

11217 / 05



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA



DIRECCION DE ENSEÑANZA

DIAGNOSTICO CITOGENETICO PRENATAL NO -INVASIVO
UTILIZANDO CELULAS FETALES EN SANGRE MATERNA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
ESPECIALISTA EN GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA

P R E S E N T A :

DR. MARCELO GONZALEZ RODRIGUEZ

PROFESOR TITULAR DEL CURSO: DR. JOSE ROBERTO AHUED AHUED

ASESOR: DR. RICARDO GARCIA CAVAZOS



MEXICO, D.F.

MARZO 2005

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

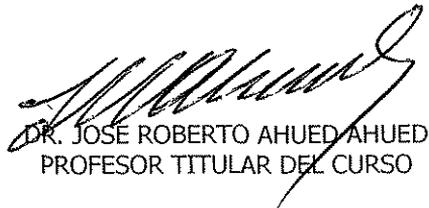
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

DIAGNOSTICO CITOGENETICO
PRENATAL NO-INVASIVO UTILIZANDO CELULAS FETALES EN SANGRE MATERNA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA EN GINECOLOGIA Y
OBSTETRICIA
P R E S E N T A

DR. MARCELO GONZALEZ RODRIGUEZ



DR. JOSE ROBERTO AHUED AHUED
PROFESOR TITULAR DEL CURSO

DR. RICARDO GARCIA CAVAZOS
TUTOR DE TESIS



SUBDIVISION DE ESPECIALIZACION
COMISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
U. N. A. M



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIA

A mis padres por todo el esfuerzo incondicional, su eterno apoyo y el ejemplo de una vida honesta basada en el amor...

A mis hermanos Everardo y Linda por la inseparable presencia en todos los momentos de mi vida...

A mis abuelos Niceforo, Santa, Rebeca y Marcelino por el ejemplo de su vida...

A Oralia y Claudio, Mario y Nicéforo, mis amigos Rafael, Miguel, Jorge, Guillermo y Gerardo pues gracias a su gran apoyo he logrado esta meta...

A Verónica por ser la felicidad que causa el mayor amor tenido, y por obtener de ella siempre mas de lo que espero....

A los dos pequeños frutos ganadores de todo nuestro amor, Hector y Gerardo por recordarme en todo momento el valor de la inocencia...

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ricardo Garcia Cavazos por su apoyo e impulso para ingresar al Instituto y para realizar esta tesis.

Al Dr. Sierra por impulsar el presente trabajo y lograr con sus esfuerzos consolidarlo

A mis maestros inolvidables: Dr. Pablo Garza Rios, Dr Carlos Neri, Dr Manuel Grosso, Dra Carballar (QEPD), Dra Guadalupe Arredondo. Dr Ariel Estrada.

INDICE

	Página
Antecedentes	1
Marco teórico del estudio	11
Justificación	15
Objetivos	16
Hipótesis	17
Material y Métodos	18
Resultados	26
Discusión	28
Conclusiones	30
Bibliografía	31

Introducción:

Actualmente el diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas y desordenes monogénicos esta basada en procedimientos invasivos, se han desarrollado diferentes procedimientos que consisten en la obtención de tejidos o células de la placenta, feto o liquido amniótico a través de inserción de una aguja guiada por ultrasonido en el útero gestante. Las técnicas para el diagnóstico invasivo son relativamente seguras, este procedimiento conduce a un riesgo de pérdida del embarazo en una magnitud de alrededor del 1%, si el procedimiento es realizado con equipo técnico adecuado y un operador experimentado. Por otra parte se están desarrollando estrategias con procedimientos no invasivos que no acarreen un riesgo en sí mismo para el embarazo. Inicialmente la edad materna se ha usado para estimar el riesgo de anomalías cromosómicas basado en el hecho de que el riesgo incrementa con la edad, por lo que es necesario el desarrollo de técnicas para un diagnóstico confiable no invasivo, que eliminen cualquier riesgo para la madre o el producto, especialmente en mujeres embarazadas consideradas de alto riesgo para cromosomopatías.

La incidencia de alteraciones cromosómicas severas en los recién nacidos es aproximadamente de 0.65% o sea 1:156 recién nacidos vivos (RNV), siendo la trisomía 21 (síndrome de Down) la más frecuente, con una incidencia aproximada de 1:650 RNV. En segundo lugar las aneuploidías de sexocromosomas con 1:1000 varones nacidos vivos como es XXY y XYY y 1:1000 mujeres nacidas vivas como es XXX. Los rearrreglos estructurales tienen una frecuencia de 0.20% o 1:1500 RNV. Cabe señalar que la incidencia de alteraciones cromosómicas en relación a la concepción es mucho más frecuente ya que se considera que más del 20-40% de todas las pérdidas gestacionales espontáneas del primer trimestre presentan alteraciones cromosómicas; en estas, el 52% son trisomías autosómicas, el 18% es 45,X, el 22% son poliploidías y el 7% otras alteraciones de tipo estructural o mosaicismos. El cromosoma 21 es el más pequeño de los cromosomas autosomas y comprende el 1-1.5% del genoma haploide y es el segundo cromosoma secuenciado con el proyecto genoma humano.

Como se ha señalado las alteraciones cromosómicas más frecuentes son las trisomías autosómicas y de sexocromosomas entre las cuales se encuentran los cromosomas 21,18,13 y de los gonosomas el X e Y.

Numerosos estudios han determinado que uno de los factores de riesgo para aneuploidias es la edad materna avanzada cuyo riesgo es incrementado importantemente hacia los 35 años (1).

Aspectos Históricos en el estudio de las aneuploidias:

El síndrome de Down (SD) es el primer desorden cromosómico descrito clínicamente por el médico Inglés Jhon Langdon Haydon Down en 1866 del cual proviene su nombre (2), siendo la causa más común de retraso mental. EN México se presenta en 1:600-650 RNV.

Es en 1876 donde Fraser y Mitchell reconocieron que el síndrome de Down se generaba en la vida intrauterina lo cual indicaba un evento congénito. Es en 1914 que Goddard reporta que la recurrencia familiar no aumentaba. La asociación de edad materna y SD fue notada desde 1909 por Suttleworth y el concepto de no disyunción cromosómica fue sugerido por Waardenburg en 1932 y es en 1934 que Bleyer propone que la migración desigual de los cromosomas durante la división celular puede originar trisomías (3).

Es en 1956 que Tjio y Levan, trabajando con técnicas de cultivo de fibroblastos de pulmón y determinaron que el número de cromosomas diploide es de 46 y no 48 así, en 1959 Lejeune demostró que un cromosoma extra acrocéntrico se presenta en individuos con síndrome de Down, dando lugar a un número aneuploide de cromosomas 47 (2).

En 1960 Polani examinó los cromosomas de un niño con síndrome de Down hijo de una mujer de 21 años donde se presentaron 46 cromosomas con fusión de dos cromosomas acrocéntricos (15:21) y en 1960 Penrose demostró que este evento era de transmisión familiar y en 1961 Clark reporta a una niña de dos años con *inteligencia normal pero con estigmas fenotípicos de síndrome de Down* descubriéndose así la forma de mosaico con células normales y trisómicas. Con esta breve historia integramos las formas cromosómicas que generan el síndrome de Down, siendo la trisomía regular la más frecuente en una proporción del 93 al 96% de los casos. El mosaicismo con un 2 a 4% y las translocaciones denominadas robertsonianas de un 2 a 5% . Actualmente los estudios moleculares nos han permitido identificar duplicaciones de porciones críticas del cromosoma 21 que generan estigmas y comportamientos del síndrome de Down lo cual determina que un pequeño desbalance génico, puede traducir el síndrome (4).

El feto o RN con trisomía 18 es menos común que la trisomía 21. Sin embargo, este concepto ha cambiado debido que después de llevar a cabo un estudio de ultrasonido en donde se detecta malformaciones con retrasos del crecimiento es más común encontrar la trisomía 18 como un desorden citogenético en cerca de 50% más frecuente que la trisomía 21. Mientras la trisomía 21 es difícil diagnosticar por ultrasonido prenatal, la trisomía 18 y 13 son diagnosticadas en virtud de los defectos encontrados en la imagen de ultrasonido en relación a retardo del crecimiento, oligo o polihidramnios. La mortalidad intrauterina asociada a la trisomía 18 es muy alta, se calcula que el 2.5% de todas las trisomías 18

sobreviven hasta el nacimiento. Los estudios moleculares utilizando marcadores polimórficos indican que el cromosoma extra 18 es de origen materno en el 90% de los casos generado por un error en la no disyunción de la meiosis II contrariamente a lo que ocurre en el caso de la trisomía 21 donde el error materno es en la meiosis I.

La trisomía 13 descrita por Patau en 1960 corresponde a un cromosoma extra acrocéntrico del grupo D, generando múltiples malformaciones que en la mayor parte de los casos es incompatible con la vida. Robinson en 1966 identifica que el cromosoma extra en la trisomía 13 es derivado materno en el 90% e los casos.

