

U A N L

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES**



**UTILIDAD DE LA CITOLOGIA DEL LIQUIDO
AMNIOTICO EN EL DIAGNOSTICO PRENATAL DEL SEXO**

**TESIS QUE EN OPCION AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA
DRA. DIANA CARMELA VAZQUEZ PEÑA**

MONTERREY, N. L. AGOSTO 1982

TM
RG5
V3
c.1



1080071424

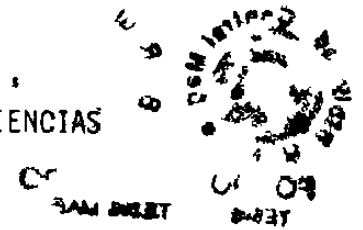
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES

" UTILIDAD DE LA CITOLOGIA DEL LIQUIDO AMNIOTICO EN EL DIAGNOSTICO PRE-
NATAL DEL SEXO"

TESIS QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

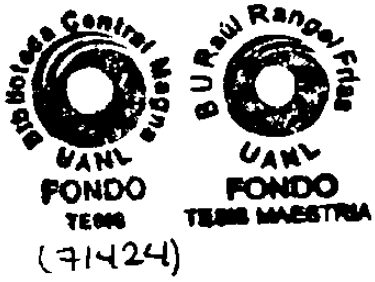


PRESENTA

DRA. DIANA CARMELA VAZQUEZ PEÑA

MONTERREY, NUEVO LEON AGOSTO 1982

TM
RF 566
V 3



BIBLIOTECA
FAC DE MED U.A.N.L.

DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA, DE LA FACULTAD DE MEDICINA
DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON.

ASESOR:

DRA. NORMA YOLANDA MEZA CARDENAS

A MIS PADRES

SR. ALFONSO VAZQUEZ GALLEGOS

SRA. DORA PEÑA DE VAZQUEZ.

Quienes con su amor y palabras de aliento, me impulsaron al logro de uno de mis más grandes anhelos.

A MI ESPOSO

DR. ALEJANDRO CANTU RIOS

Representas por tu amor el apoyo en ésta parte de mi vida.

A MIS HERMANOS

DORA ORALIA, ELIZABETH, ALFONSO Y NORA JAQUELINE.

Por su constancia, esfuerzo y trabajo han sido mi ayuda y ejemplo.

Mi agradecimiento a todas las personas que en alguna forma me apoyaron para realizar ésta tesis, en especial a la Dra. Norma Yolanda Meza por su asesoría, al Dr. José -- Luis Iglesias por su valiosa colaboración y al Ing. Heriberto Mora por la realización de los análisis matemáticos.

I N D I C E

	PAGINA
INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODO	7
RESULTADOS	15
DISCUSION Y CONCLUSIONES	29
RESUMEN	43
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	45

INTRODUCCION

Entre los más grandes avances que han tenido lugar en la medicina actual, destacan los relacionados con el estudio y conocimiento del embarazo y del medio interno fetal. Hasta hace 40 años, el conocimiento del pequeño gran mundo del feto, estaba reducido a la palpación externa y a la auscultación de los ruidos cardíacos y fetales. En la actualidad, se cuenta con diversos métodos que nos permiten conocer el medio ambiente en que se desarrolla el feto. En éste campo destacan los estudios -- practicados en el líquido amniótico, que son utilizados en forma rutinaria en embarazos de alto riesgo, para el conocimiento de la madurez pulmonar fetal, así como en la detección y pronóstico de la isoimmunización al factor Rh. Con menos frecuencia, pero no por ello menos importante, se ha utilizado el líquido amniótico en la búsqueda de enfermedades hereditarias y en la detección del sexo fetal.

La detección prenatal del sexo tiene su máxima y tal vez única aplicación, en aquellos casos que se sospecha de enfermedad hereditaria ligada al sexo (cromosoma X).

Entre los diferentes métodos actualmente utilizados, resalta -- por su alta especificidad el estudio de citogenética con cultivo y -- determinación de cariotipo de células tomadas del líquido amniótico. Este método para ser eficaz, se necesita que sea realizado entre las 12 y 14 semanas de gestación, que es cuando las células aún conservan cierta vitalidad y capacidad para crecer in-vitro. Después de las 20

semanas es inútil el intento del cultivo de células de líquido amniótico. La efectividad obtenida por éste método es de 96% en caso del sexo masculino y 98% en el sexo femenino (2).

