

5.- DISCUSSIÓ

5.1.- Representativitat de la població en estudi

S'ha incluit en aquest estudi la totalitat de mostres procedents d'avortaments espontanis de primer trimestre que han arribat al nostre laboratori en el període comprès entre 1995 i 1999, és a dir que es tracta d'un estudi prospectiu sense selecció dels casos a estudiar.

Tot i haver-hi prèviament uns criteris protocolitzats de selecció per a la recollida de mostres per a estudi citogenètic embrionari, s'hi ha acabat incluint mostres fora d'aquests criteris (com ara primers avortaments, alt nivell d'angoixa en la parella, etc.). Malauradament, alguns casos que sí que complien els requisits prèviament establerts no s'han pogut incloure en el present treball perquè la parella va rebutjar l'estudi citogenètic embrionari.

5.1.1.- obtenció de les mostres

El fet de que només 6 de les 155 biòpsies de corion hagin estat realitzades fora de la Secció d'Ecografia i Diagnòstic Prenatal de l'Institut Dexeus fa que el conjunt de les mostres formi un grup homogeni pel que fa a la seva obtenció.

Es tracta d'especialistes amb molta pràctica en la realització de biòpsies de corion en gestacions evolutives de primer trimestre. Així mateix, han estat entrenats a reconèixer les vellositats coriòniques sota una lupa binocular i a calcular-ne les quantitats, per així poder saber quan han de repetir l'extracció per tractar-se d'una mostra inadequada o escassa.

Per últim, la via d'accés en la realització de la biòpsia de corion també té repercussions en l'estudi citogenètic posterior. En la via transabdominal, les vellositats s'obtenen per succió a través d'una agulla, motiu pel qual la mostra arriba al laboratori més fragmentada i és més difícil de netejar; així doncs, les possibilitats de confusió amb altres teixits que no siguin vellositats coriòniques (per exemple, restes de decidua materna) és més fàcil.

Això és especialment important en els avortaments espontanis, on el teixit corial sovint arriba al laboratori amb aspecte degenerat i desorganitzat, i per tant és més fàcil confondre'l amb d'altres teixits materns.

La via transcervical, que és la usada de forma majoritària en les biòpsies de corion recollides en aquest estudi, es practica amb unes llargues pinces que pessiguen i arranquen les vellositats, i que després alliberen dins del tub amb el medi de transport. Això permet l'obtenció de vellositats més senceres, més netes, on es pot apreciar perfectament la forma ramificada, la irrigació sanguínia, i es distingeixen molt millor d'altres teixits que hi pogués haver presents.

5.1.2.- edat materna

L'edat mitjana de les dones, les gestacions de les quals s'han recollit aquí, és de 34 anys. La meitat (50%) tenen menys de 35 anys i un 28% tenen 38 anys o més.

S'han escollit dues poblacions de control. La primera és el grup de dones amb una gestació controlada a l'Institut Dexeus, entre els anys 1997 i 1999. En aquest primer grup control, el 71% tenen menys de 35 anys i un 10.6% tenen 38 anys o més.

La segona població presa com a control és la de les parteres de la ciutat de Barcelona entre els anys 1995 i 1999: la mitja d'edat és de 31 anys, el 77.6% tenen menys de 35 anys i un 7.4% tenen 38 anys o més (dades cedides per l'Institut Municipal de Salut Pública de l'Ajuntament de Barcelona).

La comparació entre aquestes tres poblacions, dues d'elles usades com a controls, dona com a resultat que la població analitzada en el present treball és una població de dones grans. No sorprèn aquesta conclusió ja que es tracta, majoritàriament, de parelles infèrtils (60.6%), que per tant tenen una història reproductiva amb pèrdues gestacionals de diversos anys, i essent l'Institut Dexeus un centre clínic de tipus privat i un centre de referència, on moltes parelles acudeixen després d'altres intents.

5.1.3.- edat gestacional

El 14.5% de les gestacions analitzades corresponen a gestacions de menys de 6 setmanes (3 casos de 4 setmanes i 16 casos de 5 setmanes). Aquest nombre reduït de casos en les primeres setmanes de gestació s'explica perquè es tracta, en tots els casos, de gestacions clínicament reconegudes, i en les que l'avortament es descobreix a partir d'una ecografia de primer trimestre.

En la majoria de casos el diagnòstic de gestació interrompuda es fa al realitzar la primera ecografia, on es confirma la gestació en curs, es visualitza el nombre d'embrions, es valora la correcta implantació i es data l'embrió per ecobiometria.

En alguns casos l'avortament espontani es diagnostica a la segona o tercera ecografia realitzada, totes elles en el primer trimestre de la gestació, ja sia perquè es tracta d'una gestació amenaçada o perquè són pacients amb diverses pèrdues gestacionals de primer trimestre, i per tant amb un alt nivell d'angoixa. Les pacients provinents de programes de reproducció assistida també solen tenir més d'un estudi ecogràfic durant el primer trimestre.

El 69.5% dels casos analitzats són gestacions d'entre 6 i 8 setmanes de gestació (91 casos en total). És difícil comparar aquests valors amb els d'altres estudis publicats, ja que en certs casos només es fa constar el rang, en d'altres el límit del primer trimestre pot arribar fins a la setmana 13 o 14, o simplement no s'especifica el nombre de casos per cada setmana o grups de setmanes.

Entre els pocs estudis on sí que s'ha especificat, el nombre de casos de fins 9 setmanes és del 26.5%, 34.8% o del 63.4% sobre el total de casos analitzats (veure taula 5.1). Això indica que la present mostra, tot i contenir un nombre de casos limitat, és representativa de les primeres setmanes de la gestació clínicament reconeguda.

Taula 5.1.- Proporció de casos de 9 setmanes de gestació o menys sobre el total de la mostra publicada.

Eiben et al. 1990	192/724 (26.5%)
Ohno et al. 1991	47/135 (34.8%)
Be et al. 1997	386/609 (63.4%)
present estudi	120/131 (91.6%)

Cal tenir també en compte, a l'hora de comparar diversos estudis, que les setmanes de gestació en el present estan calculades per l'ecobiometria de l'embrió, mentre que en molts dels estudis publicats es calcula per la data de l'evacuació uterina o de l'explusió espontània, o bé no s'especifica. Amb el càlcul biomètric no es tenen en compte les setmanes que han passat des de que es produí l'èxitus embrionari en un avortament retingut fins a la data de la presa de la mostra. Això en la nostra sèrie pot comportar una diferència mitja de 2 setmanes (Taula 5.2, pàgina 124).

Taula 5.2.- Diferència entre les setmanes de gestació calculades des del primer dia de la darrera menstruació a la detecció de l'avortament espontani respecte a les calculades per ecobiometria.

diferència	n casos
0	14
1 setmana	26
2 s.	32
3 s.	24

diferència	n casos
4 s.	22
5 s.	6
6 s.	1
9 s.	1

5.2.- Resultat de la tècnica citogenètica

5.2.1.- èxit de la tècnica citogenètica

En el present cas, s'ha obtingut un resultat citogenètic en un 91.5% de les mostres (130/142 de les biòpsies de corion acceptades), utilitzant en paral·lel el mètode semidirecte i, a partir del 1997, el cultiu llarg en els casos on la quantitat de vellositats coriòniques obtinguda ho permetia.

Aquest és un valor més baix que el 97.6% o el 99.7% aconseguit en gestacions evolutives de primer trimestre, segons queda recollit en els dos grans estudis col·laboratius ja citats amb anterioritat (Association of Clinical Cytogeneticists Working Party 1994; Ledbetter et al. 1992).

Aquesta diferència entre els resultats obtinguts per biòpsia de corion, segons la gestació sigui evolutiva o interrompuda, s'explica perquè les vellositats coriòniques procedents d'avortaments espontanis solen tenir un aspecte més degenerat, sense evidenciar-se activitat mitòtica espontània a la lupa binocular, el que succeeix menys freqüentment en les gestacions evolutives.

En el cas de les vellositats coriòniques procedents d'un avortament espontani, amb freqüència retingut dins de l'úter algunes setmanes, el procés de lisi cel.lular es pot haver ja iniciat en el moment de la presa de la mostra, i també és més freqüent la contaminació fúngica o bacteriana.

Tot això influeix en que el nombre de metafases i la qualitat de les bandes disminueixin, així com que augmentin el nombre de casos sense metafases o amb metafases incomptables.

Aquest índex del 91.5% d'èxits aconseguit en aquest treball és perfectament comparable amb el resultat obtingut en d'altres sèries similars, tal com es veu reflexat a la taula 5.3.

Taula 5.3.- Índex de casos cariotipats en sèries d'avortaments espontanis, mitjançant l'anàlisi citogenètic de vellositats coriòniques.

Gueneri et al. 1987	94%
Ogur et al. 1990	94.1%
Ohno et al. 1991	92.3%
Be et al. 1997	91.5%
Sánchez et al. 1999	91.4%
present treball	91.5%

5.2.2.- resultat del mètode semidirecte

En el present estudi, l'èxit del mètode semidirecte aplicat a les vellositats coriòniques en avortaments espontanis precoços es tradueix en un 87.7% de resultats, comparable al d'altres sèries publicades (Taula 5.4)

Taula 5.4.- Resultats aconseguits, en d'altres sèries publicades, en l'aplicació del mètode semidirecte.

Gueneri et al. 1987	94%
Eiben et al. 1990	76.3%
Ogur et al. 1990	86.2%
Ohno et al. 1991	92.3%
Gardó i Bajnóczky 1992	90.3%
Sánchez et al. 1999	91.4%
present treball	87.7%

Tal com es pot veure reflexat a la taula 5.5, pàgina 127, la quantitat de vellositats coriòniques obtingudes per a l'estudi citogenètic (quantificades després de netejar la mostra sota la lupa binocular) incideix de forma decisiva en l'èxit de la tècnica citogenètica. Això és especialment cert en el mètode semidirecte, doncs en un cultiu cel.lular l'èxit d'aquest depèn tant de la quantitat de teixit com de la viabilitat de les cèl.lules per a subdividir-se *in vitro*.

Entre les mostres de 10 mg. o més (la quantitat mínima recomanada), en el 10.2% dels casos no hi hagué metafases en el mètode semidirecte, en un 23.1% el nombre de metafases analitzades fou inferior a 10, i en el restant 66.7% l'anàlisi de metafases fou considerat complet (10 metafases o més).

Per contra, entre les mostres de menys de 10 mg., l'índex de no creixement s'eleva al 19.3% i el d'un estudi citogenètic incomplet al 41.9%. Només en el 38.7% dels casos es pogueren analitzar 10 o més metafases.

Taula 5.5.- Importància de la quantitat de vellositats coriòniques disponibles per al mètode semidirecte, segons la seva incidència en el nombre de metafases analitzables.

	menys de 10 mg.	10 mg. o més
M.D. sense resultat	6 (19.3%)	11 (10.2%)
M.D. amb menys de 10 metafases	13 (41.9%)	25 (23.1%)
M.D. amb 10 metafases o més	12 (38.7%)	72 (66.7%)

5.2.3.- resultat del cultiu llarg

L'índex de resultats citogenètics en el cultiu llarg en aquesta sèrie és del 73.1%, comparable o per sota d'altres publicacions, i per sota del 87.7% obtingut en el mètode semidirecte. Ogur obté un 76.4% (Ogur et al. 1990) i Be un 97.9%, un 96.6% o un 78.4%, segons si les mostres procedien del propi centre, d'altres centres de la mateixa ciutat o de centres d'altres poblacions del país (Be et al. 1997).

