



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“ANÁLISIS CITOGENÉTICO EN PÉRDIDAS  
GESTACIONALES POR MEDIO DE CULTIVO  
DE TEJIDOS”**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**B I Ó L O G A**  
**P R E S E N T A :**  
**DULCE MARIA TEA PORRAS ORTA**



**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM**

**DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. RICARDO JUAN GARCÍA CAVAZOS**



**2004**  
**FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR**



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.



**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

**"ANÁLISIS CITOGENÉTICO EN PERDIDAS GESTACIONALES POR MEDIO DE CULTIVO DE TEJIDOS"**

realizado por **Dulce María Tea Porras Orta**

con número de cuenta **70208872**, quien cubrió los créditos de la carrera de: **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

**A t e n t a m e n t e**

Director de Tesis  
 Propietario

M. en C. Ricardo Juan García Cavazos.

Propietario

M. en C. Roberto Guevara Yañez.

Propietario

M. en C. Alicia Villela Gonzalez

Suplente

Dr. en C. Luis Felipe Jiménez García

Suplente

Biol. Miguel Angel Meneses Pérez

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Consejo Departamental de**

**Biología**

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



**UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA**

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA HUMANA DEL  
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA. SSA

*Dedicatorias*

*A David, por su apoyo y aliento para seguir adelante en lo prospero y en lo adverso como mi compañero y pareja de siempre.*

*A Gabriela, Alberto y Bruno Quiroz de su mama con cariño y amor eterno.*

*A mis hermanas Isabel y Flor de Maria, que son un ejemplo de perseverancia a seguir para mi.*

*A mis padres que siempre estarán en mi corazón se las dedico con amor.*

*A la Facultad de Ciencias, orgullo de mi formación.*

***Agradecimientos:***

*A Roberto Guevara, quién me brindo su ayuda para terminar.*

*Al Dr. Ricardo García Cavazos, por la oportunidad de aprender y actualizarme en el Instituto Nacional de Perinatología.*

*A Ricardo Meléndez, por su ayuda en la comprensión del apasionante campo de la Genética Humana y como amigo.*

*A Juan Carlos Ibáñez, por permitirme trabajar y aprender de él en el área de "Cultivo de Tejidos".*

*A mis compañeros en el INPer: Karem, Javier; Karla, Wilma, Paco, Simona.*

---

<b>Contenido</b>	
Resumen	1
1. Introducción	2
1.1 Mitosis y Meiosis	3
1.2 El cariotipo Humano	5
1.3 Anormalidades cromosómicas	6
1.3.1 Anormalidades Numéricas	6
1.3.2 Anormalidades Estructurales	10
1.3.2.1 Translocación Recíproca	12
1.3.2.2 Translocaciones Robertsonianas	15
1.3.2.3 Deleción	17
1.3.2.4 Cromosomas en anillo	17
1.3.2.5 Inversión	19
1.3.2.5.1 Paracéntrica	20
1.3.2.5.2 Pericéntrica	21
1.3.2.6 Isocromosomas	22
1.3.2.7 Inserción	23
1.3.2.8 Duplicación	25
2. Justificación	26
3.1 Objetivo	27
3.2 Hipotesis	27
4. Material y Métodos	29
5. Resultados	34
Foto 1 trisomía 47, XY,+16	39
Foto 2 Síndrome de Turner	40

---

Foto 3 Trisomía 47,XY, +13	41
Foto 4 Tetrasomía 92,XXXX	42
Foto 5 Trisomía 47,XY, +21	43
Foto 5 de Tanslocación (1;14)	44
Foto 6 de Translocación (12;13)	45
Foto 7 de Translocación (6;18)	46
Ideograma de Derivativo 13	47
6. Discusión	46
7. Conclusiones	49

### Índice de Tablas

Tabla I	8
Tabla II	36
Tabla III y IV	37
Tabla V	38

### Índice de figuras

Figura 1 Mitosis y Meiosis	4
Figura 2 bandas y Regiones	6
Figura 3 Anormalidades Constitucionales vs adquiridas	7
Figura 4 Anormalidades Numéricas y formación	11
Figura 5 Diferentes tipos de Anormalidades Estructurales	13
Figura 6 Translocaciones Recíprocas	16
Figura 7 Translocaciones Robertsonianas	17
Figura 8 Tipos de Deleción	18
Figura 9 Anillos	19
Figura 10 Inversión Paracéntrica consecuencias	21



Figura 11 Inversión Pericéntrica	23
Figura 12 Isocromosómas	25
Figura 13 Inserción consecuencias	26
8. Bibliografía	51

## Resumen

El aborto espontáneo ocurre del 15 al 20% en la totalidad de los embarazos reconocidos clínicamente, mientras que del 0.8-1% presenta tres o más pérdidas gestacionales, lo que se define como pérdida gestacional recurrente. Se reporta en la literatura que el 90% de las pérdidas gestacionales en el primer trimestre del embarazo, 30% en el segundo y 3% en óbitos están relacionados con cromosomopatías. (Wilcox y cols. 1998; Pellicer, 1999; Tsunehisha y cols. 1992; Danforth, 1990; Sandra P.T.T., 1994; McDonough P.G., 1994; Mishell D. R., 1993; Pellicer, 1999; Vern, 1994).

En el Instituto Nacional de Perinatología (INPer) se atiende a mujeres con embarazo de alto riesgo, y de éstas una parte presenta pérdida gestacional recurrente. La mayoría de las pérdidas se presentan durante el primer trimestre, debido al alto porcentaje de relación con Cromosomopatías, por lo cual es de gran importancia diagnosticar estas anomalías a fin de brindar un asesoramiento genético adecuado a la pareja.

El objetivo del presente trabajo fue estandarizar la técnica de cultivo de tejidos, así como proporcionar los lineamientos para el transporte de la muestra y detectar una posible causa relacionada con anomalías cromosómicas.

La población de estudio fue conformada por 75 muestras que se refirieron a través de la consulta de Genética del INPer de enero de 1997 a diciembre de 1998. Primeramente se estandarizó el transporte de la muestra y se aseguró el buen estado del tejido para su cultivo, así como las técnicas de siembra por digestión enzimática y explante; ya en el laboratorio se puso el cuidado necesario en la selección del tejido a cultivar, para evitar la contaminación por células de tejido materno, y posteriormente aplicar las técnicas de análisis citogenético convencional.

El éxito en el cultivo se logró en un alto porcentaje, gracias al establecimiento de parámetros en el transporte de la muestra, además de en la técnica de siembra de los tejidos, obteniendo así resultados que apoyaron un diagnóstico genético en parejas con riesgo de pérdida gestacional para un embarazo posterior.

## 1. Introducción

Las pérdidas gestacionales (PG) se agrupan por edad gestacional para poder determinar las posibles causas y trazar estrategias de prevención, las PG que ocurren antes de la octava semana de gestación (SDG) son abortos tempranos, antes de 20 SDG son abortos tardíos con menos de 500 g, y después de 20 SDG se definen como óbitos, que son productos nacidos sin vida cuya muerte fetal ocurre antes y/o durante el trabajo de parto. (Danforth, 1994).

En 1993 Mishell informa que entre 15 y 20% de la totalidad de los embarazos termina en aborto espontáneo; sin embargo, la frecuencia de pérdida embrionaria es mayor, ya que Wilcox y cols. (1998) midiendo la hormona gonadotropina coriónica (hGC) en orina, por un muestreo diario en mujeres saludables esperando concebir, determinó que algunos embarazos terminaron antes de que fueran detectados clínicamente, es decir, el diagnosticado por el médico o por una prueba de embarazo convencional, presentando una frecuencia del 22% al 31%,

Cuando la pérdida gestacional se presenta por primera vez en la población general su incidencia es de 32%, mientras que el 2 al 5% de las mujeres presentan dos o mas PG (Pflueger MV, 1999) y cuando se presenta en forma recurrente la proporción va de 0.8 a 1.0% (Vern y cols. 1994). En la inducción de la ovulación con gonadotropinas coriónicas se presenta del 17 al 31% (Wilcox, 1988) y se reporta que en mujeres con aborto recurrente que se someten a fertilización *in vitro* (FIV) hay un incremento en la tasa con embriones genéticamente anormales comparada con los controles, por lo que es una de las causas de la infertilidad en parejas con aborto recurrente. (Pellicer, 1999).

El aborto espontáneo de acuerdo a Mishell (1993) y Danforth (1994), puede ser por causas fetales o por causas maternas, dentro de las primeras causas se ha asociado frecuentemente un factor genético, mientras que entre las causas maternas existen factores endocrinos, inmunológicos y anatómicos, (Stephenson, 1996).

Tsuneshisa y cols. (1992) así como Pellicer (1999), reportaron que las pérdidas de embarazo reconocidas clínicamente en mujeres con abortos repetidos, terminan en aborto espontáneo durante el primer trimestre y éstos presentan alteraciones cromosómicas hasta en el 90.1% (Danforth, 1994).

Sólo si se presenta morfología anormal, las herramientas ultrasonográficas pueden apuntar hacia una anomalía cromosómica, pero no pueden predecir el cariotipo de las PG (Held y col., 1992).

El análisis de las vellosidades coriónicas es usado como un método alternativo a la Amniocentésis en muchas partes del mundo, para la determinación temprana de cariotipo del producto, las vellosidades coriónicas son la parte fetal de la placenta, y usualmente se toma la muestra entre las semanas 10 y 12 de gestación, el feto y la placenta se desarrollan a partir del mismo óvulo fertilizado o cigoto, donde las primeras células que se diferencian son las células trofoblásticas que están destinadas a formar parte de la placenta, están involucradas en la implantación del embrión en el útero, y conforman la capa externa de las vellosidades coriales.

El cultivo de células a partir de vellosidades coriales analiza los fibroblastos que conforman el estroma o mesénquima de la placenta también y que reflejan de forma más fidedigna el cariotipo del producto por ser de origen fetal temprano.

Es importante para el crecimiento y desarrollo correcto del producto, tener el número y estructura correcta de cromosomas, la falta o el exceso de material extra causa generalmente problemas en el desarrollo del producto.

### **1.1 Mitosis y Meiosis**

El material genético está contenido en el ácido desoxirribonucleico (DNA), dentro del núcleo, y determina la organización de la vida en la célula, así como las características hereditarias que se transmitirán, cada par cromosómico está constituido de un cromosoma paterno y uno materno, dándole así su condición diploide "2n" y donde ambos cromosomas serán transmitidos a la célula hija en cada mitosis y sólo la mitad durante la meiosis, así como se muestra en la figura 1.

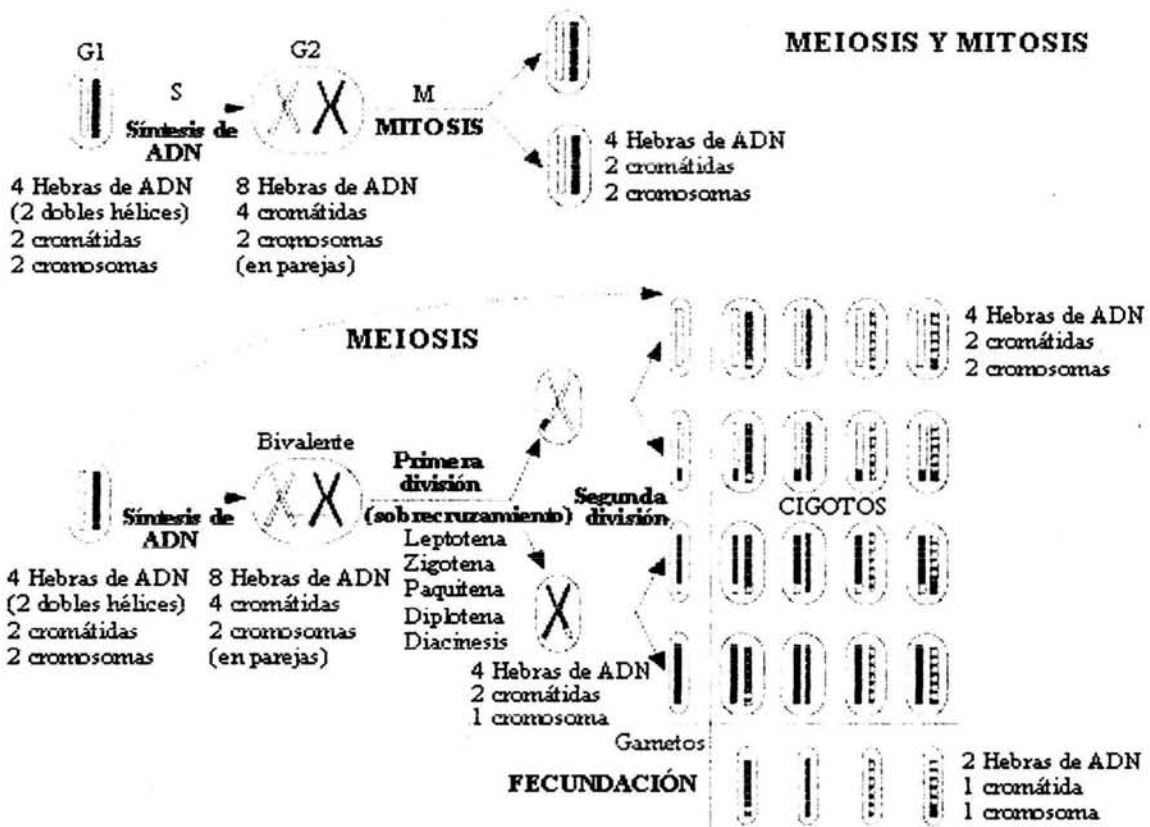


Figura 1. Mitosis Y Meiosis

## 1.2 El Cariotipo Humano

El cariotipo normal en el humano se compone de 46 cromosomas, 22 pares de autosomas nombrados del 1 al 22 por orden decreciente de tamaño, y un par de cromosomas sexuales, XX para la mujer y XY en el hombre.

Cada cromosoma tiene un centrómero (CEN) que es la región que contiene el cinetocoro (centro organizacional de microtúbulos), que es el responsable de sujetar el cromosoma al huso acromático durante la división celular.

Las dos cromátidas hermanas están unidas a la heterocromatina paracéntrica al final del lado opuesto de la región centromérica. (Figura 2).

La región del centrómero, divide al cromosoma en dos brazos, el brazo corto (brazo "p" por petite en francés), y el brazo largo (brazo "q") y convencionalmente se coloca el brazo corto o "p" hacia arriba en las representaciones en diagrama.

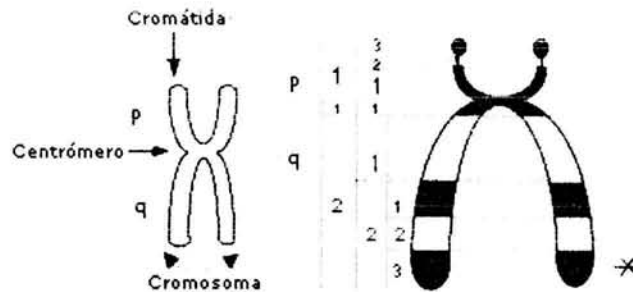
Cada uno de los brazos termina en un telómero (qter, pter) que es una secuencia genética repetitiva altamente conservada la cual inhibe la unión entre las terminaciones de las cromátidas o brazos de los cromosomas y es importante también para anclar al cromosoma a la membrana nuclear, particularmente durante la meiosis (Cremer, 2001).

Cuando el brazo corto es tan largo como el brazo largo, el cromosoma se llama metacéntrico, y si es más corto se llama sub-metacéntrico, cuando es muy corto pero permanece visible se dice ser sub-telocéntrico, cuando es extremadamente corto, virtualmente invisible, el cromosoma es acrocéntrico.

En el cariotipo humano los pares cromosómicos 13, 14, 15, 21, y 22 son acrocéntricos y el "Y" es sub-telocéntrico.

En las células de mamíferos el brazo "p" de muchos cromosomas acrocéntricos lleva las regiones de organización nucleolar (NORs) las cuales contienen genes que codifican para RNA ribosómico.