Por encima de la 20a. semana de gestación, es difícil encontrar un método que tenga la efectividad del anterior en la determinación del sexo fetal.

Destaca por lo inocuo y sencillo del procedimiento, la ultrasonografía, el cuál es un método que consiste en la visualización de las diversas partes fetales por medio de un pequeño monitor. La efectividad de éste método, varía entre 50 y 90%, dependiendo de la experiencia y del lugar dónde se practique el estudio.

Recientemente se ha enfatizado acerca de la determinación del sexo fetal por medio de un estudio citológico del líquido amniótico.

Rosa y Fanard en 1949, estudiando el líquido amniótico, obtenido a las 30 semanas de embarazo y a término, observaron diferencias en productos masculinos y femeninos, por la presencia de numerosas células escamosas con citoplasma acidófilo, teñido con la técnica de Papanicolau (1942), (2).

Langreder en 1952, describió la presencia de células naviculares en el líquido amniótico de productos femeninos (2).

Arendsen y Huisjes en 1971, Bennet et al y Nelson en 1973, uti

lizando la técnica de coloración de Shorr, reportan la determinación del sexo fetal en el último trimestre del embarazo, basándose en el porcentaje de células cianófilas en el líquido amniótico (2).

El objetivo de éste trabajo consiste en:

- a).- Determinar las características citológicas en líquido amniótico que permitan detectar el sexo fetal.
- b).- Valorar la especificidad del método.

MATERIAL Y METODO

En una labor conjunta entre los departamentos de Obstetricia - del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" y el departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., se inició éste estudio, el cuál fué dividido en tres etapas:

ETAPA 1.- Estandarización del método, tratándose de obtener el mejor tiempo para una adecuada coloración de la muestra.

ETAPA 2.- Estudio citológico de las posibles fuentes de aporte de células que se exfolian al líquido amniótico, como serían; - cavidad oral, vulva y vagina de recién nacidos en el primer día de vida extrauterina. En ésta etapa se estudiaron 40 - muestras de cavidad oral: 20 del sexo femenino (Fig.1) y - 20 del sexo masculino (Fig.2) y 20 de vulva (Fig.3). Estas fueron comparadas con las células obtenidas por centrifugación del líquido amniótico (20 muestras).

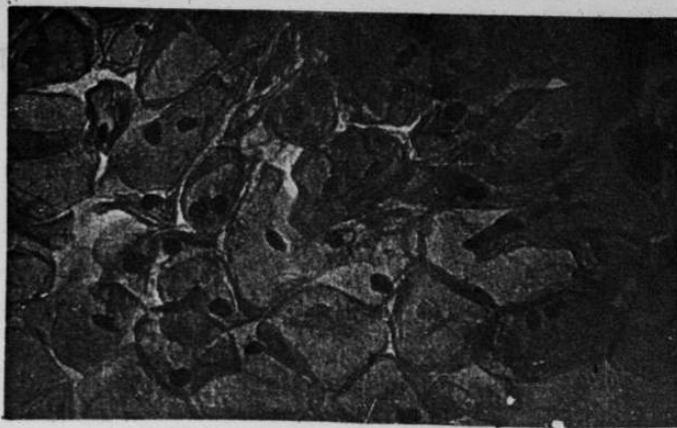


FIG.1 Citología de cavidad oral de neonato femenino (10 X 36) la cuál muestra, gran cantidad de material celular con predominio de células intermedias cianófilas.



FIG.2 Citología de cavidad oral de recién nacido (10 X 40) la cuál muestra escasa cantidad de material celular, con predominio de células intermedias acidófilas.



FIG.3 Citología de vulva de recién nacida (10 X 10) la cuál muestra una gran cantidad de material celular, con abundancia de células cianófilas.

ETAPA 3.- Consistió en el estudio citológico de 100 muestras de líquido amniótico, obtenido por amniocentésis, practicada-- en embarazos de alto riesgo para determinación de madurez fetal y transcesárea. Todos correspondieron a embarazos - por encima de 30 semanas de gestación.

Fueron excluidos aquellos líquidos fuertemente contaminados - con sangre y/o meconio. La cantidad mínima requerida de líquido amniótico fué de 10 cc.. El líquido amniótico fué procesado lo más -- pronto posible, en caso de espera de más de 6 horas se almacenó a - una temperatura de 4°C.

La muestra fué centrifugada a mil revoluciones por minuto, - durante 10 minutos. El sedimento obtenido se recogió por decantación y una gota de él, fué colocada y extendida en un portaobjetos, fijándose en alcohol etílico absoluto por 20 minutos. De cada caso fueron obtenidos 4 frotis.