Las anomalías de sexocromosomas incluyen la monosomía X, la polisomía del X y/o Y, en la mayoría de los individuos afectados no se detectan problemas al nacimiento, enfatizando que muchos cambios del fenotipo se adquieren a través del tiempo. El origen parental de la no disyunción de los sexocromosomas como es el caso XXY donde el cromosoma X extra es igualmente heredado de la línea materna o paterna; en XXX el cromosoma X extra es materno en el 90% de los casos; y en la monosomía X el X paterno es ausente en el 80% de los individuos Turner. Recientes investigaciones sugieren que el efecto del origen parental (impronta) es demostrado en estos casos. Cuando el X paterno es retenido, hay evidencias de función cognoscitiva y verbal de alto orden con buena interacción social. El riesgo de polisomía del X aumenta con la edad materna no así la monosomía del X que es más frecuente en madres jóvenes. Una alteración de cromosomas sexuales es diagnosticada en 1 en 250 amniocentesis, indicadas por edad materna, superior a los 35 años siendo más frecuente en los estudios de vellosidades coriales (4).

Diagnostico prenatal de aneuploidias:

Actualmente, el diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas y alteraciones de un solo gen es basado en estudios o procedimientos invasivos. Diferentes técnicas se han desarrollado desde 1960 para detectar este tipo de problemas. Los procedimientos básicamente consisten en la obtención de una muestra de tejido o células de la placenta, feto o líquido amniótico a través de la introducción de una aguja dentro del útero gestante bajo una guía de ultrasonido. Aunque los procedimientos invasivos son relativamente de bajo riesgo, esto depende de la experiencia del operador por lo cual el procedimiento conlleva el riesgo de pérdida del embarazo de cerca del 0.5 al 1 %. Por otra parte, las alteraciones cromosómicas mayores en recién nacidos vivos es aproximadamente 0.65% incluyendo la trisomía 21 con una frecuencia de 0.12%. Por esta razón los procedimientos invasivos son dirigidos a una población seleccionada de alto riesgo para estas alteraciones como es la edad materna mayor de 35 años o un hijo previo con cromosomopatía o un USG anormal.

Es importante señalar que el mayor número de nacimientos con alteraciones cromosómicas en especial trisomías, se ubican en mujeres jóvenes, es por ello que las estrategias de la ginecoestricia moderna orientan a ubicar o estimar el riesgo de estas alteraciones cromosómicas utilizando métodos no invasivos, que no coloquen en riesgo el embarazo. El nivel de corte para riesgo por edad materna es de 35 años que corresponde a 1:385 a término y 1:274 para el segundo trimestre para trisomía 21.(Tabla 1)

EDAD MATERNA AL TERM	ATERMINO	2° TRIMESTRE	OTRA
20	1:1734	1:1231	1/528
21	1:1612	1:1145	1/526
22	1:1500	1:1065	1/500
23	1:1408	1:1000	1/500
24	1:1327	1:942	1/476
25	1:1250	1:887	1/476
26	1:1186	1:842	1/476
27	1:1124	1:798	1/455
28	1:1064	1:755	1/453
29	1:1014	1:721	1/417
30	1:965	1:685	1/384
31	1:915	1:650	1/384
32	1:794	1:563	1/322
33	1:637	1:452	1/285
34	1:496	1:352	1/243
35	1:386	1:274	1/179
36	1:300	1:213	1/149
37	1:234	1:166	1/123
38	1:182	1:129	1/105
39	1:141	1:100	1/80
40	1:110	1:78	1/63
41	1:86	1:61	1/48
42	1:66	1:47	1/39
43	1:52	1:37	1/31
44	1:40	1:29	1/24
45	1:31	1:22	1/18
46	1:24	1:17	1/15
47	1:19	1:13	1/11
48	1:15	1:10	1/8
49	1:11	1:8	1/7

TABLA No.1 Cálculo de riesgo por edad materna y edad gestacional para Síndrome de Down a término y segundo trimestre como de otras cromosomopatías.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

I.- Métodos Invasivos.

Los métodos invasivos se utilizan con el fin de obtener muestras fetales para análisis diagnóstico e interfieren dentro de la unidad fetoplacentaria. Suelen realizarse solo en los casos en que hay un riesgo conocido de anomalía y en ocasiones como resultado de la positividad de una prueba de tamizaje y siempre después de asesoramiento genético. En global, las técnicas usuales para el diagnóstico prenatal invasivo presentan un riesgo de pérdida del embarazo en una magnitud alrededor del 1% cuando es realizada con el equipo técnico apropiado y por un operador experimentado (5).

A) Biopsia de vellosidades coriales:

Esta técnica fue introducida en 1984 por Smidt/Jensen y Hahmeman la cual consiste en la toma de tejido placentario a través del canal endocervical cuando la placenta es posterior y transabdominal cuando es anterior. La obtención de la muestra se realiza por aspiración o por corte en sacabocado y en cualquiera de los dos casos anteriores, siempre se realiza bajo guía ultrasonográfica (5).

La biopsia de vellosidades coriales se realiza entre la semana 10 y 12 de gestación y da la posibilidad del estudio cromosómico de tejidos placentario y funcional de las vellosidades coriales (5).

Las vellosidades coriales son una excelente fuente de ADN, aportando suficiente material para la mayoría de las técnicas genéticas moleculares que no requieren cultivo celular previo, eliminando así el riesgo de contaminación materna en los cultivos de células fetales (5). Sin embargo, pueden surgir dificultades en el diagnóstico y el asesoramiento cuando se detecta mosaicismos cromosómicos. Cuando se detecta un mosaicismo a menudo se encuentra confinado a la placenta (1.9%), mientras que el verdadero mosaicismo ocurre en un 1% aproximadamente de las muestras (5).

Este procedimiento ha tenido algunos reportes de efectos no deseables cuando es utilizado, a parte de que técnicamente es más complicado que la amniocentesis además al realizarlo transcervicalmente, puede arrastrar flora vaginal y producir infección (5). También se ha despertado cierta preocupación el hecho de que la biopsia corial pueda en raras ocasiones producir defectos graves del desarrollo de las extremidades (6,7). La OMS inició un registro internacional de los defectos de las extremidades post biopsia corial en 1992 (8). El estudio no mostró ninguna diferencia respecto a la población control en la frecuencia global o patrón de distribución de las alteraciones de las extremidades fetales. Actualmente se considera razonable realizar biopsia de vellosidades coriales desde la semana 11 en adelante con la certeza de que la técnica no incrementa el riesgo de presentar defectos de las extremidades (9).

B) Amniocentesis:

La amniocentesis (del griego "amnion", membrana que rodea al feto, y "kenesis", perforación), es un procedimiento que consiste en la punción de la cavidad amniótica, por la vía transabdominal, con guía ultrasonográfica continua; es el procedimiento invasivo de diagnóstico prenatal más utilizado, el cual se ha incrementado en los últimos años debido a la introducción del análisis citogenético en el diagnóstico prenatal (5,10).

Schatz en 1881 fue el primero en proponer la amniocentesis, sin embargo Henkel la llevó a cabo hasta 1919. En 1950 Bevis inició su uso para el manejo de la eritroblastosis fetal, posterior a esto la técnica fue ganando aceptación en el estudio de la isoimmunización materno-fetal por presentar una morbilidad materno-fetal baja. En 1956 Fuchs y Riis demuestran que puede realizarse el diagnóstico prenatal del sexo fetal al examinar la cromatina sexual en las células presentes en el líquido amniótico. Serr fue el primero en examinar en forma directa la cromatina sexual en células de líquido amniótico para determinar el sexo fetal. En 1965 Klinger y después Steele y Breg en 1996 reportaron los primeros estudios de cariotipo mediante cultivo de células de líquido amniótico (4).

Se clasifica de acuerdo con la etapa del embarazo en que se realice, se puede clasificar en temprana (11 a 14 semanas), y tardía (15-26 semanas). Debe realizarse en forma ideal entre la semana de gestación 16 y 18 cuando hay mayor número de células viables y líquido amniótico suficiente (250 a 500ml) (10).

Como requisitos para realizarla, la paciente debe estar informada del tipo de procedimiento y riesgo, además de firmar una hoja de consentimiento por escrito, se debe realizar también un ultrasonido previo para vitalidad fetal, volumen de líquido amniótico, localización placentaria y revisión estructural integral (10).

La morfología de las células halladas en el líquido amniótico es variada. En la muestra de líquido amniótico se encuentran diversas células, las cuales son fuentes de ácido desoxirribonucleico (ADN) necesario para el diagnóstico prenatal. Pueden encontrarse células del amnios, piel, vías genitourinarias, aparato respiratorio y tubo digestivo y en general todas presentarían el mismo cariotipo. No es frecuente que las células maternas contaminen los cultivos de líquido amniótico porque su supervivencia es limitada y son sensibles al tratamiento con tripsina que se aplica al material de estudio citogenético, sin embargo puede presentarse ocasionalmente o cuando la muestra se contamina con sangre; por lo que se recomienda eliminar los primeros tres milímetros del líquido obtenido para evitar esta posibilidad (10).

La hibridación in situ con fluorescencia (FISH) permite un estudio directo y rápido del ADN de los cromosomas en interfase o puede emplearse en trastornos monogénicos conocidos (por ejemplo, síndrome de Digeorge) (12). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede aplicarse a células del líquido amniótico no cultivadas para determinar Rh fetal, el antígeno Kell y los antígenos plaquetarios, o para la detección rápida de trisomía 21 u otros problemas cromosómicos en el ADN extraído (10).

Las alteraciones principales que pueden detectarse con estos métodos de estudio (PCR, FISH) son alteraciones cromosómicas numéricas como monosomias y trisomías (síndrome de Turner, trisomía 21), algunas alteraciones cromosómicas estructurales (deleción, duplicación, inversión, translocación) (13).