Una primera constatació és que la quantitat de vellositat sotmesa a digestió enzimàtica també és important. És per aquest motiu que es decidí d'augmentar la quantitat i la qualitat de les vellositats dedicades al cultiu, per tal d'eleva el percentatge de casos amb un resultat del cultiu, que en un inici era bastant escàs. D'1 mg es passà a cultivar de 3 a 5 mg. de vellositats coriòniques. Això requereix, però, que es disposi d'un mínim de 15 mg. de vellositats en total.

Dels 75 casos en que s'intentà el cultiu llarg de vellositats, no es pogué obtenir un resultat, o s'obtingué un fals resultat, en 22 dels casos (29.3%). S'entén per *fals resultat* quan el resultat obtingut pel cultiu no és representatiu del cariotip embrionari real, per exemple degut a contaminació materna.

En cinc casos hi ha indicis de contaminació amb material matern (3 segurs i 2 probables), el que suposa un 6.66% dels casos de cultiu llarg i un 22.7% dels casos no informatius.

En uns altres cinc casos no s'obtingué cap resultat degut a una contaminació bacteriana o fúngica, ja sigui per una mostra que ja arribà contaminada al laboratori o per una contaminació deguda a una manipulació no suficientment curosa, que feu interrompre el cultiu.

En cinc casos més tampoc es va obtenir cap resultat pel mètode semidirecte (1 cas) o s'obtingueren menys de 10 metafases (4 casos). En aquests casos s'interpreta que molt probablement el procés de degeneració cel·lular incidí directament en la no divisió de les cèl·lules en cultiu.

5.2.4.- contaminacions bacterianes i fúngiques

En un inici, tant el medi de transport com el medi d'incubació de la mostra per a mètode semidirecte no contenia antibiòtics ni antifúngics. A partir de que s'observà contaminació del medi ja a les poques hores d'incubació en un número considerable de casos, es procedí a cultivar una alíquota del medi de transport en medi tioglicolat, a 37°C durant 48h., i en cas de turbidesa es feia identificar el gèrmen pel laboratori de microbiologia.

La detecció d'un gèrmen en el medi de transport complica l'obtenció d'un resultat però no l'impossibilita totalment. A més, la incidència en l'obtenció de metafases en el mètode semidirecte també és molt diferent a la incidència sobre el cultiu llarg (Taula 5.6, pàgina 130).

Mentre que en el mètode semidirecte només en 4/17 mostres amb un gèrmen en el medi de transport no es va poder analitzar cap metafase, en el cultiu llarg va ser en la majoria de casos contaminats (7/11).

Taula 5.6.- Casos amb un gèrmen aïllat en el medi de transport, segons el mètode citogenètic aplicat i el resultat obtingut.

	mètode semidirecte	cultiu llarg
sense cap resultat	4	7
amb resultat complet	7	-
amb resultat (menys 10 met.)	6	4

Els gèrmens aïllats en el medi de transport estan especificats a la taula 5.7. En tots els casos, la mostra tant pot procedir de la gestació analitzada com dels operadors que extreuen la mostra i de l'ambient de la sala on s'extreu.

Taula 5.7.- Gèrmens aïllats a partir del medi de transport de les vellositats coriòniques. Els no identificats corresponen a casos detectats *de visu* però no tramesos al laboratori de microbiologia per a la seva identificació.

gèrmen	n		
		<i>Pseudomona ssp.</i>	1
<i>Staphilococcus aureus</i>	5	<i>Sarcina lutea</i>	1
<i>Staphilococcus epidermis</i>	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	3	no identificat	4

Donat els problemes que ocasionen aquestes contaminacions en els resultats citogenètics, en l'actualitat tant el medi de transport com el medi d'incubació del mètode semidirecte estan ja complementats amb antibiòtocs i antifúngics, motiu pel qual ja no es realitza la comprovació rutinària en tioglicolat.

5.3.- Anàlisi dels resultats citogenètics

5.3.1.- incidència d'anomalies cromosòmiques

En la nostra sèrie, la incidència d'anomalies cromosòmiques es tradueix en que 88 dels 131 embrions cariotipats són portadors d'alguna anomalia cromosòmica (el que correspon al 67.2%).

Si es compara amb d'altres sèries on s'analitzen avortaments espontanis de primer trimestre de la gestació mitjançant estudi citogenètic de les vellositats coriòniques per mètode semidirecte, es pot comprovar que l'índex trobat en aquesta sèrie està totalment en la línia amb la resta dels estudis aquí reflexats (Taula 5.8). La mitja d'anomalies cromosòmiques en avortaments espontanis del primer trimestre, obtinguda dels treballs resumits en aquesta taula, és del 67.6%.

Taula 5.8.- Recull dels principals estudis citogenètics en embrions de primer trimestre, per anàlisi directa de les vellositats coriòniques, fent èmfasi en el nombre de mostres cariotipades, l'èxit obtingut en la tècnica citogenètica i l'índex d'anomalies cromosòmiques observades.

	casos cariotipats	èxit	índex anomalies cromosòmiques
Gueneri et al. 1987	189	94%	76.7%
Ohno et al. 1991	144	92.3%	69.4%
Gardó i Bajnóczky 1992	224	90.3%	51.3%
Strom et al. 1992	95	99%	83%
Be et al. 1997	609	91.5%	63.7%
Sánchez et al. 1999	85	91.4%	62.2%
present estudi	131	91.5%	67.2%

Si es compara la taxa d'anomalies cromosòmiques segons les setmanes de gestació, tal com es troba reflexat a la Taula 5.9, no es detecten grans diferències. És difícil extreure'n conclusions, ja que el nombre de mostres en les primeres i en les darreres setmanes de gestació és massa escàs per a poder generalitzar, però sí que s'aprecia un augment de les anomalies cromosòmiques en les setmanes 6 i 7.

Taula 5.9.- Proporció d'anomalies cromosòmiques trobades, segons la setmana de gestació.

setmana	patologies	total	%
4	2	2	66.66
5	11	16	68.75
6	26	37	70.27
7	18	25	72
8	19	28	67.86
9	6	10	60
10	3	6	50
11	2	3	66.66
12	1	2	50

5.3.2.- tipus d'anomalies cromosòmiques

L'anomalia més freqüentment observada ha estat, com era d'esperar, les trisomies, totes elles autosòmiques. En segon lloc hi ha la monosomia X, seguida de prop per les poliploidies. En igual nombre s'hi troben les anomalies estructurals, i per últim, amb només un cas, una monosomia autosòmica pel cromosoma 21.

5.3.2.1.- trisomies

Les trisomies són el tipus més freqüent d'anomalia cromosòmica entre els avortaments espontanis. En el present treball l'índex de trisomies se situa al 70.5% respecte al total d'anomalies cromosòmiques, que és una xifra perfectament comparable a la trobada en d'altres treballs publicats i resumits a la taula 5.10. En tots els casos, més de la meitat de les mostres amb una cromosomopatia són deguts a la presència d'una trisomia.

Taula 5.10.- Freqüència de les trisomies respecte al total d'anomalies cromosòmiques (incluïdes les dobles trisomies).

	trisomies
Ohno et al. 1991	68%
Gardó i Bajnóczky 1992	55.7%
Strom et al. 1992	77.2%
Be et al. 1997	61.6%
Sánchez et al. 1999	64.1%
Grimoldi et al. 2001	66%
present estudi	70.5%

En totes les sèries descrites, incluit el present treball, la trisomia pel cromosoma 16 és la més freqüent entre els avortaments espontanis. La freqüència de trisomia 16, en la present sèrie, respecte al total de trisomies (20.7%) queda per sota del 31% recollit per Egozcue (Egozcue 1997) i també per sota dels valors de 33-34% recollits en d'altres treballs publicats (Gardó i Bajnóczky 1992; Be et al. 1997; Grimoldi et al. 2001), però similar al 21.8% trobat per Eiben (Eiben et al. 1990).

Per contra, el valor relatiu de trisomia 22 trobat en la nostra sèrie és superior al descrit en algunes d'aquestes publicacions citades. En el present treball, el 17.2% de les trisomies ho són pel cromosoma 22, mentre que Egozcue cita un 11.4% i Be un 14.4%. Gardó cita un índex més alt de trisomia 22, un 20.7%, i Strom troba un valor encara més alt, 23%, per sobre del 13.1% de la trisomia 16 en la seva sèrie (Gardó i Bajnóczy 1992; Strom et al. 1992; Be et al. 1997; Egozcue 1997). El valor trobat per Eiben també s'assembla molt al del present treball: 17.9% (Eiben et al. 1990).

Segons Egozcue, la trisomia 21 es dona amb quasi la mateixa freqüència que la trisomia 22, situant-se com la tercera trisomia més freqüent en avortaments espontanis (Egozcue 1997). Això no és així en la present sèrie, on només es troben un 6.7% de trisomies 21. Aquest valor relatiu encara està més disminuït en la sèrie de Be, amb només un 3.7% (Be et al. 1997). Això es deu a que els valors recollits per Egozcue fan referència a la totalitat dels avortaments espontanis, no limitats al primer trimestre i inclús amb una majoria dels casos recollits del segon trimestre.

El tercer lloc en la present sèrie, en quant a freqüències de trisomies, l'ocupa la trisomia 15, amb un 15.5%, bastant més freqüent que en d'altres sèries.

També hi ha algun cas on se cita la trisomia pel cromosoma 18 com una de les més freqüents (Gardó i Bajnóczy 1992; Silvestre 1998), si bé Egozcue li dona una freqüència relativa d'un 4.6% (Egozcue 1997). A la sèrie present només n'han aparegut dos casos, un d'ells en una doble trisomia.

Probablement, la freqüència relativa de cada cromosoma en una sèrie determinada depèn molt del nombre de casos analitzats i, sobretot, de l'edat gestacional dels embrions analitzats; a diferents períodes de la gestació s'hi trobaran diferents freqüències relatives de trisomies per a cada cromosoma.

Una freqüència relativa de trisomia 21 baixa, com en el present treball, pot ser un indicador de que la mostra conté un alt percentatge d'avortaments molt precoços, ja que la trisomia 21 probablement és causa d'avortament més comú en etapes més tardanes.

S'han trobat trisomies en tots els parells d'autosomes, excepte pels cromosomes 1, 4, 6, 12, 17, 19. Aquests cromosomes són dels que es descriuen com els menys freqüents a la taula 1.3, pàgina 25, amb un 2.4% de freqüència o menys (Egozcue 1997).

De dobles trisomies se n'han trobat 3, el que suposa un 3.4% del total de patologies. Això és comparable, si bé una mica per sota, al 4 i 5% descrits per Ohno i Grimoldi, respectivament (Ohno et al. 1991; Grimoldi et al. 2001).

De les 62 trisomies, cinc casos han estat en mosaic, el que suposa un 8.1%. També aquest valor és comparable al 10.5% descrit per Be (Be et al. 1997).

L'edat materna entre els casos amb una trisomia autosòmica és més elevada que en la població global en estudi. L'edat mitjana de les dones amb un avortament portador d'una trisomia és de 35.9 anys, mentre que el de la població global en estudi és de 34 anys.

