .
 - v) Enjuagar 5 veces con agua de la llave.
 - vi) Autoclavear por media hora en una solución al 1% de Extrán ó 7X.
 - vii) Cuando se enfríen, cepillar con escobillón por 2 min. — usando el mismo Extrán ó 7X que se usó para autoclavar.
 - viii) Enjuagar 5 veces con agua de la llave.
 - ix) Enjuagar toda la noche con agua corriente de la llave.
 - x) Enjuagar 3 veces con agua destilada.
 - xi) Enjuagar 2 veces con agua bidestilada.
 - xii) Secar en autoclave.
 - xiii) Poner tapones de gasa a los frascos, envolver éstos y las cajas de petri en papel, y sellarlos con papel indicador.
 - xiv) Autoclavear por 30 min. en escape rápido y secado.

7.- Pacientes.

Se intentó el cultivo de 64 muestras de líquido amniótico cuyo volumen varió de 6 a 30 ml (promedio 14.6 ml), obtenidas por amniocentesis transabdominal entre el 20 de septiembre de 1976 y el 10 de noviembre de 1978. Estos líquidos se obtuvieron mediante la colaboración de los Dres. Eduardo Lowenberg-Favela y Manuel Pomier, del Servicio de Perinatología del Centro Hospitalario "20 de Noviembre" I.S.S.S.T.E. En la mayoría de las pacientes se obtuvo el líquido en el segundo trimestre del embarazo, siendo su edad gestacional de 10 a 29 semanas, con un promedio de 17.6.

Los motivos por los que se practicó la amniocentesis no fueron en todos los casos aquellos que se indican para el Diagnóstico Citogenético Prenatal. Se aprovecharon los líquidos obtenidos con otros propósitos debido a que la finalidad del presente trabajo fue realizar un ensayo de algunas variables y parámetros que influyen en el cultivo de las células fetales suspendidas en éste. En el cuadro I se especifican los motivos por los que se practicó la amniocentesis.

8.- Metodología.

1.- Cultivo de Células.

Inicialmente, inmediatamente después de haberse obtenido el líquido amniótico, éste fue colocado a partes iguales en dos tubos de vidrio estériles y transportado al Instituto de Investigaciones Biomédicas en la Universidad Nacional Autónoma de México, donde se inició el proceso de cultivo (después se transportó en la jeringa misma). El tiempo que transcurrió entre la toma de la muestra y la siembra fue de 1 a 3 horas.

CUADRO 1

MOTIVOS POR LOS QUE SE PRACTICO LA AMNIOCENTESIS.

Edad materna mayor de 35 años.	22
Edad materna mayor de 35 años y producto previo anormal:	
Síndrome de Down.	2
No especificado.	4
Producto previo con Síndrome de Down:	
Por trisomía 21	6
Por translocación, con un progenitor portador.	1
Pariente(s) con Síndrome de Down.	3
Producto previo con Síndrome de Turner.	1
Familiar(es) materno(s) con Distrofia Muscular.	1
Polihidramnios.	1
Exposición a Rubéola.	7
Exposición a Rayos X o radiaciones.	5
Medicación en el primer trimestre del embarazo:	
Agentes quimioterápicos.	2
Vacunación contra fiebre amarilla.	1
Punción previa a aborto en madre con cáncer mamario.	1
Angustia materna.	1
Total	<u>58</u>

Las muestras de líquido amniótico se procesaron siguiendo uno de los procedimientos.

a) Procedimiento I.

Se tomaron 2 ml de líquido amniótico (sin centrifugar) y 3 ml de medio de cultivo suplementado con 20% de suero bovino fetal, se colocaron en frascos de cultivo de 25 cm² de superficie (T₂₅) y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% y 95% de aire atmosférico, con 100% de humedad. El primer cambio de medio se hizo a los 6 días, se registró el número y tipo de colonias en cada frasco, y los siguientes cambios de medio se hicieron cada 48 horas, hasta obtener suficientes mitosis para estudiar su cariotipo.

Los parámetros estudiados fueron:

- i) Dos medios de cultivo: Medio de Dulbecco, y Medio Mínimo de Eagle modificado.
- ii) Dos marcas de suero bovino fetal: Microbiological Associates (importado de Estados Unidos), y Biocal, S.A. (producido en México y probada su capacidad de promoción del crecimiento celular, en el Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, por el Dr. — Carlos Fernández).

En el cuadro 2 se muestran los parámetros estudiados en los líquidos amnióticos sometidos al procedimiento I.

b) Procedimiento II.

El líquido amniótico fue transferido de la jeringa a 2 tubos estériles y se centrifugó a 1,500 rpm por 10 min. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron los botones celulares en 1 ml de medio MEM modificado, suplementado con 30% de suero bovino —

CUADRO 2

PARAMETROS ESTUDIADOS EN LOS LIQUIDOS AMNIOTICOS
SOMETIDOS AL PROCEDIMIENTO I.

Muestras	Medio de Cultivo		Marcas de Suero	
	Dulbecco	MEV mod.	Microb. Ass.	Biocel
21	+		+	
5		+	+	
7		+		+
<u>Total</u>	33			

fetal (Microbiological Associates). Cada suspensión celular se colocó en un tubo Leighton (por lo tanto, 2 tubos por líquido amniótico) y se incubó en las condiciones ya descritas. El primer cambio de medio se efectuó entre 3 y 5 días después de la siembra, y los siguientes cada 48 horas.

2.- Cuento de Células.

Se tomó 0.1 ml de líquido amniótico (sin centrifugar), se le agregó 0.1 ml de Azul de Tripiano 0.4% y se incubó a 37 °C por 5 min. Se colocó una gota de esta suspensión en cada una de las cámaras de un contador Neubauer de $1/400 \text{ mm}^2 \times 1/10 \text{ mm}$ y se contaron las células que se encontraban en 5 cuadros de cada cámara. Los totales correspondientes a las células teñidas (muertas) y a las no teñidas (vivas) se multiplicaron por 2 (factor de dilución), para obtener las cifras correspondientes a miles de células por cada mililitro de líquido amniótico.

3.- Determinación del Cariotipo.

Cuando se observó en los frascos de cultivo un número suficiente de células en mitosis, se sometieron éstas a un proceso para la observación de sus cromosomas. Se cambió el medio de cultivo 24 horas antes de iniciar el procedimiento; posteriormente se agregaron 0.05 ml. de Colcemid a una concentración de 10 mcg/ml por cada mililitro de medio de cultivo, y se incubaron las células a 37 °C durante 40 min. Se desprendieron éstas con las soluciones de verseno y tripsina, y se centrifugaron a 800 rpm por 10 min. Se retiró el sobrenadante y se agregaron (agitando suavemente) 10 ml. de la solución hipotónica, dejándose reposar a 37 °C por 20 min. Nuevamente se centrifugó a la misma velocidad y tiempo, se retiró el sobrenadante, y se agregaron 10 ml de fijador Carnoy. Esta última operación se repitió 3 ó 4 veces. Finalmente se centrifugó a 800 rpm por 10 min., se retiró el sobrenadante, se resuspendieron las

células en 0.5 ml. de fijador, y se tomaron con una pipeta pasteur para colocarse en un portaobjetos, dejando caer varias gotas desde una altura aproximada de 20 cm. y flameando ligeramente. La tinción rutinaria se efectuó colocando las laminillas en la solución de Giemsa por 10 minutos.

La interpretación de los cariotipos de las células fetales se efectuó en el Departamento de Genética del Hospital del Niño, DIF, con la colaboración de las Mrs. Alessandra Carnevale y la Q.F.B. Julieta Castillo. Además, en esta institución se observaron en algunos casos los cariotipos de los linfocitos de los padres, y se efectuaron estudios de bandas cromosómicas.

CAPITULO IV

Resultados.

Se practicaron 64 amniocentesis en 58 pacientes, sin presentarse ninguna complicación para el feto o la madre. En 3 pacientes se repitió la amniocentesis en 2 ocasiones, y en 3 ocasiones en una paciente debido a fallas en el cultivo de las células. En el cuadro 3 se muestran los resultados del cultivo de las células fetales mediante los procedimientos I y II, y se especifican las causas de los fracasos en los cultivos en los que no fue posible realizar el estudio citogenético. Se aplicó la prueba de χ^2 para determinar si existe una diferencia estadísticamente significativa entre los dos procedimientos, respecto al éxito para determinar el cariotipo. Se encontró que $p > 0.25$ por lo que se concluyó que el crecimiento exitoso de las células no dependió de la elección de uno u otro procedimiento.

Se pudo determinar el cariotipo en las células fetales procedentes de 30 pacientes (cuadro 4). En 15 casos (50%) el cariotipo fue femenino normal, en 14 casos (46.7%) fue masculino normal, y sólo en una de las muestras de líquido amniótico (3.3%) se detectó una anomalía cromosómica. Se trata de un cariotipo femenino con trisomía 21 por translocación de un cromosoma 21 a un cromosoma del grupo D, siendo el padre portador de la misma y progenitor de un hijo previo con síndrome de Down por translocación. Al saber el resultado del estudio citogenético, los padres decidieron terminar el embarazo, pero no se pudo confirmar el diagnóstico porque el aborto fue practicado fuera de la ciudad de México, por un médico no identificado.

Han nacido 49 de estos fetos. De los 30 fetos en los que se determinó el cariotipo, se ha podido estudiar a 14 niños al nacimiento, habiéndose confirmado en todos ellos el diagnóstico realizado prenatalmente.

QUADRO 3

RESULTADOS DEL CULTIVO DE 64 LIQUIDOS AMNIOTICOS
PARA ESTUDIO CITOGENETICO.

	Procedimiento I		Procedimiento II	
	Número	%	Número	%
A.- Se pudo determinar el cariotipo.	17	51.5	13	41.9
B.- No se pudo determinar el cariotipo:				
1. Crecimiento celular adecuado:				
a. Contaminación microbiana.	3	9.1	5	16.1
b. Sobrecalentamiento.	4	12.1	3	9.7
c. Colchicine inactiva.	-	-	1	3.2
2. Crecimiento celular inadecuado.	5	15.2	5	16.1
3. No adhesión de las células al frasco de cultivo.	4	12.1	4	12.9
Total de Líquidos Amnióticos Procesados.	33		31	

χ^2 (entre grupos A y B) = 0.244; $p > 0.25$

CUADRO 4

RESULTADOS DEL ESTUDIO CITOGENETICO PRACTICADO
EN 30 CULTIVOS AMNIOTICOS.