Las contraindicaciones para realizarla incluyen actividad uterina, proceso infeccioso materno a cualquier nivel; oligoamnios severo entre otras. Las complicaciones pueden ser actividad uterina, ruptura prematura de membranas, hemorragia, corioamnionitis, trauma de cordón o placenta, lesión fetal entre otras

El procedimiento no está exento de riesgos, tales como:

1. Aborto espontáneo: inferior de 1 cada 200 embarazadas o 5%.
2. Corioamnionitis: 1 en cada 1,000 embarazadas.
3. Salida de líquido transvaginal: 2 cada 500 embarazadas (10).

Es indudable que los riesgos disminuyen al realizar el procedimiento bajo guía ultrasonográfica continua, siendo este el método que actualmente se realiza en México (14).

II.- Métodos No-Invasivos

Durante los últimos 30 años, investigaciones para lograr tener información del estado de salud fetal han sido enfocados a métodos no invasivos, entre ellos se encuentran el aislamiento de células fetales de sangre materna que puedan proporcionar información principalmente del estado cromosómico fetal. Los eritroblastos son células que han tenido la mayor atención ya que son abundantes en la sangre fetal en el embarazo temprano, estas células son extremadamente raras en la sangre del adulto y su vida media es de aproximadamente de 30 días. Tienen además el ADN necesario para realizar análisis genéticos (15), tienen también la ventaja de que son las células más fáciles de identificar debido al desarrollo de procedimientos de tinción específicos para la hemoglobina fetal (16). Las células del trofoblasto que se desprenden a la sangre materna desde las vellosidades corionicas son eliminadas principalmente en el pulmón y no son candidatas a su estudio cromosómico dado que son polinucleares (17) Los linfocitos fetales también pueden ser identificados en la sangre materna, su

número es muy bajo y su vida media es muy larga, llegando a permanecer por más de 20 años en la circulación materna; sumándose a linfocitos de embarazos previos (18).

Cerca de 1 en 10^3 - 10^7 de células nucleadas fetales se encuentran en la sangre materna. La proporción de células fetales de sangre materna podría ser de 1 en 10-100 obtenidas por métodos de aislamiento celular como es el aislamiento magnético (MACS) o por fluorescencia con (FACS) utilizando anticuerpos selectivos como es el CD71 que se une selectivamente al receptor de ferritina presente en la superficie de la membrana celular donde activamente se incorpora el hierro (15). La técnica de FACS (separación celular por citometría de flujo) es una técnica que separa físicamente las células fetales de las células maternas en base a las características antigénicas de la pared celular. Se utilizan anticuerpos monoclonales marcados con fluorescencia (inmunofluorescencia). Esta técnica es costosa y complicada para su empleo en la práctica clínica. La técnica de MACS (magnetic activated cell sorting) se basa en las características inmunológicas de la célula. Utiliza anticuerpos monoclonales unidos a microperlas magnéticas (inmunomagnetismo) y un separador celular magnético. Se trata de un método relativamente simple y rápido más fácil de implementar en la práctica clínica (19).

Las células aisladas e identificadas son factibles de utilizar para análisis citogenético por técnica de fluorescencia por hibridación in situ (FISH). Las sondas para identificación de los cromosomas específicos son DNA-cromosoma específico para los cromosomas involucrados en el mayor riesgo de aneuploidías por edad materna como son los cromosomas 21,18,13, X e Y. Lo interesante es que la sonda específica marca a los cromosomas en interfase o sea en células que no se encuentran en división por lo que es la técnica ideal para los eritroblastos ya que estos no se dividen y no expresan cromosomas de metafase. Uno de los grandes problemas que se enfrenta al aplicar esta técnica es que por FISH un 1-2% de las células pueden dar dos señales aun siendo trisómicas por lo que hay que contar suficientes núcleos para determinar un diagnóstico adecuado (19,20).

A) Ultrasonografía:

La ultrasonografía con todas sus variantes se ha convertido en la punta de la lanza de la observación fetal. Con la mejoría en la imagen bidimensional basada en la velocidad de repetición de cuadros y en las escalas de grises, esta tecnología que utiliza como principio la emisión de ondas sónicas de alta frecuencia y su reflejo al chocar con diferentes tejidos; permite no solo la visualización de un embrión desde la semana 5-6 del embarazo, sino que a edades gestacionales tempranas se puede realizar diagnósticos tan certeros como el de anencefalia (5).

La estrecha relación entre las anomalías cromosómicas y las malformaciones estructurales justifica que un alto porcentaje de fetos con cariotipo anormal

pueden ser identificados en el curso de un estudio ecográfico detallado. Algunos de estos defectos (denominados marcadores) son fácilmente detectados, pero otros son variaciones de la normalidad que presentan una asociación más débil con las cromosomopatías.

Planteada como técnica de tamisaje la exploración ecográfica requiere la revisión sistemática de la anatomía fetal y la búsqueda de los marcadores ecográficos, de entre los que se destaca la medición de la translucencia nucal en el primer trimestre por su elevada capacidad predictiva. Otros marcadores ultrasonográficos para cromosomopatía son dilatación pielocalicial, hipercogenecidad intestinal, el foco ecogénico intracardiaco, los quistes del plexo coroideo, el fémur y húmero acortados, el acortamiento de la falange media del quinto dedo, el aumento del ángulo iliaco, la arteria umbilical única entre otros (21,22).

Se ha mencionado mucho acerca del abuso del ultrasonido, sin embargo aunque el costo en personal y recursos es relativamente alto, toda mujer embarazada debe verse beneficiada con esta tecnología, ya que el diagnóstico anteparto permite en algunas situaciones un tratamiento correctivo, un apoyo psicológico a la pareja y un nacimiento programado en las mejores condiciones posibles (5).

No existe ningún reporte en la actualidad que establezca la presencia de efectos teratogénicos por la exposición a ondas ultrasonográficas para diagnóstico durante el embarazo. Se han mencionado riesgos potenciales identificados a altas frecuencias de emisión y por tiempo prolongado como la cavitación y el incremento de temperatura tisular, observados únicamente en estudios experimentales (21,22).

B) Marcadores bioquímicos de aneuploidias:

Entre los años ochentas y noventas el estudio de marcadores bioquímicos circulando en la sangre materna como son: alfafetoproteína, la gonadotropina coriónica y el estriol libre o no conjugado que integra la prueba del triple test, este examen ha tenido gran acogida y permanece actualmente vigente. En adición a este estudio la imagenología fetal es fundamental desde el primer trimestre, donde se identifica y se mide la translucencia nucal la cual se asocia a aneuploidias cuando se presenta > 3mm. Con estos estudios se detecta de un 60 a un 70% en el segundo trimestre, y de un 80 a 90% en el primer trimestre, lo cual reduce los procedimientos invasivos hasta en más de 15%.

Alfa-feto-proteína (AFP): La alfafetoproteína fue el primer marcador bioquímico utilizado en el tamizaje prenatal de malformaciones congénitas. En el año 1974, Wald y Brock demostraron la relación de niveles altos de AFP en el suero de las madres gestantes portadoras de fetos afectados con defectos del tubo neural (23),

posteriormente, en 1984, Merkatz observó la correlación entre niveles bajos de AFP en suero materno, durante el segundo trimestre de la gestación, y embarazos de fetos afectados de aneuploidías. Al ser la concentración sérica de la AFP independiente de la edad materna, fue posible la combinación de ambas y constituir un nuevo método de screening prenatal de aneuploidías. La AFP es un marcador particularmente específico, pero poco sensible, para la detección de la trisomía 21. Cuando se utiliza de forma aislada su sensibilidad es únicamente del 25% (24,25).

Gonadotropina coriónica humana (hCG): La hCG es una molécula compuesta por dos cadenas o subunidades: alfa y beta. Ambas subunidades coexisten en forma ligada (hCG intacta) y libre (fracción alfa hCG libre y fracción Beta hCG libre). La molécula posee, en la superficie, unos determinantes antigénicos que permiten su cuantificación mediante las técnicas de inmunoensayo, se puede determinar tanto los niveles de la molécula entera, como los de cada una de las fracciones. Las alteraciones en los niveles de la hCG en suero materno se han relacionado con la presencia de anomalías cromosómicas fetales (26).

En 1990 Muller y Boue evidenciaron la asociación de niveles bajos de hCG a gestaciones con fetos afectados por trisomía 18. Posteriormente en 1992, otros autores publicaron la asociación de niveles bajos de la hCG con algunas triploidías; todo ello hace que la hCG sea considerada como el mejor marcador bioquímico, en el segundo trimestre de la gestación, cuando se valora de forma individual. Su sensibilidad global, para la detección de aneuploidías, es de alrededor de un 40% (27).

Además de la AFP y la hCG se han estudiado otros marcadores, como el estriol no conjugado (uE3). En 1998, Canick demostró la asociación entre niveles bajos de uE3, en suero materno, y gestaciones con fetos afectados por síndrome de Down (27). En 1998 Wald propuso un programa para el screening del Síndrome de Down, basado en la combinación de la edad materna, y la concentración en suero materno de AFP, hCG y uE3 (28).

Para mejorar la sensibilidad y especificidad actualmente se realiza la determinación de los tres marcadores bioquímicos mencionados anteriormente y se combinan con la edad materna avanzada y en algunos casos con hallazgos ultrasonográficos específicos como el pliegue nucal. La metodología no es sencilla, y cada laboratorio debe estandarizar sus mediciones tomando en cuenta la población que maneja, los marcadores bioquímicos y la forma de representar los resultados, de lo contrario se pierde mucha validez para el diagnóstico prenatal.

