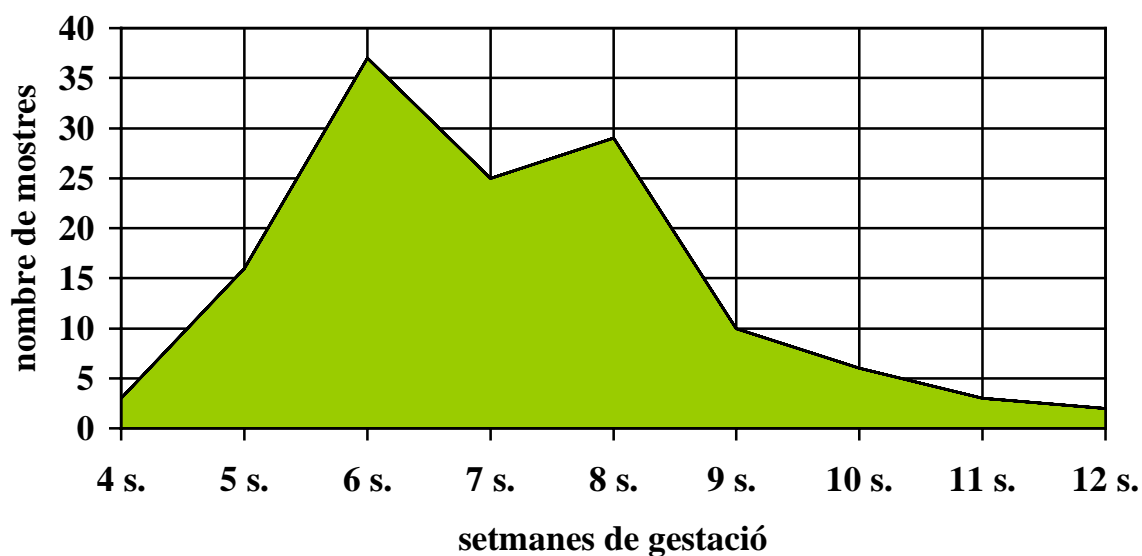


3.1.3.2.- edat gestacional de les mostres analitzades

La distribució de l'edat gestacional per ecobiometria dels 131 embrions amb diagnòstic citogenètic es troba reflectida en la figura 3.6. S'hi pot veure que un 14.5% dels embrions estudiats correspon a gestacions de menys de 6 setmanes, un 69.5% a gestacions d'entre 6 i 8 setmanes, i finalment un 16% a més de 8 setmanes. Aquests 131 embrions van ser analitzats a partir de la realització de 130 biòpsies de còrion, ja que una de les mostres corresponia a una gestació doble. La mitjana és de 7 setmanes.



4 s. 3 mostres	7 s. 25 mostres	10 s. 6 mostres
5 s. 16	8 s. 28	11 s. 3
6 s. 37	9 s. 10	12 s. 2

Fig. 3.6.- Distribució de l'edat gestacional, determinada per ecobiometria, en les 130 mostres amb estudi citogenètic.

3.1.4.- indicacions per a l'estudi citogenètic

En un principi s'establí el protocol de realitzar biòpsia corial en avortaments espontanis de pacients amb avortaments de repetició (dos o més avortaments), i en embrions malformats o amb marcadors ecogràfics de cromosomopaties ja detectades en el primer trimestre de la gestació.

Més endavant, i també a la vista dels bons resultats obtinguts, s'amplià el grup a d'altres pacients, per exemple procedents de reproducció assistida, on és molt important clarificar la causa de l'avortament abans d'entrar en el següent cicle, i el grau d'angoixa de la pacient és molt elevat.

Els motius per a la realització de les 130 biòpsies corials amb resultat citogenètic estan detallats a la figura 3.8, pàgina 70. Per infertilitat primària s'entén una parella amb dos o més avortaments i sense cap fill nascut viu, i un 40.6% dels casos reunien aquesta condició. Per infertilitat secundària es defineix una parella amb dos o més avortaments però que almenys té un fill nascut viu, i aquí s'hi troben un 20% dels casos.

Els casos provinents de gestacions aconseguïdes mitjançant el concurs de tècniques de reproducció assistida (que inclou fertilització *in vitro*, amb o sense injecció intracitoplasmàtica –ICSI- d'espermatozoides) representen un 9% dels casos. En un altre 9% dels casos es detectà una gestació sense embrió (Fig.3.7, pàgina 69).