Se utilizó la técnica de Shorr, que consiste en:

colorante simple de Shorr - - - - -	4 minutos
alcohol etílico 70% - - - - -	10 inmersiones
alcohol etílico 90% - - - - -	10 inmersiones
alcohol etílico absoluto - - - - -	10 inmersiones
xilol - - - - -	5 minutos
xilol - - - - -	5 minutos.

Preparación del colorante de Shorr:

COLORANTES Y REACTIVOS

Alcohol Etílico 50%	- - - - -	100 ml.
Biebrich Escarlata	- - - - -	0.5 grs.
Orange G.	- - - - -	0.25 grs.
Fast Green F.C.F.	- - - - -	0.075 grs.
Acido Fosfotúngstico	- - - - -	0.5 grs.
Acido Fosfomolibdico	- - - - -	0.5 grs.
Acido Acético Glacial	- - - - -	1 ml.

™

R E S U L T A D O S

Del estudio citológico de muestras de recién nacidos, se encontró que en cavidad oral de productos femeninos (Fig.4), existe predominio de células intermedias escamosas acidófilas, con núcleo redondo más grande que en las células superficiales, cromatina en grumos finos y citoplasma acidófilo abundante, con presencia de células intermedias cianófilas en menor proporción. En vulva (Fig.5) fué evidente una alta proporción de células basófilas de tipo intermedio, con núcleo redondo, central, grande y citoplasma finamente granuloso y transparente; también se observaron células cianófilas de forma navicular (Fig.6), muy semejantes a las observadas en mujeres embarazadas. Del sedimento urinario, por problemas técnicos, no fué posible obtener un adecuado material celular para estudio.

El examen citológico de productos masculinos de un día de nacidos (cavidad oral), Se observó un predominio de células escamosas intermedias, acidófilas, núcleo pequeño, oval, cromatina en grumos finos, y ausencia de células cianófilas.

Por los resultados citológicos obtenidos en el recién nacido se puede concluir que el predominio de células cianófilas con alguna presencia de células cianófilas de forma navicular, son las características del sexo femenino.

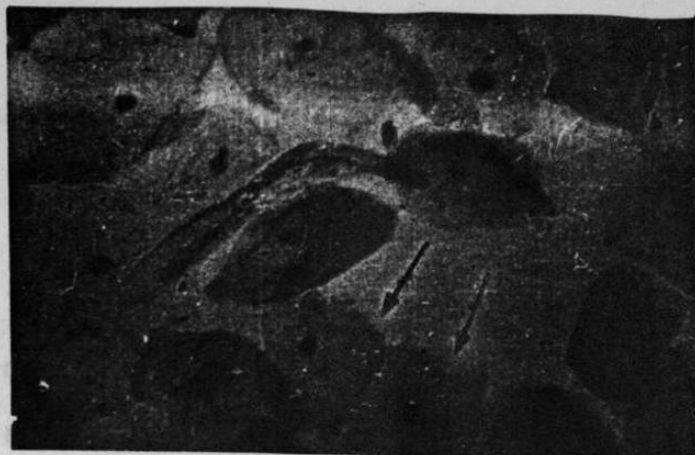


FIG. 4 Citología de cavidad oral (10 X 25) de recién nacido femenino, que presenta mayor cantidad de células intermedias acidófilas en comparación con las cianófilas. (Indicadas con flechas).



FIG. 5 Citología vulvar de recién nacida (10 X 25) que muestra gran abundancia de células intermedias cianófilas y escasas acidófilas. (Indicadas con flechas).



FIG. 6 Citología que muestra una célula cianófila de forma navicular, la cuál es característica de los neonatos femeninos. (10 X 25).

El examen microscópico de las laminillas con células de líquido amniótico dió por lo general una indicación inmediata del sexo del feto. Los especímenes obtenidos de fetos de sexo femenino (Fig.7) consistieron principalmente en gran número de células, con predominio de células intermedias basófilas, de núcleo redondo u oval, central, más grande que en las células superficiales, cromatina en grumos finos, membrana nuclear más oscura que en las células superficiales, citoplasma abundante cianófilo, transparente de aspecto granuloso. Con un porcentaje que nunca bajo de 30, aunque en la mayoría de los casos se apreció por encima del 60% (gráfica No.1). En los casos de fetos del sexo masculino (Figs. 8 y 9), se encontró un menor número de células con predominio de células acidófilas intermedias de núcleo grande, central, citoplasma abundante, acidófilo y un porcentaje de células basófilas que nunca fué mayor de 15%.