Cariotipo	Número	%
Femenino Normal 46,XX	15	50.0
Masculino Normal 46,XY	14	46.7
Femenino con trisomía 21 por translocación a un - cromosoma D. 46,XX, -D +t(Dq Gq).	1	3.3

1.- Aparición de Colonias.

a) Procedimiento I.

En el 76% (25/33) de los casos las colonias aparecieron antes de 10 días, en el 9% (3/33) de los casos entre 10 y 15 días, — en un sólo caso (3.3%) las colonias aparecieron a los 16 días, y en el 12% (4/33) de los casos no hubo formación de colonias — (Fig. 1). No se obtuvo el promedio porque la búsqueda de colonias se inició hasta el sexto día.

b) Procedimiento II.

Se observó la aparición de colonias en un período de 4 a 15 días, siendo el promedio de 9.0 días. En el 61% (19/31) de los casos las colonias aparecieron antes de 10 días, en el 26% (8/31) de los casos entre 10 y 15 días, y en el 13% (4/31) de los casos no hubo formación de colonias (Fig. 1).

No se observó una diferencia estadísticamente significativa entre estos dos procedimientos ($p > 0.50$) respecto al número de cultivos en los que las colonias aparecieron antes de 10 días, y en los que aparecieron después de 10 días a partir del día de la siembra — (cuadro 5). La fecha de aparición de las colonias tampoco tuvo relación con: a) edad materna, b) edad gestacional, c) cantidad de líquido amniótico, d) medio de cultivo, ó e) procedencia del suero.

2.- Número y Viabilidad de las Células.

Sólo en 13 de los líquidos amnióticos sometidos al procedimiento I se hizo el conteo de células antes de la siembra. El número total de células y el número de células viables observadas en estos líquidos, no guardan relación con la edad gestacional de las pacientes (Fig. 2). Tampoco se observó una relación entre la edad gestacional y el porcentaje de células viables (Fig. 3).

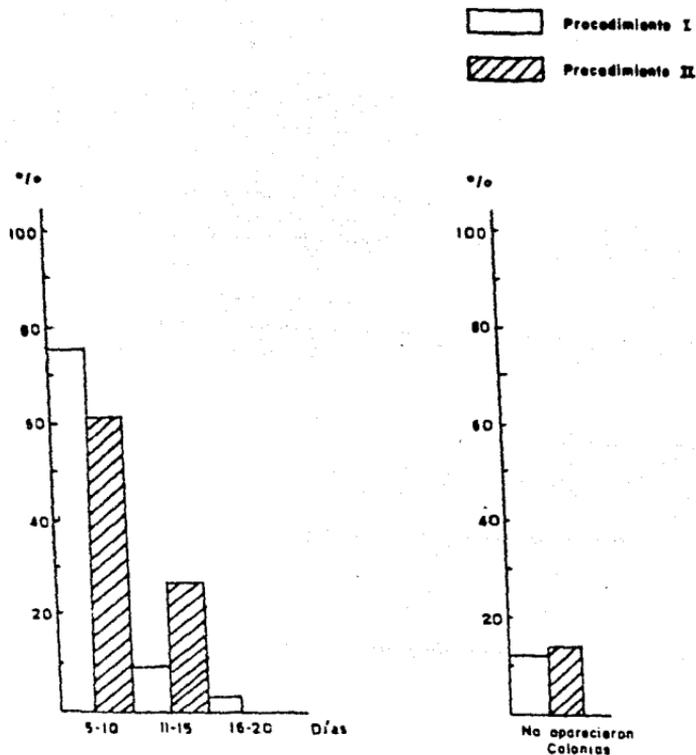


Fig. 1 Distribución de 33 cultivos de líquido amniótico procesados según el procedimiento I y de 31 cultivos procesados según el procedimiento II, según el tiempo de aparición de colonias después de la siembra. Se omitió el intervalo de 0 a 5 días debido a que fue hasta el 6o. día cuando se inició la búsqueda de colonias.

CUADRO 5

RESULTADOS DEL TIEMPO DE APARICION DE COLONIAS
EN 56 CULTIVOS ANTIBIOTICOS.

Días	Procedimiento I	Procedimiento II
0 - 10	25	19
10 - 16	4	8

χ^2 (entre procedimientos I y II) = 1.24; $p > 0.50$

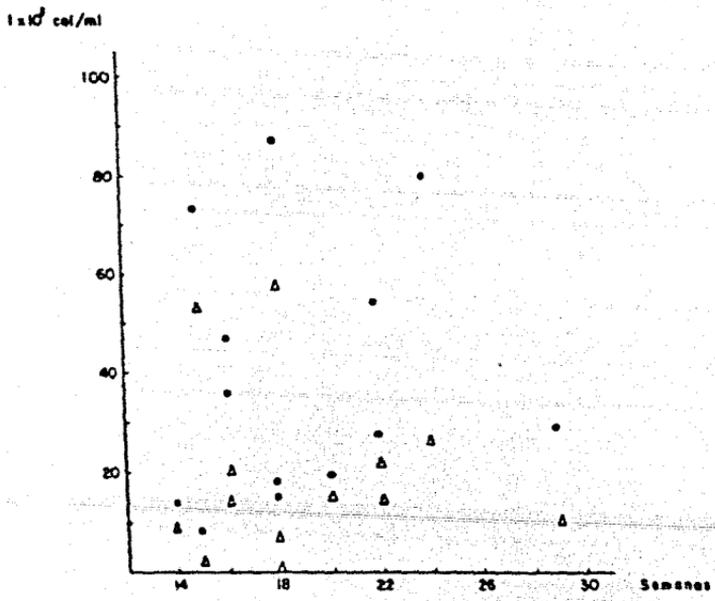


Fig. 2 Relación entre la edad gestacional y la cantidad de células en el líquido amniótico.

• células totales x 10³/ml. r = 0.11
Δ células viables x 10³/ml. r = 0.13

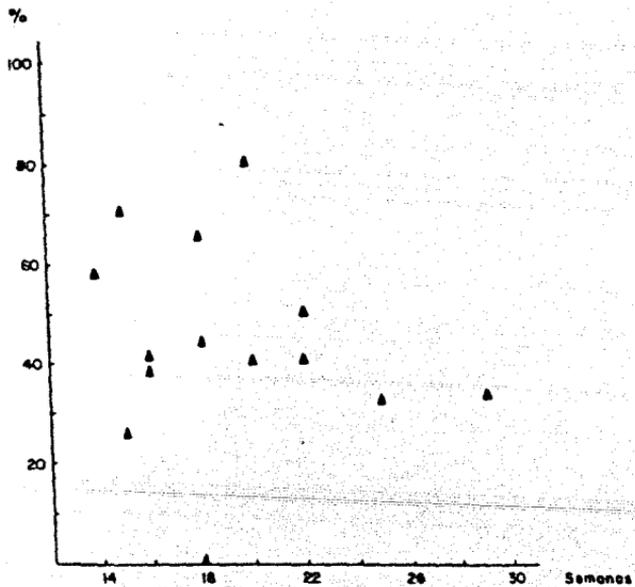


Fig. 3 Relación entre edad gestacional con la visibilidad de las células en el líquido amniótico.

$r = -0.17$

Aunque no se observó una relación entre el número de células en el líquido amniótico y el tiempo de aparición de colonias (Fig. 4), parece existir una ligera tendencia ($r = 0.53$) a la aparición más temprana de colonias con un mayor porcentaje de viabilidad celular (Fig. 5). En uno de los líquidos amnióticos no se observaron células al intentar contarlas, a pesar de lo cual aparecieron colonias 13 días después de la siembra. Hay que recordar que se requiere un mínimo de 200 células por mililitro para poder observarlas en el hemocitómetro.

El éxito o fracaso del cultivo para determinar el cariotipo, no parece depender del número total de células en el líquido amniótico (Fig. 6a), del número de células viables (Fig. 6b), ni del porcentaje de células viables (Fig. 6c).

3.- Medio de Cultivo.

De 26 muestras de líquido amniótico sometidas al procedimiento I, 21 se procesaron empleando medio de Dulbecco, y 5 utilizando medio MEM modificado, ambos suplementados con 20% de suero bovino fetal (Microbiological Associates). Se pudo determinar el cariotipo en 9 de 21 líquidos amnióticos en el primer caso, y en 3 de 5 en el segundo (cuadro 6).

Esta diferencia no fue estadísticamente significativa, ya que al aplicar la prueba de Probabilidad Exacta de Fisher ⁶⁴ se encontró que $p = 0.12$. El tamaño de la muestra es, sin embargo, muy pequeño.

4.- Procedencia del Suero.

De 12 muestras de líquido amniótico sometidas al procedimiento I, 5 fueron procesadas con medio MEM modificado y suplementado con 20% de suero bovino fetal importado (Microbiological Associates), y 7 con el mismo medio de cultivo, tipo y concentración de suero,

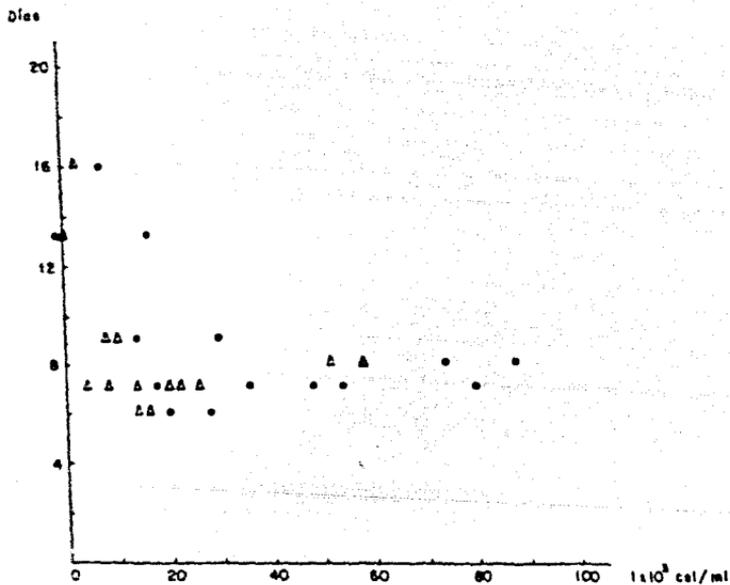


Fig. 4 Relación entre el número de células (células totales x 10⁸/ml; células visibles x 10⁸/ml), y el tiempo de aparición de colonias después de la siembra.