SEPARACION MAGNETICA DE CELULAS FETALES

El descubrir la presencia de células fetales en la sangre materna no es algo nuevo, en 1893 Schmorl identificó trofoblastos en tejido pulmonar de mujeres que murieron por eclampsia (29). En 1959 60 años después, Douglas reportó que al tomar una muestra de la vena uterina transcesárea se encontraron trofoblastos en 8 de 13 pacientes (30). En los años posteriores y aún en esa década Kleihauer demostró la presencia de eritrocitos fetales presentes en la sangre materna (31). En 1969 Walknowska y colaboradores reportaban la presencia de células con mitosis XY en la circulación sanguínea de mujeres embarazadas (32). Sin embargo es al Dr. Schroder en 1975 al que se le reconocen resultados reproducibles y válidos al detectar células fetales (linfocitos) usando como marcador citogenético al cromosoma Y observándolo por microscopía. De esta manera podía saber el sexo fetal y confirmarlo al nacimiento (33).

En 1992 se describe el uso de la técnica de MACS (magnetic activated cell sorting) para la extracción de células fetales, además se inicia el uso del anticuerpo CD71 como marcador genético. Esta técnica es actualmente la más utilizada a nivel mundial para la extracción de células fetales (34). El siguiente año se aplica la técnica de FISH (hibridación in situ con inmunofluorescencia) para detectar aneuploidias fetales como la trisomía 18 y 21, se determina también que las células fetales no persisten en los embarazos posteriores (35) y en 1997 se determina que los antígenos de superficie reconocidos por los anticuerpos monoclonales disminuye conforme se incrementan las semanas de embarazo (36); también se reporta que el CD71 es altamente expresado en células nucleadas en el crecimiento temprano fetal y sugiere que el receptor de la transferrina CD71 es muy susceptible de ser detectado con el anticuerpo correspondiente para el aislamiento de células fetales en el inicio del embarazo (37). Adicionalmente se demuestra que los fetos con aneuploidias expresan mayor transferencia de células fetales en la sangre materna que los fetos sanos (38). Con la experiencia acumulada en los diferentes centros, el National Institute of Child Health and Human Development Fetal Cell Isolation Study (NIFTY) creado en 1994 reporta que en la tasa de falsos positivos de los diferentes métodos no invasivos (principalmente el ultrasonido) de diagnóstico prenatal es de 5% a 20%, mientras que los falsos positivos obtenidos en los diferentes grupos que utilizan el aislamiento de células fetales es de 1%. Esto indudablemente permite disminuir el impacto emocional a las pacientes (39).

Con la evidencia a favor, el estudio de células fetales continuo avanzando, en España por ejemplo logran predecir el sexo fetal en 59 casos, además de

corroborar las aneuploidias al nacimiento (40). Ya en el inicio de la presente década el Dr. Yang YH realizó aislamiento de células fetales por medio de la técnica de MACS usando como marcador genético los receptores CD71, posteriormente realizaron FISH a las células aisladas, se estudiaron 65 casos obteniendo una sensibilidad de 100% y especificidad de 91.7% en la detección del sexo fetal (41), y en el 2001 se establece finalmente que las semanas ideales para realizar el estudio de las células fetales son de la 12 a 15 semanas (42).

Aspectos importantes de la técnica de MACS:

Con MACS, la separación celular se realiza fácil y rápido. Las células en suspensión son separadas con una alta pureza acorde a sus antígenos de superficie en minutos. MACS fue desarrollado en 1988 en el Instituto de Genética de la Universidad de Cologne, es un sistema para pre-enriquecer las células y después separarlas y clasificarlas. Desde entonces la compañía Miltenyi Biotec trabaja continuamente para el perfeccionamiento de la misma.

Con la tecnología de MACS se pueden separar alrededor de 10^{11} células en un paso. Las células están marcadas con anticuerpos magnéticos en aproximadamente 10 minutos. La tecnología de MACS permite aislar muchos tipos celulares incluyendo células animales, de plantas, bacterias y por supuesto las humanas. Dentro de éstas, es factible separar las células fetales de las maternas en la sangre periférica.

Como ya se describió, existen grupos de trabajo en todo el mundo que han enfocado sus esfuerzos para hacer que esta técnica sea aplicable en la clínica en un futuro cercano, actualmente su sensibilidad y especificidad son de 70 a 75% y sus falsos positivos de 1 a 2%; se espera que a corto plazo su sensibilidad aumente a 90-95% (19).

En el INPer ya se ha logrado tener experiencia en el manejo de la técnica de MACS, en el 2000 se logró la identificación no invasiva del grupo sanguíneo RH fetal. En este trabajo la separación de células fetales se efectuó mediante el empleo de anticuerpos monoclonales que reconocen los marcadores: CD14+, CD45+ y CD71+ utilizando la técnica de separación magnética (MACS). El DNA genómico se extrajo a partir de los eritroblastos fetales recuperados por la separación celular magnética, mediante una técnica de extracción salina. Se utilizaron dos iniciadores para la detección simultánea de los genes RhD y RhCE. Se obtuvo una sensibilidad diagnóstica del 89% y una especificidad diagnóstica del 100% (43).

En los últimos cuarenta años se han publicado múltiples trabajos sugiriendo primero y confirmando después, la presencia de células nucleadas procedentes del feto en la circulación periférica de mujeres embarazadas. Sin embargo, los resultados publicados durante los primeros años de investigación fueron pocos alentadores(44). Actualmente, gracias a los avances realizados en las áreas de la inmunología (anticuerpos monoclonales), de la separación celular (fluorescence activated cell sorter o FACS, magnetic activated cell sorter o MACS) y de la biología y citogenética molecular (reacción en cadena de la polimerasa o PCR, hibridación *in situ* fluorescente o FISH), resulta posible estudiar y caracterizar las diferentes poblaciones celulares fetales presentes en la circulación periférica de la mujer embarazada (15).

A inicios de los 1990's, se utilizó reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar secuencias del ácido desoxirribonucleico (DNA) específico al cromosoma Y en sangre materna de mujeres embarazadas con productos masculinos, demostrando que células fetales existen en sangre materna(38). El análisis de estas células con la técnica de FISH con sondas específicas para identificar células fetales trisómicas o masculinas en sangre materna se ha utilizado con éxito. Las principales líneas de células fetales que se han aislado de la sangre materna incluyen.

Linfocitos Fetales.

La detección temprana de linfocitos fetales en sangre materna, es referida por Faust y cols, en 1976 a las 7-8 semanas de embarazo. La proporción de linfocitos fetales en sangre materna oscila entre 0.01 % y 3.7 % estimándose que la relación entre linfocitos fetales y maternos varía entre 1/800 y 1/60,000(32). Sin embargo el aislamiento de los linfocitos fetales de sangre periférica materna mediante anticuerpos monoclonales anti HLA, presenta tres grandes dificultades. Por un lado, el gran polimorfismo de los locus HLA hace que la selección del anticuerpo sea especialmente difícil. Por otro lado, la necesidad de identificar los antígenos celulares parentales previamente al aislamiento de las células fetales, convierte al método en demasiado largo y costoso para la práctica clínica. Por último la falsa paternidad es un punto importante a tener en cuenta, si el aislamiento de células fetales se realiza únicamente con base a los locus HLA paternos(33). Los linfocitos pueden permanecer después de un embarazo o aborto previo, provocando errores en la detección de diagnósticos. La persistencia de linfocitos fetales en la circulación materna puede ser de un período de tiempo superior a cinco años post parto, haciendo que esta población celular fetal no sea la más idónea para el diagnóstico prenatal no invasivo (32).

Células trofoblásticas.

Las células trofoblásticas son células fetales multinucleadas procedentes de las vellosidades coriales, que están en íntimo contacto con la circulación materna. En 1982, Goodfellow y Taylor publican el aislamiento de células trofoblásticas en sangre periférica materna usando un anticuerpo microvellositario antitrofoblástico. Se cree que a partir del segundo mes de embarazo, la tasa por día de células trofoblásticas que migran desde las vellosidades coriales a la circulación materna es de 100.000, estimándose que su dilución en la población de leucocitos maternos es de 1:10(16). A pesar de que las células trofoblásticas son la población celular fetal que más tempranamente se pone en contacto con la circulación materna, y probablemente también es el grupo celular fetal con mayor representación en el torrente sanguíneo materno, su utilización en el diagnóstico prenatal no invasivo presenta varios problemas: la posibilidad de una discrepancia genética entre el trofoblasto y el feto, y el aspecto multinucleado de las mismas, que puede representar un problema a la hora de la interpretación y análisis genético de dichas células (17).

Eritroblastos fetales.

Los eritroblastos representan una población celular diana ideal para los experimentos de aislamiento y detección de células fetales a partir de la circulación materna, dado que en muy raras ocasiones circulan en sangre periférica de adultos normales, estando presentes en cantidades considerables en la circulación fetal(15). Dado que los eritroblastos nucleados son raros en la circulación adulta, aquellos que se aíslan de la circulación periférica materna durante el embarazo, seguramente habrán derivado del mismo (38).

