

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA (ÉNFASIS EN GENÉTICA HUMANA)**



**FRECUENCIA DE MOSAICISMOS DE BAJA PROPORCIÓN DEL  
CROMOSOMA X EN PAREJAS CON ANTECEDENTE DE ABORTO  
RECURRENTE**

**Ruth Maribel Forero Castro. Biol.**

**Bogotá D.C. - Colombia  
Noviembre de 2005**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA (ÉNFASIS EN GENÉTICA HUMANA)**



**FRECUENCIA DE MOSAICISMOS DE BAJA PROPORCIÓN DEL  
CROMOSOMA X EN PAREJAS CON ANTECEDENTE DE ABORTO  
RECURRENTE**

**Ruth Maribel Forero Castro. Biol.**

TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial  
para optar por el título de

**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA CON ÉNFASIS EN GENÉTICA HUMANA**

**Bogotá D.C. - Colombia  
Noviembre de 2005**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA (ÉNFASIS EN GENÉTICA HUMANA)**



**FRECUENCIA DE MOSAICISMOS DE BAJA PROPORCIÓN DEL  
CROMOSOMA X EN PAREJAS CON ANTECEDENTE DE ABORTO  
RECURRENTE**

**Ruth Maribel Forero Castro. Biol.**

**Directora:** Clara Ines Esteban BSc. MSc. BMR.  
Centro Colombiano de Fertilidad y Esterilidad (CECOLFES)  
Laboratorio de Biogenética

**Bogotá D.C. - Colombia  
Noviembre de 2005**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por los alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velara porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona, antes bien de buscar la verdad y la justicia. Artículo 23 de la Resolución N°13 de julio de 1946".

## **NOTA DEDICATORIA**

*“Agradezco a mi esposo Mauricio Garzón el apoyo incondicional que me brindó para poder cumplir con esta meta académica. Dedico este esfuerzo a mis padres, hermanas y amigos que siempre estuvieron pendientes del desarrollo de este trabajo”.*

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
PROGRAMA DE POSTGRADO**

**FRECUENCIA DE MOSAICISMOS DE BAJA PROPORCIÓN DEL  
CROMOSOMA X EN PAREJAS CON ANTECEDENTE DE ABORTO  
RECURRENTE**

Ruth Maribel Forero Castro. Biol.

---

Clara Ines Esteban BSc. MSc. BMR.  
Directora de Tesis

---

Angela Umaña Biol. MPhil.  
Jurado

---

Ignacio Briceño MD. PhD.  
Jurado

---

Leopoldo Arrieta BSc. MSc.  
Jurado

Bogotá D.C. Noviembre de 2005

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
PROGRAMA DE POSTGRADO**

**FRECUENCIA DE MOSAICISMOS DE BAJA PROPORCIÓN DEL  
CROMOSOMA X EN PAREJAS CON ANTECEDENTE DE ABORTO  
RECURRENTE**

Ruth Maribel Forero Castro. Biol.

---

Angela Umaña Biol. MPhil.  
Decano Académico  
Facultad de Ciencias Básicas

---

Carlos Corredor Pereira. PhD.  
Director de Postgrado  
Facultad de Ciencias Básicas