Las técnicas de tinción generan que los cromosomas presenten bandas, donde cada brazo presenta una secuencia de bandas oscuras y claras de intensidad variable, que son patrones, específicos y repetitivos para cada cromosoma. El número de bandas observado no es fijo, por ser relativamente dinámico el estado de contracción de los cromosomas, así los cromosomas de la prometáfase, tienen muchas más bandas que los de la metafase.



**Figura 2. Bandas Y Regiones.**

Se han estandarizado patrones y nomenclatura para definir el mapeo posicional de las bandas, lo cual permite a los citogenetistas comunicarse y archivar información con propósitos médicos. La numeración de las bandas comienza desde el centrómero y continúa hacia el final de cada brazo, convencionalmente los brazos están divididos en un número de regiones más fácilmente reconocibles como "bandas marcadoras de región" (landmarks), así las bandas se numeran secuencialmente en cada región y están caracterizadas por el uso del sistema decimal, (Figura 2).

### 1.3 Anormalidades cromosómicas.

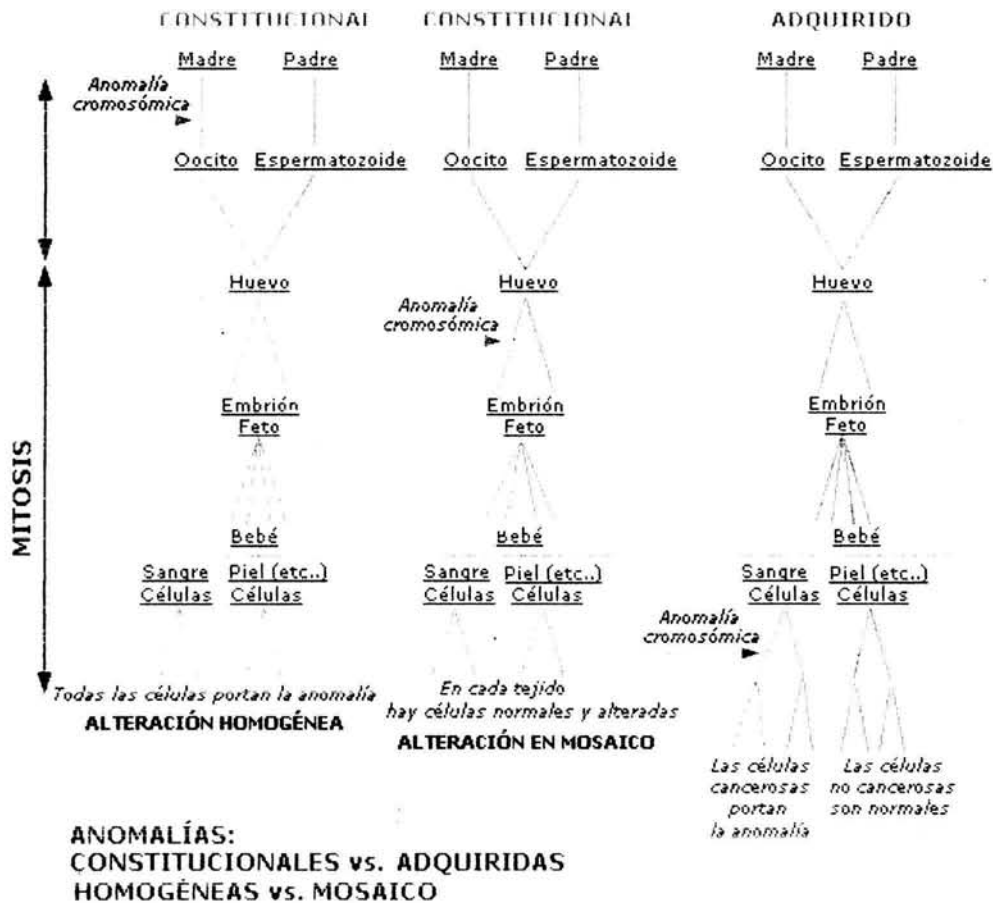
#### 1.3.1 Numéricas.

**A. Aneuploidias.-** puede ser un cromosoma, o más de uno, que dentro del conjunto diploide está de más, o de menos, mientras que si el conjunto completo está por triplicado, o más comúnmente por cuadruplicado se llama **Poliploidía**.

La no disyunción en la primera división meiótica produce 4 gametos desbalanceados el 100% de los gametos estará afectado

- La no disyunción con un cromosoma extra en los gametos produce cigotos trisómicos. La mayoría de las trisomías no son viables Ej.: trisomía 16 que es la trisomía reportada más frecuente en aborto espontáneo, y se pierden tan temprano que no es perceptible para la misma madre. Unas pocas trisomías son más o menos compatibles con la vida Ej.: trisomía 21, 13, 18 y 8.
- Gametos nulisómicos con pérdida de un cromosoma que producen monosomías. Las monosomías son más deletéreas que las trisomías y casi siempre todas terminan en aborto tempranamente (Pellicer 1999, Sirchia y cols. 1998).

- La no disyunción afecta a todos los cromosomas y raramente mas de un par de autosomas puede estar involucrado en la misma célula meiótica (no disyunción múltiple es mas frecuente en un gonosoma).
- La no disyunción no es un evento raro pero su ocurrencia seguramente esta subestimada debido a la eliminación espontánea temprana de la mayoría de las concepciones desbalanceadas.



**Figura 3.- Anormalidades Constitucionales Versus Adquiridas**

Con respecto a la figura 3 hay que recordar que en los gametos masculinos las cuatro células resultantes van a estar efectivamente presentes como espermias, mientras que en los gametos femeninos solo uno participa en la fertilización y los otros tres se van a eliminar como cuerpos



polares, la segunda división meiótica produce dos gametos desbalanceados y dos normales (50% y 50%). (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology).

**B. Euploidías.-** dos veces el número haploide mas otro,  $2n + n = 3n$  o  $2n + 2n = 4n$ , debido a fertilización anormal (gameto anormal). Se produce entonces una poliploidía, como se muestra en la tabla siguiente

**Tabla I. De Generación De Euploidías.**

<b>Gametos</b>	<b>Gametos 23,X</b>	<b>Gameto 46,XX</b>	<b>Gameto nulisómico</b>
Gameto 23,X	46, XX	69, XXX	23, X
Gameto 23,Y	46, XY	69, XXY	23, Y
Gameto 46,XX	69, XXX	92, XXXX	46, XX, mola paterna
Gameto 46,XY	69, XXY	92, XXXY	46, XY, mola paterna
Gameto nulisómico	23, X	46, XX mola materna	---

Las triploidías se encuentran en 20% de los abortos espontáneos, y se deben a un error en la división durante la gemetogénesis del óvulo o mas frecuentemente en la del espermatozoide. (Tho S., y cols., 1994) es posible que un nacido vivo la presente pero muere al poco tiempo.

Los mecanismos posibles de formación son según Jean-Loup Huret, Claude Léonard, y John RK Savage.:

- Diginia: la no expulsión del cuerpo polar.
- Diandria: fertilización de un oocito por dos espermatozoides o por un espermatozoide diploide, la diandria es 4 veces mas frecuente que la diginia.

Tetraploidía:  $4n = 92$  cromosomas. Encontrada en 6% de los abortos espontáneos. La literatura registra muy pocos productos nacidos vivos pero mueren rápidamente después de nacer. Los

tetraploides son siempre 92,XXXX o 92,XXYY, lo que sugiere que la causa es una división incompleta en la primera segmentación del cigoto o errores en la fertilización que son frecuentes de 2 a 3%. (Huret J. L, Léonard C., y Savage J.R.K.).

**B.1 Molas.** La expresión fenotípica anormal de un cariotipo diploide, pero con ambos complementos del mismo origen depende de la fuente del conjunto cromosómico adicional, el conjunto paterno adicional por un espermatozoide, presenta una placenta anormal, y son llamadas "molas hidatidiformes completas" o clásicas, y la retención del segundo cuerpo polar produce un duplicado del genoma materno llamada "diginia" y son "molas hidatidiformes parciales" y presentan partes fetales a diferencia de las molas paternas. (Tho y cols. 1994).

**B.2 Mosaicismo.** Un individuo mosaico está constituido por 2 (o más) líneas celulares diferentes. Estas poblaciones de células sin embargo vienen de un solo cigoto (Sirchia, 1998) cuando registramos un mosaico se denota por un corte entre varias clonas observadas en un cultivo ejemplo: trisomía 21 presentada como mosaico (46,XY/47,XY+21)(Bray y Wright, 1998).

La viabilidad de las dos células hijas producidas por no-disyunción es diferente, por ejemplo: en la trisomía 21, el clon monosómico para 21 no es viable y desaparece.

El fenotipo de los individuos sobrevivientes estará más o menos afectado de acuerdo a la proporción de la variedad de clonas. ([www.medgen.ubc.ca/wrobinson/mosaic/mosaicism](http://www.medgen.ubc.ca/wrobinson/mosaic/mosaicism))

La variabilidad de la proporción de clonas se ve afectada por varios factores:

La precocidad del evento, por ejemplo: 45,X/47,XXX donde no hay células normales con cariotipo 46,XX, lo que significa que es un evento cigótico, mientras que en 45,X/46,XX/47,XXX se presenta como un evento post-cigótico, si las células 46,XX son más numerosas, la anomalía ocurrió más tarde en el desarrollo, y si ocurre en el estadio 32 o 64 células, todo, nada o parte del embrión puede estar afectado porque desde aquí y después de este estadio las células destinadas a la línea primitiva, y el embrión propiamente serán segregadas y la aberración permanecerá confinada a la placenta y membranas. (Held, 1992, Astner y cols., 1998). ([www.medgen.ubc.ca/wrobinson/mosaic](http://www.medgen.ubc.ca/wrobinson/mosaic)).

El grado de afección de la aberración dependerá de la distribución de la población de líneas celulares durante la embriogénesis, en este caso, la proporción de los clones va a variar de un órgano a otro, diferentes clonas, y esto puede ocurrir *in vitro*, de cada línea celular tienen diferente cinética.

Un mosaico no debe confundirse con una quimera, en una quimera, las células se originan a partir de dos (o más) cigotos. Estos se producen por:

- Mezcla o intercambio de células, de diferentes cigotos (por ejemplo la fusión temprana de 2 embriones).
- La cruce de la circulación sanguínea entre gemelos dicigóticos, con la mezcla de sangre pueden dar diferentes cariotipos, por ejemplo 46,XX/46,XY.
- Singamia: como un tipo de fertilización anormal, por ejemplo 2 espermatozoides, mas un óvulo con su segundo cuerpo polar, forman un individuo con un cariotipo 46,XX/46,XX por ejemplo, en las quimeras, las 2 poblaciones celulares pueden o no tener diferentes cariotipos, sin embargo los genes son diferentes. (Gardner R.J., 2004).

Una muestra de piel fetal puede ser necesaria para confirmar o descartar un mosaico que esté ausente de las líneas de sangre periférica o de cordón y presente en fibroblastos o amniocitos de los cromosomas 2, 4, 8, 9, 15, 16, 17, 18, 21, y 22, aún cuando una trisomía 22 completa raramente logrará un embarazo viable. ([www.medgen.ubc.ca/wrobinson/mosaic](http://www.medgen.ubc.ca/wrobinson/mosaic)).

El Mosaicismo fetal puede ser llamado "verdadero" por encontrarse en una o mas células de dos o mas frascos de cultivo, a diferencia de el Pseudo-Mosaicismo, donde sólo encontramos células con cariotipo anormal en un solo frasco de cultivo, puede en ambos casos representar una anomalía y no presentarse únicamente *in-vitro*, pues puede ocurrir por una no-disyunción post-cigótica somática o como una alternativa de rescate de un cigoto trisómico inicialmente (Frans y cols., 1998; [www.medgen.ubc.ca/wrobinson/mosaic](http://www.medgen.ubc.ca/wrobinson/mosaic))

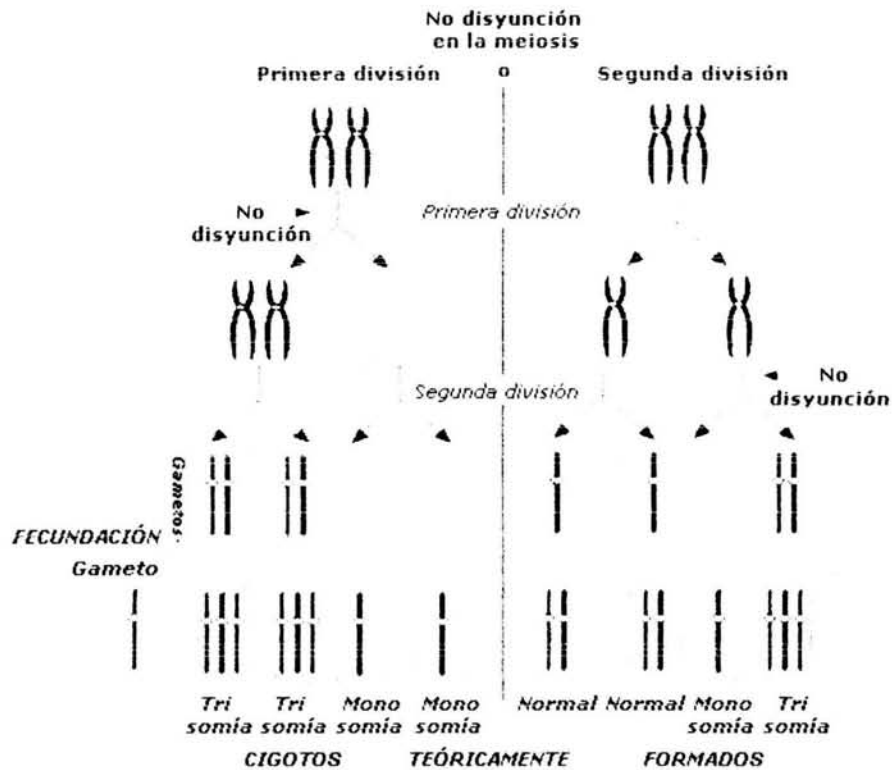
El número de células anormales y su distribución en los tejidos puede ser dependiente del tiempo en que empezó una forma de "corregir" un cigoto con una trisomía, llamada "rescate trisómico", Se llama "rescate trisómico" a la forma de perder o eliminar el cromosoma que está como adicional, durante las primeras divisiones post-cigóticas que involucran a las células destinadas a formar al embrión, así el contenido originalmente anormal del embrión puede ser "rescatado". También variará debido a la etapa en que se generó la no-disyunción y al compartimiento del tejido en el cual ocurrió (Held, 1992, Astner y cols., 1998).

### 1.3.2 Anormalidades Estructurales.

Los cromosomas pueden sufrir rupturas en cualquier punto de los brazos cortos o largos, éstas pueden presentarse dentro del mismo brazo o solo como un solo punto de ruptura y hasta la porción terminal, y pueden reunirse de varias formas entre ellas como si fuera una restitución,

en el caso de dos o mas puntos de ruptura, terminan reuniéndose para formar una aberración estructural (Figura 4) (Scriven y col. 1998).

#### ANOMALÍAS NUMÉRICAS HOMOGÉNEAS: MECANISMOS DE FORMACIÓN



**FIGURA 4.- Anormalidades Numéricas y mecanismos de formación**

Para un individuo es importante tener 2 copias normales de cada gen, sin tener material de más o de menos, esto es particularmente importante en el embrión, donde el complemento genético balanceado completo es vital para su desarrollo normal.