Las células fetales se encuentran en concentraciones muy bajas (1 célula fetal en 1×10^4 a 1×10^7 células maternas), se encuentran en etapas tempranas del embarazo, son mononucleadas, y su vida media es corta (25-35 días) lo que imposibilita que sean detectadas en embarazo subsiguiente, por lo tanto la separación celular por citometría de flujo posibilitó la identificación y análisis de eritroblastos fetales por la técnica de hibridación *in situ* fluorescente o FISH. Aunque se han detectado trisomías específicas, se debe realizar un diagnóstico prenatal efectivo de las aneuploidías más comunes (que involucran los cromosomas 13, 18, 21, X y Y) en la población (4).

JUSTIFICACIÓN

El objetivo del diagnóstico prenatal es obtener información bioquímica, genética y fisiológica acerca del feto. En los 1970's el diagnóstico prenatal surgió como una posibilidad médica y en los 1980's el desarrollo de la tecnología disponible se estandarizó para todas las pacientes con indicaciones definidas, principalmente aquellas con factores de riesgo general como la edad materna mayor a 35 años al momento del nacimiento del producto, escrutinios hormonales anormales en el suero materno, factores específicos como anomalías detectadas por ultrasonido, un hijo previo afectado por una cromosomopatía, óbito previo o muerte neonatal temprana, miembros de la pareja portadores de trastornos recesivos o abortos recurrentes.

Todas las mujeres tienen riesgo de presentar embarazo con alguna anomalía cromosómica. Este riesgo inherente se incrementa con la edad materna y disminuye con el transcurso de la gestación. El diagnóstico prenatal invasivo ha estado disponible por más de 30 años. Estos procedimientos presentan un riesgo tanto para la mujer como para el feto, aproximadamente la mitad de las mujeres mayores de 35 años asumen dicho riesgo. Por lo que es importante el desarrollo de una prueba que se pueda realizar durante el primer trimestre del embarazo y que no represente riesgo para la madre ni para el feto. La habilidad de diagnosticar cromosomopatías (aneuploidías de cromosomas 13, 18, 21, X e Y) en el feto continúa incrementándose con el avance tecnológico con lo cual se permite el diagnóstico precoz de las mismas ofreciendo a los padres y el médico los beneficios de su conocimiento en etapas tempranas del embarazo.

OBJETIVOS

- 1.-Desarrollo de un método no invasivo con alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico prenatal de aneuploidías.
- 2.-Aislamiento de eritroblastos de sangre materna periférica y determinación del origen fetal de los mismos.
- 3.-Comparación de pruebas diagnosticas prenatales ya establecidas como la amniocentesis y marcador triple, con procedimientos no invasivos como aislamiento de eritroblastos fetales y FISH, para el diagnostico prenatal de aneuploidías.
- 4.-Evaluar sensibilidad, especificidad y valores predictores del diagnostico prenatal no invasivo.
- 5.-Evaluar las aportaciones del diagnostico prenatal no invasivo.

HIPOTESIS

La evaluación prenatal temprana (9 a 13 semanas de gestación) de células fetales en sangre materna, en pacientes con embarazo de alto riesgo para cromosopatías es un procedimiento diagnóstico prenatal no invasivo, sin riesgo para la madre o el producto, con mayor especificidad y sensibilidad que las pruebas diagnósticas prenatales ya establecidas como la amniocentesis.

I.-Metodología:

Mediante un modelo descriptivo, prospectivo, transversal y observacional se estudió al binomio madre-feto para demostrar la capacidad de aislamiento de células fetales por medio del anticuerpo CD71 y la separación celular magnética con la técnica de MACS.

El trabajo se dividió en dos etapas:

Primera: se establecieron las condiciones necesarias para la separación de las células fetales presentes en la circulación materna.

Segunda: se comprobó que las células aisladas fueran fetales por medio de microscopía mediante la tinción con Wright en frotis.

Universo

Mujeres embarazadas que acuden a la consulta de diagnóstico prenatal del Instituto Nacional de Perinatología, La edad seleccionada fue de 35 a 41 años por su riesgo de cromosomopatía y que se encontraran en la semana 12-14 de la gestación por FUM o USG.

Tamaño de la muestra

El estudio se considero como piloto para la estandarización de la técnica y la compra de los insumos. La muestra consistió de 5 pacientes.

Criterios de inclusión, no inclusión y exclusión

1.-Inclusion:

Mujeres embarazadas con edad mayor a 35 años que cumplan criterios para ingresar a la clínica de diagnóstico prenatal.

Consentimiento verbal y escrito para participar en el estudio.

Embarazo del primer o segundo trimestre.

2.-No inclusión:

Negativa a participar en el estudio

3.- Exclusión:

Mujeres embarazadas que no cumplen criterios para seguimiento en la consulta de diagnóstico prenatal
Embarazo del tercer trimestre

Variables en el estudio

1.- Edad

Años en el momento del embarazo actual y de la toma de la muestra sanguínea (información obtenida de interrogatorio directo)

2.- Antecedentes ginecoobstétricos:

Número de gestaciones, cesáreas, partos y abortos. Número de productos malformados previos, o con alteraciones cromosómicas. (información obtenida de interrogatorio directo).

3.- edad gestacional:

Semanas de gestación por amenorrea segura y confiable en el momento de la toma de la muestra sanguínea materna o bien de acuerdo al ultrasonido en edades gestacionales inciertas (información obtenida de interrogatorio directo y expediente).

Recolección de datos

Se recolectaron los datos por medio de interrogatorio dirigido y se vació la información obtenida en un formato de historia clínica diseñado especialmente, se les asignó un número así como a la muestra sanguínea y se continuó el seguimiento del embarazo.

Aspectos éticos

Es una investigación de riesgo mínimo, se contó con la firma de autorización de la paciente para ingresar al protocolo.

Etapa Uno

Se recolectaron muestras sanguíneas maternas mediante el sistema vacutainer en 4 tubos de 5ml con anticoagulante K3 EDTA (compañía becton Dickinson). La muestra consistió en 20ml de sangre total obtenida por punción venosa en la vena antecubital, con una aguja calibre 21 (figura 1).



Figura 1
Tubo falcon de 50ml con 20ml de sangre materna en que se diluye la muestra 1:1 con solución fisiológica

Se vacía la muestra sanguínea (20ml) en un tubo Falcon de 50ml y se diluye 1:1 con 20ml de solución fisiológica al 0.9% de NaCl (fig 1), la solución se vierte lentamente por las paredes del tubo para no dañar las células, se agita el tubo suavemente por 2 minutos. La muestra diluida se coloca en 6 tubos Falcon de 15ml, se agrega Linfoprep en relación 2:1 (3ml de Linfoprep con 6ml de sangre diluida). Este paso de la técnica se denomina gradiente de Ficoll (figura 2). El Linfoprep es un polisacárido (densidad 1.077 gr/ml a 20 grados centígrados) que permite separar de acuerdo al tamaño y peso molecular de los componentes celulares de la muestra por el principio de migración, al centrifugarse la muestra las células mononucleares (monocitos, linfocitos y eritroblastos) quedan en la capa superior y los eritrocitos maternos con las plaquetas en la inferior.

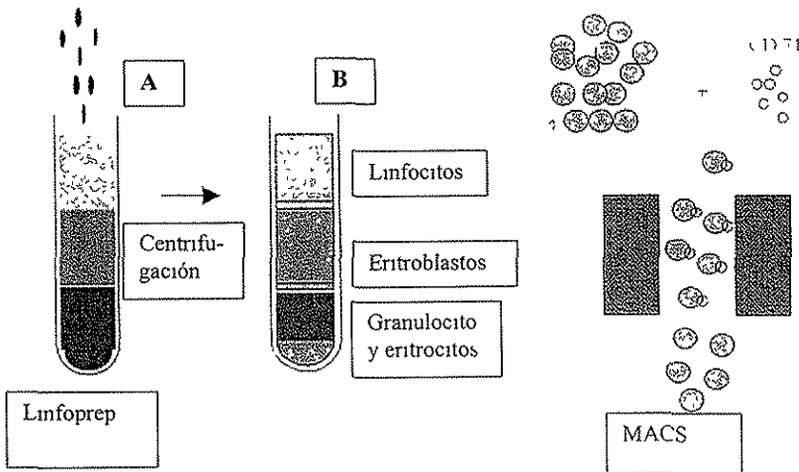


Figura 2
El tubo A contiene en su porción inferior la solución Linfoprep, en la parte superior se coloca la sangre materna evitando en todo momento que se mezclen las fracciones. El tubo B contiene a los eritroblastos fetales en la interfase entre el linfoprep y los eritrocitos maternos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se colocan los 6 tubos en una centrifuga Beckman GS-6R con un rotor modelo 798-3570 y se centrifugan por 20 minutos a 2,500rpm, sin freno y a temperatura ambiente.

Se obtienen dos fracciones celulares, la interfase contiene mononucleares maternos y eritoblastos fetales, la inferior contiene eritrocitos maternos y plaquetas (figura 2 y 3).

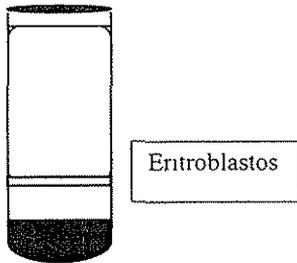


Figura 3

Una vez centrifugada la muestra con el gradiente de Ficoll, se identifica la interfase en donde se encuentran los monocitos y linfocitos maternos, además de los eritoblastos fetales

Se extrae la interfase con una pipeta Pasteur evitando mezclarla con la inferior, se colocan las células de la interfase un tubo Falcon de 50ml, se diluyen 1:5 con solución Buffer PBS1X (Sol Buffer PBS 1X a pH 7.2) y se "lavan" las células, se centrifugan en una centrifuga Beckman GS-6R durante 5 minutos a 3000rpm a temperatura ambiente.