• r = 0.39

▲ r = 0.29

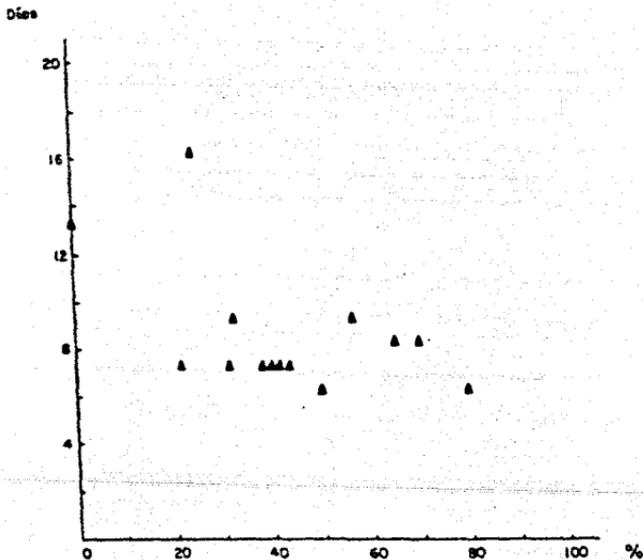


Fig. 5 Relación entre viabilidad celular con el tiempo - de aparición de colonias después de la siembra.

$r = - 0.53$

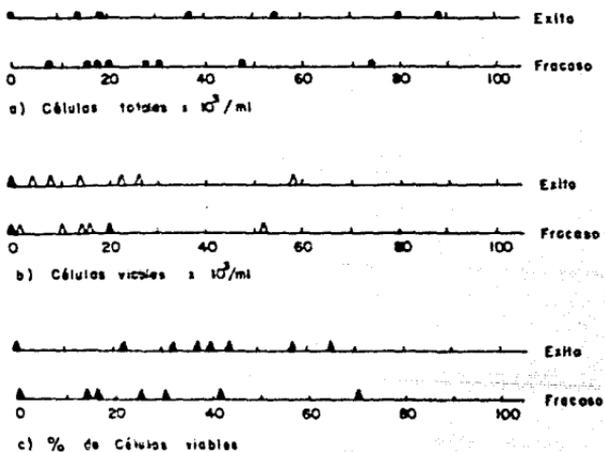


Fig. 6 Relación entre el éxito o fracaso del cultivo con:
a) células totales \bullet ; b) células viables \blacktriangle ; y c) porcentajes de células viables \blacktriangle .

CUADRO 6

RESULTADOS DEL CULTIVO DE 26 LIQUIDOS AMNIOTICOS
CON MEDIOS DE CULTIVO DIFERENTES.

Medio de Cultivo	Exito	Fracaso
Medio de Dulbecco	9	12
Medio MEM modificado	3	2

p= 0.12

pero siendo éste producido en México (Biocel, S.A.). Se pudo determinar el cariotipo en 3 de 5 líquidos amnióticos en el primer caso, y en 6 de 7 en el segundo (Cuadro 7).

Así mismo, se aplicó la prueba de Probabilidad Exacta de Fisher para determinar si los resultados observados son estadísticamente significativos. Se encontró que $p = 0.36$ lo cual indica que la procedencia del suero no determinó el éxito o fracaso del cultivo. El tamaño de la muestra es, sin embargo, muy pequeño.

S.- Tipo de Colonias.

Al iniciarse el cultivo de las células fetales se observaron principalmente células de dos tipos: células de descamación, grandes, poligonales e incapaces de crecer in vitro, y células pequeñas, — redondas u ovoides, muy refringentes, que se supone son probablemente derivadas tanto del feto como del amnion y que dan origen a las células que crecen in vitro.⁷⁷ (Fig. 7). Entre el 4o. y el 7o. día después de la siembra se observaron células que comenzaban a formar colonias de fibroblastos (Fig. 8), colonias mixtas (Fig. 9), y colonias epitelioides. En ocasiones sólo se observaron fibroblastos aislados (Fig. 10) que no siempre formaron colonias.

Las colonias epitelioides (Fig. 11) están formadas por células redondas con citoplasma irregular, que tienden a crecer formando — "islas". Difícilmente se les puede desprender de la superficie y cuando se las subcultiva ya no forman nuevas colonias.

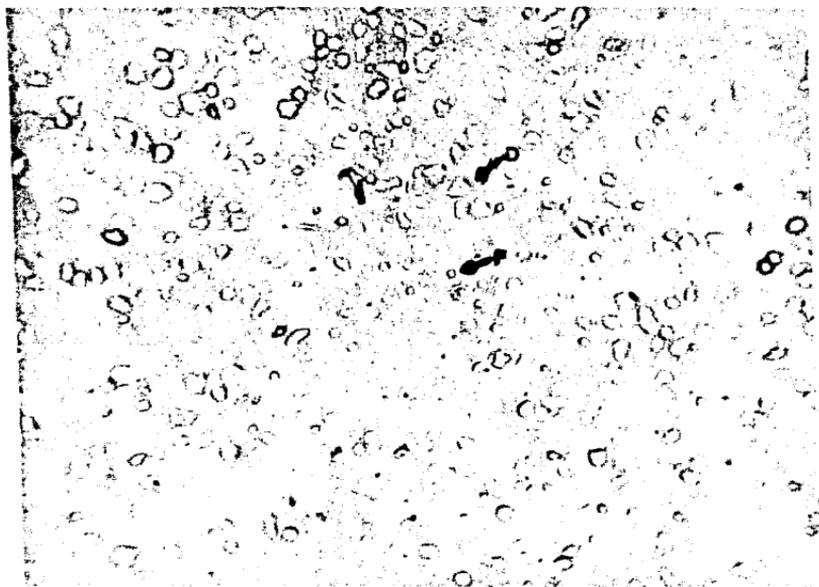
Las colonias mixtas (Fig. 12) están constituidas por células de formas variadas, su citoplasma es irregular y está limitado por una membrana ondulante. Estas colonias no alcanzan una densidad elevada, y aunque presentan cierta resistencia a la acción de la tripsina, al ser subcultivadas vuelven a formar colonias.

CUADRO 7

RESULTADOS DEL CULTIVO DE 12 LIQUIDOS AMNÍOTICOS
CON SUERO NACIONAL O IMPORTADO.

Procedencia del Suero	Exito	Fracaso
Importado (Microbiological Associates).	3	2
Nacional (Biocel, S.A.).	6	1

p= 0.36



-Fig. 7 Células de líquido amniótico el día de la siembra. Predominan las células de descamación, pero se observan algunas células pequeñas, muy refringentes, que formarán las colonias in vitro. (Contraste de fase x 120).

D = célula de descamación.

F = célula precursora de fibroblasto.

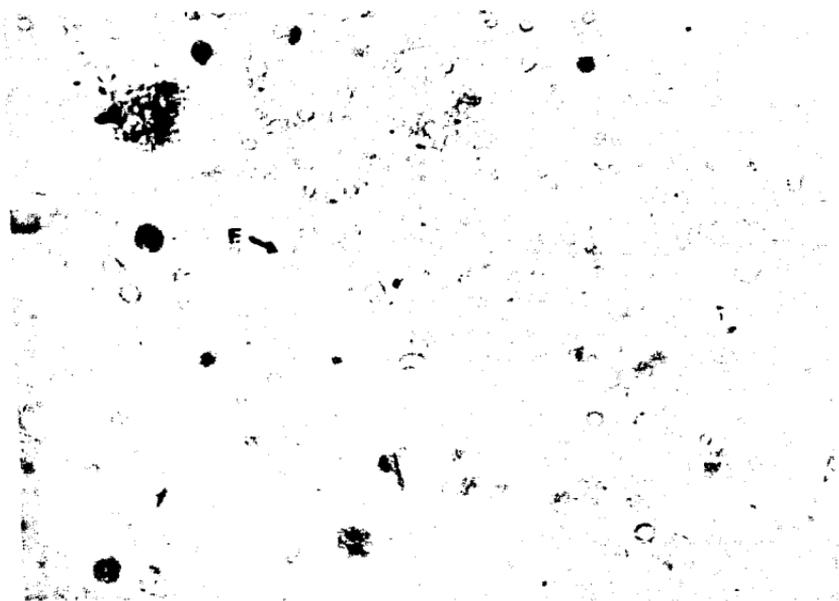


Fig. 8 Cultivo de células de líquido amniótico el 70. día después de la siembra. Se observan fibroblastos que inician la formación de una colonia. (Contraste de fase x 120).

F = fibroblasto.

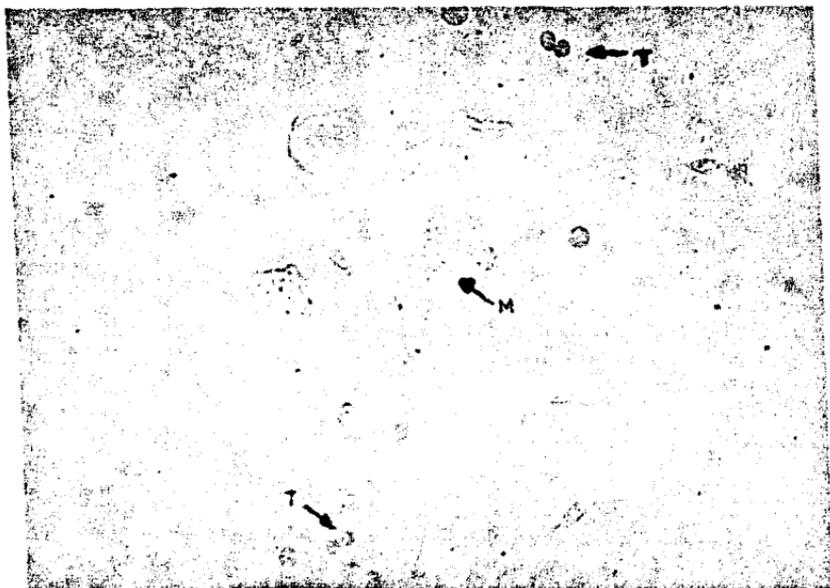


Fig. 9 Cultivo de células de líquido amniótico el 70. día después de la siembra. Se observan células de tipo mixto que inician la formación de una colonia, así como dos células en telofase. (Contraste de fase x 120).