Per grups d'edat, el resultat és també que les dones amb un avortament trisòmic són més grans que el grup en general: entre les trisomies el 57.4% de les dones tenen 35 anys o més (contra el 50% de la població en global) i un 37.7% tenen 38 anys o més (contra un 28%). Això demostra que també en el grup analitzat pel present estudi l'aparició de trisomies i l'edat materna avançada tenen una relació directa.

Segons les indicacions per a realitzar l'estudi citogenètic, els grups amb un percentatge relatiu de trisomies superior a la taxa global del 70.5% són el d'infertilitat secundària (el 80.9% de les anomalies cromosòmiques són trisomies) i el de dones a qui s'ha aplicat alguna tècnica de reproducció assistida (amb un 88.9% de trisomies).

És especialment interessant la relació entre reproducció assistida i trisomia, perquè es coneix molt poc encara sobre l'efecte de la manipulació sobre els gàmetes o l'embrió primerenc. El fet de que aquesta manipulació pogués causar un efecte negatiu sobre les futures divisions cel·lulars és un aspecte controvertit.

De fet, tot i que està protocolitzat l'estudi citogenètic prenatal en aquests casos, no s'ha pogut establir una relació amb anomalies cromosòmiques en el segon trimestre de la gestació, excepte per als cromosomes sexuals. Potser és que les conseqüències de la manipulació cal buscar-les en un període gestacional anterior.

Grimoldi troba una major incidència de cromosomopaties entre els casos provinents de tècniques de reproducció assistida (80% contra el 60.5% general), però no especifica el tipus d'anomalies trobades (Grimoldi et al. 2001). En el present treball, la incidència global de cromosomopaties en les dones provinents de reproducció assistida es manté (67.7% vs. 67.2%), però el que augmenta és la freqüència relativa de trisomies.

5.3.2.2.- monosomia X

Els deu casos de monosomia X que s'han trobat suposen el 7.6% sobre el total d'embrions analitzats i el 11.4% sobre el total de les anomalies cromosòmiques descrites.

Això suposa uns valors comparables als valors extrets d'altres treballs publicats (que es troben resumits a la taula 5.11, pàgina 138).

Taula 5.11.- Proporció relativa de casos amb cariotip 45,X respecte al total d'avortaments espontanis amb anomalies cromosòmiques.

	45,X
Ohno et al. 1991	7%
Gardó i Bajnóczky 1992	15.6%
Strom et al. 1992	11.4%
Be et al. 1997	10%
Egozcue 1997	19.7%
Sánchez et al. 1999	7.5%
Grimoldi et al. 2001	9.2%
present estudi	11.4%

La disparitat entre els valors publicats es pot deure, de nou, a les diferències entre l'edat gestacional dels embrions analitzats en els diferents estudis. Això ve reforçat pel fet de que, en el present treball, les monosomies X trobades corresponen a embrions de 8 setmanes o més. L'únic embrió de menys de 8 setmanes amb monosomia X té també una trisomia 16 i és de 6 setmanes.

També en el present estudi es comprova que la relació entre edat materna i monosomia X és inversament proporcional (Kajii i Ohama 1979), és a dir que la presència de monosomia X és més freqüent en dones joves. La proporció de dones de menys de 35 anys és del 50% en la totalitat de la mostra, mentre que en el grup d'embrions amb cariotip normal és del 55.8% i en el grup d'embrions amb monosomia X puja fins al 60%.

Si s'observen les freqüències relatives segons la indicació per a realitzar l'estudi citogenètic, es pot veure que en els dos grups de parelles infèrtils (tant per infertilitat primària com secundària) els valors de monosomia X són més baixos que el general. Mentre que un 11.4% del total de patologies trobades corresponen a monosomia X, en el grup d'infertilitat primària i secundària aquest valor és del 7.1 i del 9.5%, respectivament.

Per contra, en el grup d'alerta ecogràfica la meitat dels casos amb anomalia cromosòmica corresponen a monosomies X. Això es deu a que és una anomalia que es detecta sobretot en avortaments espontanis de finals del primer trimestre, i llavors ja és possible veure alguna malformació o algun marcador ecogràfic que recomani l'estudi citogenètic.

5.3.2.3.- monosomia 21

El fet de que només s'hagi trobat un cas amb monosomia autosòmica, entre els 88 embrions amb anomalies cromosòmiques, que correspon a una monosomia 21, s'adiu perfectament amb les dades publicades.

Pocs són els treballs publicats on es recullen casos de monosomia 21 (Kajii et al. 1973; Joosten et al. 1996; Be et al. 1997; Grimoldi et al. 2001), i al ser tant pocs els casos descrits, es fa impossible comparar freqüències relatives, ja que els valors oscil·len molt (des del 0.51% al 1.22%).

Només es podran detectar en aquelles sèries amb embrions de molt poca edat gestacional, ja que sembla que les monosomies autosòmiques són letals en etapes molt precoces del desenvolupament embrionari i que les concepcions monosòmiques ni tant sols arriben a la fase de blastocist (Edwards 1986; Evsikov et al. 2000).

5.3.2.4.- poliploidies

S'han trobat vuit casos de poliploidies, 6 triploidies i 2 tetraploidies, el que suposa un índex global del 9.1% respecte al total d'embrions amb anomalies cromosòmiques. Per separat, les triploidies suposen un 6.8% del total de cromosomopaties i les tetraploidies un 2.3%.

En comparació amb d'altres estudis publicats (les freqüències relatives dels quals estan especificades a la taula 5.12, pàgina 141), els valors d'aquest treball són similars a les publicacions amb menor índex de poliploidies (Ohno et al. 1991; Strom et al. 1992; Grimoldi et al. 2001), entre el 9 i el 12.3% en global. Les restants publicacions obtenen valors més elevats, que van del 16 al 28% (Gueneri et al. 1987; Gardó i Bajnóczky 1992; Be et al. 1997; Egozcue 1997; Sánchez et al. 1999).

En les poliploidies trobades en aquest treball també s'evidencia, com en el cas de la monosomia X, una relació inversa amb l'edat materna. Si bé 7 casos de monosomia X amb l'edat materna coneguda són molt pocs per a poder generalitzar, si que es pot dir que un 71.4% de les dones amb menys de 35 anys i un embrió amb monosomia X és un valor molt per sobre del 55.8% de

dones de menys de 35 anys amb cariotip normal i del 50% de dones de menys de 35 anys del grup en estudi en global.

Aquests resultats donen suport a d'altres publicacions, amb un nombre bastant més elevat de casos, que també descriuen aquesta relació inversa entre poliploidies i edat materna (Neuber et al. 1993).

Taula 5.12.- Valors relatius de poliploidies respecte al total de casos amb anomalies cromosòmiques.

	Poliploidies	triploidia tetraploidia
Gueneri et al. 1987	16%	
Ohno et al. 1991	9%	
Gardó i Bajnóczky 1992	23.5%	
Strom et al. 1992	10.1%	6.3% 3.8%
Be et al. 1997	20.4%	16% 4.4%
Egozcue 1997	21.4%	16% 5.4%
Sánchez et al. 1999	28.3%	26.4% 1.9%
Grimoldi et al. 2001	12.3%	12.3% 0
present treball	9.1%	6.8% 2.3%

La proporció relativa de poliploidies és especialment baixa en el grup de pacients amb infertilitat secundària (4.7% vs. 9.1%), però similar en el grup amb infertilitat primària. La meitat dels embrions amb una poliploidia corresponen a parelles amb infertilitat primària (4/8).

Com ja s'ha dit anteriorment, en els homes amb azoospèrmia, criptospèrmia i oligozoospèrmia el 33.3% de les gestacions triploides són diàndriques, degut a una fecundació per un espermatozoide diploid (Egozcue et al. 2002). Aquestes parelles sovint acaben acudint a tècniques de reproducció assistida, en especial a ICSI. És per tant d'esperar que una majoria dels avortaments triploides que es donin en aquest grup de pacients tinguin un orgien diàndric. En el present treball no hi ha dades per a confirmar-ho.

Una de les tetraploidies observada és en mosaic, amb una línia 46,XX i l'altra 92,XXXX. Es podria pensar que l'origen de la línia tetraploide pot ser degut a un error *in vitro*, sinó fos que ambdues línies cel.lulars aparèixen tant en el mètode semidirecte com en el cultiu llarg. És precisament en el mètode semidirecte, on és menys probable una aberració *in vitro*, on la línia tetraploide és majoritària (en un 95%), mentre que en el cultiu va ser trobada en un 30%, encara que això darrer tampoc és totalment representatiu de la freqüència en que aquesta línia podia estar present en el mesènquima d'aquesta gestació.

Altres grups (Be et al. 1997) han trobat altes proporcions de mosaics entre les tetraploidies (en aquest cas, 10 de les 17 tetraploidies tenien una línia normal), el que fa pensar també que aquest cas de mosaic sigui vertader, i no degut a una anomalia ocorreguda *in vitro*.

Només dos dels casos amb poliploidies van presentar una degeneració placentària de tipus molar, segons va demostrar l'anàlisi anatomo-patològic posterior. D'aquests dos, en un cas la mola ja havia estat detectada per ecografia (era un embrió de 9 setmanes de gestació) i aquest era el motiu pel qual es recomanà l'estudi citogenètic.

Dels 5 casos en que es diagnosticà una mola, un cas va resultar ser una tetraploidia, un altre una triploidia amb tetrasomia pel cromosoma 18, dos casos de trisomia (pels cromosomes 7 i 8) i un cas de cariotip normal 46,XY.

Aquestes dades confirmen que les poliploidies, en el primer trimestre de la gestació, s'associen a degeneració molar de la placenta amb molt menys freqüència que en el segon o tercer trimestre. Per tant, la majoria de poliploidies quedaran sense diagnosticar si només s'aconsella l'estudi citogenètic basant-se en l'examen ecogràfic o macroscòpic de la placenta (Jauniaux et al. 1996).

5.3.2.5.- anomalies estructurals

Les 8 anomalies estructurals trobades en el present estudi són desequilibrades. En 6 casos un dels dos pares era portador de l'anomalia de forma equilibrada; concretament, en dos casos el portador era el pare (tots dos casos amb una translocació recíproca) i en quatre casos la portadora era la mare (una translocació recíproca i tres translocacions robertsonianes).

D'aquests 6 casos familiars, en 4 d'ells el desequilibri provocat en l'embrió no és fruit d'una segregació desequilibrada (o no només, segons el cas) sinó que es dona l'aparició d'un cromosoma extra d'una de les parelles implicades en la translocació o d'un cromosoma marcador. Això dona suport a la idea de que la presència d'una translocació predisposa a la no-disjunció (Andrews i Roberts 1982).

Durban i col. mostren, en un estudi realitzat en primers corpuscles polars d'òocits de parelles on un dels dos membres és portador d'una translocació, que si la regió intersticial és llarga hi ha més tendència a l'adjacent II i a la segregació 3:1, donant així una major proporció de gàmetes desequilibrats (Durban 2001). Les anomalies estructurals presents en aquest estudi són d'aquest tipus.

Els dos casos *de novo* es donen en embrions en els que es troba una discrepància entre el mètode semidirecte i el cultiu llarg. Això sembla indicar que l'origen és un error de tipus mitòtic en les primeres etapes del desenvolupament embrionari, i per això la seva distribució entre els diferents teixits analitzats ha estat desigual.