Un embrión que tiene una anomalía numérica constitucional, una translocación desbalanceada, una o tres copias de algún conjunto de genes, resulta en un desarrollo anormal, no todo el complemento es absolutamente necesario para el funcionamiento de las células de los diferentes tejidos, pero la falta de una copia puede tener consecuencias lamentables, como en el Sx de Angelman / Prader-Willi .(Perk J., y cols., 2002)

Las 2 megabases en el dominio de PWS/AS, contienen un grupo de genes que se expresan paternamente, y los dos últimos genes UBE3A y ATP10C, se expresan exclusivamente del

alelo materno, (Perk J., y cols, 2002) El síndrome de Prader-Willi (PWS) es el resultado de defectos moleculares que traen como consecuencia el silenciamiento de la expresión de los genes paternos, mientras que el síndrome de Angelman (AS) se genera de defectos moleculares que causan la pérdida de expresión del dominio en la copia de los genes maternos, otro ejemplo es el del Retinoblastoma donde con una copia no pasa nada pero la eliminación de las dos por mutación o por pérdida de heterocigocidad causa la formación del tumor, es importante que las dos copias de un gen sean normales, si una ruptura ocurre dentro del dominio de un gen, puede reunirse erróneamente, inactivando o preniendo su actividad en el momento inadecuado o producir un gen híbrido con partes de un oncogén codificando para una proteína fusionada con propiedades oncogénicas.

Muchas de las aberraciones estructurales son letales para la célula y son rápidamente eliminadas de la población celular, de aquellas que sobreviven y son transmitidas; las más frecuentemente encontradas son translocaciones, inversiones y deleciones pequeñas donde no hay aparentemente pérdida de material, o no son tan deletéreas.

Los cromosomas rearrreglados y que son transmitidos, se llaman cromosomas "derivativos" (der) y se nombran de acuerdo al centrómero que portan, la translocación recíproca entre el cromosoma 1 y el cromosoma 14, resultara en der (1) y der (14).

En el caso particular de las translocaciones entre autosomas y cromosoma "X" de un producto "XX" la inactivación de uno o los cromosomas "X" no se lleva a cabo al azar y generalmente se sigue un patrón que favorece al individuo, Ej.: en una translocación balanceada entre un "X" y un autosoma  $t(X;autosoma)$  se inactiva el "X" normal para dejar el total balanceado; en contraste si la translocación es desbalanceada entre el cromosoma "X" y el autosoma se inactiva el cromosoma "X" translocado y puede ser diferente el patrón de inactivación en linfocitos que en fibroblastos (Zori y cols., 1993).

### **1.3.2.1 Translocación Recíproca.**

Es un intercambio entre segmentos terminales de los brazos de dos cromosomas, que pueden ser del mismo par homólogo o no serlo, si tenemos en cuenta que no hay pérdida o alteración

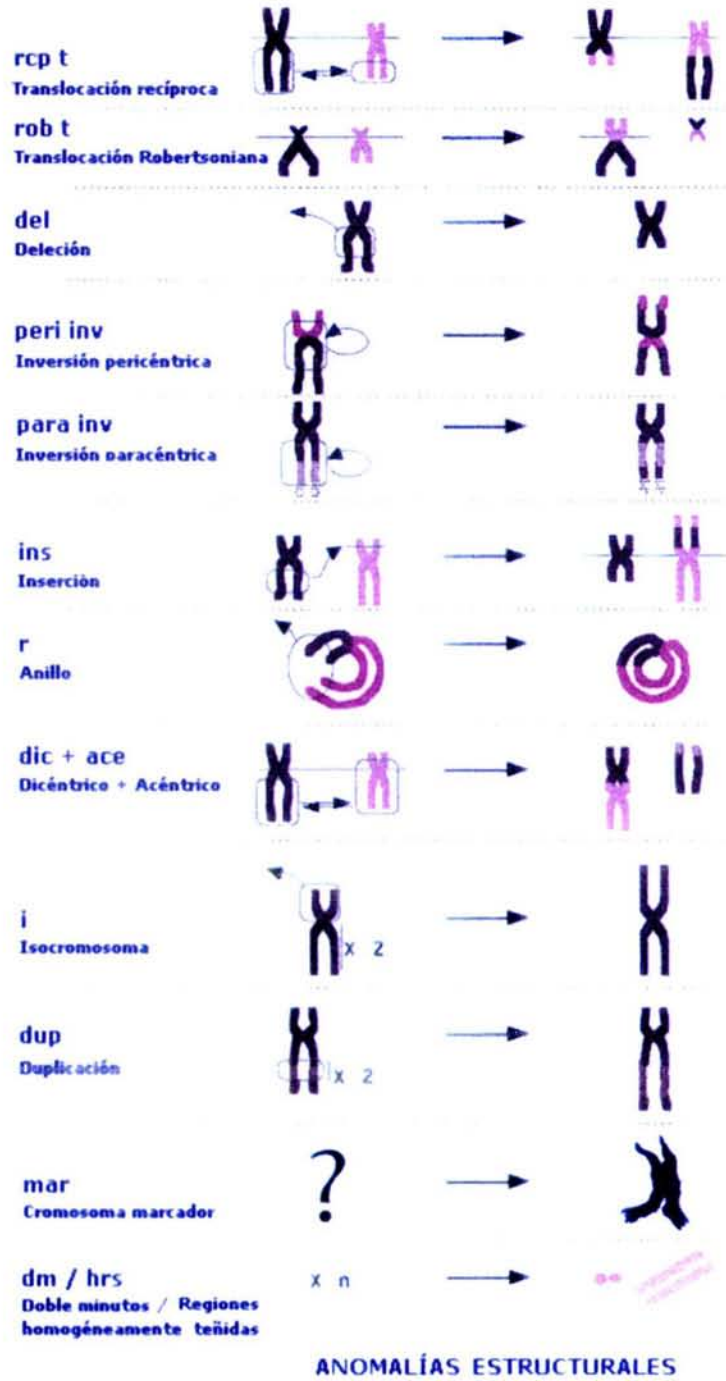


Figura 5.- Diferentes Tipos De Anormalidades Estructurales.



en los puntos de intercambio, el nuevo arreglo es genéticamente balanceado y denominado: translocación balanceada.

Durante la meiosis, cuando hay apareamiento entre segmentos de cromosomas homólogos, los cromosomas normales forman un bivalente, lo que permite el entrecruzamiento, en las translocaciones pueden formar un cuadrivalente (tetravalente, en Griego) causando problemas en la segregación.

En anafase I de la meiosis, los cromosomas se separan sin romper el centrómero; mientras que la segregación y separación de las cromátidas ocurre en la anafase 2, en el caso de un cuadrivalente puede ser de varios tipos: (Figura 6).

- *Tipo alterno*, produce gametos normales, o gametos con la translocación parental balanceada. El producto tendrá un fenotipo normal (a menos que exista un desbalance no perceptible bajo microscopio óptico, o críptico).
- *Adyacente Tipo 1*, (frecuente): Se asocia a un cromosoma normal por ejemplo: a) un cromosoma reareglado o derivativo del otro par (der b), al recombinarse dan lugar a una deficiencia en la duplicación, exceso de algunas porciones y falta de otras.
- *Adyacente Tipo 2*, (muy rara) (Tho PTS y Mc Donough PG, 1994) Se asocia a un cromosoma normal con un derivativo del mismo par (por ejemplo: 13+ der(13)).
- *Tipo 3:1*, (rara) (Tho PTS y Mc Donough PG, 1994) - Cualquiera de los cromosomas derivativos y los 2 homólogos normales (por ejemplo a, b, der(b)) segregados a una célula hija, y el otro derivativo (der(a)) a la otra, - O un homólogo normal con los 2 cromosomas derivativos (b, der(a), der(b)) a una célula, y el cromosoma normal (a) a la otra célula. En cualquiera de los casos, resultará en cigotos con 47 o 45 cromosomas.

#### Características de una Translocación Recíproca

- La translocación recíproca es en la mayoría de los casos un rearmiento balanceado y los portadores son de fenotipo normal (Munné y cols., 2000).
- En la meiosis el valor de una mala segregación incrementa, especialmente cuando un acrocéntrico está involucrado en la translocación, adyacente tipo I, adyacente tipo II y tipo 3:1 acarrear abortos, o el nacimiento de un producto mal formado, entre mas desbalanceado sea el cigoto, menor es la probabilidad de que el producto llegue a término.
- El entrecruzamiento durante la meiosis no tiene consecuencias en la estructura o morfología de los cromosomas (no es el mismo caso en inversiones o en otros rearmientos).

- Las rupturas pueden ocurrir en los centrómeros intercambiando brazos completos.

Translocaciones complejas:

Tres o más puntos de ruptura y participando más de dos cromosomas en el intercambio producen rearrreglos muy complicados.



**TRANSLOCACIONES RECÍPROCAS:  
TRANSMISIÓN A LA DESCENDENCIA**

*MEIOSIS:  
Emparejamiento de  
secuencias homólogas:  
---> Tetravalente*

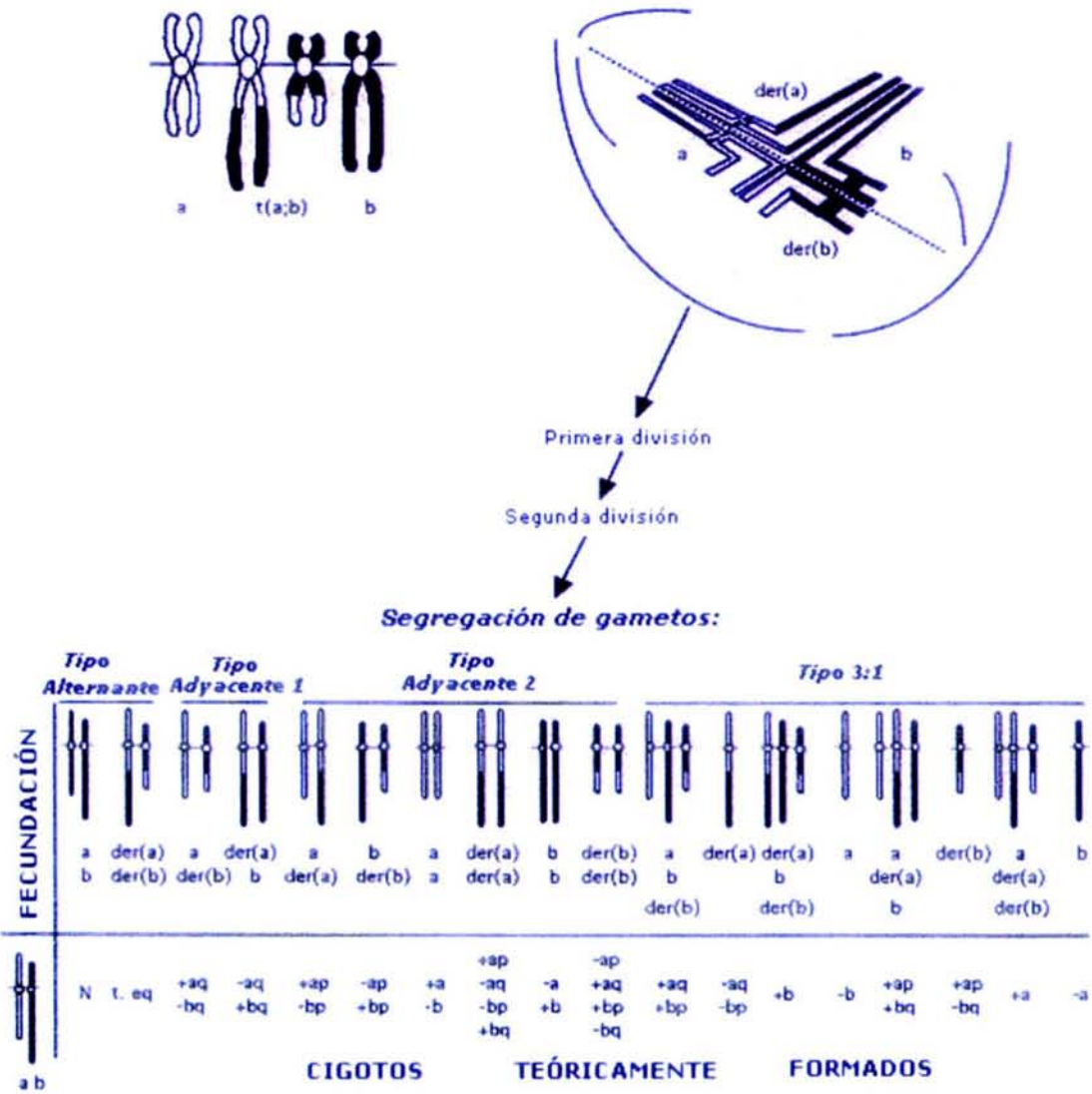


Figura 6.- Translocaciones Recíprocas.

### 1.3.2.2 Translocaciones Robertsonianas.

La fusión cercana a los centrómeros de dos acrocéntricos, es mas frecuente en los brazos "p", dando lugar a un cromosoma dicéntrico, o sea con los dos centrómeros.

El cromosoma reareglado incluye los brazos largos de los dos cromosomas acrocéntricos, mientras que la mayoría del material de los brazos cortos está perdida, casi siempre uno de los centrómeros está inactivado, así la translocación da funcionalmente un monocéntrico que no presenta problemas de segregación.

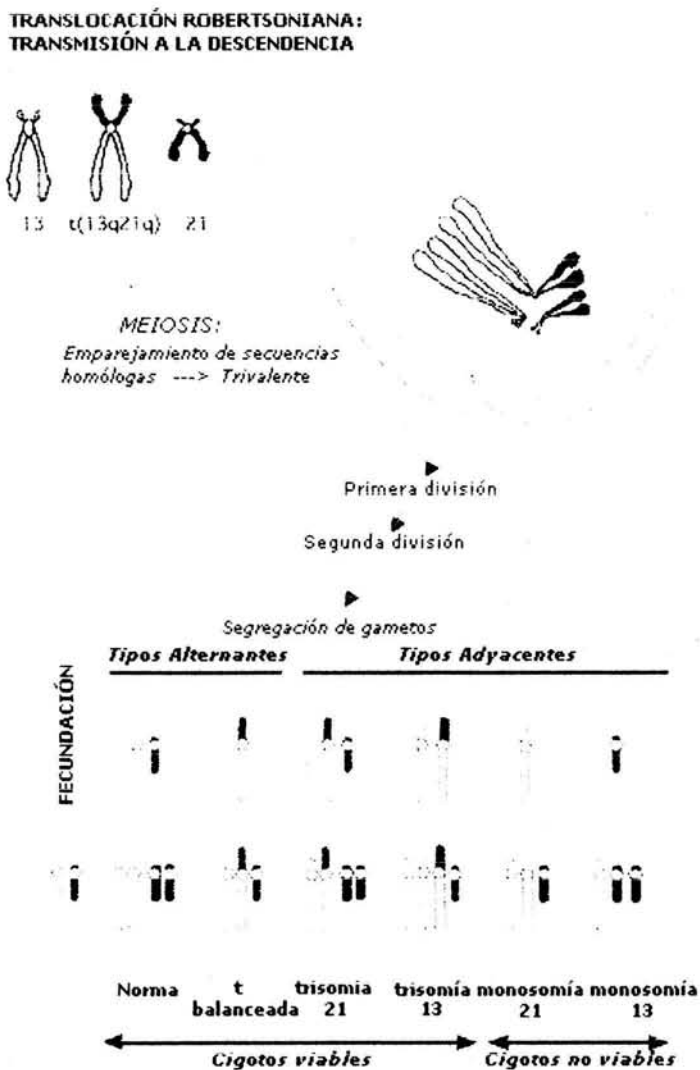


Figura 7.- Translocaciones Robertsonianas

El cariotipo de un individuo portador de translocación robertsoniana tiene 45 cromosomas sin embargo se dice que aparentemente es balanceado y no tiene consecuencias aparentemente.

**1.3.2.3 Deleción.-** Es la pérdida de un segmento cromosómico, ya sea intersticial o terminal (figura 8) siempre resulta en la pérdida importante de material genético y la pérdida produce una "monosomía parcial" generando un cariotipo desbalanceado, con deficiencia parcial de un cromosoma, Las deleciones son por lo tanto reordenamientos desbalanceados.

Si la deleción es intersticial se indican los 2 puntos de ruptura; en cambio sólo se registra 1 punto de ruptura cuando la deleción parece ser terminal, una deleción terminal deja un cromosoma sin telómero.