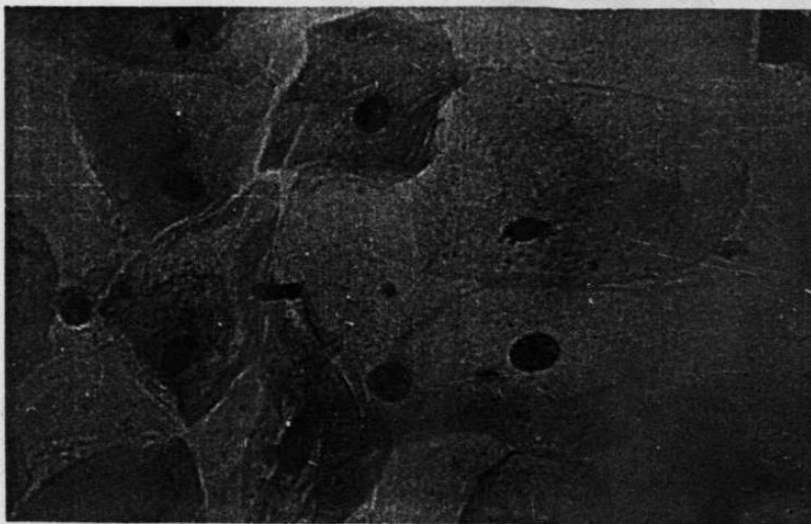
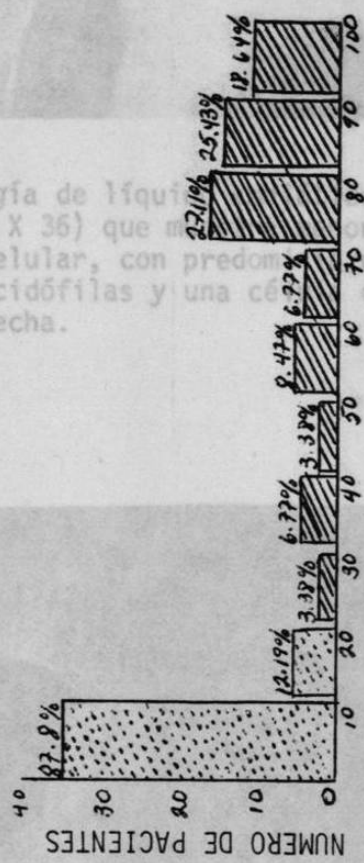


Fig.7 Citología de líquido amniótico que muestra células cianófilas intermedias de neonato femenino. (10 X 40).

MASCULINO
FEMENINO

NOTA: Porcentaje con respecto al total de masculinos y femeninos.



NUMERO DE CELULAS CIANOFILAS

Gráfica No.1

FIG. 8 Citología de líquido amniótico de neonato masculino (10 X 36) que muestra una célula intermedia acidófila (Indicada con flecha).

FIG. 9 Citología de líquido amniótico de neonato masculino (10 X 40) que muestra una célula intermedia acidófila.

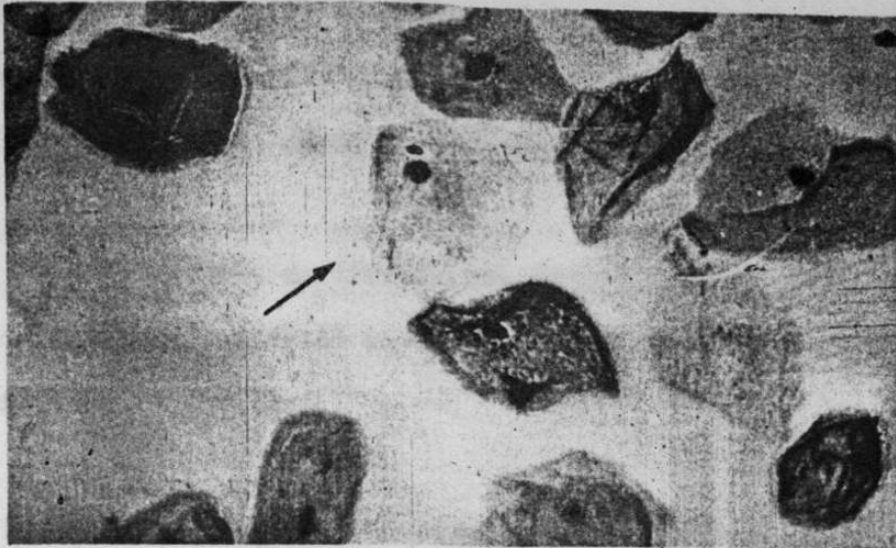


FIG. 8 Citología de líquido amniótico de neonato masculino (10 X 36) que muestra menor cantidad de material celular, con predominio de células intermedias acidófilas y una célula cianófila. (Indicada con flecha.