Totes les translocacions robertsonianes trobades són de les del tipus der(13;14) (q10;q10), que sempre es descriu com la més freqüentment trobada entre la població infèril (Bourrouillou et al. 1986; De Braekeleer i Dao 1991).

La freqüència relativa de les anomalies estructurals varia molt entre els diferents treballs publicats, però de tots ells el treball que presenta un valor més elevat és el nostre (veure la taula 5.13).

Taula 5.13.- Freqüència relativa de les anomalies estructurals entre els avortaments espontanis amb anomalies cromosòmiques.

Gueneri et al. 1987	6.3%
Ohno et al. 1991	6%
Gardó i Bajnóczy 1992	5.2%
Strom et al. 1992	1.3%
Be et al. 1997	4.9%
Egozcue 1997	4.1%
Sánchez et al. 1999	1.9%
Grimoldi et al. 2001	4.1%
present treball	9.1%

Una primera limitació per a la detecció d'anomalies estructurals és la baixa resolució obtinguda en general amb el mètode semidirecte aplicat a vellositats coriòniques, que fa que puguin passar desapercebudes anomalies estructurals petites.

En segon lloc, també influirà el percentatge de parelles de la mostra en què un dels dos membres sigui portador d'una anomalia cromosòmica. En el present estudi, per exemple, tots els embrions amb un dels pares portador d'una anomalia de tipus estructural han tingut un cariotip patològic.

En diagnòstic pre-implantacional s'ha vist que en els progenitors portadors d'una translocació robertsoniana el 23% dels embrions aconseguits són normals i el 77% cromosòmicament anormals. En el cas dels portadors de translocacions recíproques encara és pitjor, ja que un 11% dels embrions són normals i un 89% anormals (Magli et al. 2001).

5.3.2.6.- mosaics

En el present treball s'ha trobat un 9.1% dels embrions amb cariotip patològic amb dues línies cel.lulars i, en tots els casos menys un, una de les línies és normal i l'altra patològica.

Comparant amb d'altres treballs publicats (resumits en la taula 5.14), es pot veure que els mosaics estan força ben representats en el treball present, ja que és el segon en ordre decreixent.

Taula 5.14.- Freqüència de mosaics en referència al total de mostres amb un cariotip anòmal.

Creasy et al. 1976	4.2%
Chandley 1981	2%
Ohno et al. 1991	6%
Be et al. 1997	12.6%
present treball	9.1%

Això és un indicador de que el nombre de metafases analitzades per cas és superior al d'altres sèries, el que ha permès detectar mosaics de més baixa freqüència. El fet de realitzar en paral·lel el mètode semidirecte i el cultiu llarg també ajuda a detectar mosaics, ja que en dos casos la línia minoritària del mètode semidirecte fou detectada en un re-anàlisi després de detectar el mosaic en el cultiu llarg (Ribas Seix et al. 2000).

Hi ha autors que proposen que el mosaicisme detectat en vellositats coriòniques es relaciona més amb mort fetal que no amb problemes gestacionals i en el fetus (Wapner et al. 1992).

Al no disposar de fragments de l'embrió per a la seva anàlisi citogenètica, no es pot detectar en quins casos el mosaic és confinat a placenta, especialment quan en la meitat dels casos no es té un resultat del cultiu llarg, ja sigui perquè no se'n féu o perquè no s'obtingué cap resultat.

De tota manera, el fet de que es tracti d'un avortament espontani fa pensar en que pocs d'aquests casos poden ser atribuïts a un mosaic confinat a placenta i, en tot cas, si n'hi ha algun, ha de ser prou important per la viabilitat de la gestació com per a provocar la seva interrupció.

5.3.3.- indicacions per a l'estudi citogenètic i patologia cromosòmica

5.3.3.1.- infertilitat primària

El percentatge d'anomalies cromosòmiques dins d'aquest grup (66.7%) és molt similar al percentatge total dels 131 embrions amb un resultat citogenètic (67.2%).

L'edat materna de les gestacions compreses en aquesta indicació és similar a la població general: el 56.5% tenen menys de 35 anys i el 27.4% tenen 38 anys o més.

Les anomalies estructurals són més freqüents en aquest grup que en el total d'embrions analitzats (11.9% vs.9.1%), tal com s'esperava. Ja s'ha dit abans que una de les causes de la infertilitat en la parella és que un dels dos pares sigui portador d'una anomalia cromosòmica estructural equilibrada, ja que una porció dels seus gàmetes seran desequilibrats i donaran lloc a avortaments espontanis o a fetus malformats.

De les cinc anomalies estructurals amb indicació d'infertilitat primària en la parella, en quatre casos un dels pares era portador d'una anomalia estructural equilibrada (dues translocacions recíproques i dues robertsonianes). En el cinquè cas es tractava també d'una gestació anembrionada.

De les 6 triploidies recollides en el present estudi, quatre es donen en avortaments espontanis de parelles amb infertilitat primària. Com ja s'ha comentat, encara que no es disposa d'aquest tipus de dades, el més probable es que es tractessin de triploidies d'origen diàndric, per fecundació amb un espermatozoide diploid (Egozcue et al. 2002).

La freqüència relativa de monosomia X és més baixa en el grup d'infertilitat primària que en el total (7.1% vs. 11.4%).

5.3..2.- infertilitat secundària

En aquest grup el percentatge d'anomalies cromosòmiques és també molt similar al general (67.7% vs. 67.2%), tal com passa en el grup d'infertilitat primària. Però, en aquest grup d'infertilitat secundària, les trisomies hi són més representades (80.9% vs. 70.5% general). Per contra, les poliploidies hi són disminuïdes (4.8% vs. 9.1%), encara que, a l'haver-hi només un sol cas, aquesta xifra és poc representativa.

L'augment de trisomies pot estar indicant que un dels dos membres de la parella té més risc de no-disjunció meiòtica. En aquest cas, aquesta parella tindria més risc de tenir un altre embrió trisòmic més endavant, i per tant seria recomanable realitzar un diagnòstic prenatal cromosòmic en cas de gestació evolutiva.

Però cal tenir en compte que l'edat materna de les gestacions incloses en aquest grup és superior a la de la població estudiada en el seu conjunt: només el 28.1% té menys de 35 anys i, en canvi, un 43.7% té 38 anys o més. Només aquesta dada per sí sola ja ha d'explicar un augment de les trisomies.

5.3.3.3.- reproducció assistida

Els casos en que la indicació diagnòstica era ser una gestació aconseguida amb el concurs de tècniques de reproducció assistida (14 casos, el que suposa un 9% de la mostra) presenten, en aquest treball, un índex d'anomalies cromosòmiques similars al general (64.3% vs. 67.2%). Però el que destaca és que la freqüència relativa de trisomies augmenta considerablement (88.9% vs. 70.5%).

Altres publicacions han fet també un esment particular als resultats obtinguts en aquest grup de pacients, les provinents d'un programa de reproducció assistida.

Grimoldi, sense especificar quants casos provenen de reproducció assistida, troba un índex d'anomalies superior en aquest grup (80% vs. 60.5% de la mostra global), però no concreta quin tipus d'anomalies cromosòmiques hi troba ni amb quina freqüència (Grimoldi et al. 2001).

En la mostra analitzada per Be hi ha un 3.6% de pacients d'aquest grup (22 mostres) i el seu resultat és semblant al del present treball. L'índex total d'anomalies cromosòmiques no varia gaire (63.6% d'anomalies en el grup de pacients de reproducció assistida vs. 63.7% de cromosomopaties en tota la mostra analitzada), però la freqüència relativa de trisomies es més elevada que la general (78.6% vs. 61.6%).

En aquest grup de gestacions, l'edat materna presenta uns valors molt similars als de la població global en estudi: la meitat tenen menys de 35 anys i un quart tenen 38 anys o més.

Aquests resultats incideixen en la polèmica de si les tècniques de reproducció assistida augmenten o no les anomalies cromosòmiques en els embrions manipulats. Les dades semblen indicar que les cromosomopaties ni augmenten ni disminueixen en general, però que cal estar vigilants sobre un possible augment de trisomies.

Aquest augment de trisomies seria compensat per una disminució d'altres tipus d'anomalies, per exemple les poliploidies (que es poden detectar abans de transferir l'embrió, mitjançant la visualització de més de dos pronuclis).

Les trisomies trobades entre aquest grup són: un cas de trisomia 2, de trisomia 5 i de trisomia 9, dos casos de trisomia 21 i de trisomia 22, i una doble trisomia pels cromosomes 18 i 21.

5.3.3.4.- gestacions anembrionades

De 14 gestacions anembrionades en el present estudi, en 7 hi ha una anomalia cromosòmica. Aquest 50% és un valor més baix que l'índex general (67.2%).

En el 71.4% d'aquests casos l'anomalia cromosòmica és una trisomia. Les trisomies trobades són pels cromosomes 2, 10, 14, 20 i 21 (un cas de cada).

Aquestes dades no s'adiuen gens a les descrites prèviament, on es troba un índex similar d'anomalies cromosòmiques però una freqüència relativa de trisomies més elevada (sobretot a expenses de les trisomies 16 i 22) i de monosomies X disminuïda (Minelli et al. 1993; Cusí i Carrera 1997).

Aquesta discordància amb les dades del present treball s'accentua si tenim en compte l'edat materna en els casos de gestacions anembrionades. Un 38.5% tenen 38 anys o més, el que significa un valor incrementat respecte a la població global, encara que la meitat segueixen tenint menys de 35 anys.

5.3.3.5.- alerta ecogràfica

L'alerta ecogràfica pot ser deguda a la visualització d'una anomalia morfològica o funcional de l'embrió o bé a un marcador de cromosomopatia. En el primer trimestre de la gestació és difícil la visualització de l'embrió, però les noves tècniques d'ecografia transvaginal, amb la incorporació de noves tecnologies com el doppler color i l'ecografia en tres dimensions, està canviant el diagnòstic en aquesta àrea.

Les noves tecnologies i l'experiència creixent dels especialistes està permetent desenvolupar els coneixements en embriologia, especialment en les primeres setmanes de gestació. Això permet saber què és normal o fisiològic i què és patològic en un embrió d'aquesta edat gestacional.

Així s'ha pogut veure que els marcadors ecogràfics no tenen el mateix significat en els diferents estadis de la gestació, sobretot entre el primer i el segon trimestre.

Dels 11 casos agrupats la indicació diagnòstica d'alerta ecogràfica, només tres tenen un cariotip normal. En un d'ells era el resultat esperat, doncs un defecte de la paret abdominal no es relaciona amb cromosomopatia.

Els marcadors ecogràfics detectats han estat, ordenats per freqüència: en primer lloc, i en igualtat numèrica, la presència o sospita d'higroma quístic i una translucència nocal de tamany augmentat (4 casos de cada); en segon lloc, amb tres casos, un edema generalitzat; segueix un hidrops, amb dos casos; i per acabar, amb un cas cada un, hidrotòrax, onfalocèle, mola i sospita de limfangioma quístic. Quatre casos presentaven una combinació de dos o tres marcadors.

La freqüència relativa de monosomia X està molt augmentada en aquest grup: 50% vs. 11.4% general. Això és degut a que quasi tots els embrions tenien 9 o més setmanes de gestació. L'únic cas de menys de 9 setmanes era un embrió amb trisomia 11, de 7 setmanes de gestació. Les tres trisomies descrites eren pels cromosomes 11, 13 i 22.