## RESUMEN

El aborto recurrente se presenta entre el 1 y 7% de las parejas. Dentro de su etiología se encuentran factores genéticos, inmunológicos, anatómicos, hormonales, metabólicos, trombofílicos e infecciosos. El objetivo de este trabajo fue establecer la frecuencia de mosaicismos de baja proporción en cromosomas sexuales, en una población colombiana de parejas con antecedente de aborto recurrente. Así mismo se realizaron interpretaciones sobre los hallazgos citogenéticos y clínicos en las parejas estudiadas, especialmente en aquellas que fueron afectadas por mosaicismo de baja proporción en cromosomas sexuales. Se realizó un estudio citogenético prospectivo caso – control en 20 parejas con antecedente de aborto recurrente, remitidas al Laboratorio de Biogenética Molecular del Centro Colombiano de Fertilidad y Esterilidad (CECOLFES). Como técnicas citogenéticas se usó el método convencional de bandeado GTG para estudio de anomalías cromosómicas y el método molecular de Hibridación in situ con Fluorescencia (FISH) para confirmar los mosaicismos de baja proporción en cromosomas sexuales. De acuerdo con los hallazgos paraclínicos de las parejas, el diagnóstico mostró factores inmunológicos (75%), anatómicos (30%), hormonales (25%), masculino (25%), infecciosos (25%), genéticos (15%) e idiopático (10%). Sólo se estudió citogenéticamente el 10% de los productos de aborto de todas las parejas. Se halló un 10% de mosaicismo de baja proporción en cromosomas sexuales en dos mujeres abortadoras cuyo diagnóstico final incluyó factor genético e infeccioso (paciente *mos1*) y factor genético e inmune (paciente *mos2*). El método de FISH permitió dar un valor diagnóstico a los mosaicismos observados por citogenética convencional, pues el porcentaje de aneuploidía es mayor con respecto al grupo control, no obstante para confirmar los mosaicismos de las pacientes como anomalías constitucionales sería recomendable estudiar otro tipo de tejidos, como por ejemplo fibroblastos de biopsia de piel y tejidos gonadales. Se concluyen aspectos como la evidencia multifactorial de la patogénesis del aborto recurrente, el subdiagnóstico del factor genético en las parejas remitidas y la necesidad de focalizar investigaciones futuras en la interpretación citogenética y asociación clínico – patológica de los mosaicismos de baja proporción en cromosomas sexuales con el aborto recurrente.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>4</b>
3.1	OBJETIVO GENERAL.....	4
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
<b>4</b>	<b>ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS .....</b>	<b>5</b>
4.1	ASPECTOS HISTÓRICOS DE LA CITOGENÉTICA.....	5
4.2	CARIOTIPO .....	5
4.2.1	<i>TÉCNICAS DE BANDEO CROMÓSOMICO.....</i>	<i>7</i>
4.2.2	<i>CARIOTIPO ANORMAL.....</i>	<i>8</i>
4.2.3	<i>NOMENCLATURA CITOGENÉTICA .....</i>	<i>11</i>
4.3	ABORTO ESPONTÁNEO .....	14
4.3.1	<i>ANORMALIDADES CROMOSÓMICAS EN PÉRDIDA FETAL.....</i>	<i>15</i>
4.4	ABORTO RECURRENTE .....	20
4.4.1	<i>ASPECTOS GENÉTICOS DEL ABORTO RECURRENTE .....</i>	<i>21</i>
4.4.2	<i>CAUSAS ANATÓMICAS.....</i>	<i>32</i>
4.4.3	<i>CAUSAS HORMONALES Y DESÓRDENES METABÓLICOS.....</i>	<i>33</i>
4.4.4	<i>CAUSAS INMUNOLÓGICAS.....</i>	<i>34</i>
4.4.5	<i>DESÓRDENES TROMBOFÍLICOS .....</i>	<i>37</i>
4.4.6	<i>CAUSAS INFECCIOSAS .....</i>	<i>37</i>
4.4.7	<i>AGENTES QUÍMICOS Y AMBIENTALES.....</i>	<i>38</i>
4.4.8	<i>FACTOR MASCULINO .....</i>	<i>39</i>
4.4.9	<i>CAUSAS IDIOPÁTICAS .....</i>	<i>39</i>
<b>5</b>	<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>41</b>
5.1	TIPO DE ESTUDIO: .....	41
5.2	POBLACIÓN: .....	41
5.3	MUESTRA: .....	41
5.4	CRITERIOS DE INCLUSIÓN: .....	41
5.5	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN: .....	41
5.6	POBLACIÓN CONTROL PARA ESTUDIO CITOGENÉTICO: .....	41
5.7	VALORACIÓN CLÍNICO – PATOLÓGICA DE LAS PAREJAS.....	42
5.8	ANÁLISIS CITOGENÉTICOS EN LAS PAREJAS.....	42
5.8.1	<i>ESTUDIO POR CITOGENÉTICA CONVENCIONAL (BANDEO GTG)...</i>	<i>42</i>
5.8.2	<i>ESTUDIO POR CITOGENÉTICA MOLECULAR (FISH) .....</i>	<i>43</i>
5.9	EVALUACIÓN DE LA RESERVA OVÁRICA.....	44
5.10	SISTEMATIZACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN .....	44
5.11	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS.....	46