Se obtiene un botón celular en el fondo del tubo (figura 4), se decanta el sobrenadante con cuidado sin perder el botón celular, se resuspende el mismo en 1ml de una solución (EDTA 2mm 30ml, mas BSA 0.5% 30ml).

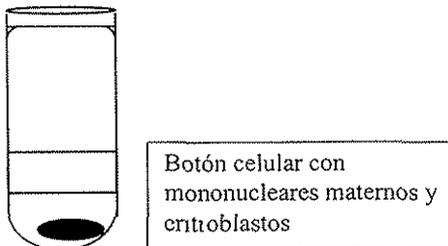


Figura 4

Posterior a la centrifugación, se obtiene el botón celular en el fondo del tubo

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Se procede a realizar un conteo celular en una cámara de Neubauer (0.0025 mmcuadrados marca Mari Enfeld) tomando 10ul de la muestra celular mas 90ul de azul tripan al 0.1%, se mezclan y tomando 10ul de la solución los cuales se colocan en la cámara de Neubauer (figura 5).

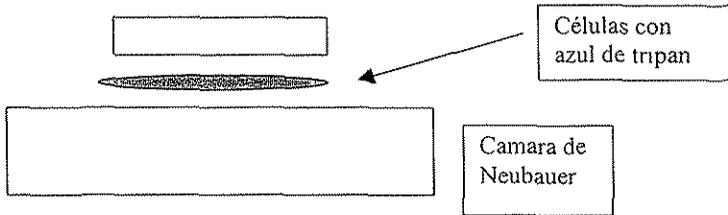


Figura 5

Las células teñidas se colocan entre la cámara de Neubauer y el cubreobjetos para poder proceder al conteo de las mismas

Se observa con microscopio óptico al 40X (microscopio Nikon Labophot-2) y se realiza el conteo de las células vivas y muertas en los cuatro cuadrantes. El número de células vivas se obtiene al sumar el total de las que no presentan permeabilidad al colorante y se multiplica por una constante de 100,000.

El siguiente paso consiste en la selección de los eritroblastos fetales por medio del receptor de transferrina presente como antígeno de superficie en la membrana celular del eritroblasto. Se procede a favorecer la unión del anticuerpo CD71 que es selectivo para este receptor de transferrina, este anticuerpo tiene la propiedad de estar unido a una microesfera magnética. En nuestro trabajo se selecciono el anticuerpo CD71 porque como ya se describió antes, este anticuerpo es el mas específico para unirse a los receptores de ferritina en la membrana presentes en los eritroblastos de las células fetales (figura 6).

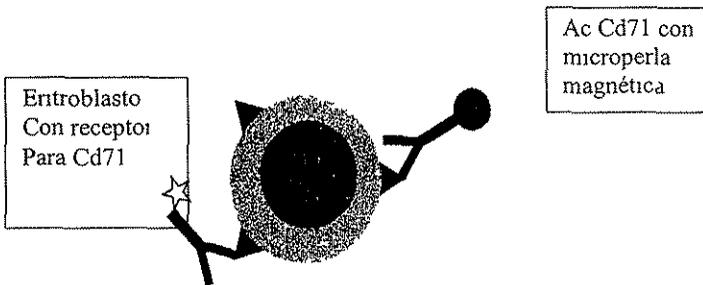


Figura 6

Eritroblasto con el antígeno de superficie al cual se une el anticuerpo CD71 Este anticuerpo se encuentra unido a una microesfera magnética que permite separar a la célula fetal de las demás células al exponerla a un campo magnético

Por cada 10,000,000 de células vivas se agrega al homogeneizado celular 8ul del Buffer PBS y 20ml del anticuerpo CD71 y se incuba a 4 grados centígrados por 20 minutos. Se pasa la solución a un nuevo tubo falcon de 50ml y se agrega 20 veces del volumen de Buffer PBS y se "lava el concentrado celular", se centrifuga nuevamente con las condiciones ya descritas y se obtiene un nuevo botón celular, se decanta el sobrenadante desechando el anticuerpo que no se haya unido a las células fetales y se resuspende el botón celular con 1 ml de Buffer (PBS + EDTA2mm+BSA 0.5%).

Se escoge la columna apropiada del MACS (columna MS+/RS+) y se coloca en el MACS junto con el tubo colector. Se lava el sistema con 3ml de PBS y se agrega el homogeneizado celular ya incubado con en anticuerpo CD71. El anticuerpo tiene a su vez unido una esfera magnética y al pasar las células por la columna metálica se adhieren a la misma (fracción positiva) por el efecto del campo magnético creado por el imán incluido en el equipo MACS. Las células mononucleares y linfocitos maternos no marcadas con el anticuerpo pasan libremente por la columna ferromagnética y se recolectan en un tubo (fracción negativa). Figura 7.

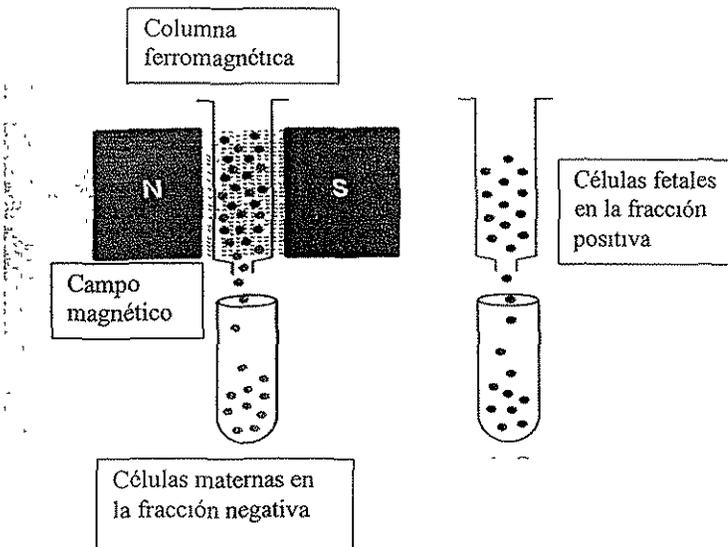


Figura 7

Las células fetales marcadas con el anticuerpo CD71 marcado con una esfera magnética, al pasar por la columna metálica y exponerse al campo magnético son separadas en dos fracciones: la fracción positiva y la fracción negativa

Lo que se obtiene del paso anterior son dos fracciones, la primera que contiene las células fetales marcadas con el anticuerpo CD71 a la que llamaremos fracción positiva, y la segunda que contiene la fracción celular no unida al anticuerpo que

se llama fracción negativa. La fracción positiva que es la que nos interesa tiene la ventaja de ser la manera más directa de aislar las células fetales, en esta fracción raramente se afecta la función de las células o su viabilidad. Se puede obtener una selección celular con un alto grado de pureza con un solo paso de las células a través de la columna magnética.

Segunda etapa:

Se realiza un frotis con las células fetales que lograron separarse. Se tiñe el frotis con la técnica de Wright y se observan bajo microscopía directa (microscopio Nikon Labophot-2 al aumento 40x). A continuación se describen la cadena de diferenciación que siguen los eritroblastos fetales y que por su morfología característica nos permiten identificarlos en el frotis.

Pronormoblasto: ésta es la primera célula reconocible como perteneciente a la célula eritroide. Mide 12 a 29mcm de diámetro y se distingue del mieloblasto por su citoplasma muy azul, que suele ser sólo una estrecha orilla en torno del núcleo relativamente grande; muchas veces se tiñe en forma despareja y puede presentar un halo perinuclear. El núcleo consiste en una red de riendas de cromatina distribuidas con uniformidad, que le imparten un aspecto finamente reticular. Se tiñe de un color púrpura rojizo y contiene varios nucléolos más oscuros.

Normoblasto inicial: Existe una gran semejanza entre esta célula y el pronormoblasto; su diámetro varía entre 10 y 16mcm. El núcleo es relativamente grande, muy tingible y las riendas de cromatina son más gruesas que en el pronormoblasto, de modo que le confieren un aspecto más grueso; no suelen verse nucléolos.

Normoblasto intermedio: En esta célula, que mide 8 a 14mcm de diámetro, el citoplasma presenta una reacción tintorial policromática, es decir, tendencia a tomar los colorantes básicos y ácidos, de modo que le imparten tinte púrpuro que se torna más acidófilo a medida que la célula madura porque empieza a aparecer hemoglobina. El núcleo ocupa una parte relativamente más pequeña del total y disminuye de tamaño a medida que la célula envejece; ahora se tiñe intensamente y la cromatina está dispuesta en grumos (46).

Una vez comprobado que las células aisladas sean fetales, se procede a realizar la técnica de FISH (hibridación in situ con inmunofluorescencia) en núcleos en interfase, no cultivadas empleando un kit de sondas multicolor de los cromosomas 21,18,13 X e Y para detectar aneuploidías cromosómicas en fetos con alto riesgo de cromosomopatía. Las sondas empleadas son ADN específicas para cromosomas y son elaboradas para un loci, el centrómero, un cromosoma completo o bien para telómeros. Se utilizan sonda de AneuScreen de Vysis que identifica cromosomas en células sin cultivar en interfase, permitiendo conocer el número de señales de

los cromosomas 21,18,13 X e Y y obtener un diagnóstico prenatal en un lapso de 48-72 Horas.