L'edat materna es manté molt similar a la general pel grup poblacional: un 45.4% tenen menys de 35 anys i un 27.3% tenen 38 anys o més.

5.3.3.6.- pares portadors d'anomalies cromosòmiques

Tots els casos en què un dels pares era portador d'una anomalia cromosòmica presentaven un embrió amb també una anomalia cromosòmica.

En sis casos es tractava d'una anomalia estructural que el progenitor presentava de forma equilibrada: tres translocacions recíproques i tres translocacions robertsonianes, totes elles der(13;14)(q10;q10).

El setè cas es tracta d'un pare amb cariotip 46,XY/48,XYYY/48,XXXY i amb un embrió amb trisomia 16. Donat que la majoria de les trisomies pel cromosoma 16 són d'origen matern, és possible que l'anomalia cromosòmica paterna no tingui rellevància en l'anomalia cromosòmica embrionària, però tampoc es pot descartar que l'excés de cromosomes sexuals paternes no hagi interferit en la meiosi, produint un espermatozoide disòmic.

5.3.3.7.- anomalia cromosòmica en gestació anterior

Dels 5 casos amb aquesta indicació diagnòstica, dos presentaven una anomalia cromosòmica. En un cas es repetia una trisomia, si bé afectant un altre cromosoma, i en l'altre apareix una triploidia després d'una trisomia.

Les dades d'aquest estudi són massa poques per a treure'n cap conclusió. S'ha descrit que el 66% dels avortaments espontanis ocorreguts després d'un avortament amb cariotip anormal tindran també un cariotip patològic, encara que generalment amb una anomalia cromosòmica diferent (Carrera et al. 1996), i també que un avortament espontani amb una trisomia letal *in utero* no incrementa el risc per a un altre avortament espontani amb una cromosomopatia (Warburton et al. 1987).

5.3.4.- discrepàncies

A vegades, tot i obtenir un resultat citogenètic, aquest resultat pot no correspondre totalment o parcial al cariotip de l'embrió que es pretén analitzar. Això pot ser degut a la presència de cèl.lules d'origen matern (contaminació materna) o a una repartició diferenciada de les diferents línies cel.lulars entre els diferents teixits originats, en els casos de mosaics.

En cas de trobar-nos amb mosaics, pot ser que la segona línia cel.lular s'hagi originat en les primeres divisions cel.lulars post-zigòtiques, cas en el que esperem més o menys presència d'ambdues línies cel.lulars en tots els teixits

provinents de la proliferació i diferenciació d'aquest zigot, o que s'hagi originat en una divisió cel.lular en un teixit ja diferenciat, cas en que només es trobaran les dues línies cel.lulars en el teixit en qüestió.

Per últim, quan hi ha un cultiu cel.lular, sempre hi ha la possibilitat de que el mosaic sigui resultat d'una divisió anòmala durant el citat cultiu. En aquest cas, anomenat pseudomosaic, aquesta segona línia cel.lular no era present en els teixits embrionaris abans de la presa de la mostra i és una font segura d'error, si no hi ha mesures per a descartar-lo.

5.3.4.1.- contaminació materna

L'única manera d'evitar la presència de material d'origen matern en la mostra a cultivar és una curiosa selecció de les vellositats coriòniques amb una lupa binocular. Aquí hi té una gran influència l'experiència del tècnic, que ha de saber reconèixer els diferents teixits que s'hi poden trobar.

També hi tindrà influència l'estat de la mostra. Unes vellositats coriòniques en bon estat, irrigades i actives mitòticament, seran molt més fàcil de diferenciar de, per exemple, decídua materna que no unes vellositats degenerades i sense irrigació.

Com ja s'ha dit anteriorment, les vellositats coriòniques procedents d'avortaments espontanis solen presentar un aspecte degenerat, el que facilita errors en la tria de la mostra.

La contaminació materna en una anàlisi citogenètica es detecta quan es troben dues línies cel·lulars de diferent sexe. Això vol dir, per una banda, que difícilment es detectarà contaminació materna en un embrió de sexe femení i cariotip igual al de la mare (que, en general, serà normal). Per altra banda tampoc es podrà detectar contaminació materna si només es troba una línia cel·lular femenina i no hi ha un altre teixit embrionari o es pot conèixer el sexe embrionari per observació directa de l'embrió.

Aquest darrer és el problema amb el que ens trobem en el cas d'avortaments espontanis de primer trimestre on, degut a la tècnica obstètrica del legrat, és impossible observar l'embrió i es fa difícil cultivar-ne algun teixit.

L'anàlisi citogenètica de les vellositats coriòniques pel mètode semidirecte i el cultiu llarg en paral·lel permeten analitzar dos teixits extraembrionaris diferents a partir d'una sola mostra.

L'aplicació del mètode semidirecte fa gairebé impossible la presència de mitosis maternes, si bé s'ha descrit algun cas (Blakemore et al. 1985; Jensen et al. 1986; Simoni et al. 1986). L'índex de contaminació materna observada en gestacions evolutives és de 0.06% (Ledbetter et al. 1992).

Per contra, en el cultiu llarg de vellositats coriòniques és molt probable trobar-hi cèl.lules maternes. En gestacions evolutives s'ha observat índex de contaminació materna que van des del 0.5% al 0.91% (Ledbetter et al. 1992; Association of Clinical Cytogeneticists Working Party 1994).

Pocs estudis citogenètics de vellositats coriòniques procedents d'avortaments espontanis fan constar l'índex de contaminació materna detectada. Cheung troba metafases 46,XX en el 27% dels cultius llargs de fetus en que es coneixia que el sexe era masculí (Cheung et al. 1987). Roberts detecta contaminació materna en un 16.7% dels fetus masculins (Roberts et al. 1988). Finalment, Ogur troba un 3.4% (2 casos) de contaminació materna (Ogur et al. 1990).

En el present estudi es troba contaminació materna reconeguda en 3 casos, el que suposa un 4% dels cultius a llarg terme realitzats. Si incluïm també els casos possibles, aquest índex seria del 9.3%.

Hi ha dos casos dubtosos, perquè també podria tractar-se de discrepàncies entre teixits diferents o mosaicismes confinats a placenta: 45,X pel mètode semidirecte i 46,XX o bé un mosaic 45,X/46,XX al cultiu llarg.

Finalment, hi ha 2 cultius llargs amb un resultat de 46,XX que no s'ha pogut confirmar pel mètode semidirecte, perquè no se'n feu o perquè no s'obtingué cap resultat. Com que desconeixem el sexe embrionari, no podem catalogar-los de contaminació materna, encara que podrien ser-ho.

Si mirem la raó sexual de tots els resultats obtinguts per cultiu llarg obtenim un 1.4 (31 sexe masculí contra 22 sexe femení, sense comptar les monosomies X). Aquesta dada va a favor de que en aquesta sèrie s'han minimitzat els efectes de la contaminació amb material matern.

En conclusió, l'ús en paral·lel del mètode semidirecte i el cultiu llarg és el millor mètode per a poder detectar una contaminació amb material matern. L'única manera d'evitar-la és una cuidadosa separació de les vellositats coriòniques amb la lupa binocular. Sembla també que el cultiu llarg utilitzant Chang com a medi de cultiu pot afavorir evitar la contaminació materna (Roberts et al. 1988).

5.3.4.2.- discrepàncies entre el mètode semidirecte i el cultiu llarg

En el present treball s'han trobat dos casos de discrepàncies entre els resultats obtinguts pel mètode semidirecte i el cultiu llarg que, sobre un total de 49 mostres amb diagnòstic per ambdues tècniques, suposa un 4.1%.

En d'altres treballs realitzats amb avortaments espontanis, els valors trobats són del 0%, del 3.4% o del 5.9% (Strom et al. 1992; Ogur et al. 1990; Grimoldi et al. 2001). La validesa del percentage en tots aquests casos es bastant discutible, ja que estem parlant sempre d'un nombre molt baix de casos. En tot cas, el valor del present treball és plenament comparable als descrits.

Els valors de discrepàncies entre els resultats procedents del mètode semidirecte i el cultiu llarg trobats en gestacions evolutives són molt menors.

Ledbetter, en un ampli treball col·laboratiu, cita un 0.97% d'anomalies cromosòmiques trobades en el mètode semidirecte però no en el cultiu llarg (un total de 35 casos), i que en els 9 casos en que es comprovà en un altre teixit fetal resultaren falsos positius del mètode semidirecte. També cita quatre casos de resultat patològic en el cultiu llarg i normal en el mètode semidirecte; en dos d'aquests l'amniocentesi confirmà la patologia (per tant resultaren ser fasos negatius del mètode semidirecte) i en els altres dos l'amniocentesi fou normal (fals positiu del cultiu llarg) (Ledbetter et al. 1992).

5.3.4.3.- mosaicisme confinat a placenta

El mosaicisme confinat a placenta és una forma de mosaicisme constitucional, ja que les dues o més línies cel·lulars amb cariotip diferent es donen en una unitat feto-placentària derivada d'un únic zigot. Segons el moment en que es doni aquest error post-zigòtic, de la línia cel·lular implicada i de la viabilitat de la cèl·lular mutant, pot donar lloc a diferents tipus de mosaicisme: generalitzat o confinat a la placenta o a l'embrió. El mosaicisme confinat a placenta es dona en un 2% de les gestacions evolutives d'entre 10 i 12 setmanes de gestació (Kalousek 2000).

En el cas dels avortaments espontanis de primer trimestre, al no disposar d'una mostra de l'embrió, és difícil detectar un mosaicisme confinat a placenta, però es pot sospitar a partir de discrepàncies en els resultats obtinguts pel mètode semidirecte i el cultiu llarg.

Mentre que el mosaïcisme confinat a placenta que implica tant el trofoblast com el mesènquima (tipus III) és el menys freqüent, tant el tipus I (confinat a trofoblast) com el tipus II (confinat a mesènquima) donarà com a resultat una discrepància en el resultat entre el mètode semidirecte i el cultiu.

En el present treball, tant els dos casos de discrepància com els dos casos de possible contaminació materna amb 45,X pel mètode semidirecte (Taula 5.15) podrien ser també mosaïcismes confinats a placenta. Evidentment, no podem descartar qualsevol dels casos en què només hi ha resultat per una de les dues tècniques citogenètiques ni tampoc podem descartar que diversos dels casos recollits aquí siguin mosaïcismes confinats a placenta del tipus III.

Taula 5.15.- Casos del present treball que podrien ser mosaïcismes confinats a placenta (tipus I i II)

cariotip en m.semirecte	cariotip en cultiu llarg
46,XY,-9,+der(9)(?) / 46,XY	46,XY,inv(9)(p11q34)
46,XX	46,XX,der(15;15)(q10;q10)+10
45,X	46,XX
45,X	45,X / 46,XX

Segons el criteri seguit per Griffin, els dos primers casos de la taula 5.15 haurien de ser considerats mosaïcismes confinats a placenta, ja que el resultat en mesènquima és totalment anormal, mentre que el resultat en citotrofoblast és normal o anormal en mosaic. En la seva mostra, Griffin troba un 6.1% de casos que compleixen aquest requisit (Griffin et al. 1997).