DELECIÓN INTERSTICIAL  
Y DELECIÓN TERMINAL

**Figura 8.- Tipos de deleciones**

**1.3.2.3.1 Deleciones constitucionales.-** Algunas deleciones en autosomas tienen repercusiones fenotípicas mayores, ejemplo: del(18p); del(18q); del(4p): Síndrome de Wolf-Hirschhorn; y del(5p): Síndrome de Cri Du Chat" 10 a 15% de los casos de deleción vienen de un rearreglo parental por una mala segregación la mayoría ocurre de *novo*, la deleción puede acompañarse de la trisomía parcial de otro cromosoma (duplicación / deficiencia) por el tipo de apareamiento durante la meiosis (Figura 10).

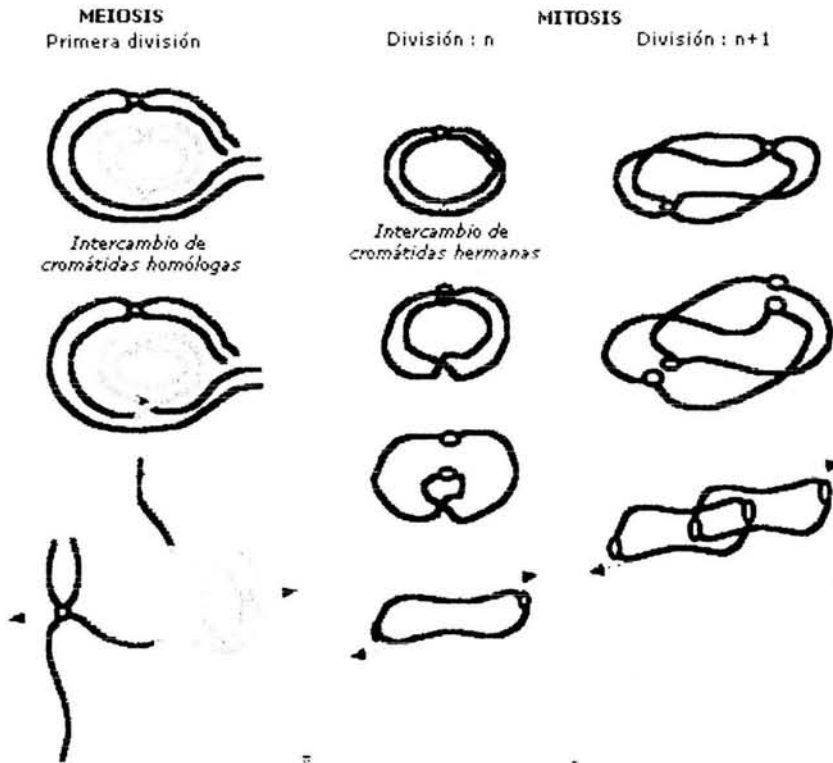
**1.3.2.3.2 Microdeleciones.-** La pérdida de un segmento cromosómico puede ser tan pequeña que incluya solo un gen o parte de un gen (Stansfield, 1996) aun así pueden ser transmitidas ejemplo: del (13) (q14.00q14.09) causante del retinoblastoma.

La deleción en cromosomas sexuales afecta la gametogénesis y la diferenciación sexual, excepto en "Y"q distal, pero el Síndrome de Turner está determinado por la deleción del brazo corto del cromosoma "X" (Xp).

**1.3.2.4 Cromosomas en anillo.-** Puede suceder como un evento con centrómero o sin el, perdiéndose en éste caso, los que se transmiten son siempre con centrómero, un anillo con un centrómero involucra la deleción frecuentemente pequeña, de los extremos de ambos brazos,

incluyendo los telómeros y la reunión del segmento medio consigo mismo en una estructura circular, causando problemas durante la mitosis para separar las cromátidas hermanas en anafase.

### ANILLOS: CONSECUENCIAS



**Figura 9.- Anillos**

Es un rearrreglo desbalanceado donde los segmentos terminales del cromosoma con la ruptura, casi siempre se pierden, y pueden ocurrir anomalías como duplicaciones / deleciones, por los problemas mecánicos en la mitosis y la meiosis, acompañados de cambios continuos en el tamaño del anillo y su composición.

Si las cromátidas hermanas intercambian durante meiosis seguido de la replicación cromosómica (figura 9) se puede formar un anillo dicéntrico o un par de anillos entrelazados, que pueden dejar puentes, rupturas, pérdida de material en la anafase de la mitosis, las siguientes fusiones y fisiones pueden dejar anillos de tamaño variable y duplicaciones y pérdidas de tamaño variable también, además de duplicaciones y pérdidas adicionales, también se pueden producir múltiples anillos entrelazados.

Haciendo énfasis en que debido a la composición inestable del anillo, la designación de puntos de ruptura no puede ser muy certera o representar en su caso el cambio inicial.

Son mas frecuentes *de novo*, y raramente se transmiten a sus descendientes, debido a su inestabilidad en las divisiones celulares dejan una gametogénesis sin terminar, existe una frecuencia de mosaicismo, la repercusión en el fenotipo es variable, con signos de trisomía o de delección.

En humanos, el anillo más frecuente en anomalías constitucionales es el del cromosoma 13.

**1.3.2.5 Inversión.-** La inversión ocurre cuando un segmento de del cromosoma se rompe, y se reúne dentro del mismo cromosoma invirtiendo su posición. Normalmente solo una inversión grande puede ser detectada.

Las inversiones son rearrreglos balanceados (sin pérdida o ganancia de material aparente) y el portador es de fenotipo normal. Si hay una ruptura en medio de uno o dos genes, resultará un desbalance para éstos genes en particular.

**1.3.2.5.1 Inversiones Paracéntricas.-** Cuando el segmento invertido está dentro del mismo brazo del cromosoma, sea "p" o "q" se convierte en un evento raramente detectado debido probablemente a que son pequeños segmentos los involucrados.

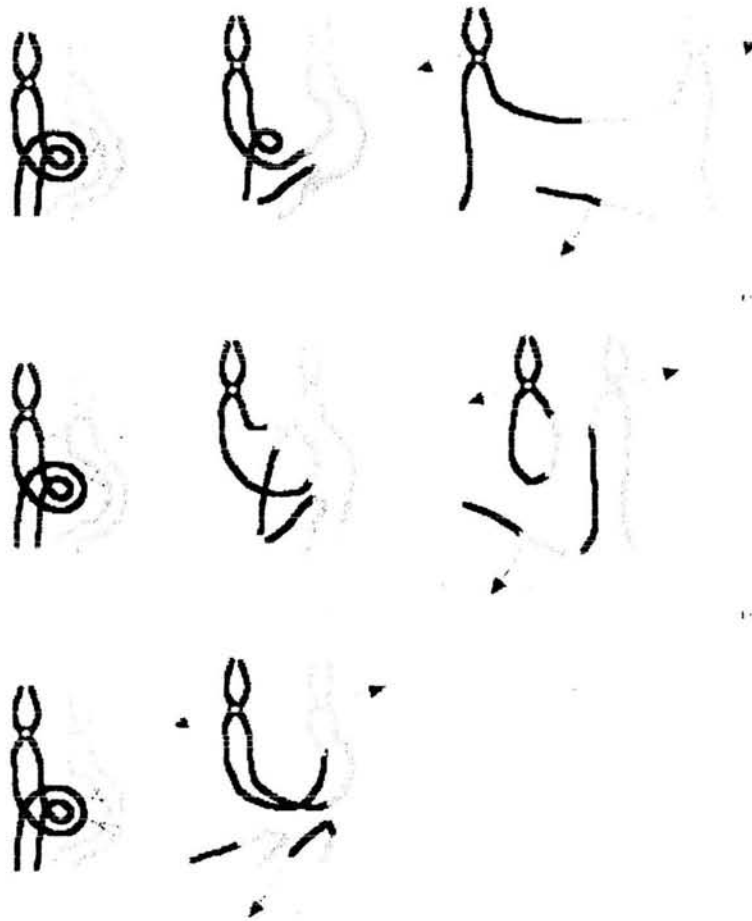
Las inversiones paracéntricas más frecuentes en anomalías constitucionales afectan a los cromosomas 3, 7 y 14.

Los portadores son frecuentemente fértiles (sin importar el sexo), y cerca de la mitad de los descendientes tendrán cariotipo normal, y la otra mitad un cariotipo con el rearrreglo balanceado como el portador, la progenie es igual a menos que se de entrecruzamiento entre los segmentos involucrados cosa que es poco frecuente, hay pocos abortos con formas desbalanceadas, que son frecuentemente muy dañinas como para dar origen a fetos viables. Hay muy pocos casos de descendientes malformados teniendo una constitución aparentemente balanceada bajo microscopio óptico.

**INVERSIÓN PARACÉNTRICA : CONSECUENCIAS**  
**-Primera división Meiótica-**

Sobrecruzamiento

► Anafase I



**Figura 10.- Inversión Paracéntrica; Consecuencias**

En la meiosis hay apareamiento de segmentos homólogos, lo cual resulta en un "loop" o "rizo de inversión" (formación de un lazo en forma de una "e" que es básicamente una inversión en la secuencia genética), si el entrecruzamiento se lleva a cabo dentro del rizo, produce un fragmento acéntrico que se pierde y forma un puente de unión entre los dos centrómeros en la anafase el puente puede:

- Romper y de acuerdo donde rompe habrá duplicación / delección o deficiencia de ciertos segmentos en las células hijas.
- Impide la separación de la célula, produciendo una sola célula hija con el material genético duplicado.
- El fragmento dicéntrico será incluido completamente en una célula hija, en éste caso habrá en telofase de la segunda división, una célula normal, una célula con la inversión balanceada, una célula que no tiene ésta cromátida y una con la cromátida dicéntrica. Éste cromosoma dicéntrico puede: entrar en ciclo de fisión-fusión con rearrreglos complejos, o impedir la diacinesis (dejando una tetraploidía), o como última opción inactivar uno de sus dos centrómeros, estabilizando el rearrreglo. (Figura 10)
- Otros entrecruzamientos pueden dejar un producto desbalanceado hasta en 100% (B y C de la figura 10).

Existe una fuerte presión de selección a favor de las células hijas normales, o aquellas que portan la inversión balanceada (tan frecuente en genética, tenemos la paradoja de una anomalía muy grande que puede dejar menos consecuencias en el recién nacido, como en las células sexuales, oocitos, o embriones que las portan y serán eficientemente eliminados, el ejemplo observable es el sesgo que existe, lo que es una regla general en biología.

**1.3.2.5.2 Inversión pericéntrica.**- Una inversión se dice pericéntrica cuando los dos puntos de ruptura involucrados están en lugares opuestos al centrómero, y la reunión invierte efectivamente el segmento que incluye el centrómero.

Algunas inversiones Paracéntricas son frecuentes y son llamadas variantes cromosómicas: como la inversión paracéntrica del 9, inv(9)(p11q11.3), encontrada en 1 / 440 individuos (con variaciones geográficas grandes) y descendencia con formas desbalanceadas no ha sido encontrada regularmente.

- Entrecruzamientos entre heterocromatina se dan raramente.
- Inv(Y) encontrada en 1 a 2 / 1000 individuos varones.

Algunas inversiones pueden ser causa de abortos, produciendo esterilidad (pasa frecuentemente en el varón) y dejar productos desbalanceados en meiosis.

Durante la meiosis el entrecruzamiento en el "rizo de inversión " puede producir cromosomas recombinantes (rec) con duplicación de un segmento y deficiencia de otro, ejemplo: duplicación

de "p" y deficiencia de "q", que puede registrarse como del/dup(p), duplicados-deficiencias como aquellos fuera del rizo de inversión, se pueden ver en la parte baja de la figura 11.

Si la inversión es grande, la probabilidad de entrecruzamiento dentro del rizo de inversión aumenta, y los segmentos duplicados-deficientes fuera del rizo disminuyen. Sin embargo el riesgo puede aumentar después de que la probabilidad de que el concepto sea viable aumenta. Por el contrario, una inversión pequeña tiene menor probabilidad de entrecruzamiento en un rizo de inversión pequeño. Sin embargo si esto ocurre son muy grandes los segmentos duplicados-deficientes lo cual puede tener una presión de selección muy fuerte y el riesgo de descendencia malformada puede ser bajo.

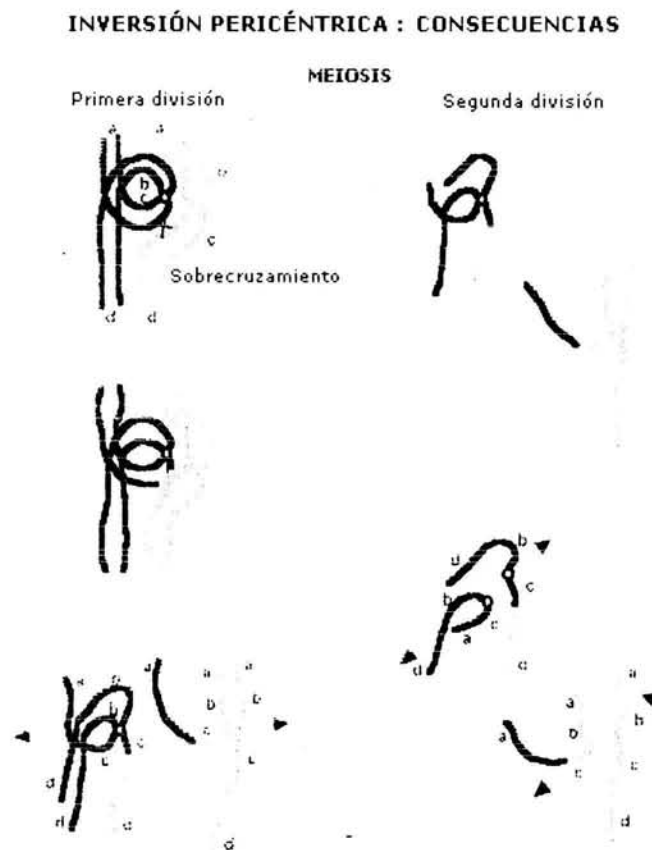


Figura 11.- Inversión Pericéntrica.



El entrecruzamiento fuera de los segmentos invertidos o del "rizo de inversión" es completamente normal.

Dondequiera que ocurra el entrecruzamiento dentro del "rizo de inversión" las consecuencias serán las mismas aún involucrando genes o parte de ellos.

La pérdida de un brazo completo, es reemplazada por la duplicación del otro brazo y es equivalente a una monosomía de un brazo y a una trisomía del otro, y 2 o más quiasmas dentro de un rizo de inversión se cancelan uno al otro.

**1.3.2.6 Isocromosomas.-** Es propiamente un rearrreglo estructural. Se registra como "i" seguido de un paréntesis con el número del cromosoma y el brazo ej.: (17q) o i(17)(q10), que significa la duplicación del brazo "q" y la pérdida del brazo "p". puede ser heterocigótico.

Éste rearrreglo es frecuente como una anomalía adquirida en cáncer ejemplo: i(17q) anomalía secundaria en Leucemia Mielocítica Crónica (LMC). Es también un rearrreglo frecuente en el síndrome de Turner con el cromosoma "X" como i(Xq). Los mecanismos de formación de un isocromosoma son variados y podemos tener un ejemplo en la figura 12.

En células somáticas el origen más frecuente para un isocromosoma es la deleción-uniión con una cromátida hermana ocurriendo dentro de la región centromérica.

**1.3.2.7 Inserción.-** Puede definirse como una translocación intersticial no recíproca, pero puede tener un origen parental a partir de una translocación recíproca paterna.

Un segmento intersticial se rompe y se transfiere a una nueva posición en otro cromosoma, ocasionalmente dentro de su homólogo, pudiendo insertarse aún dentro del mismo cromosoma en algún otro lugar.

El segmento insertado puede estar posicionado con su orientación original con respecto al centrómero o también invertido.