M = célula tipo mixto (AF).

T = célula en telofase.

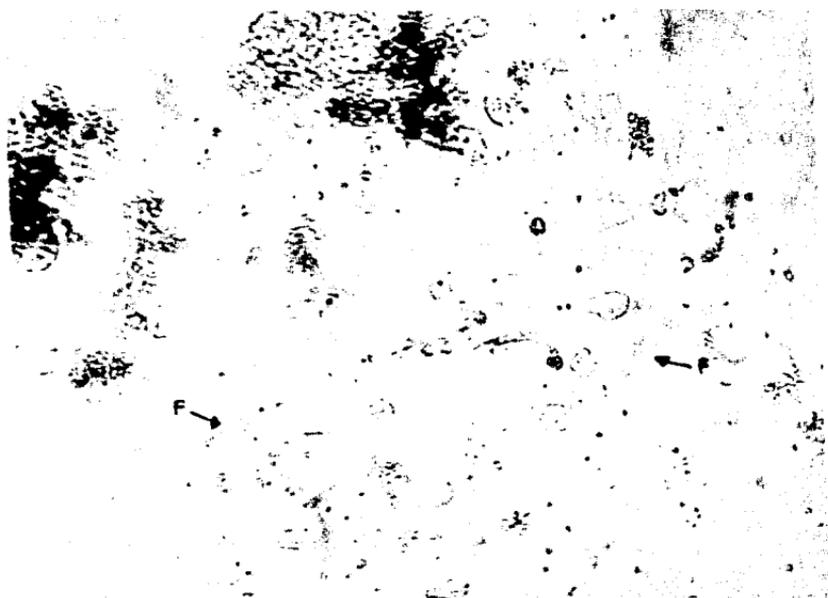


Fig. 10 Cultivo de células de líquido amniótico el 40. - día después de la siembra. Se observan fibroblastos aislados que no formaron colonias. (Contraste de fase x 200).

F = fibroblasto aislado.

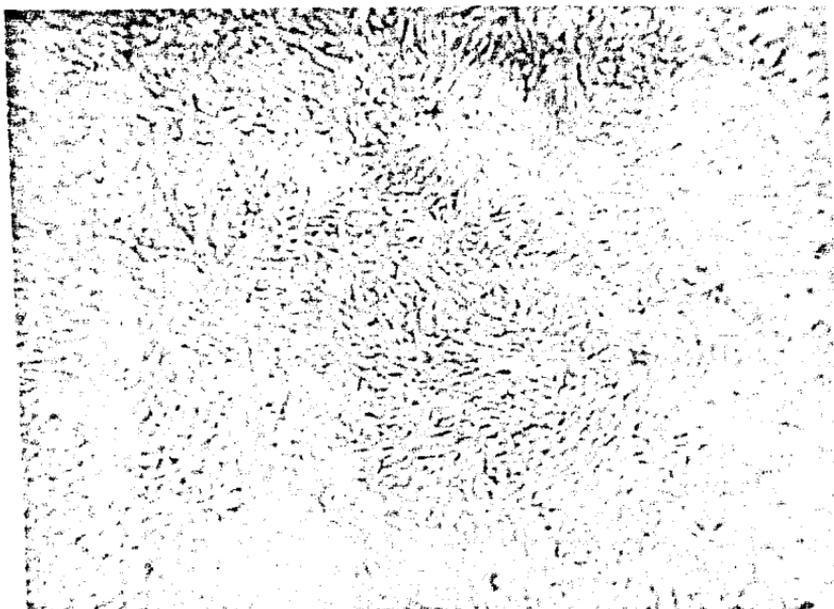


Fig. 11 Cultivo de células de líquido amniótico 26 días - después de la siembra. Se observa una colonia epitelioide. (Contraste de fase x 120).

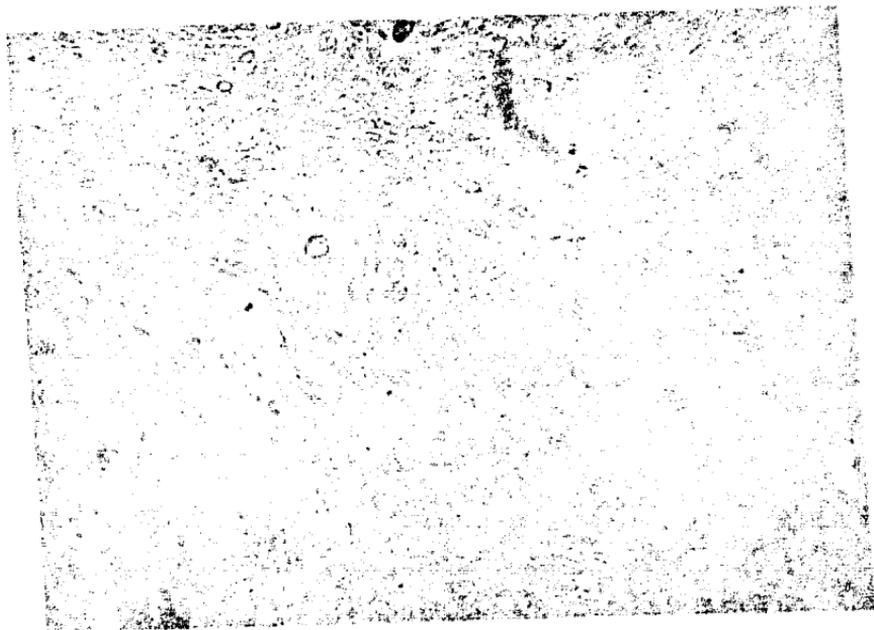


Fig. 12 Cultivo de células de líquido amniótico 26 días - después de la siembra. Se observa una colonia de células de tipo mixto (AF). (Contraste de fase x 120).

Las colonias de fibroblastos (Fig. 13) están formadas por células fusiformes que existen prolongaciones largas, y tienden a dispersarse adquiriendo una disposición paralela. Generalmente alcanzan una densidad elevada, se les puede desprender fácilmente de la superficie y subcultivar durante muchas generaciones. Son indistinguibles de los fibroblastos humanos procedentes de la piel.

En 16 cultivos de líquido amniótico somáticos al procedimiento I se establecieron 484 colonias, de las cuales el 50% (241) estuvieron constituidas por células de tipo mixto (AF), el 33% (159) por células epitelioides, y el 17% (84) por fibroblastos (Fig. 14). Se observó la aparición de colonias de tipo mixto en el 93% de los cultivos, de colonias epitelioides en el 93% de los cultivos, y de colonias de fibroblastos en el 76% de los cultivos.

6.- Tiempo Necesario para Determinar el Cariotipo.

a) Procedimiento I.

Se intentó determinar el cariotipo cuando se observaba que las células cubrían dos terceras partes de la superficie del frasco de cultivo; y que además se observaban aproximadamente 50 células en mitosis (Fig. 15). En 21 cultivos de líquido amniótico - estas condiciones se dieron en un período de 9 a 48 días después de la siembra, pero sólo en 17 casos (81%) se pudieron observar metafases adecuadas para la determinación del cariotipo, y para dichos casos el promedio fue de 24.7 días. En los restantes 4 casos (19%), aunque se observaron mitosis en el cultivo mismo, - las metafases ya fijadas y teñidas no fueron de la calidad que requiere para ser analizadas e interpretadas. Como se muestra en la Fig. 16, en el 29.4% (5/17) de los cultivos que pudieron ser estudiados se determinó el cariotipo entre 10 y 20 días después de la siembra, en el 35.3% (6/17) de los cultivos se determinó entre 20 y 30 días, y en el 35.3% (6/17) de los cultivos se determinó entre 30 y 40 días después de la siembra.

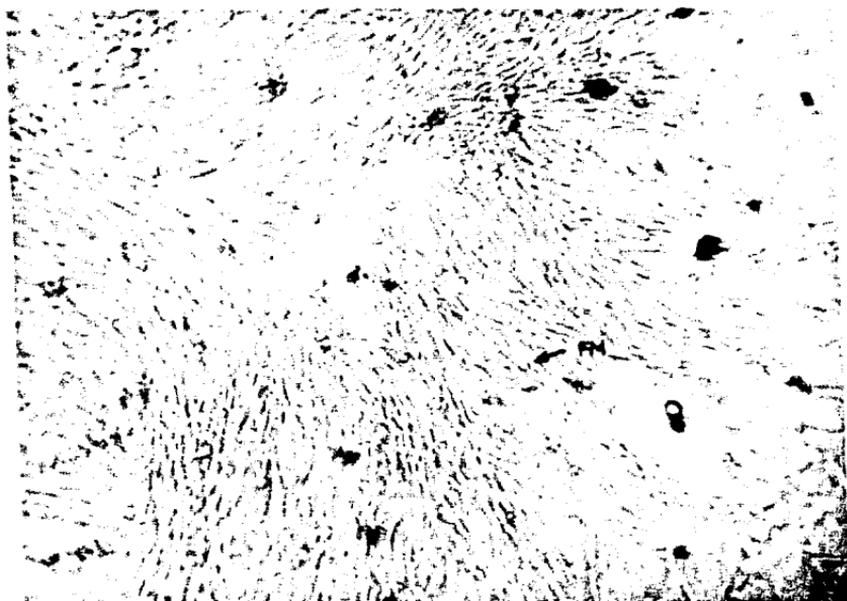


Fig. 13 Cultivo de células de líquido amniótico 22 días — después de la siembra. Se observa una colonia de fibroblastos. Las células redondas, refringentes son células en mitosis. (Contraste de fase $\times 120$).