5.12	CONSIDERACIONES ÉTICAS .....	46
<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
6.1	ASPECTOS CLÍNICOS DE LAS PAREJAS CON ABORTO RECURRENTE: .....	47
6.2	CARACTERIZACIÓN DE LOS ABORTOS.....	48
6.3	FACTORES DIAGNÓSTICOS INFLUYENTES SOBRE LOS ABORTOS	52
6.4	ANTECEDENTES PATOLÓGICOS, FAMILIARES Y PERSONALES ....	54
6.5	ASPECTOS GENÉTICOS .....	56
6.5.1	<i>GRUPO CONTROL</i> .....	57
6.5.2	<i>PRESENTACIÓN DE CASO PACIENTE mos 1</i> .....	59
6.5.3	<i>PRESENTACIÓN DE CASO PACIENTE mos 2</i> .....	63
6.6	MEDICIÓN DE LA RESERVA OVÁRICA EN LAS PACIENTES <i>MOS1 Y MOS2</i> .....	64
<b>7</b>	<b>ANÁLISIS DE RESULTADOS .....</b>	<b>67</b>
7.1	FACTORES DIAGNOSTICADOS EN LAS 20 PAREJAS ABORTADORAS .....	67
7.2	ANTECEDENTES PATOLÓGICOS, FAMILIARES Y PERSONALES EN LAS 20 PAREJAS CON ABORTO RECURRENTE.....	71
7.3	ASPECTOS GENÉTICOS DE LOS MOSAICISMOS DE BAJA PROPORCIÓN EN CROMOSOMAS SEXUALES EN PAREJAS CON ABORTO RECURRENTE .....	72
7.4	POSIBLES IMPLICACIONES BIOLÓGICAS DE LOS MOSAICISMO DE BAJA PROPORCIÓN EN CROMOSOMA SEXUAL EN LAS MUJERES ABORTADORAS .....	80
7.5	ASPECTOS CLÍNICOS DE LAS PACIENTES CON MOSAICISMO DE BAJA PROPORCIÓN EN CROMOSOMA X .....	82
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>85</b>
<b>9</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>87</b>
<b>10</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>88</b>

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Símbolos y abreviaciones más comunes usados en el Sistema Internacional de Nomenclatura para Citogenética Humana (ISCN., 1995) .....	13
Tabla 2. Factores etiológicos asociados con pérdida fetal. ....	24
Tabla 3. Registro de información del proyecto. ....	46
Tabla 4. Datos obstétricos de las 20 abortadoras con respecto al grupo control. ....	47
Tabla 5. Relación entre tipo de aborto, edad materna, edad gestacional y estudio citogenético.....	50
Tabla 6. Relación entre la cantidad de abortos presentados y el número de parejas afectadas con especificación de promedio de edad gestacional y edad materna en el momento de las pérdidas. ....	51
Tabla 7. Hallazgos citogenéticos en los 6 productos de aborto estudiados. ....	51
Tabla 8. Frecuencia de factores diagnósticos señalados en las 20 parejas estudiadas por aborto recurrente. ....	53
Tabla 9. Antecedentes patológicos y familiares reportados por las 20 parejas con aborto recurrente.....	55
Tabla 10. Descripción del porcentaje de anomalía cromosómica encontrado en las 20 parejas remitidas para estudio citogenético.....	56
Tabla 11. Especificación de los resultados citogenéticos de acuerdo con la cantidad de abortos presentados en las 20 parejas remitidas. ....	56
Tabla 12. Hallazgos citogenéticos de las mujeres con mosaicismo de baja proporción en cromosomas sexuales. ....	58
Tabla 13. Comparación entre el porcentaje de aneuploidía observado por FISH en 1000 núcleos interfásicos en las pacientes con mosaicismo de baja proporción en cromosoma sexual (mos1 y mos2) y sus respectivas controles.....	58
Tabla 14. Comparación de los hallazgos citogenéticos convencionales (Bandeo GTG) y moleculares (FISH) en mujeres control entre las edades de 23 a 42 años. ....	58
Tabla 15. Datos acerca de los abortos padecidos por la paciente mos1.....	60