Es un rearrreglo balanceado usualmente. Se registra como "ins" seguido de un paréntesis con el número del cromosoma que recibe el segmento y precedido del número del cromosoma que dona el segmento si es que son diferentes. Un segundo paréntesis indica el punto de ruptura donde se inserta, seguido de los dos puntos terminales de ruptura del segmento delecionado ejemplo. ins(2)(p13q31q34) e ins(5;2)(p12;q31q34) indicando que el segmento q31q34 del cromosoma 2 está insertado en p13 del cromosoma 2 y en p12 del cromosoma 5.

Una inserción puede ser directa (dir ins) tomando su orientación con respecto al centrómero, la banda proximal, la que queda más cercana al centrómero, en el ejemplo anterior la banda q31 precede a la banda q34.

También una inserción puede ser invertida (inv ins) si la banda proximal queda mas lejos del centrómero, ej.:ins(2)(p13q34q31) e ins(5;2)(p12;q34q31), donde el número de banda distal, más lejana al centrómero precede al número de la banda proximal.

Ésta aberración puede ser balanceada y estable en células somáticas, y se puede transmitir por muchas generaciones de células. sin embargo se convierte en devastador en meiosis, en muchos casos el segmento insertado puede no ser muy largo causando la formación de un rizo, y si es largo causar la formación de un cuadrivalente.

#### ISOCROMOSOMAS: MECANISMO DE FORMACIÓN

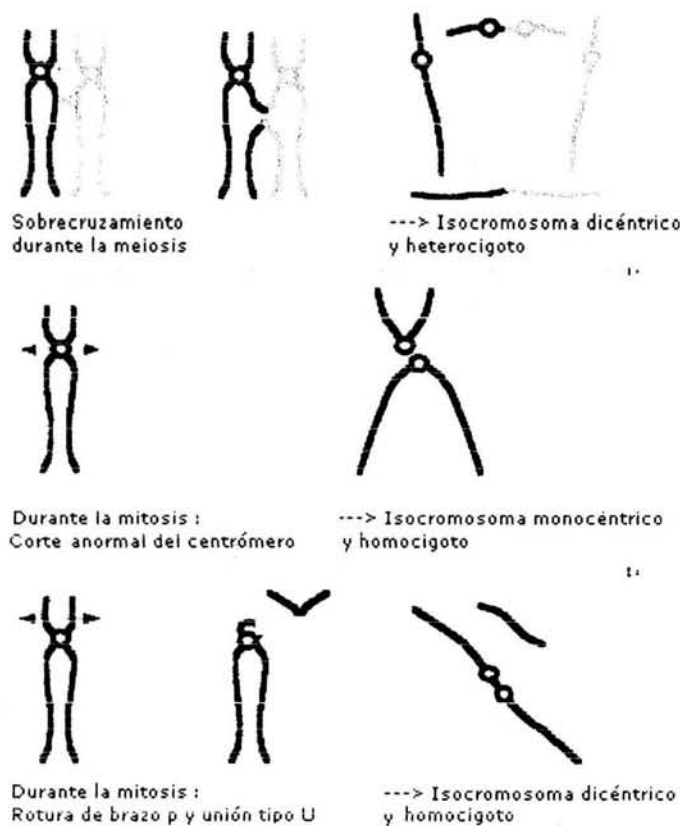
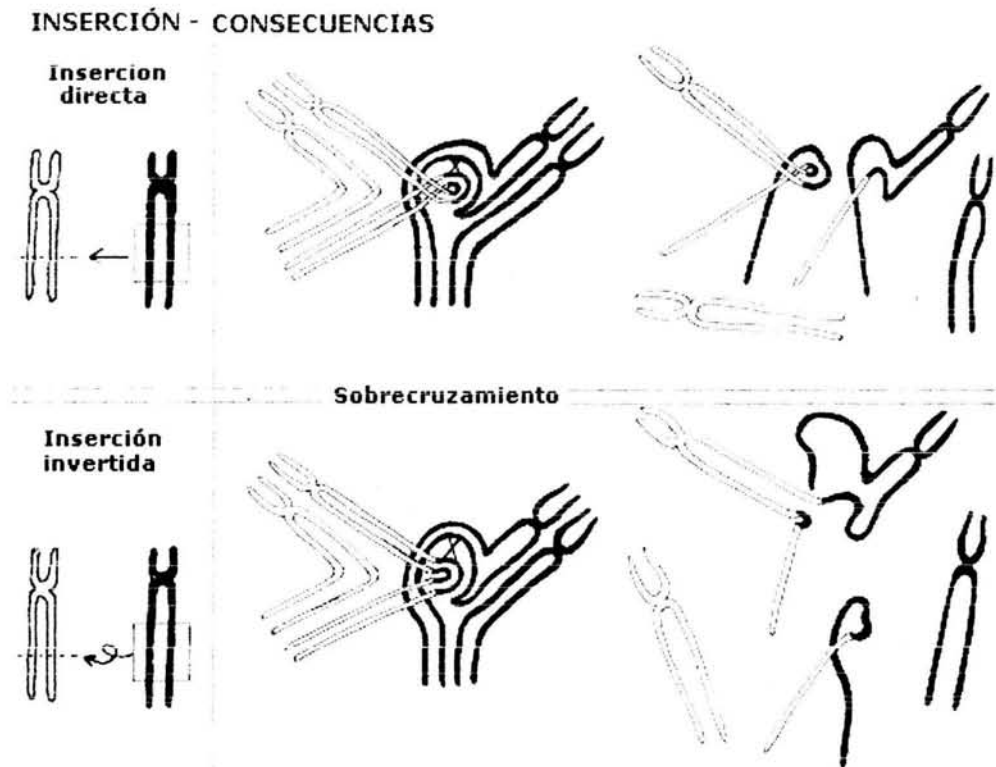


Figura 12.- Inserción

En todo caso el promedio de segregación en Meiosis I puede dejar la mitad de los gametos desbalanceados, por el contrario si el segmento es largo entonces permite la formación del cuadrivalente, generando un 25% de gametos normales si la inserción es directa y no hay ningún segmento invertido como se muestra en la figura 6.



**Figura 13.-Inserción Consecuencias**

**1.3.2.8 Duplicación.-** La duplicación puede ser directa ejemplo: un segmento determinado del cromosoma que se encuentra repetido una o más veces, el segmento duplicado toma la misma orientación con respecto al centrómero, llamada también duplicación en "tandem" o de "uno tras otro".

La duplicación será invertida cuando el segmento duplicado tome la orientación opuesta con respecto al centrómero.

Es un rearrreglo desbalanceado y se registra como "dup" seguido de un paréntesis con el número del cromosoma, y un segundo paréntesis indicando los puntos de ruptura y la región duplicada.

En la mayoría de los embarazos es posible detectar en la placenta, el contenido cromosómico como una forma segura de representar el cariotipo del producto de gestación, es por esto que es importante obtener un resultado del análisis citogenético, ya sea de placenta o de partes fetales en una pérdida gestacional con sospecha de genopatía.

## 2. Justificación

Aproximadamente de 5 a 8% de las parejas con historia de pérdida gestacional recurrente tienen cariotipo anormal, de forma numérica o estructural. (Chen S.H. y cols, 2002).

Las trisomías autosómicas representan el 50% de todas las Anormalidades Cromosómicas del primer trimestre, y están asociadas a la edad materna, de éstas la trisomía 16 es la más común en abortos del primer trimestre. (Warburton D., 1980).

El cultivo de tejidos es utilizado dentro del laboratorio de genética del Instituto Nacional de Perinatología para confirmar o apoyar un diagnóstico en caso de una pérdida gestacional, aun en pérdidas detectadas tempranamente o durante las semanas posteriores de embarazo, como evidencia de la posible causa del evento, debido al alto porcentaje de anormalidades cromosómicas en pérdidas gestacionales se justifica la estandarización de la técnica en toma, transporte y cultivo de tejidos, además del método utilizado para la obtención de material cromosómico de calidad analizable por las técnicas de citogenética clásica dejando muestras preparadas para un análisis de bandas cromosómicas, o para estudios posteriores con técnicas moleculares, como una forma de apoyo para el asesoramiento genético de la pareja, como una forma de establecer el porcentaje de riesgo de una pérdida gestacional para un siguiente embarazo.

### **3.1 Objetivos**

Estandarizar la técnica de cultivo de tejidos en el laboratorio de genética del Instituto Nacional de Perinatología.

Apoyar con el análisis citogenético el manejo y asesoramiento de la pareja con riesgo de pérdida gestacional para un embarazo en el futuro.

### **3.2 Hipótesis**

Si se lleva a cabo el análisis citogenético convencional en pérdidas gestacionales se espera encontrar diversos tipos de alteraciones cromosómicas, que hayan comprometido su desarrollo y no permitieron su viabilidad.

## **4. Material y métodos**

### **4.1 Población de estudio.**

Muestras obtenidas de pérdidas gestacionales de pacientes del Instituto Nacional de Perinatología que fueron referidas por la consulta de Genética en un periodo de enero de 1997 a diciembre de 1998.

### **4.2 Obtención de la muestra.**

A partir de muestras tomadas entre enero de 1997 y diciembre de 1998 de pérdidas gestacionales de pacientes del Instituto Nacional de Perinatología, con indicación de cariotipo, se selecciono el tejido adecuado para la biopsia que fue de los tejidos siguientes:

Piel fetal

Placenta (vellosidades coriales)

Órgano de origen fetal

Con una biopsia de aproximadamente 3 X 2 X 0.5 mm, fue suficiente.

Fue establecido que se enviaran tubos estériles con medio de transporte con medio MEM (100 mililitros, adicionado con 1 mililitro de gentamicina y dos mililitros de fungizona). a los quirófanos, para que las muestras biológicas se depositaran en el transporte adecuado, con indicaciones de ser enviados al laboratorio de genética del Instituto lo mas pronto posible, en caso de no ser mandada de inmediato la muestra se pidió que se mantuviera a temperatura ambiente, para preservar las características de vida de las células.

Se hizo la solicitud de etiquetar con el nombre del paciente, fecha, hora de la colecta, colector y el origen de la biopsia o tejido, además de la indicación por la cual se referia al laboratorio de Genética.

### **4.3 Proceso de la muestra biológica en el laboratorio.**

El registro de la muestra se llevaba a cabo por los médicos genetistas o la persona que llevaba la muestra al laboratorio, los tubos de la muestra se manejaban en un área estéril, o campana de flujo laminar vertical, para proteger los cultivos de contaminación, se colocó la muestra

biológica en cajas de "petri" estériles de 60 X 10 mm de poliestireno desechables para observar al microscopio de disección y se etiquetaron las cajas que corresponderán a cada tubo o muestra, dependiendo de si hay mas de un tubo, muestra o tejido, se abrió una hoja de seguimiento del cultivo, para cada muestra enviada, bajo el microscopio de disección se selecciono la parte de donde se tomaron las células para cultivo.

#### 4.4 Cultivos de células.

Todo el manejo se hizo en la campana de flujo laminar vertical o estéril, desde el corte del tejido seleccionado para cultivo, y el deposito en una caja de "petri" de 35 x 10 mm de poliestireno desechable estéril, para ser lavado a profundidad con solución salina isotónica estéril, eliminando todas las células sanguíneas, o residuos que representaran competencia en nutrientes y oxígeno.

Se realizaron cortes finos de menos de 1 mm<sup>2</sup> aproximadamente en forma tajante por medio de 2 bisturís, se fragmentó finamente el tejido en cuestión y se tuvo el cuidado de no rasgarlo, pues las fibras impiden la adecuada adherencia a la superficie de cultivo, se pipetearon en la misma solución los explantes para liberar a las células.

En 2 botellas para cultivo se depositaron un promedio de 10 fragmentos por caja, colocando previamente un baño de medio de cultivo en el fondo de la botella, y desechando el excedente, aproximadamente 2-3 mililitros, se colocaron los explantes con ayuda de una pipeta de vidrio o plástico estéril, distribuyéndolos uniformemente en el fondo, y se utilizó el mismo método con un tejido que fuera diferente de la misma muestra del producto de pérdida gestacional, si se tenía disponible para poder confirmar o desechar un mosaico, o por contaminación de células maternas.

Se agregó el MEM de cultivo suplementado necesario (100 mililitros de medio de cultivo MEM mas 22 mililitros de suero fetal bovino, mas 1 mililitro de L-Glutamina, mas 1 mililitro de penicilina G sódica, sulfato de estreptomicina anfotericina B como fungizona marca Gibco) para que los explantes no flotaran, y así dar oportunidad a las células liberadas de adherirse al fondo sin dificultad.

Los frascos de cultivo e colocaron en forma horizontal sobre las charolas estériles y se mantuvieron dentro de la incubadora, a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub>.



Bajo el microscopio invertido cada frasco de cultivo fue observado, para verificar que los explantes se encontraran adheridos al fondo del frasco llevar a la incubadora sin moverlos de ahí por lo menos 24 – 48 horas.

Después fueron revisadas bajo el microscopio invertido cada 24 horas para que se detectara si los explantes ya habían liberado células vivas.

#### **4.5 Mantenimiento de los cultivos.**

Cada 24 – 48 horas se revisaron bajo el microscopio invertido si las células estaban liberadas y adheridas alrededor de los explantes, y si no había contaminación.

Al encontrar células adheridas en por lo menos tres explantes, se adiciono 1 o 2 mililitros de medio de cultivo (preparado como se explicó arriba) para alimentarlas.

Cuando había suficientes células en cada explante, se llevaba hasta 5 mililitros la cantidad de medio de cultivo por botella.

Los cambios de medio de cultivo se hicieron dos veces por semana renovando el aminoácido L-glutamina cada 8 días en el medio de cultivo.

Se evitó el goteo en las charolas que contenían los frascos de cultivo y se cambiaron una vez por semana (esto evita la contaminación por el ambiente).

#### **4.6 Subcultivos.**

Se seleccionaron las botellas para subcultivar bajo el microscopio invertido, con los criterios siguientes: tres o mas explantes con células liberadas a su alrededor, y adheridas al fondo, que no se observaran en mal estado, vacuoladas o en forma diferente al huso característico de los fibroblastos, se lavaron con 3 mililitros de solución estéril de Hanks, que posteriormente se desecho, se agregó un mililitro de tripsina a todo el fondo de la botella distribuyéndolo uniformemente, para observar al microscopio invertido la acción de la tripsina golpeando suavemente el fondo en caso necesario para ayudar a que se desprendieran las células.

Al observar suficientes células liberadas, se agregaron tres mililitros de MEM de cultivo suplementado, para detener la acción de la tripsina por medio del suero fetal bovino adicionado en el medio, se decantó en un tubo de centrifuga cónico estéril de 15 mililitros, y se centrifugó a 1000 rpm por 10 minutos.

Se agregaron nuevamente 5 mililitros de MEM de cultivo suplementado a la botella, para su regreso a la incubadora en caso de respaldo o necesidad de un nuevo subcultivo confirmatorio, se desechó el sobrenadante con tripsina del tubo de ensaye centrifugado con ayuda de una pipeta sin tocar el paquete celular, y se agregó medio suficiente para obtener una concentración de 30 células aproximadamente por campo bajo el microscopio invertido, se resuspendió el botón celular.

Se depositaron las células resuspendidas y disgregadas en cajas de "petri" de 35 X 10 milímetros de poliestireno que contenían un cubreobjetos de 22 X 22 milímetros estériles, sin rebasar éste, aproximadamente 0.5 mililitro por caja, y se verificaron al microscopio invertido la concentración de células teniendo cuidado de no derramar el líquido fuera del cubreobjetos, se procuró tener un promedio de 3 a 5 cajitas por botella para poder probar al cosechar y al bandear.

Si había células adheridas al revisar al microscopio invertido durante los siguientes tres días, se agregaban 3 mililitros de medio suplementado, se revisó cada día el crecimiento y estado del cultivo.

Al contar al microscopio invertido de 3 a 5 metafases (puntos refringentes) por campo a 10X, se marcaban para cosecharlas al día siguiente.