FW = fibroblasto en mitosis.

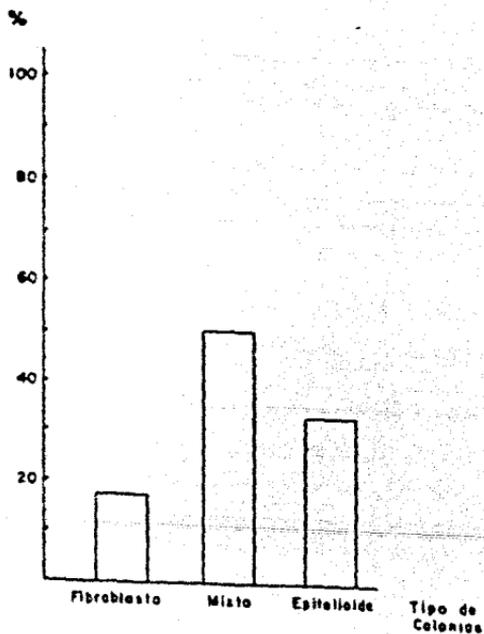


Fig. 14 Distribución de 16 cultivos de líquido amniótico, según el tipo de colonias establecidas.

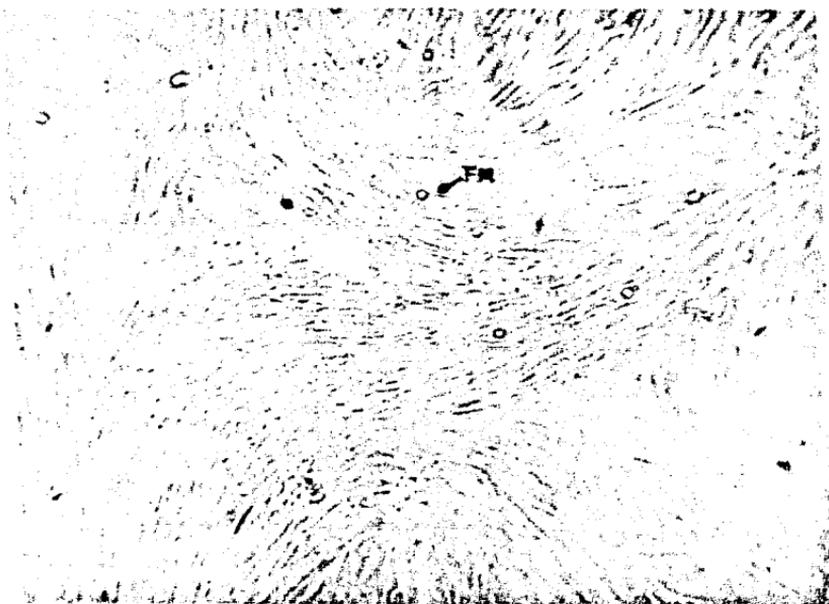


Fig. 15 Colonia de fibroblastos 22 días después de la —
siembra. Se observan numerosas células en mitosis (redon
des y refringentes). (Contraste de fase x 120).

FM = fibroblasto en mitosis.

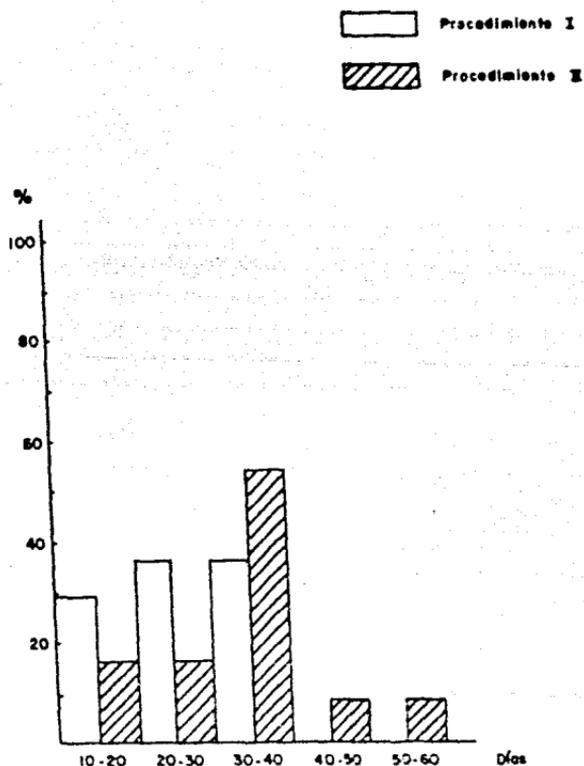


Fig. 16 Distribución de 17 cultivos de líquido amniótico procesados según el procedimiento I y de 13 cultivos procesados según el procedimiento II, según el tiempo transcurrido entre el inicio del cultivo y el estudio del cariotipo.

Sólo en 11 de los 17 líquidos amnióticos a los que se les pudo determinar el cariotipo, se había medido viabilidad al momento de la siembra. No se observó una relación entre el porcentaje de células viables y el tiempo que transcurrió entre la siembra y la cosecha de las células para el estudio citogenético (Fig. 17). Sin embargo, parece ser que cuando se establece un mayor número de colonias de fibroblastos (Fig. 18) o de colonias de tipo mixto (Fig. 19), el tiempo en que se puede estudiar su cariotipo es menor ($r = -0.62$ y $r = -0.48$ respectivamente) que cuando se establece un mayor número de colonias epitelioides ($r = 0.10$) (Fig. 20).

b) Procedimiento II.

Se intentó determinar el cariotipo en 14 cultivos de líquido amniótico que reunían los requisitos indicados en la sección anterior, y esto pudo hacerse en un período de 14 a 56 días después de la siembra. Sólo se pudo determinar el cariotipo en 13 de 14 casos (52.8%), siendo el lapso promedio entre siembra y cosecha de 31.1 días. En uno de los 14 casos (7.1%) no se observaron metafases analizables. Como se muestra en la Fig. 16, en el 15.3% (2/13) de los cultivos que pudieron ser estudiados se determinó el cariotipo entre 10 y 20 días después de la siembra, en el 15.3% (2/13) de los cultivos se determinó entre 20 y 30 días, en el 53.9% (7/13) de los cultivos se determinó entre 30 y 40 días, en el 7.7% (1/13) de los cultivos se determinó entre 40 y 50 días, y en el 7.7% (1/13) de los cultivos se determinó entre 50 y 60 días después de la siembra.

No se observó una diferencia estadísticamente significativa entre estos dos procedimientos ($p > 0.25$) respecto al número de cultivos en los que se determinó el cariotipo antes de 20 días, y en los que se determinó después de 20 días, a partir del día de la siembra (Cuadro 8).

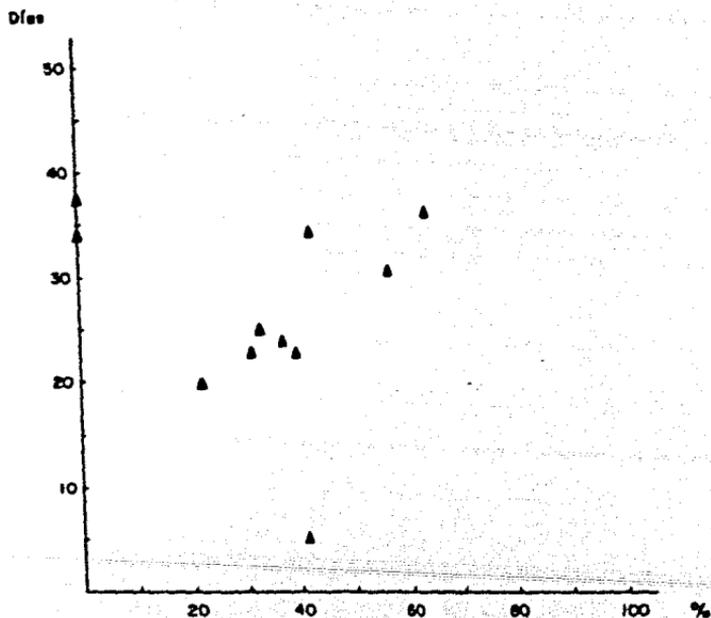


Fig. 17 Relación entre el porcentaje de células visibles, y el tiempo necesario para estudiar el cariotipo.

$r = 0.15$

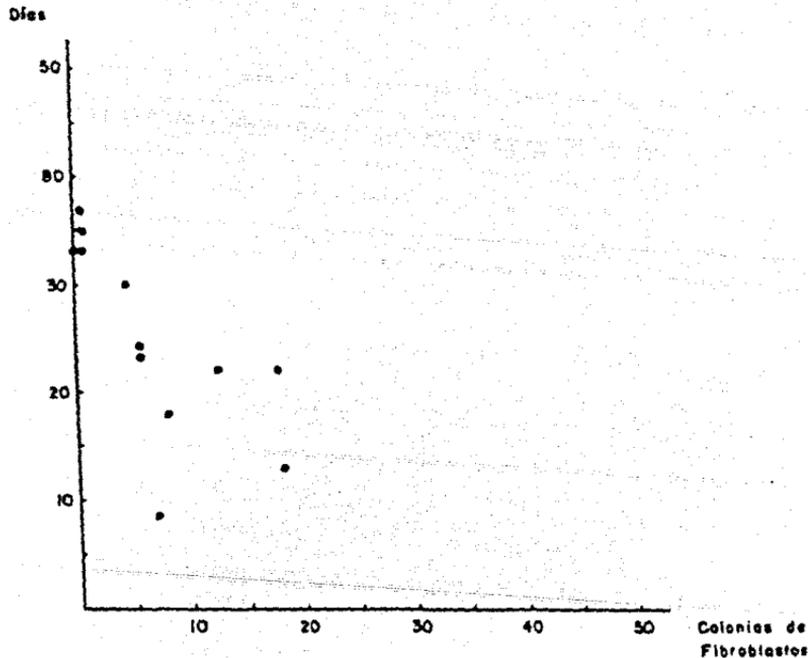


Fig. 18 Relación entre el número de colonias de fibroblastos y el tiempo necesario para estudiar el cariotipo.
 $r = - 0.62$