Tabla 16. Datos acerca de los abortos padecidos por la paciente mos2.....	64
Tabla 17. Medición de la FSH en el día tres del ciclo menstrual en las pacientes mos1 y mos2 con sus respectivos controles de la misma edad. ....	64
Tabla 18. Comparación de hallazgos citogenéticos en estudios mundiales de parejas con aborto recurrente reportados entre 1980 y 2003. ....	73
Tabla 19. Comparación de los mosaicos de baja proporción en cromosomas sexuales hallados en el presente estudio con respecto a los reportados en la literatura mundial mediante análisis convencionales por bandeó GTG.....	76
Tabla 20. Descripción clínica y citogenética de las pacientes afectadas por mosaicismo de baja proporción en cromosomas sexuales. ....	84

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cariotipo e Idiograma humano en bandeado G con complemento cromosómico de sexo masculino 46,XY .....	9
Figura 2. Proceso de evaluación y pruebas diagnósticas sugeridas para el seguimiento de parejas con aborto recurrente.....	40
Figura 3. Frecuencia de abortos preclínicos, embriónicos y fetales ocurridos en las 20 parejas con aborto recurrente.....	50
Figura 4. Relación entre la cantidad de abortos presentados y el número de parejas afectadas. ....	51
Figura 5. Frecuencia de factores diagnósticos señalados en las 20 parejas estudiadas por aborto recurrente. ....	52
Figura 6. Árbol genealógico paciente <i>mos1</i> .....	61
Figura 7. Fotos de los estudios citogenéticos realizados en la paciente <i>mos1</i> . ....	62
Figura 8. Árbol Genealógico de paciente <i>mos 2</i> . ....	65
Figura 9. Fotos de los estudios citogenéticos realizados en la paciente <i>mos2</i> . ....	66
Figura 10. Comparación de la frecuencia de hipodiploidías detectadas por FISH en 1000 núcleos interfásicos, entre mujeres controles del presente estudio (Cecolfes, 2005) y mujeres normales reportadas por Guttenbach et.al. (1995) y Devi A.S.et.al. (1998). ....	79
Figura 11. Comparación de la frecuencia de hipodiploidías detectadas por FISH en 1000 núcleos interfásicos, entre las mujeres abortadoras con mosaicismo y los controles normales del reporte internacional de Guttenbach et.al. (1995) y Devi A.S.et.al. (1998) y del presente estudio (Cecolfes, 2005) .....	79

# 1 INTRODUCCIÓN

Desde 1970 con la implementación de las técnicas de bandeado cromosómico y los recientes avances en citogenética molecular, se han identificado en diversas entidades clínicas, anomalías cromosómicas numéricas y estructurales, estableciendo relaciones entre el fenotipo y el genotipo. Estos hallazgos no sólo han orientado el diagnóstico clínico, sino que han permitido direccionar el tratamiento de los pacientes y fundamentar la consejería genética.

Una de estas entidades es el aborto recurrente, el cual es diagnosticado cuando una pareja presenta tres o más pérdidas consecutivas antes de las 20 a 28 semanas de gestación. En la población americana el aborto recurrente ocurre entre el 1 y 2% de las parejas, en la población europea entre un 2 y 7% y en la asiática entre un 2 y 5% (Hogge W.A., *et.al.*, 2003, Christiansen O.B., *et. al.*, 2005., Kuo P.L. and Guo H.R., 2004).