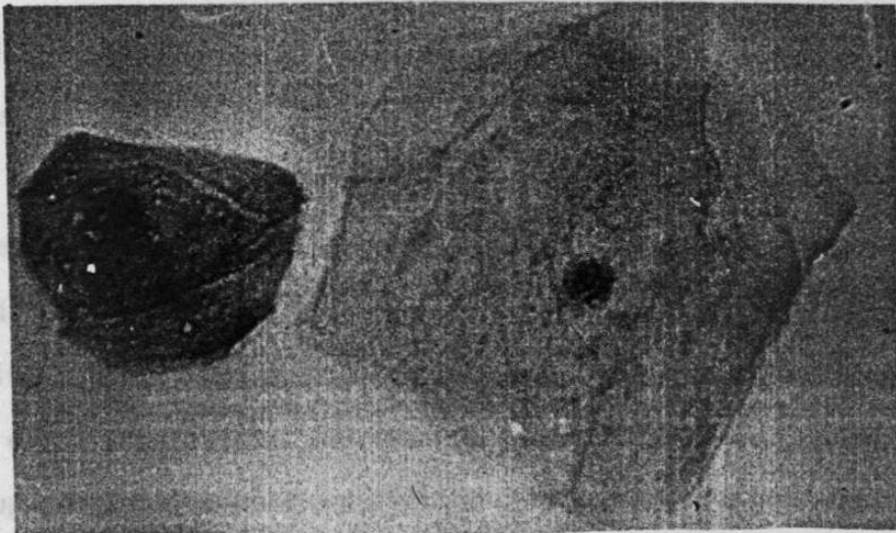


FIG. 9 Citología de líquido amniótico de neonato masculino (10 X 40) que muestra una célula intermedia acidófila.

Por otro lado, la frecuencia de formas naviculares fueron siempre características de productos femeninos, éstas son células intermedias - cianófilas de núcleo central, redondo, cromatina en grumos finos y bordes celulares levantados, dándole la forma abarquillada típica.

De las 100 muestras de líquido amniótico, se pudo hacer un diagnóstico certero del sexo fetal en el 99% de los casos. Solamente hubo error diagnóstico en un caso.

Del estudio citológico de cavidad oral y vulvar de recién nacido se obtuvo lo siguiente:

De cavidad oral - - - - -	predominio acidófilo
De vulva - - - - -	predominio basófilo y se observan formas naviculares.

Del sedimento urinario, por problemas técnicos no fué posible obtener un adecuado material celular para estudio.

Como se puede apreciar en el cuadro No.1, de las 100 muestras de líquido amniótico procesadas, 59 correspondieron a fetos del sexo femenino y 41 a fetos del sexo masculino. En el grupo de fetos femeninos, el acierto diagnóstico fué en todos los casos, mientras que en el grupo de fetos masculinos, se apreció un caso de diagnóstico - erróneo (Fig.10). En total, se pudo precisar un diagnóstico prenatal del sexo correcto en el 99% de los casos.

De acuerdo a los
 precisar que la técnica
 tercer trimestre de
 en el diagnóstico

	MASC.	FEM.	TOTAL
ACIERTOS	40	59	99
NO-ACIERTOS	1	0	1
TOTAL	41	59	100

CUADRO No.1



FIG.10 Citología de líquido amniótico de neonato masculino (10 X 36) que muestra gran cantidad de células intermedias cianófilas, imagen característica de neonatos femeninos.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en éste trabajo, podemos precisar que la técnica citológica de Shorr del líquido amniótico del tercer trimestre de gestación, tiene un alto grado de predictibilidad en el diagnóstico prenatal del sexo.