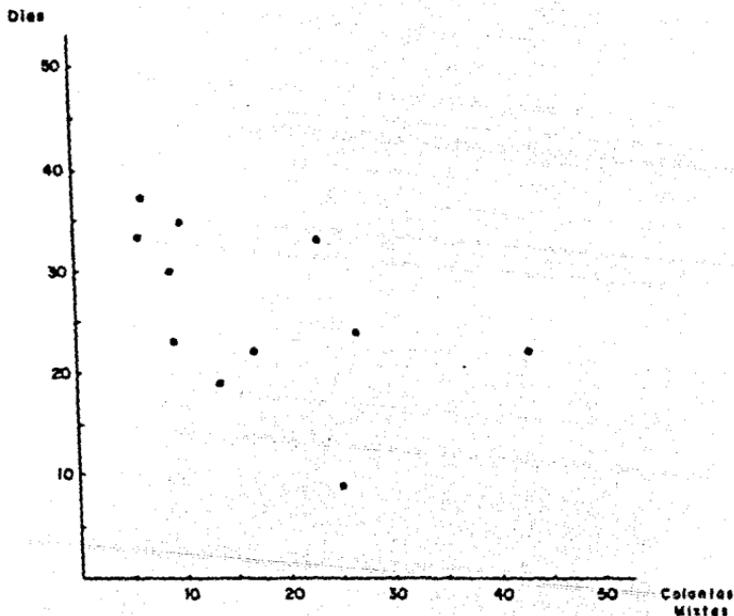


Fig. 19 Relación entre el número de colonias mixtas y el tiempo necesario para estudiar el cariotipo.

$r = -0.43$

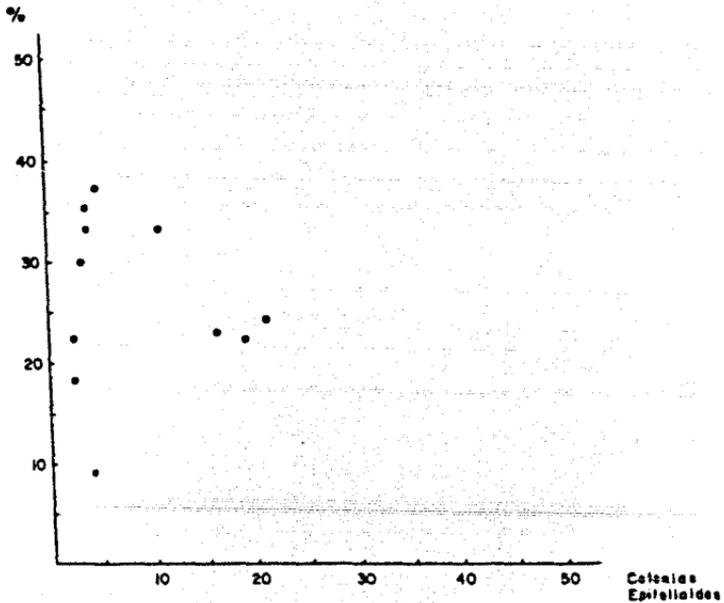


Fig. 20 Relación entre el número de colonias epitelioides y el tiempo necesario para estudiar el cariotipo.

$r = 0.10$

CUADRO 8

RESULTADOS DEL TIEMPO PARA DETERMINAR EL CARIOTIPO
EN 30 CULTIVOS AMNIOTICOS.

Cías	Procedimiento I	Procedimiento II
10 - 20	5	2
10 - 16	12	11

χ^2 (entre procedimientos I y II) = 0.27; $p > 0.25$

CAPITULO V

Discusión.

Este trabajo representa en México, el primer intento en el establecimiento de una metodología para el cultivo de las células fetales obtenidas por amniocentesis transabdominal, con el fin de estudiar su cariotipo y practicar así el Diagnóstico Citogenético Prenatal.

La amniocentesis, practicada entre 14 y 18 semanas de gestación, permite hacer el diagnóstico de todas las anomalías cromosómicas, y más de 100 enfermedades metabólicas, y conocer el sexo del feto en casos de padecimientos ligados al cromosoma X, con riesgos mínimos para la madre y el feto. Así, es posible ofrecer un diagnóstico confiable a aquellas parejas a riesgo de tener un hijo anormal, y no sólo una estimación probabilística de que el feto esté o no afectado.

Aunque no se sabe exactamente de qué partes del feto o membranas fetales provienen las células capaces de reproducirse in vitro, y es difícil estimar qué proporción de éstas poseen el potencial para formar colonias, es posible mediante condiciones adecuadas de cultivo, obtener un número suficiente de células para estudios cromosómicos y bioquímicos.

La eficacia de los procedimientos I y II parece ser similar (cuadro 3). Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas, al elegir entre uno u otro procedimiento respecto al tiempo transcurrido desde la siembra hasta la aparición de colonias (cuadro 5), o respecto al tiempo necesario para cosecharlas y estudiar su cariotipo (cuadro 3). La diferencia principal entre los dos procedimientos consiste en que en el procedimiento II las células son separadas por centrifugación y sembradas a una mayor densidad celular.

La centrifugación de las muestras de líquido amniótico representa la iniciación del proceso de cultivo de las células fetales en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico prenatal, aunque otros investigadores prefieren no hacerlo. Marchant ⁴⁷, quien en un estudio inicial encontró que las células no centrifugadas crecían mejor ($p < 0.011$) posteriormente demostró que el supuesto trauma producido a las células al centrifugarlas no alteró su crecimiento, sino que otros factores, como el no sustituir el líquido amniótico inicialmente por medio de cultivo, pudieron ser los responsables del retraso o impedimento del crecimiento celular.

A diferencia de Emery ¹⁷, nosotros no encontramos correlación entre el número total de células por mililitro, el número de células viables por mililitro, o el porcentaje de células viables, y la edad gestacional (Fig. 2 y Fig. 3). En su estudio Emery observó que el número total de células aumentaba después de la semana 13 de gestación desde aproximadamente 16×10^3 hasta aproximadamente 180×10^3 células en la semana 33; mientras que el número de células viables aumentaba sólo — desde aproximadamente 2×10^3 en la semana 13 hasta aproximadamente — 25×10^3 células en la semana 33. Es posible que las 13 muestras de líquido amniótico en las que efectuamos el conteo en este estudio no sean suficientes para encontrar una relación. Además, tenemos la impresión que el número total de células extraídas es mayor si se agita el vientre de la madre antes de la amniocentesis, lo cual no se hizo en todos nuestros casos.

Independientemente de la edad gestacional, el éxito o fracaso del cultivo no tuvo relación con el número total de células, con el número de células viables, o con el porcentaje de células viables en el líquido amniótico (Fig. 4). Así, en dos ocasiones en las que no se observaron células viables, uno de los cultivos fracasó y el otro fue un éxito. Esto contrasta con los hallazgos de Nelson y Emery ⁵¹ quienes reportaron en un estudio de 237 líquidos amnióticos que en muestras obtenidas después de 20 semanas de gestación, el número de éxitos no depen-

dió del número de células viables; pero en muestras obtenidas antes de 20 semanas, los cultivos que crecieron bien contenían el triple de células viables que los que fracasaron, y los porcentajes de células viables fueron siempre mayores en los éxitos (16% y 18%) que en los fracasos (11% y 12%). También reportaron no haber observado células viables en 15 cultivos que fracasaron así como en 9 cultivos que fueron éxitos.

Así mismo, en el estudio de Nahlström⁸², se observó que mientras mayor era la cantidad de células viables, mayor era la probabilidad de éxito del cultivo, requiriéndose aproximadamente 2,000 células viables por muestra, pero esto no sucedía en presencia de un gran número de células muertas, posiblemente porque éstas liberen sustancias tóxicas al medio.

Como ha sido reportado anteriormente por varios investigadores (Marchant⁴⁷, Gray et. al.²⁷, Nelson y Emery⁵¹, Hasolt²³, Nahlström⁸², etc.), en el presente estudio se demostró que el medio de cultivo, la marca de suero bovino fetal, o la concentración de éste, con tal que sea mayor de 15% (Félix et. al.¹³), no son factores que determinen la adherencia y reproducción de las células fetales cultivadas *in vitro*. Es decir, éstas crecerán bien cuando se cumplan los requisitos nutricionales básicos, se mantengan en condiciones adecuadas de temperatura, humedad y pH, y se manipulen estérilmente; pero dependen del potencial de sobrevivencia de las células presentes en cada muestra de líquido amniótico.

Las colonias que se establecieron en los frascos de cultivo estuvieron constituidas por células de 3 tipos: mixto (47), epitelioide, y fibroblastoide. Su morfología correspondió a la de los tipos celulares descritos por Marchant⁴⁷ y Hoern et. al.³⁰

No se puede determinar de antemano en qué proporción aparecerán estos tipos celulares en las diferentes muestras de líquido amniótico, pero parece ser que las células de tipo mixto predominan en la mayoría

de los cultivos primarios mientras que los fibroblastos constituyen la menor parte; aunque éstos pronto superan en número a las células de otros tipos por su velocidad de reproducción y su facilidad para ser subcultivados ³⁰.

En el presente estudio las colonias de tipo mixto constituyeron el 50%, las epitelioides el 33%, y las de fibroblastos el 17% del total de colonias establecidas en 16 muestras de líquido amniótico (Fig. 14). Esto es similar a lo observado por Hearn et. al. ³⁰ quienes reportaron porcentajes de 66.5%, 24.7%, y 8.8% respectivamente en un estudio de 20 muestras de líquido amniótico, y porcentajes de 60.8%, 33.7%, y 5.5% respectivamente en un estudio de 418 muestras ³¹. Observaron la aparición de colonias de tipo mixto en todos sus cultivos, de colonias epitelioides en el 31.3%, y de colonias de fibroblastos en el 33.3% de sus cultivos. En nuestro estudio, en relación al número de cultivos en los que se registró el número de colonias, se establecieron estos tres tipos de colonias en porcentajes de 93%, 93%, y 76% respectivamente.