El mosaïcisme confinat a placenta s'ha associat a pèrdues gestacionals, retard del creixement intrauterí i part pre-terme, entre d'altres. La trisomia pel cromosoma 16 és una de les freqüentment observades en mosaïcismes confinats a placenta (Kalousek i Barrett 1994), a la vegada que és també una de les més freqüents entre els avortaments espontanis.

La majoria dels casos de mosaïcisme confinat a placenta amb un fetus cromosòmicament normal es dona a partir d'un zigot trisòmic i pèrdua post-zigòtica d'un dels tres cromosomes en les línies cel·lulars que donaran lloc al fetus (fenòmen també conegut com a *rescat de la trisomia*).

Aquesta pèrdua d'un dels tres cromosomes implica que en un terç dels casos en que es produeixi aquesta correcció, els fetus podran presentar una disomia uniparental per aquell parell de cromosomes, amb un efecte variable segons el cromosoma afectat i l'origen parental dels dos cromosomes que resten.

5.3.5.- raó sexual

La raó sexual s'obté de dividir el nombre de casos de sexe masculí entre el nombre de casos de sexe femení. S'entén per sexe masculí quan almenys un dels cromosomes sexuals és un Y i sexe femení en absència d'un cromosoma Y, és a dir quan tots els cromosomes sexuals són X. Els 10 casos amb 45,X no s'han tingut en compte, doncs es desconeix l'origen i quin és el cromosoma de menys.

Amb el total dels 131 embrions analitzats citogenèticament s'obté una raó sexual de 0.83, és a dir un excés d'embrions femenins (66 contra 55 embrions masculins). Aquest desequilibri a favor dels embrions de sexe femení és encara més gran si es tenen en compte els embrions amb un resultat citogenètic anormal: 0.62, i s'inverteix amb els embrions amb un resultat citogenètic normal: 1.39, és a dir major presència d'embrions del sexe masculí.

Tant Silvestre com Griffin, analitzant vellositats coriòniques procedents d'avortaments espontanis, tant per mètode semidirecte com pel cultiu llarg, han obtingut raons sexuals 1 (Griffin et al. 1997; Silvestre 1998).

Altres treballs realitzats també en vellositats coriòniques per mètode semidirecte, on es pot descartar un efecte de la contaminació materna, troben una prevalença d'avortaments espontanis cromosòmicament normals i de sexe femení (46,XX): 0.65 i 0.76 (Gueneri et al. 1987; Eiben et al. 1990) .

6.- CONCLUSIONS

1. El present treball ha resultat ser el més representatiu dels avortaments espontanis de gestacions clíniques del primer trimestre de la gestació, ja que un 91.6% dels casos són de 9 setmanes o menys, i un 69.5% d'entre 6 i 8 setmanes. A més, és l'únic on l'edat gestacional ha estat ben establerta en tots els casos.

2. La tècnica citogenètica ha permès obtenir uns bons resultats: en el 91.5% de les mostres acceptades s'ha obtingut un resultat citogenètic. Aquesta xifra és inferior a les sèries realitzades amb gestacions evolutives però molt comparable a d'altres sèries realitzades amb avortaments espontanis.

3. S'ha obtingut un 87.7% d'èxit en el mètode semidirecte i un 73.1% en el cultiu llarg, el que suposa un valor similar i lleugerament inferior als descrits, respectivament. Es demostra la influència de la quantitat de vellositats coriòniques disponibles per a l'anàlisi en la consecució d'un resultat complet. El mínim es fixa en 15 mg: 10 mg per al mètode semidirecte i 5 mg. per al cultiu llarg.

4. La contaminació fúngica o bacteriana és un problema que incideix decisivament en l'èxit aconseguit, però que influencia molt més el cultiu llarg que el mètode semidirecte. L'ús d'antibiòtics i antifúngics tant al medi de transport com al medi de cultiu permet reduir aquest efecte perjudicial, sobretot en el mètode semidirecte.

5. Realitzar en paral·lel el mètode semidirecte i el cultiu llarg, si la quantitat de vellositats coriòniques ho permet, aporta no només incrementar l'èxit de la tècnica citogenètica, sinó també poder realitzar, en una sola mostra, l'anàlisi de dos teixits extra-embriònaris. Això permet detectar alguns casos de discrepàncies, detectar més acuradament els mosaics i reduir significativament la contaminació amb cèl·lules maternes.
6. L'índex d'anomalies cromosòmiques és del 67.2% en el present treball, molt en la línia d'altres estudis publicats de semblants característiques.
7. Les trisomies són, com s'esperava, la principal de les anomalies cromosòmiques descrites, amb un 70.5% del total d'anomalies cromosòmiques. La més freqüent és la trisomia pel cromosoma 16, amb un 20.7%, seguida per la trisomia 22 (17.2%) i la trisomia 15 (15.5%). La quarta anomalia més freqüent ha estat la trisomia 13, amb un 8.5%. Només s'ha trobat quatre casos de trisomia 21, un més que les trisomies pels cromosomes 8 i 20.
8. Els grups amb un índex més alts de trisomies han sigut els d'infertilitat secundària (que s'acompanya d'una edat materna més elevada que la població analitzada en el seu conjunt) i el de reproducció assistida (amb una edat materna similar a la general).
9. Les trisomies són directament proporcionals a l'edat materna, tal com està profusament demostrat.

10. Les monosomies X han suposat un 11.4% del total d'anomalies cromosòmiques, amb una relació també esperada inversament proporcional a l'edat materna. Només s'ha trobat un cas de monosomia autosòmica, pel cromosoma 21.

11. L'índex de poliploidies ha estat del 9.1%, amb un 6.8% de triploidies i un 2.3% de tetraploidies. Aquests valors estan per sota dels trobats en d'altres estudis de caire semblant. La majoria dels avortaments triploides pertanyen al grup de parelles amb infertilitat primària, formades per individus amb anomalies meiòtiques freqüents.

12. Les anomalies estructurals han suposat un 9.1%, més alt que la resta d'estudis, però en la majoria dels casos són herències desequilibrades d'anomalies familiars. El grup amb major proporció d'anomalies estructurals és el d'infertilitat primària.

13. El grup de gestacions anembrionades en el present treball ha resultat tenir una taxa d'anomalies cromosòmiques inferior a la taxa total, a pesar de que l'edat materna en aquest grup era superior a la global. Aquest treball conclueix que no hi ha relació entre gestació anembrionada i anomalia cromosòmica.

14. L'alerta ecogràfica ha resultat una eina molt precisa per a indicar embrions amb un alt risc de cromosomopatia, inclús en avortaments espontanis de primer trimestre, ja que en 8/11 s'ha trobat una anomalia cromosòmica. La gran limitació és l'edat gestacional en què s'obtenen els millors resultats, el que fa que la seva validesa es redueixi al final del primer trimestre.
15. En la aquesta sèrie, el fet de un dels dos progenitors fos portador d'una anomalia cromosòmica ha estat també un indicador de molt alt risc, ja que en tots els casos l'embrió tenia també una anomalia cromosòmica.
16. La relació entre embrions masculins i femenins (coneguda com a raó sexual) demostra un excés d'embrions femenins en el total d'avortaments amb un resultat citogenètic (0.83), un excés encara més exagerat d'embrions femenins entre els casos amb una anomalia cromosòmica (0.62), i lògicament un excés d'embrions masculins entre els cromosòmicament normals (1.39).
17. L'estudi citogenètic embrionari en el cas d'un avortament espontani ha de ser mitjançant l'obtenció de vellositats coriòniques per biòpsia de corion. L'èxit aconseguit és molt superior al d'altres procediments, com ara el legrat, i a d'altres tipus de teixits embrionaris. Això obliga a disposar d'un personal tècnic experimentat en les condicions adequades.

18. El present treball demostra la importància d'analitzar citogenèticament **tots** els avortaments espontanis de primer trimestre, independentment de que sigui el primer o el tercer. Si la majoria d'aquests avortaments seran portadors d'una anomalia cromosòmica, no es pot obviar una prova analítica tan segura com és un cariotip embrionari, mentre que s'està sotmetent a les parelles avortadores a tot un seguit d'altres proves amb un diagnòstic clínic molt més imprecís.

7.- BIBLIOGRAFIA

- Andrews T, Roberts D (1982) Chromosome analyses in couples with repeated pregnancy loss. *Journal of Biosocial Sciences* 14: 33-52
- Angell RR (1991) Predivision in human oocytes at meiosis I: a mechanism for trisomy formation in man. *Human Genetics* 86: 383-387
- Angell RR, Ledger W, Yong EL, Harkness L, Baird DT (1991) Cytogenetic analysis of unfertilized human oocytes. *Human Reproduction* 6: 568-573
- Appleman Z, Rosensaft J, Elchalal U, Caspi B, Chemke J (1991) Chorionic villus sampling for fetal karyotyping in missed abortions. *Prenatal Diagnosis* 11: 55-57
- Association of Clinical Cytogeneticists Working Party oCViPD (1994) Cytogenetic analysis of chorionic villi for prenatal diagnosis: an ACC collaborative study of U.K. data. *Prenatal Diagnosis*. 14: 363-379
- Balasz J, Creus M, Fábregues F (1997) El aborto recurrente de causa inmunológica. *Cuadernos de Medicina Reproductiva* 3: 117-139
- Balasz J (2001a) Autoimmune factors in early pregnancy loss. 5th. World Congress in Perinatal Medicine, Barcelona, pp 278-282
- Balasz J (2001b) Fracaso reproductivo y anticuerpos antifosfolipídicos. XVIII Congreso Español de Medicina Perinatal, Barcelona, pp 28-29
- Be C, Velasquez P, Youlton R (1997) Abortos espontáneos: estudio citogenético en 609 casos. *Revista Médica de Chile* 125: 317-322
- Blakemore K, Samuelson J, Breg W, Mahoney M (1985) Maternal metaphases on direct preparation of first trimester decidua. *Hum Genet* 69: 380
- Blanco J, Gabau E, Gómez D, Baena N, Guitart M, Egozcue J, Vidal F (1998) Chromosome 21 disomy in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21, in a population with high prevalence of Down Syndrome: increased incidence in cases of paternal origin. *American Journal of Human Genetics* 63: 1067-1072
- Boada M, Veiga A (1999) Investigación en embriones humanos (documento provisional). Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida.
- Bosch M, Egozcue J, Templado C (1998) Numerical abnormalities in spermatozoa of ageing man. A four color FISH study. *Cytogenetics and Cell Genetics* 81: 148