Como ya se mencionó, las características celulares que nos orientan al diagnóstico, son típicas en los fetos del sexo femenino y -- consisten principalmente en un alto número de células intermedias basófilas y en la presencia de formas naviculares. La explicación posible para éste predominio celular, se basa en que el feto está en contacto con una gran cantidad de hormonas sexuales presentes en la circulación materna y provenientes en gran medida de la placenta. Esta relación tan estrecha de feto y hormonas sexuales, trae como consecuencia que el tracto genital del feto femenino responda ante éste estímulo, produciéndose cambios en exocervix, vagina y vulva, cambios muy semejantes a los observados en la mujer embarazada. Dentro de éstos cambios, se debe mencionar la hiperplasia de los epitelios del canal vaginal y de la vulva fetales, produciendo enormes cantidades de células que se descaman y alcanzan al líquido amniótico. Como es conocido, durante el embarazo, tiene especial importancia la progesterona y esa ésta hormona principalmente, que debemos la predominancia de células intermedias basófilas y formas naviculares tanto en la mujer embarazada como en el feto femenino. Se debe mencionar además que las formas naviculares ya mencionadas, solamente se encuentran en citologías tomadas durante el embarazo.

Durante el transcurso de ésta investigación, pudimos apreciar ciertos aspectos técnicos que nos ayudan a una mejor preparación de las muestras:

- El mantenimiento del sistema de coloración, cambiando frecuentemente los alcoholes y filtrando el colorante.
- La refrigeración de la muestra a 4°C por un período de tiempo - de cuando menos 3 horas, nos demostró una mayor afinidad del colorante hacia las células amnióticas.
- El procesamiento de las muestras en un período de tiempo no mayor de 48 horas, ya que cuando permanecían por encima de éste, - obtuvimos resultados difíciles de interpretar, por presentar citólisis y una franca disminución de la afinidad por el colorante.
- La contaminación leve con sangre ó meconio, no interfirió con la interpretación de los especímenes.
- Dado que uno de los principales problemas, al obtener las muestras era lo escaso del material adherido al portaobjetos, se utilizó en cada caso 4 muestras, con lo cuál se pudo realizar una revisión más completa de cada caso, así como un diagnóstico más exacto.

Como se mencionó al inicio del trabajo, todas las muestras de líquido amniótico utilizadas para éste estudio, se obtuvieron transcesárea y en amniocentésis practicadas para determinación de madurez fetal. En ningún caso se obtuvo líquido amniótico con el único propósito de tratar de determinar el sexo fetal, ya que se consideró que-

era demasiado riesgoso practicar una amniocentésis para éste solo propósito. La punción transcesárea, se practicó por la facilidad, inocuidad y la rapidez en la solución de alguna complicación en caso de que ésta se presentara.

Como se puede apreciar en el cuadro 3, al comparar nuestros resultados con otras series publicadas, podemos comprobar que el porcentaje de aciertos en la muestra, es muy semejante a la de los demás autores. Aunque nuestra serie es la más numerosa de todas, lo cuál la hace estadísticamente significativa, es de tomar en cuenta el alto porcentaje de acierto diagnóstico, ya que el máximo error anotado corresponde a un sólo caso en la mayoría de los trabajos. Esto demuestra la efectividad del procedimiento del líquido amniótico en la detección prenatal del sexo.

El valor de éste escrito, se basa principalmente en la determinación de que el estudio citológico del líquido amniótico es bastante -- preciso (99% en éste trabajo), rápido, no costoso y que puede practicarse en cualquier toma de líquido amniótico. Su aplicación clínica se encuentra limitada, ya que el determinar el sexo fetal a una edad gestacional tan avanzada como lo es el tercer trimestre, coloca al clínico en una actitud expectante, ya que no es posible un manejo agresivo ante la posibilidad de enfermedad ligada al sexo. Su utilidad principal se podría mencionar, cuando el estudio del sexo fetal no es posible -- realizarlo por citogenética, por la edad gestacional avanzada ó por -- falta de una técnica apropiada y se conoce el riesgo de enfermedad ligada al sexo, permitiendo de ésta manera, una mejor atención pediátrica ante ésta posibilidad.

CUADRO 3

COMPARACION DE RESULTADOS PUBLICADOS DE 1949 A 1975 POR GREENSHER (2)

AUTORES	No. PACIENTES	No. DX. CORRECTO
Rosa y Fanard (1949)	40	40
Arendzen y Huisjes (1971)	67	66
Bennett, Morris, and Daveg. (1972)	31	30
Nelson (1973)	29	28
Hudson (1975)	48	48

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL PRESENTE TRABAJO:

Vázquez, Iglesias (1982)	100	99
--------------------------	-----	----



Como dato importante se observó, que durante el procesamiento de las muestras, los líquidos amnióticos provenientes de fetos del sexo femenino, eran de un aspecto más turbio y al ser centrifugados daban un sedimento mucho más abundante que el obtenido de fetos masculinos (ver gráfica No.2). De ésta manera, aún antes de obtener la coloración de la laminilla, se podía tener una idea más ó menos exacta del posible sexo del neonato. Este dato fué tomado en cuenta en unión a la abundancia de material celular apreciado en la laminilla y al porcentaje de células basófilas intermedias y células acidófilas para permitir el diagnóstico prenatal del sexo.