#### **4.7 Obtención de metafases.**

Se preparó fijador suficiente para hacer 3 cambios por caja, con 5 partes de alcohol metílico (CH<sub>3</sub>-OH) y 2 de ácido acético (CH<sub>3</sub>-COOH) y se mantuvo frío en 2 o 3 recipientes de vidrio con tapón, posteriormente se agregó 1 mililitro de colcemida al 50% diluida en Hanks' con jeringa y aguja de 27G X 13 mm a cada una de las cajas y se incubó por 20 minutos a 37°C.

Después de éste tiempo se desechó el medio con la colcemida y se agregaron 3 mililitros de solución hipotónica de KCL (0.085%) poco a poco por las paredes de la caja, dejándolas media hora en la incubadora a 37°C, para posteriormente sobre una mesa fija agregar un mililitro de fijador (5:3) como pre-fijación, por 10 minutos a temperatura ambiente y de ahí en adelante no se movieron las cajas, para desechar cada cambio se utilizó un pipeteador automático cuidando de hacerlo suavemente, para no desprender las metafases, para cada cambio se agregaron 3 mililitros de fijador frío suavemente (permanecieron durante la cosecha en el congelador) por cada caja dejando pasar 10 minutos entre cada cambio y realizando 3 cambios en total.

En el último cambio se retiró todo el fijador y se observó bajo el microscopio invertido durante el secado que debió ser gradual y fue necesario en ocasiones utilizar aire y/o vapor hasta que se observaron los cromosomas visibles y separados.

Al desprender el cubreobjetos del fondo de la cajita se etiquetó en el reverso, y se depositó en la parte externa de la tapa de la caja de petri, se cubrió con la base de la misma caja, se etiquetó nuevamente la caja con la calidad y, o cantidad de las metafases que contenía cada cubreobjetos, se sometieron a maduración por 24 horas a 60° centígrados.

#### **4.8 Obtención de bandas GTG.**

Se colocaron los cubreobjetos en una solución de tripsina al 4% en solución amortiguadora de fosfatos con pH 7.0 (en nuestro caso con una tableta de pH 7.2 mas un gramo de NaCl en 1000 mL de agua bidestilada) de 1 minuto con 30 segundos hasta 2 minutos con treinta segundos, tiempo que debió ajustarse en cada caso.

Se enjuagó en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0 y se pasó a solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0 por 1 minuto (en nuestro caso con una pastilla de pH 7.0 en 1000 mL de agua bidestilada).

La tinción se hizo en una solución amortiguadora de fosfatos de pH 6.8, (con una tableta de pH 6.8 en 1000 mL de agua bidestilada) con colorante GIEMSA al 4%, por un periodo que varia de 1 minuto con 30 segundos a 2 minutos.

Se enjuagaron los cubreobjetos en agua corriente en un último recipiente y se pusieron a secar, para posteriormente montarlos en un portaobjetos con resina, para ser analizados al microscopio óptico.

## 5. Resultados.

Los resultados de 75 muestras de pérdidas gestacionales obtenidas durante el periodo de enero de 1997 a diciembre de 1998 en el laboratorio de genética del Instituto Nacional de Perinatología, correspondieron a 56 casos con resultado en cariotipo, representando el 74.6%, dentro de los cuales 15 presentan anomalías cromosómicas correspondiente al 26.78%, con un 25.33% sin resultado por cariotipo, debido a las condiciones del tejido.

El número de trisomías y monosomías se presentaron en igual número de casos (Tabla II) la trisomía 16 en tres casos, y la monosomía del cromosoma "X" también en tres casos, dos casos de trisomía 13, un caso de trisomía 21, y cuatro casos de translocaciones en autosomas, correspondiendo a: 45,XX,der(13)t(13;18)(p11;q11), 46,XY,t(6;18)(q21;q11.2), 46,XX,t(1;14)(p36.3;24.3), y por último 46,XX,t(12;13)(q24.1;q12), una tetrasomía en mosaico 92,XXXX/46,XX, además de una trisomía trece en mosaico, 46,XY/47,XY,+13.

De los casos con anomalías, 11 son aneuploidías, de las cuales 73.33% son en autosomas y 26.66% en cromosomas sexuales.

En autosomas 46.66% se localizan en cromosomas acrocéntricos, y únicamente el cromosoma 16 tiene 3 casos, representando el 20% de las anomalías.

Dentro de los autosomas el cromosoma 13 tiene la mayor frecuencia de las anomalías cromosómicas tanto numéricas como estructurales con 5 casos y un tercio del total.

La frecuencia de monosomía del cromosoma "X", corresponde a lo reportado en la literatura (Cremer y Cremer, 2001, Zori, 1993).

La trisomía 16, no representa la principal trisomía en la presente muestra.

Dentro de las aneuploidías en autosomas se encuentra una proporción muy diferente entre los sexos con 6 casos masculinos, representando el 85.7%, y con un solo caso entre los femeninos representando el 14.3%.

En cuanto a las aneuploidías en cromosomas sexuales, sólo se presentaron en el cromosoma "X", con 4 casos.



Nº	Edad materna	SDG	TABLA II	
			Indicación	Citogenética
1	-	-	Aborto	47,XY, +16
2	-	-	Dx, Sx. De Turner en mosaico	45,X
3	-	terminus	Pb. Sx. De Edward's	47,XX,+13
4	39	30.3	Cíclope en L :A : aborto espontáneo G3 P1, A1, A+1999	45,XX,der(13)t(13;18)(p11;q11),-18
5	35	23.1	Óbito, hidrops + higroma quístico gigante, G5, P4, A+	Turner 45,X
6	30	36.4	Pb. SX. De Edward's, G4, P1, C1, A+, Gemelar 2º masculino, Facies Potter, pie equinovaro bilateral	46,XY,t(6;18)(q21;q11.2)
7	37	21.3	Hidrops fetalis, higroma quístico, muerte fetal, G5, P4.A1, AB+	Turner 45,X
8	-	-	-	46,XX,t(1;14)(p36.3;q24.3)
9	39	36.4/37.1	RCIU fetal/EMA, sexo indeterminado, malformaciones, G1, C1, A+	mos 46,XY/47XY,+13
10	38	36.3	Con alteración cardiaca, Sx dismórfico, Triple marcador alterado, G1, C1, 1999	47,XY,+13
11	-	-	2 Abortos previos	47,XY,+16
12	19	28	Hidrops fetalis, picl de feto	mos 92,XXXX (15)/46,XX(15)
13	26	12.2 por fun	Aborto, madre portadora de translocación (12;13) G5,A5, O+1999.	46,XX,t(12;13)(q24.1;q12)
14	36.2	terminus	Polihidramnios, hidrops fetalis, Pb Trisomía 21	47,XY,+21
15	38	12	Aborto	47XY,+16

SDG –semanas de gestación

TABLA III ANORMALIDADES CROMOSÓMICAS TOTALES

ANORMALIDADES CROMOSÓMICAS TOTALES	15	100%
ANEUPLOIDÍAS	11	73.33%
ESTRUCTURALES	4	26.66%

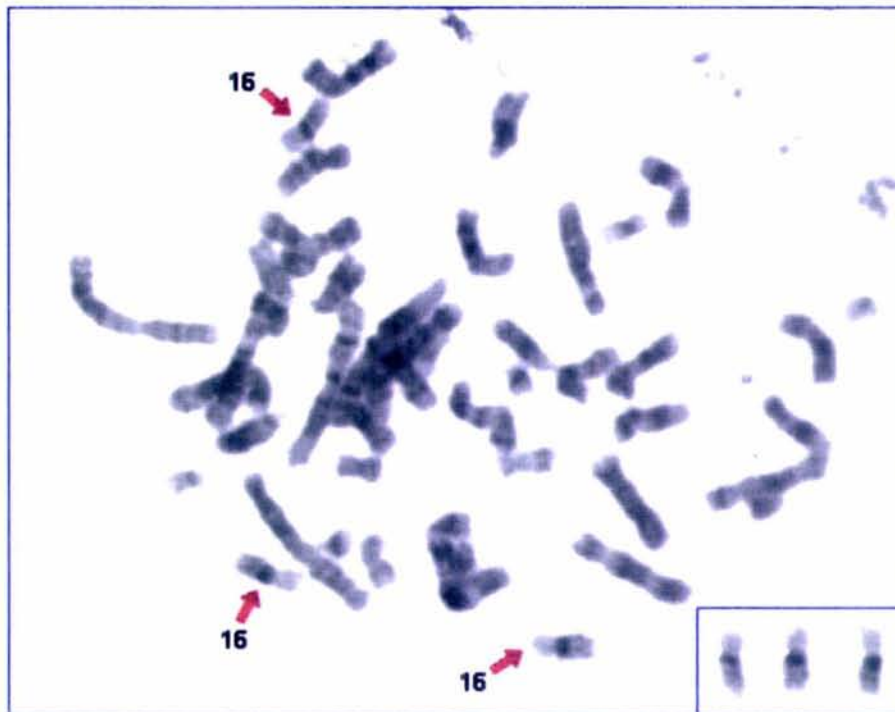
TABLA IV PORCENTAJE ENTRE NORMALES Y SEXO

NORMALES	FEMENINO	MASCULINO
NÚMERO	32	8
PORCENTAJE	80%	20%
Nº TOTAL	40	

## TABLA V ANEUPLOIDÍAS

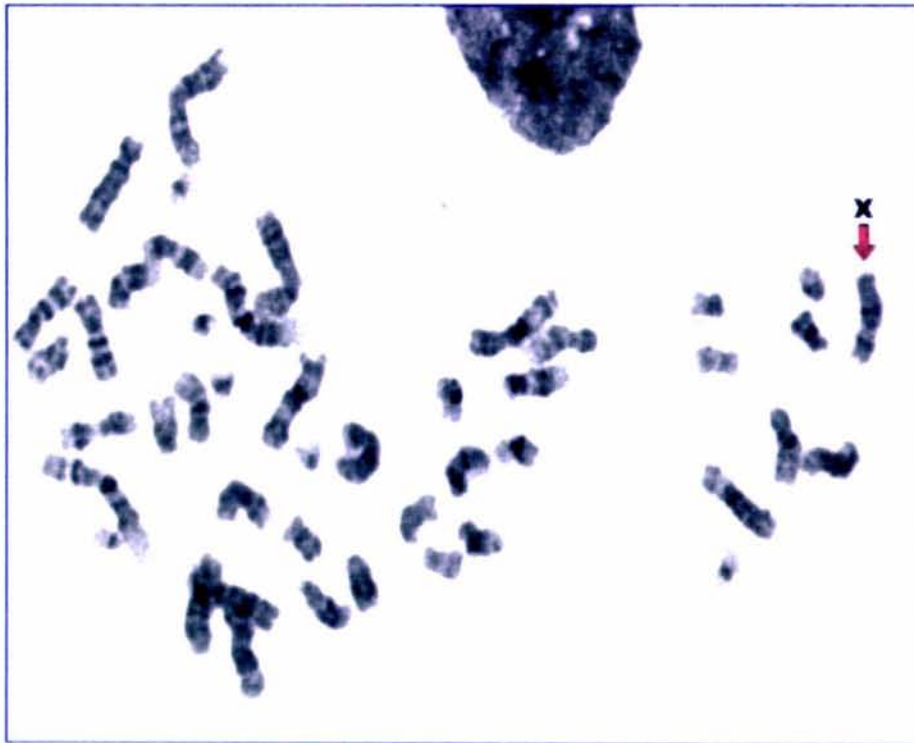
TABLA IV.- Aneuploidias en cromosomas sexuales y autosómas que se presentaron en los productos de pérdida gestacional.

AUTOSOMAS	M	F	CROMOSÓMAS SEXUALES	M	F
47,XY,+16	3	-	-	-	-
47,XY,+13	1	-	45,X	-	3
47,XX,+13	-	1	-	-	-
46,XY/47,XY,+13	1	-	92,XXXX	-	1
47,XY,+21	1	-	-	-	-
TOTAL	6	1	-	-	4