Además, se observó que cuando se establece un mayor número de colonias de fibroblastos o de tipo mixto, existe una tendencia hacia la posibilidad de cosechar las células para estudiar su cariotipo en un menor tiempo que cuando predominan las colonias epitelioides (Figs. 18, 19, y 20). Simpson et. al. ¹⁶ observaron igualmente que además de poder estudiar el cariotipo en un menor tiempo, se obtiene un mayor porcentaje de éxito en la determinación del mismo cuando esto se hace en cultivos en los que predominan las células de tipo mixto o fibroblastos, en vez de hacerse en aquellos en los que predominan las células epitelioides.

Finalmente, la proporción de muestras de líquido amniótico en las que se pudo determinar el cariotipo mediante cualquiera de los dos procedimientos empleados, es aún muy baja para considerarse satisfactoria (51.5% y 41.9%). Así mismo, el tiempo transcurrido entre la siembra y

la obtención de suficientes mitosis para el estudio citogenético (promedio 24.7 y 31.3 días). Estas cifras son sólo comparables con los resultados obtenidos por algunos laboratorios al iniciarse la técnica — del cultivo de células fetales a partir de 1966; actualmente en Estados Unidos, Canadá, y Europa se logran porcentajes de éxito muy cercanos al 100% en períodos de 2 a 3 semanas.

En el 21.2% de los líquidos amnióticos sembrados por el procedimiento I, y en el 29.0% de los sembrados según el procedimiento II — (cuadro 3), no se pudo determinar el cariotipo por factores que pudieron ser identificados (contaminación microbiana, sobrecalentamiento — por fallas del incubador, y colchicina inactiva), y que en el futuro podrán ser prevenidos por medio de precauciones adicionales. Queda — aproximadamente una cuarta parte del total de líquidos amnióticos, en los que la causa del fracaso no pudo ser identificada. Estudios posteriores deberán indicar cuál variable (ó variables) es la responsable(s) de estos fracasos, para que al ser controlada(s) se tenga un éxito cercano al 100%. También debemos intentar reducir el lapso de tiempo entre la siembra del líquido amniótico y su cosecha para la determinación del cariotipo.

A pesar de estos problemas aún no resueltos, se logró practicar — el Diagnóstico Citogenético Prenatal en 30 casos. En varios de ellos el resultado normal impidió la realización de un aborto, que sin dicho resultado se hubiese llevado a cabo. En un caso la información obtenida contribuyó a prevenir el nacimiento de un niño con Síndrome de Down. Este estudio es el primero en su tipo que se efectúa en México, habiéndose así demostrado su factibilidad y utilidad para nuestro país.

CAPITULO VI

Conclusiones.

El Diagnóstico Prenatal representa el inicio de una nueva fase de la medicina, comprende diversas técnicas que nos permiten valorar algunos aspectos relacionados con la salud del feto. La amniocentesis que es sólo una de ellas, nos permite estudiar en una etapa temprana de la gestación la composición del líquido amniótico, y cultivar las células procedentes del feto con el fin de efectuar estudios cromosómicos y bioquímicos.

A pesar de que este procedimiento diagnóstico se practica ya desde hace algunos años en países desarrollados, en México es la primera vez que se intenta el cultivo de células amnióticas con el fin de determinar el cariotipo fetal. Aunque se logró proporcionar a 30 madres a riesgo de tener un hijo anormal, un diagnóstico acertado sobre el cariotipo del feto, aliviando en muchos casos su angustia, y se detectó un caso de trisomía 21 por translocación en una familia en la que ya un hijo afectado por la misma anomalía; tanto el porcentaje de éxitos como el tiempo en que se pudo determinar el cariotipo no fueron completamente satisfactorios. Será ahora necesario continuar esta investigación para conocer todas las causas de los fracasos y así poder evitarlas.

Además, el establecimiento de una metodología para el cultivo de las células fetales representa el primer paso para poder practicar en México no sólo el Diagnóstico Prenatal de aberraciones cromosómicas, sino también de errores innatos del metabolismo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Allen, H. H.; Sergovich, F.; Stuart, E. M.; Pozsonyi, J. y Murrey, E.: Infants Undergoing Antenatal Diagnosis: A Preliminary Report. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 118(3): 310, 1974.
2. Armandares, S.: Diagnóstico Prenatal de las Enfermedades Hereditarias: Riesgos e Indicaciones. *Gaceta Méd. Méx.* 104(2): 110, 1972.
3. Atkins, L.; Milunsky, A. y Shahood, J. W.: Prenatal Diagnosis: Detailed Chromosomal Analysis in 500 Cases. *Clin. Genet.* 6(4): 317, 1974.
4. Barr, M. L. y Bertram, E. G.: *Nature* 163: 876, 1949.
5. Bartman, J.: Ultrastructure of Cultivated Amniotic Fluid Cells. *Obstet. Gynecol.* 38(6): 838, 1971.
6. Bloom, A. D.; Schmickel, R.; Barr, M. L. y Burci, A. P.: Prenatal Detection of Autosomal Mosaicism. *J. Pediatr.* 84(5): 732, 1974.
7. Bloomberg, B. D.; Golbus, M. S. y Hanson, K. H.: The Psychological Sequelae of Abortion Performed for Genetic Indications. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 122(2): 797, 1975.
8. Bonsens, R. W.: The Chemistry and Physiology of Amniotic Fluid. En: - *Antenatal Diagnosis*, (Ed. A. Dorfman). The University of Chicago Press, Chicago, 1973, pág. 3.
9. Boué, J. y Boué, A.: Genetic Counseling and Prenatal Diagnosis of Chromosomal Anomalies. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 14: 290, 1976.
10. Brauer, J.: Moral and Ethical Considerations Concerning Abortion. En: *Antenatal Diagnosis*, (Ed. A. Dorfman). The University of Chicago Press, Chicago, 1973, pág. 243.
11. Casadei, R.; D'Ablasio, G.; Kaplan, B. J. y Schinn, C. P.: A Cytologic Study of Amniotic Fluid. *Acta Cytol.* 17(4): 269, 1973.
12. Cedarqvist, L. L.; Wennerstrom, C.; Senterfit, L. B.; Baldrige, P. E. y Rother, D. J.: Simplified Method for the Accelerated Growth of Amniotic Fluid Cell Cultures. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 116(6): 871, 1973.
13. Churchouse, M. J. y Larstone, V. E.: The Occurrence of "Satellite Cells" in Amniotic Fluid. *Acta Cytol.* 14(9): 609, 1970.
14. Cock, L. N.; Shoot, R. S. y Andreas, B. F.: Fetal Complications of Diagnostic Amniocentesis: A Review and Report of a Case with Pneumothorax. *Pediatr.* 53(3): 421, 1974.

15. Dorfman, A.: Medical Progress: Problems and Probabilities. En: Antenatal Diagnosis, (Ed. A. Dorfman), The University of Chicago Press, Chicago, 1973, pág. 233.
16. Eagle, H.: Nutrition Needs of Mammalian Cells in Tissue Culture. Science 122: 501, 1955.
17. Emery, A. E. H.: Antenatal Diagnosis of Genetic Disease. Churchill - Livingstone, Edinburgh, 1973.
18. Evans, H. E.; Ethan, L. y Glass, L.: Effect of Amniotic Fluid on Bacterial Growth. Obstet. Gynecol. 49(1): 35, 1977.
19. Félix, J. S.; Donerty, R. A.; Davis, H. T. y Ridge, S. C.: Amniotic - Fluid Cell Culture I. Experimental Design for Evaluating Cell Culture Variables: Determination of Optimal Fetal Calf Serum Concentration. - Pediatr. Res. 8(11): 870, 1974.
20. Fuchs, R. y Reis, P.: Nature, 177: 330, 1956.
21. Fuchs, R. y Philip, J.: Proc. Can. Soc. Obstet. Gynecol. 1: 42, 1961.
22. Gairdner, D.: Fetal Medicine - Who is to Practise it? J. Obstet. Gynaec. Brit. Comm. 75: 1223, 1968.
23. Gallaard, H.: European Experience with Prenatal Diagnosis of Congenital Disease: A Survey of 6,121 Cases. Cytogenet. Cell Genet. 16: 453, 1976.
24. Gerbie, A. B.; Melancon, S. B.; Ryan, C. y Nadler, H. L.: Cultivated Epithelial-Like Cells and Fibroblasts from Amniotic Fluid: Their Relationship to Enzymatic and Cytologic Analysis. Amer. J. Obstet. Gynecol. 114(3): 314, 1972.
25. Goldstein, A. I. y Cumars, K. A.: Minimizing the Risk of Amniocentesis for Prenatal Diagnosis. J. Am. Med. Assoc. 237(12): 1336, 1977.
26. Gospodrowics, D.; Moran, J. y Dwashi, N. D.: Effects of Fibroblast - Growth Factor and Epidermal Growth Factor on the Fate of Growth of Amniotic Fluid Derived Cells. J. Clin. Endocrin. and Metab. 44(4): 561, 1977.
27. Gray, C.; Davidson, R. G. y Cohen, M. M.: Simplified Technique for - the Culture of Amniotic Fluid Cells. J. Pediatr. 79(1): 119, 1971.
28. Hesholt, L.: Behaviour of Cell Cultures of Human Amniotic Fluid. J. - Med. Genet. 13(1): 34, 1976.
29. Hauge, M.; Poulsen, H.; Halberg, A. y Mikkelsen, M.: The Value of - Fluorescence Markers in the Distinction Between Maternal and Fetal - Chromosomes. Humangenetik 26(3): 187, 1975.