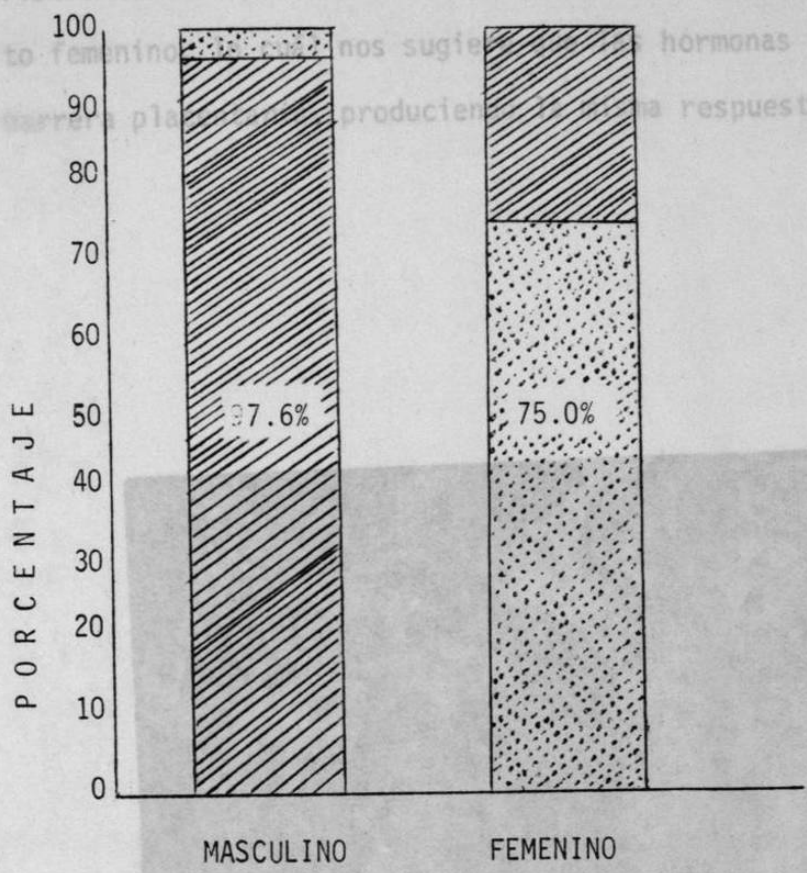
Se pudo apreciar que de los 59 líquidos de fetos femeninos, - 44 presentaron un sedimento abundante posterior a la centrifugación. Esto representa el 75%, en contraste al 2.4% de los fetos masculinos (ver cuadro No.2). Se puede concluir que cuando el líquido amniótico demuestra abundante sedimento, es muy factible que se trate de un feto femenino, mientras que cuando el sedimento es escaso, no necesariamente nos excluye ésta posibilidad.

	MASC.	FEM.	TOTAL
ABUNDANTE	1	44	45
NO-ABUNDANTE	40	15	55
TOTAL	41	59	100

CUADRO 2 Relación de la cantidad de sedimento en líquido amniótico.

Se muestra que el influjo hormonal durante la gestación, da ciertas características típicas a la citología de una mujer embarazada (Fig.11), como son la aglomeración celular y las células naviculares (indicada con flecha). Estas características se observan en la citología de líquido amniótico.

 CON SEDIMENTO ABUNDANTE.
 SIN SEDIMENTO ABUNDANTE.



RELACION DE LA SEDIMENTACION DEL LIQUIDO AMNIOTICO.

GRAFICA No.2

Fig.11 Citología de una mujer embarazada.

Se muestra que el influjo hormonal durante la gestación, da ciertas características típicas a la citología de una mujer embarazada (Fig.11), como son la aglomeración celular y la presencia de las células naviculares (indicada con flecha). Estas mismas características se observan en la citología de líquido amniótico de un feto femenino, lo cuál nos sugiere que las hormonas maternas pasan la barrera placentaria, produciendo la misma respuesta.