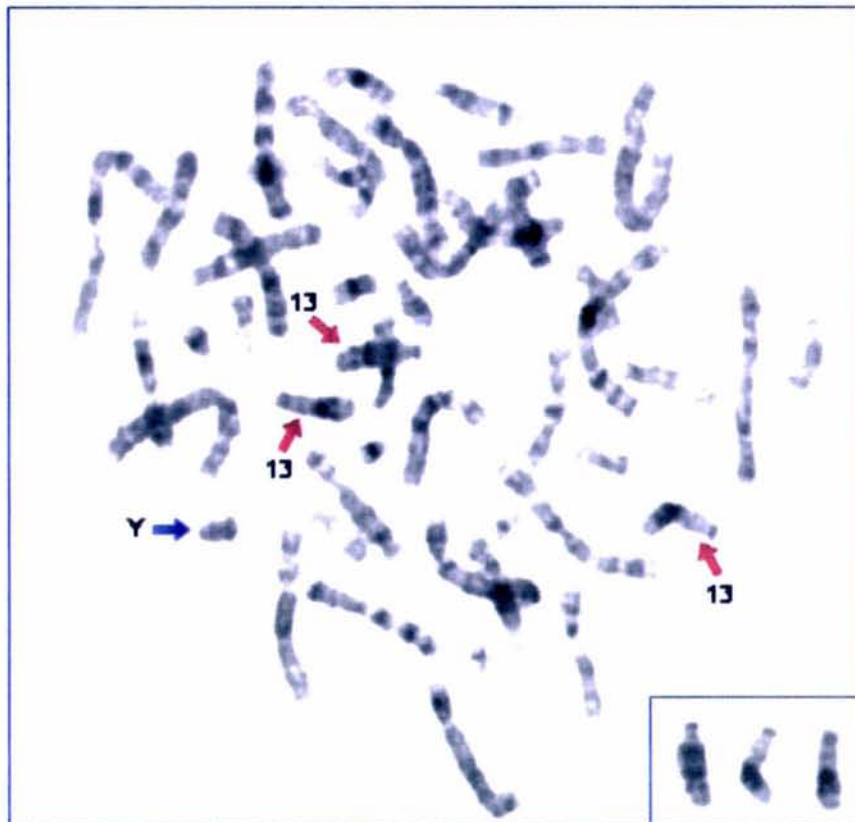


**Foto 1.** Trisomía 16 con complemento cromosómico XY correspondiente al 1.

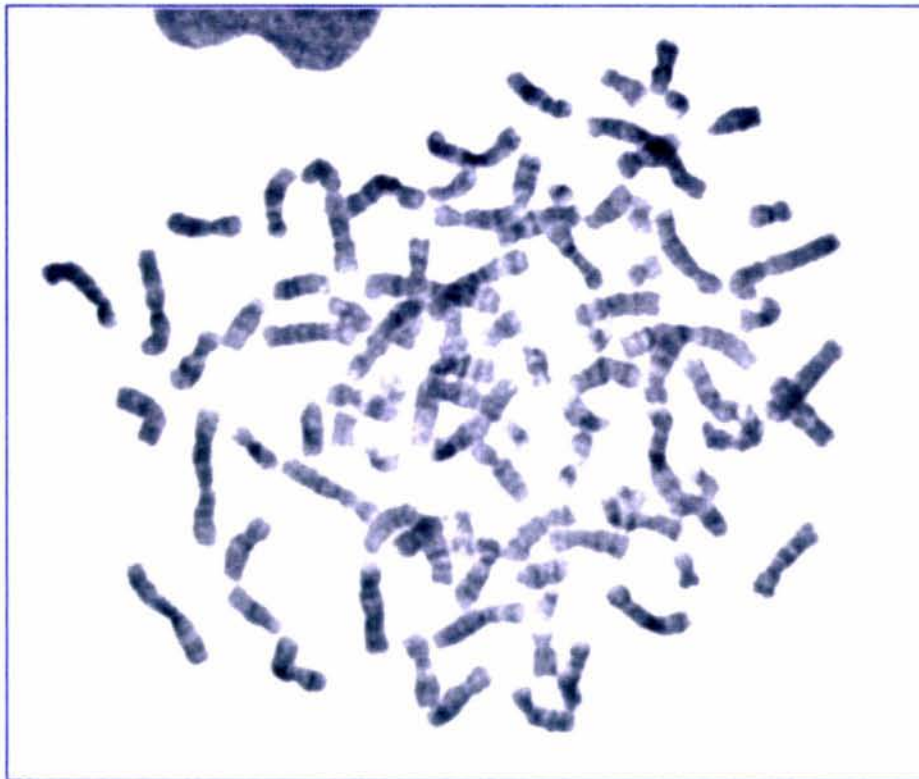




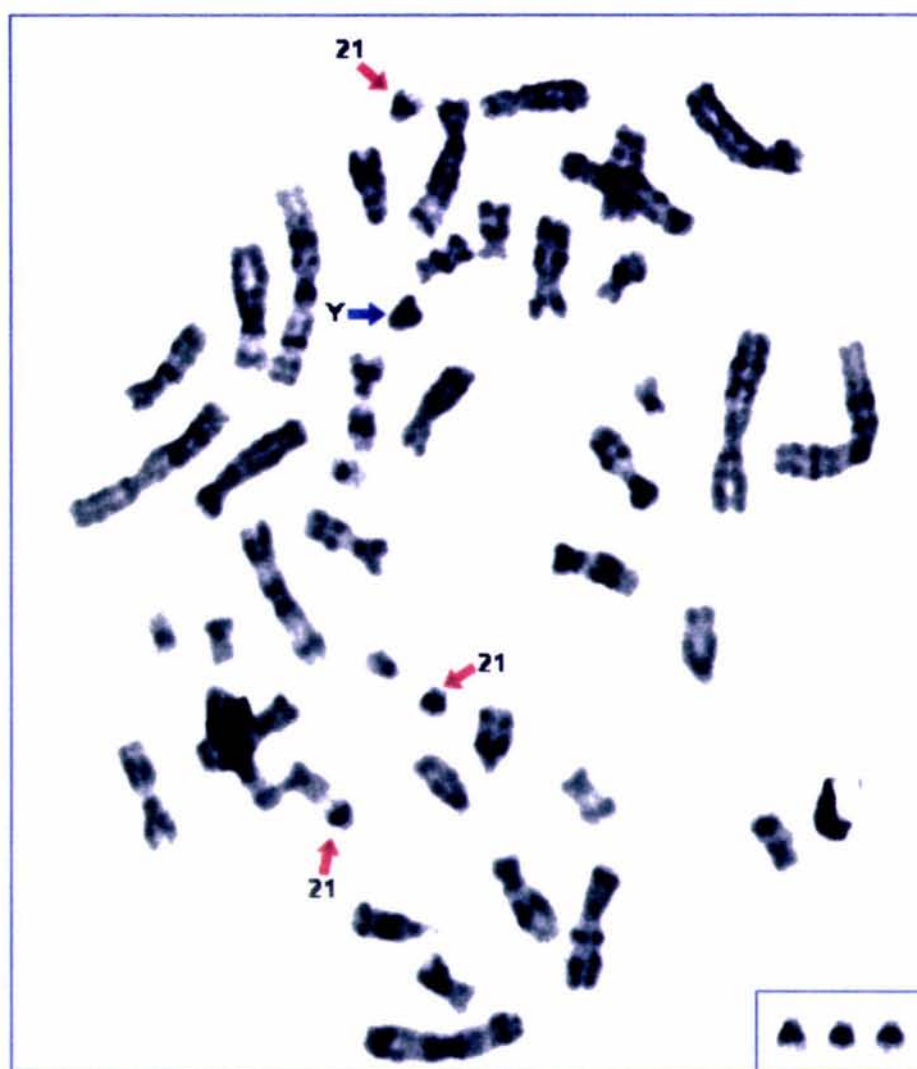
**Foto 2.** Se muestra un solo X lo que indica Síndrome de Turner correspondiente al caso 5.



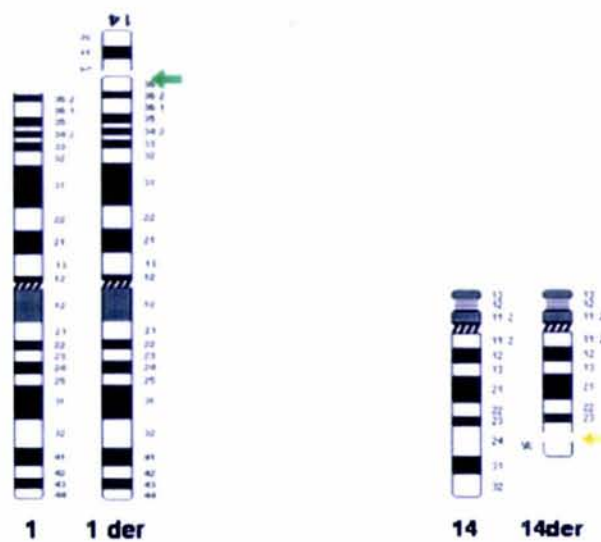
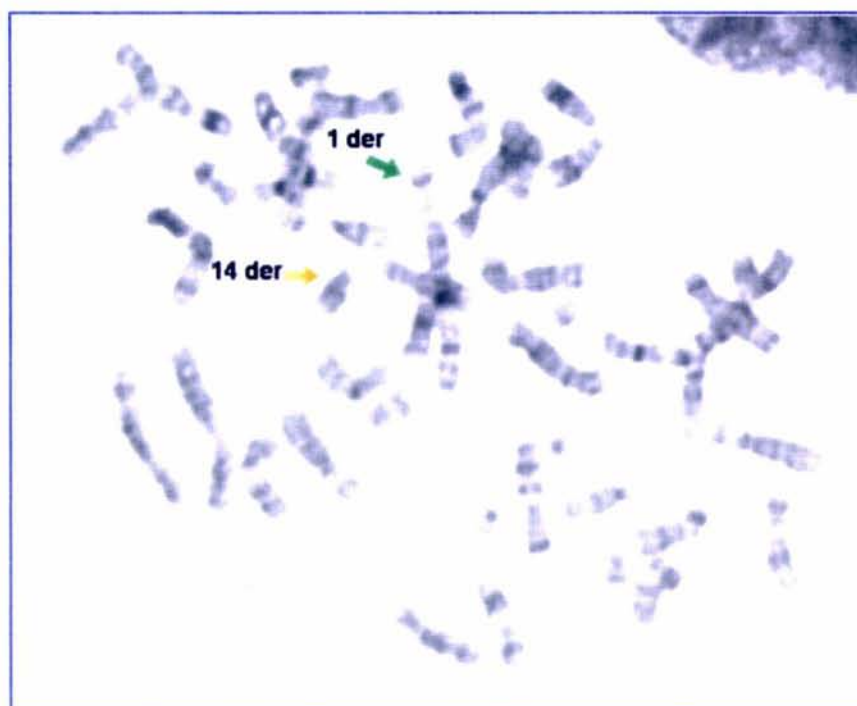
**Foto 3.** Se muestra trisomía 13 con complemento cromosómico XY, correspondiente al caso 10.



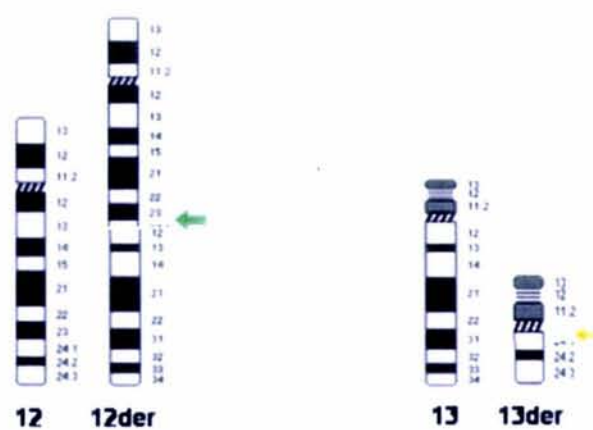
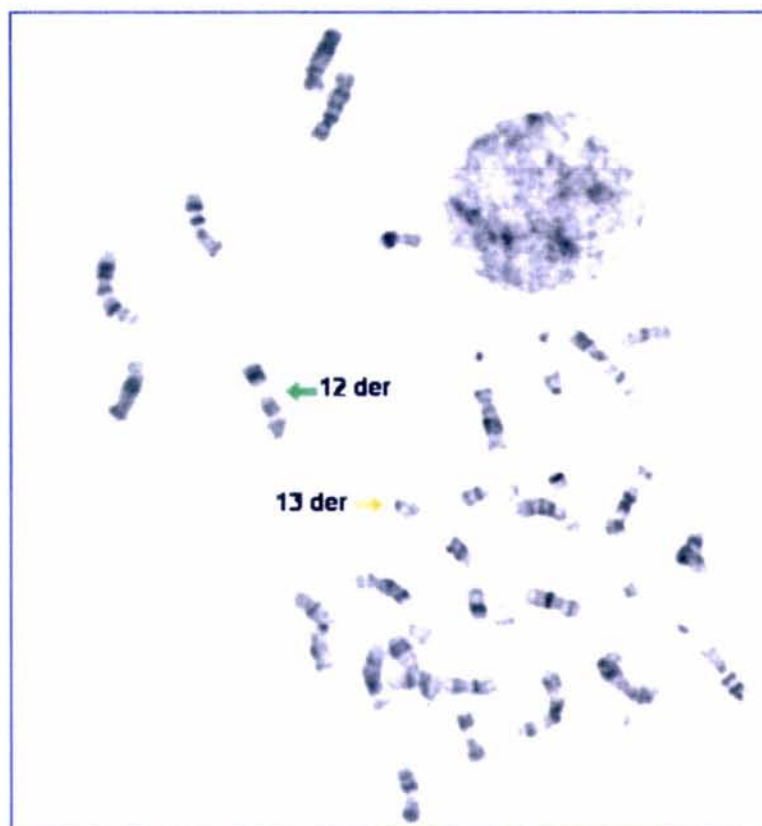
**Foto 4.** Tetrasomía 92,XXXX correspondiente al caso.



**Foto 5.** Trisomía 21 con complemento cromosómico XY correspondiente al caso 14.



**Foto 6.** Translocación 46, XX, t(1;14)(p36.3;q24.3) correspondiente al caso 8.



**Foto 7.** Translocación 46, XX, t(12;13)(q24.1;q12), correspondiente al caso 13,

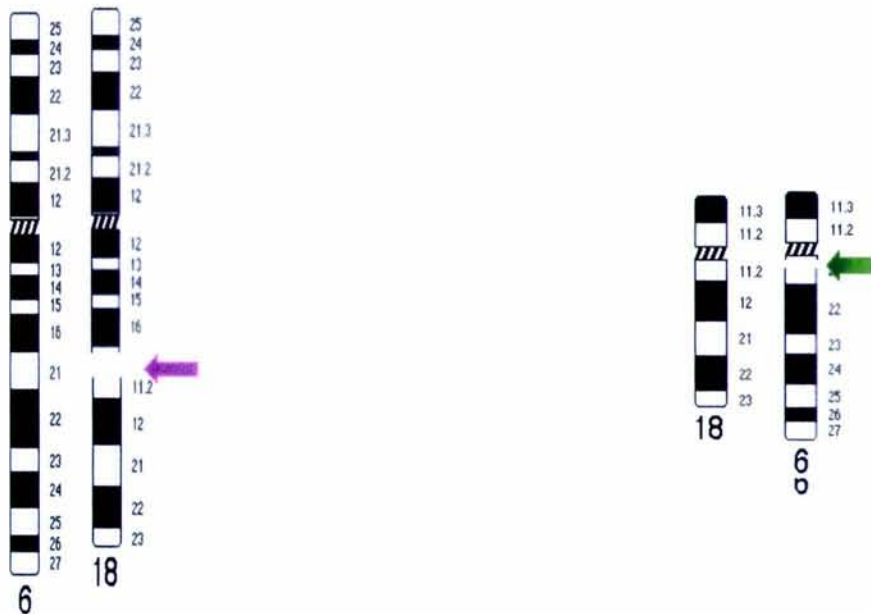
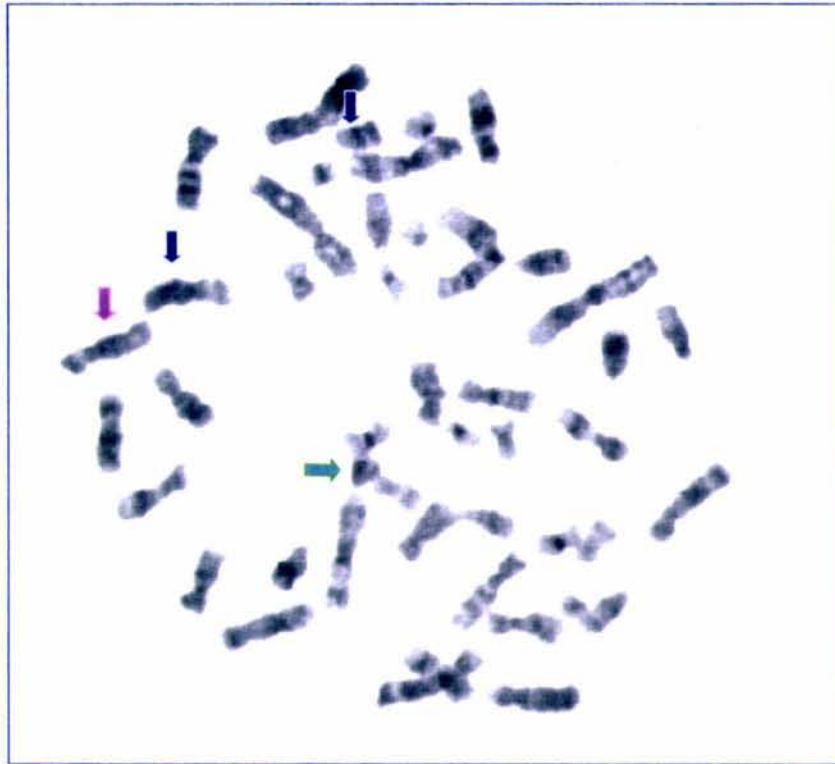
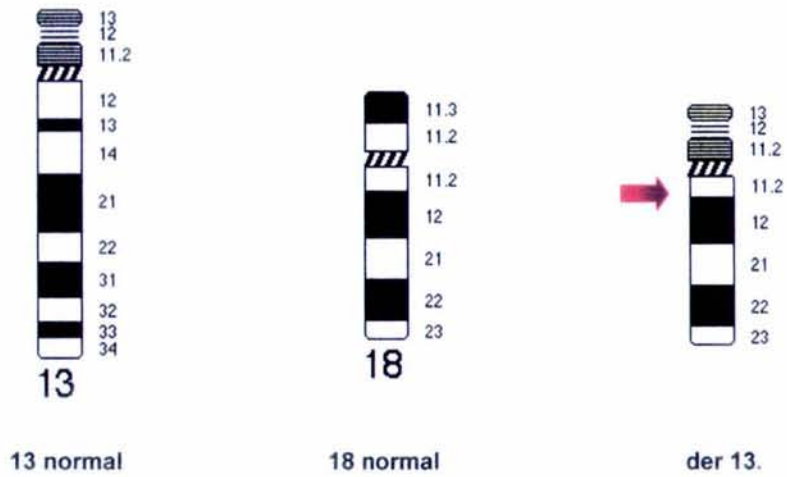


Foto 8 de Translocación 46,XX,t(6;18)(q21;q11.2)  
Correspondiente al caso N° 6



Ideograma de translocación 45,XX, der(13)t(13;18)(p11;q11) , -18 correspondiente al caso 4



## 6. Discusión

El hospital del INPer por ser de tercer nivel, concentra casos muy especializados de mujeres con embarazo de alto riesgo, entre ellos están los de riesgo genético. (Mishell, 1993, Wilcox y col., 1998, Katz y kuller, 1994, Pellicer, 1999, Tsunehisa y col., 1992).

Todas las muestras son de tejido, provenientes de productos de pérdida gestacional, y fueron analizadas para investigar una posible causa de origen cromosómico.