Sota el nom d'alerta ecogràfica s'agrupen els casos on s'ha detectat una anomalia morfològica de l'embrió o un marcador de cromosomopatia, ja sigui abans o en el moment de detectar l'èxitus embrionari, cosa que es produí en un 7.1% dels casos, especialment de finals del primer trimestre.

En un 4.5% dels casos, un dels progenitors era portador d'una anomalia cromosòmica equilibrada ja coneguda amb anterioritat i en un 3.2% hi havia un antecedent d'una gestació (finalitzada o no) amb una anomalia cromosòmica.

En *altres* s'inclouen els casos amb antecedents d'esterilitat en un dels dos membres de la parella, angoixa per la pèrdua embrionària o casos sense una indicació identificada.

Finalment, cal tenir en compte que hi ha mostres incloses en més d'un grup, ja que tenien més d'una indicació diagnòstica.

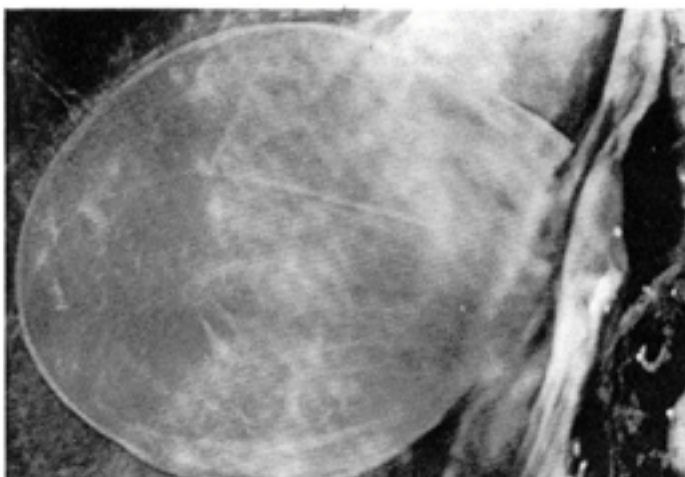


Fig.3.7.- Gestació anembrionada, sense presència de sac amniòtic ni embrió. Només es detecta el sac coriònic i una reducció del desenvolupament de les vellositats coriòniques.

- 1.- Infertilitat primària: 63 casos (40.6%)
- 2.- Infertilitat secundària: 31 casos (20%)
- 3.- Reproducció assistida: 14 casos (9%)
- 4.- Gestació anembrionada: 14 casos (9%)
- 5.- Alerta ecogràfica embrionària: 11 casos (7.1%)
- 6.- Progenitors portadors d'anomalia cromosòmica equilibrada: 7 casos (4.5%)
- 7.- Anomalia cromosòmica en gestació anterior: 5 casos (3.2%)
- 8.- Altres: 10 casos (6.5%)