Las células colectadas al final del proceso de separación magnética son sometidas a un tratamiento enzimático con tripsina, solución hipotónica y fijadas en Carnoy.

Posteriormente se realiza el proceso de desnaturalización, hibridación y tinción de los núcleos. Las preparaciones se analizan con un microscopio de epifluorescencia, ejecutando un registro de las señales para cada cromosoma. Se analiza un mínimo de 100 núcleos para cada paciente a ciegas (47,48,49). Los resultados que pueden obtenerse en la diferentes variedades de aneuploidías se muestran a continuación (figura 8):

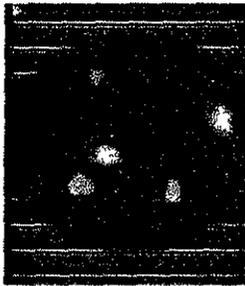


Foto A
Cromosomas 21
marcado en azul

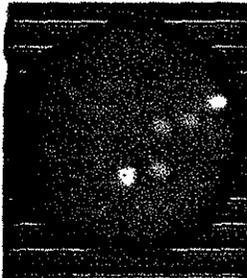


Foto B
Cromosomas 18
marcados en rojo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 8

En La foto A se observan 3 cromosomas 21 en el núcleo de la célula fetal con el diagnóstico de trisomía 21, en la foto B se observan tres cromosomas 18 con el diagnóstico de trisomía 18

RESULTADOS

Se tomaron muestras de 5 pacientes embarazadas, la edad materna fue en promedio fue de 35.4 años con un rango de 35 a 41 años. Todas las muestras se tomaron por la misma persona con la técnica ya descrita y se procesaron de acuerdo al protocolo descrito para la separación celular con la técnica de MACS. Tabla 1

Edad de la paciente	Edad gestacional en semanas
35	12
36	10
37	13.2
39	11.5
41	9

Al realizar el conteo de las células vivas (que en ese paso de la técnica incluyen a mononucleares maternos y eritroblastos fetales) el promedio de células vivas fue de 18,440,000 células con un rango de 16,900,000 a 20,400,000 células vivas. El porcentaje de células vivas fue en promedio de 95.8%. (Tabla 2)

Tabla 2

Paciente	Células vivas	Células muertas	% de viabilidad
1	16,900,000	500,000	97
2	17,500,000	400,000	97
3	18,100,100	600,000	94
4	19,300,000	1000,000	95
5	20,400,000	800,000	96

Al visualizarlas bajo microscopía directa un frotis de sangre total con la tinción de Wright se pudo observar células mononucleares maternas que sirvieron como control negativo para diferenciar la morfología de estas células comparadas con los eritroblastos fetales. (figura 9)

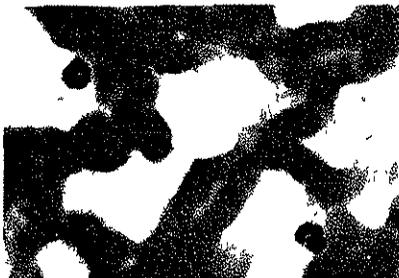


Figura 9 Polimorfonuclear materno con su morfología nuclear característica

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Finalmente al realizar la misma tinción a las células aisladas mediante el anticuerpo CD71 y la técnica de MACS se pudo observar y demostrar la presencia de eritroblastos fetales en las 5 muestras analizadas. En todos los casos se pudo observar la presencia de los núcleos celulares de los eritroblastos fetales y en algunos casos el citoplasma, la membrana celular no logro permanecer intacta en el frotis (figura 10 y 11)



Vista panorámica de los eritroblastos fetales al 10x

Figura 10

Puede observarse en esta microfotografía la presencia de 6 eritroblastos fetales dispersos en el campo



Eritroblasto fetal con su morfología característica al 40x

Figura 11

Se observa la morfología nuclear del eritroblasto, no se aprecia la membrana celular.

Eritroblasto, dentro de su morfología en esta microfotografía resalta su citoplasma muy azul, que suele ser sólo una estrecha orilla en torno del núcleo relativamente grande, el núcleo consiste en una red de riendas de cromatina distribuidas con uniformidad, que le imparten un aspecto finamente reticular. Se tiñe de un color púrpura rojizo y contiene varios nucléolos más oscuros. La membrana celular no logro apreciarse en ninguna de las células fetales encontradas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSION

En base al trabajo realizado en el laboratorio y los resultados obtenidos , el método propuesto de aislamiento de células fetales presentes en una muestra de células en sangre materna a por medio de un gradiente de densidad, en combinación con la separación celular magnética usando marcador CD71 se presenta una sensibilidad cercana al 90% y una especificidad del 100%.

Mediante el uso del gradiente de Ficoll se logro separar dos fracciones celulares que permitió obtener mononucleares maternos y eritroblastos fetales, al analizarlas bajo microscopio con azul tripan pudo demostrarse un numero elevado de células vivas con un porcentaje de viabilidad de 95.8%. Al usar el anticuerpo CD71 y la técnica de separación celular magnética con la técnica de MACS se logro aislar células fetales en todos los casos, mismas que se identificaron por microscopía; sin embargo la ausencia de la membrana celular nos obliga a detectar el paso de la técnica en la cual se pierde; aunque no hay duda de que las células obtenidas sean fetales debemos preservar en lo posible su morfología completa.

Algunos estudios varían en cuanto al número de células aisladas por este método que pueden llegar de 13 eritroblastos por cada 10ml de sangre materna (47). Algunos autores recomiendan el uso de un gradiente de triple densidad de Ficoll-Hypaque para lograr un mejor enriquecimiento de las células fetales que puede dar un rendimiento tres veces mayor a lo obtenido por separación en directo de las células fetales por MACS (35). Como puede observarse las alternativas y modificaciones de la técnica son motivo de continuar estandarizando para obtener el mayor número de estas células que hasta la fecha han sido escasas.

El seleccionar eritroblatos como célula ideal para el estudio de aneuploidías fetales es que tiene la ventaja de una vida media de 35 a 75 días en la circulación materna y pueden obtenerse después de la semana 10 de la gestación, en muy raras ocasiones circulan en sangre periférica de adultos normales pero están presentes en cantidades considerables en la circulación fetal. Dado que los eritroblastos nucleados son raros en la circulación adulta, aquellos que se aíslan de la circulación periférica materna durante el embarazo, seguramente habrán derivado del mismo (47). En el caso de los linfocitos, la persistencia de linfocitos fetales en la circulación materna puede ser de un período de tiempo superior a cinco años post parto, haciendo que esta población celular fetal no sea la más idónea para el diagnóstico prenatal no invasivo (32). A pesar de que las células trofoblásticas son la población celular fetal que más tempranamente se pone en contacto con la circulación materna, y probablemente también es el grupo celular fetal con mayor representación en el torrente sanguíneo materno, su utilización en el diagnóstico prenatal no invasivo presenta varios problemas: la posibilidad de

una discrepancia genética entre el trofoblasto y el feto, y el aspecto multinucleado de las mismas, que puede representar un problema a la hora de la interpretación y análisis genético de dichas células (30).

Por lo tanto la identificación de eritroblastos fetales en sangre materna y la posibilidad de conocer la constitución cromosómica en relación a las aneuploidías más frecuentes es actualmente uno de los métodos de diagnóstico prenatal no invasivo que evitaría la amniocentesis y el riesgo de complicaciones asociadas al procedimiento así como el tiempo para el análisis de resultados que va de 2 a 3 semanas, por otra parte la amniocentesis puede constituir una importante fuente de angustia materna que influye en la decisión de practicarse siendo en muchos casos negativa ante la suma de los factores antes mencionados.

Es por ello que el diagnóstico prenatal genético no invasivo permitirá la evaluación temprana de la condición fetal en un corto periodo de espera para obtener resultados.