La trisomía 16 en el presente trabajo se encontró en una proporción de 20%, semejante a lo reportado en la literatura, 20% del total de las anormalidades cromosómicas en abortos espontáneos tempranos, y el 15% de todas las anormalidades cromosómicas, es letal si no está en forma de mosaico, esto se debe en parte a la incompatibilidad con el desarrollo fetal completo, algunos autores han informado su presencia en placenta en forma de mosaico en un 3% (Ledbetter y col., 1992, Henderson, 1996; [www.medgen.ubc.ca/wrobinson/mosaic](http://www.medgen.ubc.ca/wrobinson/mosaic)).

Craine & Chung en 1998, informaron que la presencia de ésta trisomía se encuentra limitada a la placenta en muchos casos, debido a un fenómeno de no-disyunción, que la confina a los tejidos extraembrionarios, si esto sucede pueden pasar dos cosas, primero: continuar el embarazo con la desaparición de los tejidos placentarios de la línea anormal trisómica (Sirchia y col., 1998, Los y col., 1998) lo cual puede ser confirmado al no encontrarse la trisomía en la placenta de término, y el examen patológico sólo revela partes infartadas o nódulos fibrosos, el segundo efecto sería la permanencia de la trisomía que puede provocar el aborto debido al desarrollo deficiente de la vascularización placentaria y a un aumento del índice apoptótico. (Qumsiveh y cols ., 2000).

Por esto mismo existen reportes de trisomía 16, en forma de mosaico solo en vellosidades coriales, o "confinada a placenta", que raramente se confirma en líquido amniótico o en fibroblastos de piel del feto después del nacimiento.

Esto explicaría por qué la mayoría de los embarazos de trisomía 16 se pierden alrededor de las 12 semanas de gestación y sólo cerca del 10% logran hacer la reducción a disomía o el llamado "rescate trisómico", por medio de la eliminación del cromosoma que se encuentra adicionalmente y que puede dejar una disomía uniparental en potencia ([www.medgen.ubc.ca/wrobinson/mosaic](http://www.medgen.ubc.ca/wrobinson/mosaic)) continuando al segundo trimestre de la gestación. (Berghella y col., 1998, Sirchia y col., 1998).

En este estudio se observaron tres casos del total de 15 con trisomía completa del cromosoma 16, productos que se perdieron durante el primer trimestre de gestación y que fueron los tres masculinos.

El porcentaje de la AC, tanto numéricas como estructurales es semejante a lo reportado en la literatura, aun cuando el tamaño de la muestra es menor a el esperado (menos de 100 casos) como representativo.

Continuar con ésta técnica el estudio de las pérdidas gestacionales, debe hacerse tomando en consideración que recabar los datos completos para un análisis como son: edad materna, semanas de gestación, antecedentes familiares, (árbol genealógico, cariotipo de los progenitores), y estudiar mas de un tejido para descartar completamente algún tipo de mosaicismo dependiendo del diagnóstico y el caso (confinado a placenta u otro confinado a piel por ejemplo), será necesario para confirmar en nuestra población la incidencia de AC.

Es importante tomar en consideración que: la toma de la muestra, el medio de transporte, así como el tiempo transcurrido entre la toma de muestra y la siembra, son factores importantes para el éxito del cultivo, en general las condiciones previas al cultivo resaltan como determinantes para obtener un resultado satisfactorio.

Las causas principales de la falla en el cultivo son: la contaminación, tanto materna, como por microorganismos, debido al mal manejo de la muestra (temperatura, medio de transporte, etc.) dando como resultado células contaminadas, muertas o inadecuadas para reproducirse, con resultados erróneos.

El cultivo de tejidos proveniente de vellosidades coriales demostró ser una técnica confiable para el análisis citogenético (Brambati y col., 1998, Borrel y col., 2000, van den Berg y col., 2000, Sikkema-Raddatz y col., 2000, Mcconnel y Carr, 1975, Eiben y col., 1998) y se estableció como una técnica de diagnóstico genético en la pérdida gestacional.

Se sugiere que los estudios citogenéticos contemplen el uso de técnicas de análisis molecular, pues la aplicación de ambos puede proporcionar más información sobre la causa de los abortos con un cariotipo aparentemente normal. (Bell y col., 1999, Kalousek y Barrett, 1994).

Los casos con resultado normal muestran una diferencia entre los sexos muy grande, que también se reporta en la literatura, tabla IV (80% /20% ) que pueden ser descartadas en parte por medio de polimorfismos maternos (Stern y col. 1996, Tho y Donough, 1998, Bell y col. 1999, Wolf y Hoger, 1995).



## 7. Conclusiones

Se cumplió con el objetivo de establecer el método de cultivo de tejidos en el laboratorio de Genética del Instituto Nacional de Perinatología, el éxito en el cultivo de los tejidos provenientes de las pérdidas gestacionales fue de 74.66%.

El porcentaje de anormalidades tanto estructurales como numéricas es semejante a lo reportado en la literatura.

El establecimiento de los datos, como son: edad materna, semanas de gestación, antecedentes familiares, diagnóstico de la muestra, así como el cariotipo parental, es necesario para tener una mejor documentación del caso durante el análisis de los resultados.

El estudiar más de un tejido es reportado en la literatura como necesario para descartar completamente algún tipo de mosaicismo, como el confinado a la placenta.

Es muy importante tomar en consideración que: la toma de muestra, el medio de transporte, así como el tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y la siembra, son factores importantes para el éxito del cultivo.

Por lo tanto las causas principales de fracaso en el cultivo son: contaminación por microorganismos, o materna, mal manejo de la muestra, transporte en un medio inadecuado como alcohol o formol, temperatura inadecuada como la refrigeración o la congelación, dando como resultado células muertas o contaminadas inadecuadas para el cultivo de fibroblastos o simplemente para reproducirse.

El cultivo de tejidos proveniente de pérdidas gestacionales es una técnica confiable de análisis citogenético (Brambati, y col. 1998; Borrel y col., 1999; Van den Berg y col., 2000; Sikkema-Raddatz y col., 2000; McConnell C., 1975; Eiben y col., 1998) por lo cual fue establecido como una técnica de diagnóstico confiable en el laboratorio de Genética del Instituto Nacional de Perinatología.

Es posible aplicar técnicas de análisis molecular que proporcionen mayor información sobre la causa de la pérdida gestacional con un cariotipo normal (Bell y col., 1999; Kalousek, Barrett, 1994)

La obtención de un resultado por medio de ésta técnica se convierte en una herramienta muy importante para apoyar el asesoramiento genético de la pareja con problemas genéticos para la concepción.

## 8. Bibliografía

1. Mishell D. R., 1993, Recurrent Abortion, *Journal of reproductive Medicine*, Vol. 38, N°4, pp 250-259.
2. Wilcox Allen J., Weinsberg C.R, O'Connor J.F., Baird D.D., Schlatterer J.P., Canfield R.E., Amstrong E. Glenn, Nisula C.B., 1988, Incidence of Early Loss of Pregnancy, *The New England Journal of Medicine*, Vol. 319, N° 4, pp.189-194.
3. Vern L. Katz, y Jeffrey A. Kuller, 1994, Recurrent Miscarriage, *American Journal of Perinatology*, Vol. 11, N°6, pp386-397.
4. Pellicer A., Rubio C., Vidal F., Minguez Y., Jiménez C., Egozcue J., Remohí J., Simón C., 1999, In Vitro Fertilization Plus Preimplantation Genetic Diagnosis in Patients with Recurrent Miscarriage: an Analysis of Chromosome Abnormalities in human Preimplantation Embrios, *Fertility and Sterility*, Vol., 71 N° 6, pp 1033-1038.
5. Tsunehisa M., Takabumi H., Chikahiro O., Kiwuamu T., Toshitaka S., Ken-ichi I., Masakatsu U. y Rihachi I., 1992, Survey of 1129 Japanese women with a history of recurrent spontaneous abortions, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, Vol. 44, pp 123-130.
6. Danfoth, 1994, *Tratado de Ginecología y Obstetricia*, 5ª edición Interamericana, Mc Graw Hill, cap 26, pp 545-556 y cap. 39, 835-855.
7. Thompson & Thompson, 1996 *Genética en Medicina*, 4ª edición, Masson S.A.
8. Stern J., Dorfmann A.D., Gutierrez-Najar A.J., Cerrillo M., Coulam C.B. 1996, Frequency of Anormal Karyotypes among abortuses from women with and without a history of recurrent spontaneous abortion, *Fertility and Sterility*, Vol. 65: N°2 February, pp 250-253.
9. Sandra P.T.T., y McDonough P.G., 1994, Reproductive Genetics, Genetics of Fetal Wastage, Sporadic, and Recurrent Abortion, *Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America*, Vol., 5, N° , pp 157-176.
10. Brambati B., Tului L., Cislighi C. y Alberti E., 1998, First 10,000 Chorionic Villus Samplings Performed on Singleton Pregnancies by a Single Operator, *Prenatal Diagnosis*, Vol. 18, pp255-266.
11. Bell K.A., Van Deerlin P., Bassem R. H., y Feinbeerg R.F., 1999, Cytogenetic Diagnosis of "normal 46,XX" karyotypes in spontaneous abortions frequently may be misleading, *Fertility & Sterility*, Vol.71, N° 2, pp 334-341.



12. Vis Carien, Everhardt E., Velde te J., Exalto N., 1998, Microscopic Investigation of villi from chorionic villous sampling, *Human Reproduction*, Vol. 13, Nº 10, pp2954-2957.
13. Sirchia S.M., Garagiola I., Colucci G., Gueneri S., LalattaF., Grimoldi M.G., y Simoni G., 1998, Trisomic Zigote Rescue Reveales by DNA Polymorphism Analysis in Confined Placental Mosaicism, *Prenatal Diagnosis*, Vol. 18, pp 201-206.
14. Stephenson M., 1996, Frecuency of factors associated with habitual abortion in 197 couples, *Fertility and Esterility*, vol. 66, Nº, pp 24-29.
15. Hanneman J.M., Vejerslev L.O., accuracy of cytogenetic findings on chorionic villus sampling (cvs)-Diagnostic Consequences of CVS Mosaicism and Non-Mosaic Discrepancy in Centres Contributing to EUCROMIC\*, 1986-1992, *Prenatal Diagnosis*, Vol 17:9, pp801-820.
16. Jakobs M. E., van Lith Jan M.M., De Graaf I.M., Knegt A. C. y Hoovers J. M. N., 2000, Genetic Analisis of fetal nucleated red blod cell from CVS washings.
17. Munné S., Sandalinas M., Escudero T., Fung J., Gianaroli L., Cohen J., y el Saint Barnabas Medical Center PGD Network, 2000, Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations, *Fertility and Esterility*, Vol. 73, Nº6, pp 1209-1218.
18. Kalousek D.K., 1994, Current Topic: Confined Placental Mosaicism and Intrauterine Fetal Development, *Placenta*, Vol. 15, pp 219-230.
19. Borrel A., Fortuny A., Lazaro L., Costa D., Seres A., Pappa S., Soler A., 1999, First-trimestre Transcervical Chorionic Villus Sampling by Biopsy Forceps versus Mid-trimester Amniocentesis: A Randomized Controlled Trial Proyect, *Prenatal Diagnosis*, Vol. 19, pp1138-1142.
20. Van den Berg C., Van Postal D., Brandenburg H., Wildschut H.I.J., den Hollander N. S., Pijpers L., Galjaard J.H.R., Los J.F., 2000, Acuracy of abnormal karyotypes after the analysis of both short- and long- term colture of chorionic villi, *Prenatal Diagnosis*, Vol. 20, pp 956-969.
21. Scriven P.N., Handyside A.H., y Ogilvie M.C., 1998, Chromosome Translocations Segregation modes and Strategies for Preimplantation genetic Diagnosis, *Prenatal Diagnosis*, Vol. 18, pp 1437-1449.
22. Kalousek D.K., Barrett I., 1994, Genomic Imprinting related to Prenetal Diagnosis, *Prenatal Diagnosis*, Vol. 14, pp1191-1201.

23. Sikkema-Raddatz B., Bouman K., Verschuuren-Bemelmans C.C., Stoepker M., Mantingh A., Beekhuis J.R., y de Jong B., 2000, Fours Years' cytogenetic experience with the culture of chorionic villi, *Prenatal Diagnosis*, Vol. 20, pp 950-955.
24. Held K.R., Kerber S., Kaminsky E., Shing S., Goetz P., Seemanova E., Goedde H.W., 1992, Mosaicism in 45,X Turner syndrome: does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes?, *Human Genetic*, Vol. 88, 288-294.
25. Astner A., Schwinger E., Caliebe A., Jonat W., y Gembruch U., 1998, Sonographically Detected Fetal and Placental Abnormalities Associated with Trisomy 16 Confined to the Placenta. A case Report and Review of the Literature, *Prenatal Diagnosis*, Vol. 18, pp 1308-1315.
26. European Collaborative Research on Mosaicism in CVS (EUCROMIC), 1999, Trisomy 15 CPM: Probable Origins, Pregnancy Outcome and Risk of Fetal UP *Prenatal Diagnosis*, Vol. 19, pp 29-35.
27. Sundberg K., Lundsteen C., y Philip J., 1999, Comparison of cell Cultures, Chromosome Quality and Karyotypes Obtained after Chorionic Villus Sampling and Early Amniocentesis with Filter Technique, *Prenatal Diagnosis*, Vol. 19, pp12-16.
28. Bray I.C., Wright D. E., 1998, Estimating the Spontaneous Loss of Down Syndrome Fetuses Between the times of Chorionic Villus Sampling, Amniocentesis and Livebirth, *Prenatal Diagnosis*, Vol. 18, pp 1045-1054.
29. Berghella V., Wapner R.J., Yang-Feng T., y Mahoney M.J., 1998, Prenatal Confirmation of True Fetal Trisomy 22 Mosaicism by Fetal Skin Biopsy Following Normal Fetal Blood Sampling, *Prenatal Diagnosis*, Vol. 18, pp 384-389.
30. Wolf C. G., Hoger O.E. III, 1995, Indications for Examination of spontaneous abortion specimens: a reassessment, *American Journal Obstetric Gynecology*, Vol. 173, N° 5, pp 1364-1368.
31. Los F.J., Van Opstal D., Van den Berg C., Braat P.G.A., Verhoef S., Wesby-Van Swaay E., y Van Den Ouweland M.W., y Halley D.J.J., 1998,, Uniparental Disomy with and without Confined Placental Mosaicism: a Model for Trisomic Zygote Rescue, *Prenatal Diagnosis versus chorionic villus sampling, letters to the editor*, *Prenatal Diagnosis*, Vol. 18, pp 405-415.
32. Qumsiyeh M.B., Kim K:R., Ahmed M.N:, Bradford W., 2000, Cytogenetics and Mecanismos of Espontaneous Abortions: increased apoptosis and decreased Cell

- Proliferation in cromosomally abnormal villi, *Cytogenet Cell Genet*, Vol. 88, pp 230-235.
33. Luque C., Herraéz S.A., 2001, *Biología Molecular e Ingeniería Genética*, ed. Harcourt, España.
34. Gardner R.J. Mc Kinlay, Sutherland Grant R., *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*, 3<sup>d</sup>. edition, 2004.
- [www.medgen.ubc.ca/wrobinson/mosaic](http://www.medgen.ubc.ca/wrobinson/mosaic)
  - Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.
  - Mathews AL, (1999), Cromosomal Abnormalities Trisomy 18, Trisomy 13, deletion, and microdeletion. *J. Perinat. Neonatal Nurs. Sep;13(2)* 59-75, pp 103-104, Pub Med index por Medline- PMID 10818854,
  - Perk J., Makedonski K.,Laude L., Cedar H., Razin A., y Shemer R., 2002, The Imprinting Mechanism of the Prader-willi / Angelman Regional Control Center, Vol. 21, N° 21, pp 5807-5814.
  - Bielieski J., Hopwood JJ.,Melville EL.,Anson DS., 1998, Recombinant human Sulphamidase, expresion amplification, porification and characterization, *Biochem. J.*, Jan I; 329(Pt 1), 145-150, Pub Med index por Medline- PMID 9405287.