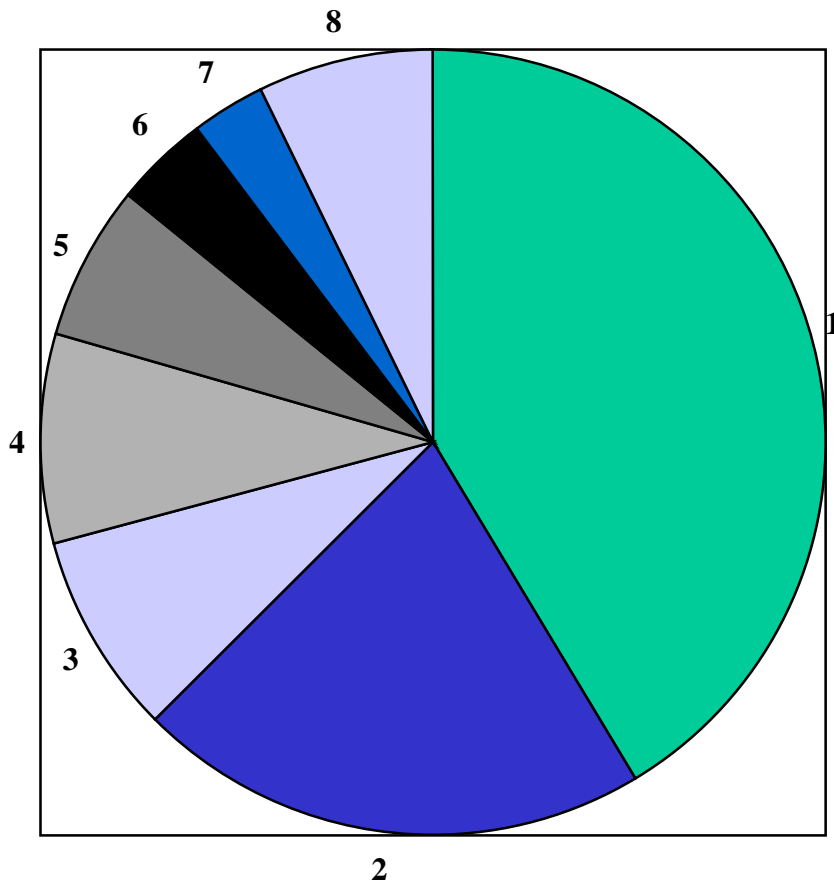
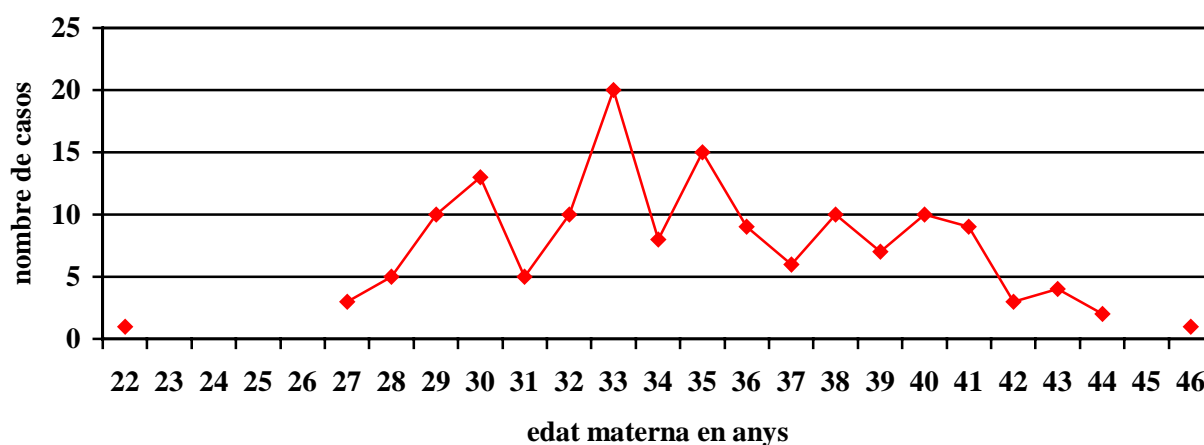


Fig. 3.8.- Distribució dels motius per a la realització de l'estudi citogenètic de l'embrió. Cal tenir en compte que hi ha mostres incloses en més d'un grup, ja que tenien més d'una indicació diagnòstica.

3.1.5.- edat materna

L'edat de les pacients dels casos amb diagnòstic citogenètic (130 en total, un d'ells amb dos embrions) és de menys de 35 anys en el 50% dels casos; entre 35 i 37 anys hi ha el 21.9% i de 38 anys o més hi ha el 28% de les pacients (Fig. 3.9). En dos casos es desconeix l'edat materna. La mitja d'edat se situa als 34 anys.



22 anys	1 cas
27	3
28	3
29	10
30	12

31 anys	3 casos
32	8
33	16
34	8
35	15

36 anys	8 casos
37	5
38	8
39	6
40	7

41 anys	8 casos
42	2
43	3
44	2
46	1

Fig. 3.9.- Edat de les pacients en les 130 biòpsies de còrion amb resultat citogenètic (131 embrions analitzats).

En cinc d'aquestes pacients s'han analitzat dos embrions, corresponents a dues gestacions separades en el temps.

3.2.- Selecció de les mostres

Les mostres de vellositats coriòniques són recollides immediatament després de la seva extracció, en un tub estèril amb medi RPMI 1640 (Gibco) i un 2% d'heparina sòdica a l'1% (Leo). Més endavant es complementà amb penicilina (10.000 IU/ml) i estreptomycinina (10.000 µg/ml) (ambdós antibiòtics també de Gibco), per tal d'evitar contaminacions abans ja d'iniciar les incubacions.

El tub és remès immediatament al laboratori juntament amb una petició on es fan constar les dades de la pacient i de la gestació; si no pot ser tramès de forma immediata, el tub que conté la mostra es pot guardar unes hores en una estufa a 37°C.