- Bosch M, Rajmil O, Martínez-Pasarell O, Egozcue J, Templado C (2001) Linear increase of diploidy in human sperm with age: a four-colour FISH study. *European Journal of Human Genetics* 9: 533-538
- Boué J, Boué A, Lazar P (1967) Les aberrations chromosomiques dans les avortements. *Annales de Génétique* 10: 179-187
- Boué J, Boué A, Lazar P (1975) Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions. *Teratology* 12: 11-26
- Boué A, Boué J, Gropp A (1985) Cytogenetics of pregnancy wastage. *Advances in Human Genetics* 14: 1-57
- Bourrouillou G, Colombies P, Dastugue N (1986) Chromosome studies in 2136 couples with spontaneous abortions. *Human Genetics* 74: 399-401
- Burgoyne P, Holland K, Stephens R (1991) Incidence of numerical chromosome anomalies in human pregnancy: estimation from induced and spontaneous abortion data. *Human Reproduction* 6: 555-565
- Carr D (1963) Chromosome studies in abortuses and stillborn infants. *Lancet* ii: 603-606
- Carr D (1967) Chromosome anomalies as a cause of spontaneous abortion. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 97: 283-293
- Carrera JM, Torrents M, Muñoz A, Devesa R, Comas C (1997) *Biometría fetal ecográfica*. A: Carrera JM (ed) *Crecimiento fetal normal y patológico*. Masson, Barcelona, pp 123-188
- Carrera M, Ribas I, Torrents M, Méndez B, Serra B, de la Iglesia C, Boada M, Veiga A, Barri P (1996) Abortos espontáneos de repetición y anomalías cromosómicas numéricas. ¿Es el diagnóstico preimplantacional una alternativa diagnóstica? *Progresos en Diagnóstico Prenatal*. 8: 342-347
- Carrera M, Serra B, Carrera J (2000) Aspectos genéticos del aborto espontáneo recurrente. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. XVII: 21-32
- Cnattingius S, Signorello L, Anneren G, Clausson B, Ekbohm A, Ljunger E, Blot W, McLaughlin J, Petersson G, Rane A, Granath F (2000) Caffeine intake and the risk of first-trimester spontaneous abortion. *New England Journal of Medicine* 343: 1839-45

- Colls P, Martínez-Pasarell O, Pérez MM, Egozcue J, Templado C (1998) Sperm chromosome analysis in the father of a child with a de-novo reciprocal translocation t(11;15)(q12;q22) by G-banding and fluorescence in-situ hybridization. *Human Reproduction* 13: 60-64
- Comino R (1997) Factores endocrinos del aborto recurrente. *Cuadernos de Medicina Reproductiva* 3: 85-105
- Crane J, Cheung S (1988) An embryogenic model to explain cytogenetic inconsistencies observed in chorionic villus versus fetal tissue. *Prenatal Diagnosis* 8: 119-129
- Creasy M, Crolla J, Alberman E (1976) A cytogenetic study of human spontaneous abortions using banding techniques. *Human Genetics* 31: 177-196
- Cusí V, Carrera J (1997) *Gestación anembrionada*. A: Carrera J, Kurjak A (eds) *Medicina del embrión*, 1ª ed. Masson, Barcelona, pp 449-453
- Chandley A (1981) The origin of chromosomal aberrations in man and their potential for survival and reproduction in the adult human population. *Annales de Génétique* 24: 5-11
- Cheung S, Crane J, Beaver H, Burgess A (1987) Chromosome mosaicism and maternal cell contamination in chorionic villi. *Prenatal Diagnosis* 7: 535-542
- De Braekeleer M, Dao T-N (1991) Cytogenetic studies in male infertility. *Human Reproduction* 6: 245-250
- Downie SE, Flaherty SP, Matthews CD (1997) Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using fluorescence in-situ hybridization. *Molecular Human Reproduction* 3: 585-598
- Durban M, Benet J, Boada M, Fernández E, Calafell JM^a, Laila JM^a, Sánchez García JF, Pujol A, Egozcue J, Navarro J (2001) PGD in female carriers of balanced Robertsonian and reciprocal translocations by first polar body analysis. *Human Reproduction Update* 7: 591-602
- Edmonds D, Lindsay K, Miller J, Williamson E, Wood P (1982) Early embryonic mortality in women. *Fertility and Sterility* 38: 447-453
- Edwards RG (1986) Causes of early embryonic loss in human pregnancy. *Human Reproduction* 1: 185-196

- Egozcue J (1997) Pérdidas embrionarias de origen genético. A: Carrera J, Kurjak A (eds) *Medicina del Embrión*, 1ª ed. Masson, Barcelona, pp 381-385
- Egozcue J, Blanco J, Vidal F (1997) Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Human Reproduction Update* 3: 441-452
- Egozcue S, Blanco J, Vendrell J, García F, Veiga A, Aran B, Barri P, Vidal F, Egozcue J (2000) Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Human Reproduction Update* 6: 93-105
- Egozcue S, Blanco J, Vidal F, Egozcue J (2002) Diploid sperm and the origin of triploidy. *Human Reproduction* (in press)
- Eiben B, Borgmann S, Schubbe I, Hansmann I (1987) A cytogenetic study directly from chorionic villi of 140 spontaneous abortions. *Human Genetics* 77: 137-141
- Eiben B, Bartels I, Bähr-Porsch S, Borgmann S, Gatz G, Gellert G, Boebel R, Hammans W, Hentemann M, Osmers R, Rauskolb R, Hasmann I (1990) Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage. *American Journal of Human Genetics* 47: 656-663
- Evsikov S, Cieslak J, Verlinsky Y (2000) Effect of chromosomal translocations on the development of preimplantation human embryos in vitro. *Fertility and Sterility* 74: 672-677
- Font GE, Gonzalez FA, Solaris M (2001) Early pregnancy loss definition: sporadic and recurrent. 5 th. *World Congress of Perinatal Medicine*, Barcelona, pp 268-273
- Ford JH, Wilkin HZ, Thomas P, McCarthy C (1996) A 13-year cytogenetic study of spontaneous abortion: clinical applications of testing. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 36: 314-318
- Gardó S, Bajnóczky K (1992) Cytogenetic analysis of spontaneous abortions with direct analysis of chorionic villi. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. 47: 117-120

- Geisler M, Kleinebrecht J (1978) Cytogenetic and histologic analyses of spontaneous abortions. *Human Genetics* 45: 239-251
- Griffin D, Millie E, Redline R, Hassold T, Zaragoza M (1997) Cytogenetic analysis of spontaneous abortions: comparison of techniques and assessment of the incidence of confined placental mosaicism. *American Journal of Medical Genetics* 72: 279-301
- Griffin DK, Abruzzo MA, Millie EA, Sheean LA, Feingold E, Sherman SL, Hassold TJ (1995) Non-disjunction in human sperm: evidence for an effect of increasing paternal age. *Human Molecular Genetics* 4: 2227-2232
- Grimoldi MG, Benevento A, Buiatitot S, Fiori S, Malgara R, Meroni E, Quarantiello G, Tognoli C, Coggi G (2001) Cytogenetic analysis of 1280 early spontaneous abortions. *Annales de Génétique* 44: Abstract s149
- Gueneri S, Bettio D, Simoni G, Brambati B, Lanzani A, Fraccaro M (1987) Prevalence and distribution of chromosome abnormalities in a sample of first trimester internal abortions. *Hum Reprod* 2: 725-739
- Guerra D (1997) Factores psicológicos en el aborto recurrente. *Cuadernos de Medicina Reproductiva* 3: 141-151
- Hahnemnn J, Vejerslev L (1997) Accuracy of cytogenetic findings on chorionic villus sampling (CVS) - Diagnostic consequences of CVS mosaicism and non-mosaic discrepancy in centres contributing to EUCROMIC. *Prenatal Diagnosis* 17: 801-820
- Hassold T, Matsuyama A, Newlands I, Matsuura J, Jacobs P, Manuel B, Tsuei J (1978) A cytogenetic study of spontaneous abortions in Hawaii. *Annales of Human Genetics* 41: 443-451
- Hassold T (1980) A cytogenetic study of repeated spontaneous abortions. *American Journal of Human Genetics* 32: 723-730
- Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuel B, Matsuura J, Matsuyama A, Wilson C, Yamane J, Jacobs P (1980) A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Annales of Human Genetics* 44: 151-178
- Hassold T (1982) Mosaic trisomies in human spontaneous abortions. *Human Genetics* 61: 31-35

- Hassold T, Warburton D, Kline J, Stein Z (1984) The relationship of maternal age and trisomy among trisomic spontaneous abortions. *American Journal of Human Genetics* 36: 1349-1356
- Hassold T, Sherman S, Hunt P (2000) Counting cross-overs: characterizing meiotic recombination in mammals. *Human Molecular Genetics* 9: 2409-2419
- Hassold T, Hunt P (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews* 2: 280-291
- Hatch M, Kline J, B L, Hutzler M, Warburton D (1990) Paternal age and trisomy among spontaneous abortions. *Human Genetics* 85: 355-361
- Henderson K, Shaw T, Barrett I, Telenius A, Wilson R, Kalousek D (1996) Distribution of mosaicism in human placentae. *Human Genetics* 97: 650-654
- Hill J (1994) Sporadic and recurrent spontaneous abortion. *Current Problems in Obstetrics, Gynecology and Fertility XVII*: 113-164
- Jacobs P (1990) The role of chromosome abnormalities in reproductive failure. *Reproduction, Nutrition, Development suppl.1*: Abstract 63s-74s
- Jauniaux E, Kadri R, Hustin J (1996) Partial mole and triploidy: screening patients with first-trimester spontaneous abortion. *Obstetrics and Gynecology* 88: 616-619
- Jensen P, Hertz J, Therkelsen A (1986) Admixture of maternal metaphases in first trimester direct chromosome preparations? *Prenatal Diagnosis* 6: 383-385
- Johnson M, Drugan A, Koppitch F, Uhlmann W, Evans M (1990) Postmortem chorionic villus sampling is a better method for cytogenetic evaluation of early fetal loss than culture of abortus material. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 163: 1505-1510
- Joosten A, Devos S, Van Opstal D, Brandenburg H, Gaillard J, Vermeij-Keers C (1996) Full monosomy 21, prenatally diagnosed by fluorescent in situ hybridization. *Prenatal Diagnosis* 17: 271-275
- Kajii T, Ohama K, Niikawa N, Ferrier A, Avirachan S (1973) Banding analysis of abnormal karyotypes in spontaneous abortion. *American Journal of Human Genetics* 25: 537-547

- Kajii T, Ohama K (1979) Inverse maternal age effect in monosomy X. *Human Genetics* 51: 147-151
- Kajii T, Ferrier A, Niikawa N, Takahara H, Ohama K, Avirachan S (1980) Anatomic and chromosomal anomalies in 639 spontaneous abortuses. *Human Genetics* 55: 87-98
- Kalousek DK (1987) Anatomic and chromosome anomalies in specimens of early spontaneous abortion: seven-year experience. *Birth Defects* 23: 153-168
- Kalousek D (1994) Current topic: confined placental mosaicism and intrauterine fetal development. *Placenta* 15: 219-230
- Kalousek D, Barrett I (1994) Confined placental mosaicism and stillbirth. *Pediatric Pathology* 14: 151-159
- Kalousek D (2000) Pathogenesis of chromosomal mosaicism and its effect on early human development. *American Journal of Medical Genetics* 91: 39-45
- Kline J, Levin B, Kinney A, Stein Z, Susser M, Warburton D (1995) Cigarette smoking and spontaneous abortion of known karyotype. Precise data but uncertain inferences. *American Journal of Epidemiology* 141: 417-427
- Kurjak A, Carrera J, Kupesik S, Latin V, Ujevic B (1997) Fracaso gestacional precoz: estudio mediante ecografía y Doppler. A: Carrera J, Kurjak A (eds) *Medicina del embrión*. Masson, Barcelona, pp 205-212
- Lamb NE, Freeman SB, Savage-Austin A, Pettay D, Taft L, Hersey J, Gu Y, Shen J, Saker D, May KM, Avrampoulos D, Petersen MB, Hallberg A, Mikkelsen M, Hassold TJ, Sherman SL (1996) Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. *Nature Genetics* 14: 400-405
- Lauritsen J (1976) Aetiology of spontaneous abortion. A cytogenetic and epidemiological study of 288 abortuses and their parents. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica Supl.*52: 3-29
- Ledbetter D, Zachary J, Simpson J, Bolbus M, Pergament E, Jackson L, Mahoney M, Desnick R, Schulman J, Copeland K, Verlinsky Y, Yang-Feng T, Schonberg S, Babu A, Tharapel A, Dorfmann H, Lubs H, Rhoads G, Fowler S, De la Cruz F (1992) Cytogenetic results from the US Collaborative study on CVS. *Prenatal Diagnosis* 12: 317-345