30. Hoehn, H.; Bryant, E. M.; Karp, L. E. y Martin, G. M.: Cultivated — Cells from Diagnostic Amniocentesis in Second Trimester Pregnancies I. Clonal Morphology and Growth Potential. *Pediatr. Res.* 8: 746, 1974.
31. Hoehn, H.; Bryant, E. M.; Karp, L. E. y Martin, G. M.: Cultivated — Cells from Diagnostic Amniocentesis in Second Trimester Pregnancies — II. Cytogenetic Parameters as Functions of Clonal Types and Preparative Technique. *Clin. Genet.* 7(1): 29, 1975.
32. Hohn, K. V.; Singley, J. A. y Chavin, M.: Fetal Bovine Serum: A Multi variative Standard. *PROC. SOC. Exp. Biol. Med.* 149(2): 344, 1974.
33. Hayes, A. D.: Ultrastructure of Cells of Amniotic Fluid. *J. Obstet. — Gynecol. Brit. Colth.* 75: 164, 1968.
34. Hsu, L. Y. F.; Kim, H. J.; Hausknecht, R. y Hirschhorn, K.: Prenatal Diagnosis of 4EX/46XY Mosaicism with Postnatal Confirmation in a Phenotypically Normal Male Infant. *Clin. Genet.* 10(4): 202, 1976.
35. Hsu, L. Y. F.; Serotkin, A. y Hirschhorn, K.: Identification of Macrophages in Amniotic Fluid Cell Cultures. *Lancet* 1: 799, 1976.
36. Hsu, L. Y. F.; David, K.; Serotkin, A.; Goddard, L. y Hirschhorn, K.: Identification of Macrophages in Amniotic Fluid Cell Cultures. *Lancet* 1: 1349, 1975.
37. Hughes, D. T. y Rink, E.: Prenatal Diagnosis from Uncultured Amniotic Fluid Cells. *Lancet* 1: 269, 1972.
38. Jacobson, C. E.: Techniques and Risks of Amniocentesis. En: *Antenatal Diagnosis*, (Ed. A. Dorfman). The University of Chicago Press, Chicago, 1973, pág. 29.
39. Jacobson, C. E. y Barter, R. H.: Intrauterine Diagnosis and Management of Genetic Infections. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 99(6): 796, 1967.
40. Kardon, N. B.; Chernay, P. R.; Hsu, L. Y. F.; Martin, J. L. y Hirschhorn, K.: Problems in Prenatal Diagnosis Resulting from Chromosomal Mosaicism. *Clin. Genet.* 3: 83, 1972.
41. Katayama, K. P.; Park, I. J.; Heller, K. H.; Barakat, E. Y.; Preston, E. y Jones, M. M.: Errors of Prenatal Cytogenetic Diagnosis. *Obstet. — Gynecol.* 44(5): 693, 1974.
42. Knorr-Gärtnner, H. y Herle, I.: A Modified Method of Culturing Human Amniotic Fluid Cells for Prenatal Detection of Genetic Disorders. *Humangenetik* 14: 333, 1972.
43. Krooth, R. S. y Weinberg, A. N.: Studies of Cell Lines Developed from Tissues of Patients with Galactosmia. *J. Exptl. Med.* 113: 1155, 1961.

44. Lind, T.; Kendall, A. y Hyttén, F. E.: The Role of the Fetus in the Formation of Amniotic Fluid. *J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwth.* 79(4): 289, 1972.
45. Lisgar, F.; Gertner, M.; Cherry, S.; Hsu, L. Y. F. y Hirschhorn, K.: Prenatal Chromosome Analysis. *Nature* 225: 280, 1970.
46. Lubs, H. y Lubs, M. L.: Indications for Amniocentesis. En: *Antenatal Diagnosis*, (Ed. A. Dorfman). The University of Chicago Press, Chicago, 1973, pág. 17.
47. Marchant, G. S.: Evaluation of Methods of Amniotic Fluid Cell Culture. *Am. J. Med. Technol.* 37(10): 391, 1971.
48. Miller, J.; Michel, J.; Bertocci, B.; Argaman, M. y Sachs, T.: Studies on Antimicrobial Activity of Amniotic Fluid. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 125(2): 212, 1975.
49. Morris, N.: Legal Aspects of the Prevention of the Birth of Mentally Retarded Children. En: *Antenatal Diagnosis*, (Ed. A. Dorfman). The University of Chicago Press, Chicago, 1973, pág. 239.
50. Nadler, H. L. y Gerbie, A. B.: *N. Engl. J. Med.* 282, 596, 1970.
51. Nelson, W. M. y Emery, A. E. H.: Amniotic Fluid Cell Cultures. *J. Med. Genet.* 10(1): 19, 1973.
52. NICHD Registry for Amniocentesis Study Group.: Midtrimester Amniocentesis for Prenatal Diagnosis: Safety and Accuracy. *J. Am. Med. Assoc.* 236(13): 1471, 1976.
53. Núñez Castañeda, J.: Aspectos Legales del Diagnóstico Prenatal. *Rev. Invest. Clin.* 30: 321, 1978.
54. Omenn, G. S.: Prenatal Diagnosis of Genetic Disorders. *Science* 200: 916, 1978.
55. Peakren, D. G.; Moreton, M. F. y Robinson, A.: Prenatal Diagnosis: Techniques Used to help in Ruling Out Maternal Contamination. *J. Med. Genet.* 14(1): 37, 1977.
56. Pitkin, R. M.; Reynolds, M. A. y Burchell, R. C.: Fetal Contribution to Amniotic Fluid. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 100(6): 831, 1968.
57. Prescott, G. H.; Pernoll, M. L.; Hecht, F. y Nicholas, A.: A Prenatal Diagnosis Clinic: An Initial Report. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 116(7): 542, 1973.
58. Puck, T. T.; Cieciura, S. J. y Fisher, H. W.: Clonal Growth in vitro of Human Cells with Fibroblastic Morphology. Comparison of Growth and Genetic Characteristics of Single Epithelioid and Fibroblast-Like Cells from a Variety of Human Organs. *J. Exptl. Med.* 106: 145, 1957.

59. Robinson, J.; Tennes, K. y Robinson, A.: Amniocentesis: Its Impact on - Mothers and Infants. A 1 Year Follow-Up Study. Clin. Genet. 8(2): 97, 1975.
60. Rudiger, H. W.: Enhancement of Amniotic Fluid Cell Growth in Culture. Humangenetik 22(1): 81, 1974.
61. Schneider, E. L.; Stanbridge, E. J.; Epstein, C. J.; Galbus, M.; Abbo-Halbasch, G. y Rodgers, G.: Mycoplasma Contamination of Cultured Amniotic Fluid Cells: Potential Hazard to Prenatal Chromosomal Diagnosis. Science 184: 477, 1974.
62. Serr, D. M.; Sachs, L. y Dannon, M.: Bull. Res. Council Israel 58: 137, 1955.
63. Shettles, L. B.: Amer. J. Obstet. Gynecol. 71: 834, 1956.
64. Siegel, S.: Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences. Mc. Grae Hill Book Co., New York, 1966, pág. 7.
65. Simpson, N. E.; Dallaire, L.; Miller, J. R.; Siminovich, L.; Hemerton, R.; Miller, R. y Mc Keen, C.: Prenatal Diagnosis of Genetic Disease in Canada: Report of a Collaborative Study. Can. Med. Assoc. J. 115: 739, 1976.
66. Singh, S.; Millers, I.; Schloot, W. y Goetts, W.: A Rapid Micro Culture Method for Chromosome Preparations from Fibroblasts and Amniotic - Cells. Clin. Genet. 8(1): 18, 1975.
67. Sinnat, E. M.; Dunn, L. C. y Dobzhensky, T.: Principios de Genética. - Ediciones Omega, Barcelona, 1972, pág. 52.
68. Steins, M. W. y Berg, A. R.: Chromosome Analysis of Human Amniotic - Fluid Cells. Lancet 1: 383, 1966.
69. Stevenson, A. C.; Johnson, H. A.; Steward, P. y Dolding, D. R.: Congenital Malformations: A Report of a Study of Series of Consecutive - Births in 24 Centers. Bull. W. H. O. Suppl. 34.
70. Sutherland, G. F. y Bain, D. A.: Antenatal Diagnosis in Inborn Errors of Metabolism: Tissue Culture Aspects. Humangenetik 20(3): 251, 1973.
71. Sutherland, G. R.; Sauld, R. y Bain, D. A.: Observations on Human Amniotic Fluid Cell Strains in Serial Culture. J. Med. Genet. 11(2): 190, 1974.
72. Sutherland, G. R.; Rowser-Riley, S. M. y Gain, D. A.: Chromosomal Mosaicism in Amniotic Fluid Cell Cultures. Clin. Genet. 7(5): 400, 1975.
73. Teperkano, T. R. y Hux, C. H.: Incidence of Tetraploidy as Related to Amniotic Fluid Cell Types. Amer. J. Obstet. Gynecol. 120(8): 1066, - 1974.

75. Triede, H. A.; Crossman, J. T. y Metcalfe, S.: Antenatal Analysis of -
the Human Chromosomes. Amer. J. Obstet. Gynec. 94: 529, 1966.
76. Tjio, J. H. y Levan, A.: The Chromosome Number of Man. Hereditas 42: 1,
1956.
77. Velázquez, A.: Diagnóstico Prenatal de las Enfermedades Hereditarias:
Aspectos Metodológicos. Gaceta Méd. Méx. 104(2): 110, 1972.
78. Velázquez, A.: Somatic Cell Genetics. En: Textbook of Human Genetics -
(Ed. G. Fraser y G. Mayo). Blackwell Scientific Publications, Oxford,
1975, pág. 270.
79. Velázquez, A.; Lowenberg-Favela, E.; Del Vecchio, N. A.; Carnevale, A.;
Niño de Rivera, O. y Castillo, J.: Diagnóstico Prenatal de Enfermedades
Genéticas, Ginec. Obstet. Méx. 268(44): 395, 1978.
80. Velázquez, A. y Sanchez Corcero, J.: El Aborto: Un estudio Multidisci-
plinario. I.N.A.M. Direc. Genl. de Publicaciones. Méx. En prensa.
81. Ahlström, J.: Viability of Amniotic Cells at Different Stages of Gesta-
tion. Lancet 2: 1037, 1970.
82. Ahlström, J.: The Quantity of Viable Cells at Various Stages of Gesta-
tion. Humangenetik 22(4): 325, 1974.
83. Walker, S.; Lee, C. L. Y. y Gregson, H. M.: Polyploidy in Cells Cul-
tures from Amniotic Fluid. Lancet 2: 1137, 1970.