Un cop al laboratori, es trasllada la mostra a una càpsula de Petri de 5 mm. de diàmetre que conté medi fresc. S'observa amb la lupa estereoscòpica a 75 augments (Olympus SZH) i es neteja de possibles restes de decídua materna, coàguls, i de tot allò que no s'estigui segur de ser vellositats coriòniques (Fig. 3.10, pàgina 73). Llavors s'estima el pes segons els estàndards de Newport (Newport et al. 1986).

La mostra es reparteix en diverses plaques de Petri, a raó de 7-8 mg. per placa. A partir de maig del 1997 també es destinen uns 3 mg. per a disgregació enzimàtica per tal de realitzar un cultiu llarg de les mateixes vellositats coriòniques.



Fig. 3.10.- Imatge d'una vellositat coriònica obtinguda per biòpsia transcervical i observada en una lupa binocular a 75 augments.

3.3.- Mètode semidirecte

S'ha aplicat el mètode semidirecte basat en el descrit per Simoni (Simoni et al. 1983; Simoni et al. 1984), adaptat a la nostra pròpia metòdica.

3.3.1.- incubació

La mostra es deposita en una o més plaques de Petri amb 5 ml. de medi de cultiu, idèntic al medi utilitzat per al transport (RPMI 1640 complementat amb penicilina, estreptomycina i heparina sòdica). S'incuben durant 24 h. en estufa de CO₂ (a 37°C i ph7.3, amb un 100% d'humitat) (Heraeus). En cas d'haver-hi més d'una placa es coliquen en diferents estufes, per a més seguretat envers

possibles falles en el funcionament de les estufes o risc de contaminació fúngica i bacteriana.

3.3.2.- processament

A les 23 h. de cultiu s'afegeix 0.1 ml. de Colcemid (Gibco) a cada càpsula i es continua la incubació durant 1 hora més.

Llavors, mitjançant una pipeta Pasteur, s'aspira el medi de cultiu i s'hi afegeix solució hipotònica (citrat tri-sòdic a l'0.8% pre-escalfat a 37°C) i es deixa en una estufa de 37°C. El temps del xoc hipotònic pot variar amb les condicions atmosfèriques, però en general oscil·la entre 7 i 9 minuts.

Passat aquest temps s'extreu la solució hipotònica i s'hi afegeix solució fixadora de Carnoy (metanol:àcid acètic glacial 3:1) a -20°C, acabada de preparar. Es deixa 30 minuts al congelador (-20°C). Llavors es canvia la solució fixadora i es torna a deixar uns 20 minuts més dins del congelador.

Per últim, s'extreu totalment la solució fixadora, inclús ajudant-se amb un paper de filtre, i s'afegeix àcid acètic al 40% en aigua destil·lada: unes 15 gotes, però aquesta quantitat depèn de la quantitat de mostra que s'estigui processant. Es deixa a temperatura ambient durant 14 minuts.

Llavors es recull la suspensió cel·lular, apartant les restes de material no disgregat, i es deposita repartida en els portaobjectes nets i desengreixats.

L'extensió es realitza mitjançant la màquina extensora ECT85, a una temperatura de 40°C. Passats uns dos minuts, i quan encara la gota no s'ha

assecat del tot, es decanten els portaobjectes i es deixen assecar del tot a temperatura ambient.

3.3.3.- bandeig

L'envelliment dels portaobjectes es realitza en estufa de 60°C durant unes 18 h. (al llarg de tota la nit).

Les bandes habituals són les bandes GTG, és a dir amb bacto tripsina (Difco) en solució salina 9‰, a 37°C. El temps d'exposició a aquesta solució és variable, però està al voltant de 2 minuts.

La tinció utilitzada és 10 ml. Giemsa (Merck) en 90 ml. de tampó (3.4 gr. KH_2PO_4 en 1 l. d'aigua destil.lada i pH ajustat a 6.8). Es tenyeixen els portaobjectes durant 15 minuts, passats els quals es renten amb aigua corrent i aigua destil.lada, i es deixen assecar a l'aire.

3.3.4.- anàlisi microscòpica

Els portaobjectes s'analitzen amb un microscopi òptic (Olympus BH-2 primer i Olympus BX50 després) amb oculars de 10x i objectius de 10x i 100x immersió. Es graven totes les metafases amb el suport informàtic del programa Cytovision (Applied Imaging), s'imprimeixen i l'anàlisi es realitza al microscopi i sobre el paper.