- Lippman A, Tomkins D, Shime J, Hamerton J (1992) Canadian multicentre randomized clinical trial of chorion villus sampling and amniocentesis. Final Report. *Prenatal Diagnosis* 12: 385-476
- Lippman Hand A, Vekemans M (1983) Balanced translocation among couples with two or more spontaneous abortions: are males and females equally likely to be carriers? *Human Genetics* 63: 252-257
- Macas E, Imthurn B, Keller PJ (2001) Increased incidence of numerical chromosomes abnormalities in spermatozoa injected into human oocytes by ICSI. *Human Reproduction* 16: 115-120
- Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Fortini D, Furlan V, Tagliasacchi D (2001) Impact of Robertsonian and recombinant translocations on the chromosomal constitution of in-vitro generated embryos. *Human Reproduction* 16: 31-32 (Abstract)
- Marchese C (1984) Chorionic villi biopsy: effect on contamination by maternal decidua after overnight incubation. *American Journal of Human Genetics* 36s: 194
- Martínez Pasarell O, Nogués C, Bosch M, Egoscue J, Templado C (1999b) Analysis of sex chromosome aneuploidy in sperm from fathers of Turner syndrome patients. *Human Genetics* 104: 345-349
- Martínez Pasarell O, Templado C, Vicens Calvet E, Egozcue J, Nogués C (1999a) Paternal sex chromosome aneuploidy as a possible origin of Turner syndrome in monozygotic twins. *Human Reproduction* 14: 2735-2738
- Míguez L (1996) Estudio citogenético en vellosidades coriales. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona
- Minelli E, Buchi C, Granata P, Meroni E, Righi R, Portentoso P, Giudici A, Ercoli A, Sartor M, Rossi A, Fasola M, Campagna C, Casalone R (1993) Cytogenetic findings in echographically defined blighted ovum abortions. *Annales de Génétique* 36: 107-110
- Munné S, Sepulveda S, Balmaceda J, Fernandez E, Fabres C, Mackenna A, Lopez T, Crosby JA, Zegers-Hochschild F (2000) Selection of the most common chromosome abnormalities in oocytes prior to ICSI. *Prenatal Diagnosis* 20: 582-586

- Neuber M, Rehder H, Zuther C, Lettau R, Schwinger E (1993) Polyploidies in abortion material decreases with maternal age. *Human Genetics* 91: 563-566
- Neugebauer R, Kline J, Stein Z, Shrout P, Warburton D, Susser M (1996) Association of stressful life events with chromosomally normal spontaneous abortion. *American Journal of Epidemiology* 143: 588-6
- Newport M, Coleman D, McPherson K (1986) Estimation of the weight of chorionic villus samples obtained from first trimester pregnancies by transcervical aspiration. *Prenatal Diagnosis* 6: 265-269
- Ogur G, Debusscher C, Vamos E (1990) Etude comparée des caryotypes des produits d'avortements spontanés précoces obtenus par une méthode directe et par culture à long terme. *Journal de Gynecologie, Obstetrique et Biologie de la Reproduction* 19: 427-432
- Ohno M, Maeda T, Matsunobu A (1991) A cytogenetic study of spontaneous abortions with direct analysis of chorionic villi. *Obstetrics and Gynecology* 77: 394-398
- Parrilla JJ (1997) Aborto recurrente. Definiciones, incidencia y factores epidemiológicos. *Cuadernos de Medicina Reproductiva* 3: 13-23
- Pellestor F (1991) Fréquences et distributions de l'aneuploïdie dans les gamètes humains. *Annales de Génétique* 34: 70-75
- Plachot M, Veiga A, Montagut J, De Grouchy J, Calderón G, Lepretre S, Junca A-M, Santaló J, Carles E, Mandelbaum J, Barri P, Degoy J, Cohen J, Egozcue J, Sabatier JC, Salat-Baroux J (1988) Are clinical and biological IVF parameters correlated with chromosomal disorders in early life: a multicentric study. *Human Reproduction* 3: 627-635
- Plachot M (1989) Chromosome analysis of spontaneous abortions after IVF. An european survey. *Human Reproduction* 4: 425-429
- Portnoï M-F, Joyce N, Van den Akker J, Morlier G, Taillemite J-L (1988) Karyotypes of 1142 couples with recurrent abortion. *Obstetrics and Gynecology* 72: 31-34
- Ribas I, Méndez B, Ferreti R, Morán M, Punzón MM, Torrents M (1997) Estudios cromosómicos mediante biopsia corial en abortos espontáneos de primer trimestre de la gestación. *Progresos en Diagnóstico Prenatal* 9: 253-257

- Ribas Seix I, Méndez B, De la Iglesia C, Carrera M, Torrents M (2000) Discrepàncies en citogenètica de vellositats corials: mètode semidirecte vs. cultiu. A propòsit de tres casos. 2º Congrés Català d'Obstetrícia i Ginecologia, Barcelona.
- Roberts C, Lowe C (1975) Where have all the conceptions gone? *Lancet* 1: 498-499
- Roberts E, Duckett DP, Lang GD (1988) Maternal cell contamination in chorionic villus samples assessed by direct preparations and three different culture methods. *Prenatal Diagnosis* 8: 635-640
- Rubio C, Simon C, Blanco J, Vidal F, Minguez Y, Egozcue J, Crespo J, Remohí J, Pellicer A (1999) Implications of sperm chromosome abnormalities in recurrent miscarriage. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 16: 253-258
- Sánchez J, Franzi L, Colliá F, De Diaz S, Panal M, Dubner M (1999) Cytogenetic study of spontaneous abortions by transabdominal villus sampling and direct analysis of villi. *Prenatal Diagnosis* 19: 601-603
- Santaló J, Català V, Bádenas J (1987) Chromosomal abnormalities and IVF. A: Egozcue J (ed) *Cellular aspects of in vitro fertilization. Cell biology reviews*. Springer International, Leioa, pp 63-72
- Sargent I (1995) Placenta y abortos precoces de repetición. A: Redman, Sargent, Starkey (eds) *La placenta humana.*, vol 13. Masson, Barcelona, pp 323-334
- Silvestre E (1998) Estudi d'una sèrie d'avortaments espontanis: anàlisi citogenètica i histològica. Tesi Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona
- Simoni G, Brambati B, Danesino C, Rossella F, Terzoli G, Ferrari M, Fraccaro M (1983) Efficient direct chromosome analyses and enzyme determinations from chorionic villi samples in the first trimester of pregnancy. *Human Genetics* 63: 349-357
- Simoni G, Brambati B, Danesino C, Terzoli G, Romiti L, Rossella F, Fraccaro M (1984) Diagnostic application of first trimester trophoblast sampling in 100 pregnancies. *Human Genetics* 66: 252-259

- Simoni G, Rossella F, Lalatta F, Fraccaro M (1986) Maternal metaphases on direct preparation from chorionic villi and in cultures of villi cells. *Human Genetics* 72: 104
- Soler A (1996) Caracterització morfològica de les vellositats coriòniques en relació amb el diagnòstic prenatal citogenètic, Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona
- Stene J, Stene E (1984) Risk for chromosome abnormality at amniocentesis following a child with a non-herited chromosome aberration. An european collaborative study 1981. *Prenatal Diagnosis* 4: 81-95
- Strom C, Ginsberg N, Applebauj M, Borzogi N, White M, Caffarelli M, Verlinsky Y (1992) Analyses of 95 first-trimester spontaneous abortions by chorionic villus sampling and karyotype. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 9: 451-461
- Takahara H, Ohama K, Fujiwara A (1977) Cytogenetic study in early spontaneous abortion. *Hiroshima Journal of Medical Sciences* 26: 291-296
- Templado C, Egozcue J, Rajmil O, Bosch M (2001) Incremento lineal de anomalías cromosómicas estructurales en el espermatozoide humano en relación con la edad. XXI Congreso de la Sociedad Española de Genética Humana, Oviedo. *Progresos en Diagnóstico Prenatal*, pp 341
- Tuerlings JHAM, De France HF, Hamers A, Hordijk R, Van Hemel JO, Hansson K, Hoovers JMN, Madan K, Van Der Blij-Philipsen M, Gerssen-Schoorl KBJ, Kremer JAM, Smeets DFCM (1998) Chromosome studies in 1792 males prior to intra-cytoplasmatic sperm injection: the Dutch experience. *European Journal of Human Genetics* 6: 194-200
- Van Opstal D, Van den Berg C, Deelen W, Brandenburg H, Cohen-Overbeek T, Halley J, Van den Ouweland A, In't Veld P, Loss F (1998) Prospective prenatal investigations on potential uniparental disomy in cases of confined placental trisomy. *Prenatal Diagnosis* 18: 35-44
- Veiga A, Calderon G, Santaló J, Barri PN, Egozcue J (1987) Chromosome studies in oocytes and zygotes from an IVF programe. *Human Reproduction* 2: 425-430

- Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Evsikov S, Wolf G, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, Valle J, Ginsberg N, Strom C, Kuliev A (1998) Preimplantation diagnosis of common aneuploidies by the first- and second-polar body FISH analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 15: 285-289
- Viscasillas P (1997) Enfermedades infecciosas y abortos de repetición. *Cuadernos de Medicina Reproductiva* 3: 107-116
- Wapner R, Simpson J, Golbus M, Zachary J, Ledbetter D, Desnick R, Fowler S, Jackson L, Lubs H, Mahony R, Pergament E, Rhoads G, Shulman J, De la Cruz F (1992) Chorionic mosaicism: association with fetal loss but not with adverse perinatal outcome. *Prenatal Diagnosis* 12: 347-355
- Warburton D, Stein Z, Kline J, Sussier M (1980) Chromosome abnormalities in spontaneous abortions: data from the New York city study. A: Porter I, Hook E (eds) *Human embryonic and fetal death*. Academy Press, New York, pp 261-288
- Warburton D, Kline J, Stein Z, Strobino B (1986) Cytogenetic abnormalities in spontaneous abortions of recognized conceptions. A: Porter I, Hatcher N, Willey A (eds) *Perinatal Genetics*. Academic Press, New York, pp 23-40
- Warburton D, Kline J, Stein Z, Hutzler M, Chin A, Hassold T (1987) Does the karyotype of a spontaneous abortion predict the karyotype of a subsequent abortion? Evidence from 273 women with two karyotyped spontaneous abortion. *American Journal of Human Genetics* 41: 465-483
- Zaragoza MV, Surti U, Redline RW, Millie E, Chakravarti A, Hassold TJ (2000) Parental origin and phenotype of triploidy in spontaneous abortions: predominance of diandry and association with the partial hydatidiform mole. *American Journal of Human Genetics* 66: 1807-1820