Esperamos poder llegar a utilizar esta técnica por el costo beneficio que implica y que pueda ser aplicable a gran escala dentro de la población de riesgo

ESTA TESIS NO SALIÓ
DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

Pueden aislarse células fetales de la sangre materna en mujeres embarazadas tomando la muestra en el primer y segundo trimestre del embarazo, usando el anticuerpo CD71 y la técnica de separación celular magnética (MACS). Los eritroblastos obtenidos pueden ser utilizados para realizar diagnóstico prenatal por medio de técnicas de citogenética molecular. Es necesario establecer los parámetros ideales dentro de la técnica que permitan no causar destrucción a la morfología del eritroblasto fetal, que fue lo que nos aconteció y no era prudente utilizar las sondas de FISH para no perderlas. Es necesario ampliar el número de pacientes para estandarizar la técnica, una vez establecidas las condiciones ideales de la misma se podrá dar el siguiente paso al realizar diagnóstico por medio de las células fetales obtenidas y comparar los resultados con los obtenidos por amniocentesis como validación de los resultados por ser actualmente el estándar de oro.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Ferguson-Smith MA, Yates JRW. Maternal age specific rates for chromosome aberrations and factors influencing them: report of a collaborative study on 965 amniocentesis. *Prenatal Diagnosis*,1984;4:5-44.
- 2.-Langdon Down J. Observations on an ethnic clasification of idiots. Clinic lectures and reports,1866,London Hospital 1886;3:259-62.
- 3.-Fraser J, Mitchell A. Report a case with autopsy with notes on 62 cases by A Mitchell. *J Ment Sci*,1876;22:169-79.
- 4.-Epstein CH J, Down syndrome (trosomy 21).The metabolic and molecular bases ofinherited disease. Eight edition. Mc Graw Hill,cap 63:1223-1256.
- 5.-Heredia M. Métodos de Diagnóstico Prenatal, tesis del Instituto Nacional de Perinatología;1998:7-19.
- 6.-Holzgreve W, Miny P, Schloo R. "Late CVS" International registry compilation of data from 24 centres. *Prenatal Diagn* 1990;10:159-167.
- 7.-Firth HV et al. Severe Limb abnormalities after chorion villus sampling at 55-56 days' gestation. *Lancet* 1991;42:762-763.
- 8.-Schloo R, Miny P, Holzgreve W. Horst J, Lenz W. Limb reduction defects following chorionic villus sampling.American Journal Medical genetics.1991;42:404-413.
- 9.-Froster UG, Jackson L. Limb defects and chorionic limb sampling: results from an international registry,1992-94. *Lancet*,1996;347:489-494.
- 10.- Amniocentesis en: Normas y procedimientos de Ginecología Y Obstetricía 2002; 197-199.
- 11.-Verma L, Macdonal F, Leedham P, McConachie M, Dhanjal S, Hulten M. Rapido and simple prenatal DNA diagnosis of Down's syndrome. *Lancet* 1998;359:9-12.
- 12.-Van Opstal D, Van HJ, Sachs ES. Fetal aneuploidy diagnosed by fluorescence in situ hybridisation within 24 hours after amniocentesis. *Lancet* 1993; 342:802.
- 13.-Goddard HH,Skuse DH, James RC, Bishop DVM et al. Evidence from Turner syndrome of an imprinted X-Linked locus affecting cognitive funcion, *Nature*,1997;387:705-708
- 14.-Hernandez AE, Leis-Marquez MT, Ahued AR. Complicaciones asociadas al uso de amniocentesis diagnóstica en la segunda mitad del embarazo, realizada con o sin guía ultrasonográfica continua. *Perinatología y Reproducción Humana* 2000;14:7-13.
- 15.-Bianchi WD,Flint FA, Pizzimenti MF, Knoll JH,Latt SA. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci*, 1990: 87:3279-83.
- 16.-Kleinhauer E, Braun H, Betke K. Demonstration von fetalem Hamaglobin in der erythrozyten eines Blutausstriches. *Klin Wochenschr* 1957;35:637-638.
- 17.-Goodfellow CF, taylo PV. Extention and identification of trofoblast cell circulating in peripheral blood during pregnancy *Br J Obstet Gynecol* 1982;89:65-

68.)

- 18.-Ciaranfi A, Curchod, Odartchenko N. Post partum survival of fetal lymphocytes in the maternal blood. *Schweiz Med Wochensh* 1997;107:134-138.
- 19.-MACS separation columns. Manual para el usuario. Miltenyi Biotec,200015-60
- 20.-Isada NB, Hume RJ, Reichler A. Fluorescent in situ hybridization and second-trimester sonographic anomalies: uses and limitations. *Fetal Diagnosis Therapy* 1994;9:367-370
- 21.-Thompson MO, Thilaganathan B. The significance of isolated fetal hydronefrosis following routine first and second trimester screening for Down's syndrome. *British Journal Obstetric and Gynecology* 1998;108:860-864.
- 22.-Nyberg DA, Luthy DA, Resta RG, Nyberg BC, Williams MA. Age-adjusted ultrasound risk assessment for fetal Down's syndrome during the second trimester: description of the method and analysis of 142 cases. *Ultrasound Obstetric and Gynecology* 1998;12:8-14.
- 23.-Wald NJ, Brock DJH, Bonnar J. Prenatal diagnosis of spina bifida and anencephaly by maternal serum alpha-fetoprotein measurements. *Lancet* 1974;1:765-767.
- 24.-Merkatz IR, Nitowsky HM, Macri JN, Jhonson WE. An association between low maternal serum alphafetoprotein and fetal chromosome abnormalities. *American Journal Obstetric Gynecology* 1984;148:886-894.
- 25.-Palomaki GE, Knight GJ, Haddow JE, Canick JA, Saller Jr DN, Panizza DS. Prospective intervention trial of a screening protocol to identify fetal trisomy 18 using maternal serum alpha-fetoprotein, unconjugated oestriol, and human gonadotropin. *Prenatal Diagnosis* 1992;12:925-930.
- 26.-Muller F, Boue A. A single chorionic gonadotropin assay for maternal serum screening for Down's syndrome. *Prenatal Diagnosis* 1990;10:389-398.
- 27.-Wald NJ, Cuckle HS, Densem JW, Nanchahal K, Royston P, Chard T. Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy. *British Medical Journal* 1998;297:883-887.
- 28.-Canick JA, Knight GJ, Palomaki GE, Haddow JE, Cuckle HS, Wald NJ. Low second trimester maternal serum unconjugated oestriol in pregnancies with Down's syndrome. *British Journal Obstetric and Gynecology* 1998;95:330-333.
- 29.-Schmorl G. Uber das Schicksal emolisch verschleppter Placentarzellen. *Zentralbl Gynakol.* 1905;29:129-137.
- 30.-Douglas GW, Thomas L, Carr M, Cullen NM. Trophoblasts in the circulating blood during pregnancy. *American Journal of obstetrics and Gyneacology.* 1959;58:969-973.
- 31.-Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration von fetalem Hamaglobin in den Erythrocytes eines Blutauustrihes: *Klinische Wochenschrift.* 1957;35:637-638.
- 32.-Walknowska J, Conte FA, Grumbach M. Practical and theoretical implications of fetal/maternal lymphocyte transfer, *Lancet*, 1969; I: 1119-22.
- 33.-Seigler HF, Metzgar RS. Embryonic development of human transplantation antigens. *Transplantation*, 1970;9:478-86.

- 34.-Gänshirt-Ahlert D et al. Magnetic cell sorting and the transferring receptor as potential means of prenatal diagnosis from maternal blood. *American Journal Obstetric and Gynecology*, 1992; 166: 1350-5.
- 35.- 31.-Gänshirt-Alhert D, Borjesson-Stooll R, Burschyk M, Dhor A, Garritsen H. Detection of fetal trisomies 21 and 18 from maternal blood using triple gradient and magnetic cell sorting. *American Journal of Reproductive Immunology*,1993;30:194-201.
- 36.- Adinolfi M. On a non invasive approach to prenatal diagnosis based on the detection of fetal nucleated cells in maternal blood samples. *Prenatal Diagnosis*, 1991; 11:799-804.
- 37.-Yun Ling Z, Kai Zhen D, Ann De Maria. Search for the optimal fetal cell antibody: results of immunophenotyping studies using flow cytometry. *Human Genetics*, 1997 ; 11:799-804.
- 38.- Bianchi DW et al. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *American Journal of Human Genetics*,1997;61:822-9
- 39.-De la Cruz F. Low false-positive rate of aneuploidy detection using fetal cells isolated from maternal blood. *Fetal diagnosis and therapy*,1998;13:380-2
- 40.-Rodríguez de Alba M, Palomino P, Jurado A, Sanz R, Ibañez MA. Prenatal diagnosis on fetal cells obtained from maternal peripheral blood: report 66 cases. *Prenatal Diagnosis*,1999;19:934-40.
- 41.-Yang YH et al. Prenatal genetic diagnosis from maternal blood: Simultaneous immunophenotyping and FISH of fetal nucleated erythrocytes isolated by negative and positive Magnetic Activated Cells Sorting. *Yon Sei Medical Journal*,2000;41:258-65.
- 42.-Rodríguez de Alba, Palomino P, González C, Sánchez IL, Ibañez M. Prenatal diagnosis on fetal cells from maternal blood: practical comparative evaluation of fetal first and second trimestre. *Prenatal Diagnosis*,2001;21:165-70.
- 43.-Saavedra TM. Identificación prenatal no invasiva del grupo sanguíneo RH, Tesis para obtener el grado de Maestría en Bioquímica y Biología Molecular, México DF 2000.
- 44.-Bennett PR, Le-Van-Kim C, Colin Y. Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification. *New England Journal Of Medicine* 1993; 329:607-610.
- 45-Lighten AD, Overton TG, Sepulveda W, Warwick RM, Fisk NM, Bennett PR. Accuracy of prenatal determination of RhD type status by polimerase chain reaction with amniotic cells. *American Journal Obstetric and Gynecology* 1995;173:1182-1185.
- 46.-George A. Atlas de Hematología. Editorial panamericana 5ª edición, 1998:7-10.
- 47.-Klinger K y cols. Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence in situ hybridization (FISH) *American Journal Genetics*,1992;5:55-65.
- 48.-Christensen B, Bryndorf FT, Philip J, Lundsten C, Hansen W. Rapid prenatal diagnosis of trisomy 18 and triploidy in interphase nuclei of uncultured amniocytes by non-radioactive in situ hibridization. *Prenatal diagnosis*, 1992;12:2411-250.

49.-Ward BE, Gersen SL, Caelli M, Mc Guire NM. Rapid prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by fluorescence in situ hybridization: clinical experience with 4500 specimens. American Journal genetics,1993;52:854-865.