No es tenen en compte les metafases de menys de 40 cromosomes ni aquelles en les quals per la qualitat del bandeig o de l'extensió no es puguin classificar un per un tots els cromosomes.

S'analitzen, si es pot, entre 20 i 25 metafases, i es cariotipen a l'ordinador, si és possible, tres metafases, que s'imprimeixen.

3.4.- Cultiu llarg

A partir de maig del 1997 es destina una petita part de la mostra per a cultiu llarg mitjançant disgregació enzimàtica. En un inici la mostra destinada era de 1 mg. però es va passar a almenys 3 mg. per tal de disminuir el nombre de fracassos en el cultiu.

El protocol per al cultiu llarg, amb un mètode *in situ*, ha estat cedit pel Dr.Elejalde (Milwaukee, USA) i està protegit per copy-right.

3.4.1.- disgregació enzimàtica

Després d'una disgregació mecànica amb pinces i tisores, s'introdueixen els fragments de vellositats coriòniques dins del tub que conté el còctel d'enzims (colagenasa, desoxirribonucleasa i hialuronidasa). Es col·loca al rotor i dins d'una estufa a 37°C durant 1 hora. Passat aquest temps es realitzen dos rentats per tal d'eliminar els enzims i aturar la seva acció.

3.4.2.- cultiu

A partir del sediment cel.lular obtingut per centrifugació, es procedeix a la sembra de dos cultius *in situ* i un estàndard en medi CHANG D (Irvine Cientific) complementat amb antibiòtics.

Es segueix el creixement del cultiu *in situ* a partir del dia 4 de cultiu amb un microscopi invertit (Olympus CK2 i IM amb oculars de 10x i objectiu de 4x) i se sacrifica o subcultiva quan el creixement cel.lular, el tipus de colònia cel.lular obtinguda i l'índex mitòtic observat així ho aconsellen.

3.4.3.- processament

S'afegeixen 6λ de Colcemid (Gibco) a les plaques de cultiu *in situ* a processar, durant 45 minuts. Passat aquest temps es retira el medi de cultiu i s'afegeix solució hipotònica a 37°C durant un temps que varia segons el creixement cel.lular observat. Llavors s'afegeixen 600λ de solució fixadora per aturar l'acció de la hipotònica i 5 minuts després es retira tot el contingut i s'afegeixen 5 ml. de solució fixadora fresca. Passats 20 minuts es retira el fixador i se n'afegeix novament de fresc. 20 minuts després es retira totalment el fixador i s'enganxa el cubre on hi ha el material metafàsic sobre d'un portaobjectes amb medi de muntatge per a microscopia (Adh Clinic, Clinic Services) i es deixa assecar. Tot el procés es realitza en un ambient amb la humitat controlada.

3.4.4.- bandeig

L'envelliment i bandeig de les preparacions de material cultivat és igual que en les preparacions obtingudes per mètode semidirecte (apartat 3.3.3), si bé augmenta el temps d'exposició a la bacto tripsina fins a 3 minuts o més.

3.4.5.- anàlisi microscòpica

Al microscopi s'analitzen 10 metafases de cada flascó de cultiu del que s'ha obtingut metafases. Almenys una d'elles es cariotipa completament a l'analitzador d'imatges.

3.5.- Informe citogenètic

L'informe citogenètic s'entrega al Servei d'Ecografia i Diagnòstic Prenatal (qui ha realitzat la biòpsia de corion), que s'encarrega de trametre'l ja sigui a l'obstetra titular o bé directament a la pacient.

Sempre s'entrega un informe després de l'anàlisi del mètode semidirecte, ja sigui un informe complet (que inclou un cariotip), un informe de no-creixement i per tant de no resultat, o bé un informe parcial (quan el nombre de metafases analitzades ha estat escàs o bé la qualitat dels cromosomes obtinguda ha estat baixa) i per tant cal esperar el resultat del cultiu llarg per acabar l'estudi citogenètic de l'embrió.

Un cop acabat l'anàlisi de les metafases procedents del cultiu llarg, només es realitza un informe i es comunica a l'obstetra quan el resultat és discrepant amb el del mètode semidirecte o bé en cas d'informe previ amb un resultat parcial o de no-creixement en el mètode semidirecte. Si el resultat és coincident o bé no hi ha resultat, l'estudi del cultiu llarg queda registrat al full del cas pertinent però no es realitza cap notificació.