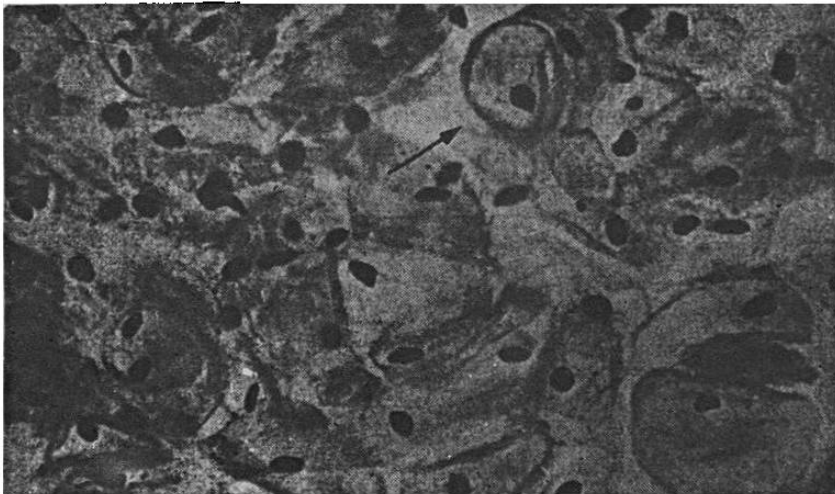


Fig.11 Citología de una mujer embarazada.

R E S U M E N .-

Se realizó un estudio citológico de 100 muestras de líquido amniótico, obtenidas por amniocentésis y punción transcesárea, con la finalidad de determinar el sexo fetal en el último trimestre del embarazo.

Se demostró una diferencia significativa en las citologías de neonatos femeninos y masculinos, ya que es posible hacer su determinación con mucha exactitud, basándose en la mayor cantidad de células, con predominio de células escamosas intermedias cianófilas y células naviculares en los productos femeninos, en comparación con la menor cantidad de células, con predominio de células escamosas intermedias, acidófilas y la ausencia de las células naviculares en los productos masculinos, empleándose la técnica de Shorr. Después de la centrifugación se observó un sedimento más abundante en neonatos femeninos en comparación con neonatos masculinos.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Amarose, Anthony P., Wallingford, Arthur J., Plotz, E.J. Prediction of fetal sex from cytologic examination of amniotic fluid. - The New England Journal of Medicine. 1966. vol. 275 715-717.
- 2.- Greensher, A., Gersh, R., Peakman, D., Robin, A. Intra-uterine -- diagnosis of fetal sex. Pediatrics. 1971. vol. 48 N°1 159-160.
- 3.- Hudson, Elizabeth A. The cytological difference between amniotic fluids of male and female fetuses. British Journal of obstetrics and Gynaecology. 1975. vol.82 523-528.
- 4.- Iinuma, Kazuso., Nakagome, Yasuo. Fluorescence of Barr body in -- human Amniotic- Fluid Cells. Lancet. 1973. 1(800) 436-437.
- 5.- Lewis, B.V., Chapman, P.A. A comparison of techniques for determining prenatal sex from liquor amnii. J. Clin. Path. 1974. vol.27 639-642.
- 6.- Montalvo-Ruiz, Luis. Citología vaginal del la recién nacida y niña prepúber. Citología vaginal, endocervical y endometrial, hormonal y maligna. 1967, vol.3 67-72.
- 7.- Mukherjee, Asist B., Blattner, Peggy Y., Nitowsky, Harold M. Sex - Chromatin fluorescence in human amniotic-fluid. Lancet. 1971. 2 - (726) 709- 710.
- 8.- Nelson, M.M., Emery, A. E. H. Amniotic fluid cells; prenatal sex - prediction and culture. British Medical Journal. 1970. 1(695) --- 523-526.
- 9.- Quayle, Sarah., Chitham, R.G., Craft, Ian. Prenatal diagnosis from uncultured amniotic-fluid cells. Lancet. 1972. 1(744) 269-270.

- 10.- Soon-Ju, Kap.- Park, James., Jones, Howard W., Winn, Kevin J.-
Prenatal sex determination by observation of the X- Chromatin -
and the Y- Chromatin of exfoliated amniotic fluid cells. Obstet.
Gynecol. 1976. 47(3) 287-290.
- 11.- Wied, George L., Bibbo Marluce. Evaluation of endocrinologic con-
dition of the patient by means of vaginal cytology. 1973. vol.11
N°2 202-212.