Los factores etiológicos de la pérdida habitual del embarazo son muy heterogéneos, los más reconocidos comprenden las anomalías uterinas y las anomalías cromosómicas estructurales balanceadas, también se incluyen defectos en la fase luteal, desórdenes sistémicos maternos, desórdenes endocrinos, y desórdenes autoinmunes. No obstante, a pesar de los enormes avances en el estudio de parejas con aborto recurrente, en el 50% de los casos, no han sido encontradas las causas que expliquen las pérdidas (Lee R.M. and Silver R.M., 2000).

Actualmente está en discusión el reconocimiento de algunas causas tales como; las infecciones maternas, desórdenes autoinmunes y mosaicismos de baja proporción en cromosomas sexuales, como posibles responsables de muchas de las pérdidas en estos pacientes que experimentan aborto recurrente y que posiblemente son subdiagnosticados (Christiansen O.B., *et. al.*, 2005., Kuo P.L. and Guo H.R., 2004).

Desde el punto de vista citogenético, la presencia de mosaicismos de baja proporción con aneuploidías en cromosomas sexuales, se han asociado con desarrollo sexual anormal y falla reproductiva, evidenciada en amenorrea primaria o secundaria, infertilidad y/o falla ovárica prematura, sin embargo, permanece muy oscura su relación con el aborto recurrente. Por ello, surge la necesidad de realizar un diagnóstico citogenético más extensivo a nivel convencional y molecular, para analizar un mayor número de células y corroborar la presencia real de un mosaicismo

de baja proporción, con respecto a los estudios de rutina que pueden llegar a dar un subdiagnóstico o generar dudas sobre la veracidad de sus hallazgos.

## 2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Actualmente, los análisis citogenéticos de rutina sobre productos de aborto es una práctica poco común, por muchos factores tales como; la omisión misma del estudio citogenético dentro del repertorio de exámenes autorizados por las entidades promotoras de salud, imposibilidad del estudio por envío inapropiado de las muestras (Formol, Transporte), selección inadecuada del tejido, entrega tardía de la muestra al laboratorio, contaminación de los cultivos o falla en el crecimiento celular. Esta problemática ha repercutido de manera importante en el manejo de las parejas con pérdida recurrente de la gestación, porque se pierde por completo el referente genético que estas muestras únicas e irrepetibles pudiesen brindar.

A esta gran problemática, se suma la poca disponibilidad de estudios genéticos que diagnostiquen en las parejas, factores etiológicos relacionados con la pérdida habitual de la gestación.

Como un aporte a esta problemática, surgió el interés de implementar a nivel citogenético, un proceso diagnóstico más extensivo con pruebas convencionales y moleculares que permitieran hallar en las parejas con aborto recurrente desbalances cromosómicos, como los mosaicismos de baja proporción en cromosomas sexuales, que al ser poco asociados con esta entidad patológica, muchas veces han sido subdiagnosticadas y por ende subestimado el factor genético en las parejas.

Se espera dar aportes citogenéticos a la comunidad médica y científica para decidir y justificar investigaciones futuras en este tipo de parejas y para plantear la consejería reproductiva más adecuada en quienes intentan entender el porqué sus embarazos culminan en pérdidas y con base en ello decidir sobre un nuevo intento.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer la frecuencia de mosaicismos de baja proporción en cromosomas sexuales, en una población colombiana de parejas con antecedente de aborto recurrente.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar un estudio citogenético caso – control para el diagnóstico de mosaicismos de baja proporción en cromosomas sexuales en parejas con aborto recurrente, mediante técnicas convencionales (Bandeo GTG) y moleculares (Hibridación in situ con Fluorescencia).

Valorar los factores diagnósticos encontrados durante el proceso de evaluación clínico – patológica de las parejas con aborto recurrente.

Realizar interpretaciones sobre los hallazgos citogenéticos y clínicos en las parejas con aborto recurrente, especialmente en aquellas que estén afectadas por mosaicismo de baja proporción en cromosomas sexuales.

## 4 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

### 4.1 ASPECTOS HISTÓRICOS DE LA CITOGENÉTICA

La citogenética es un área de la Genética que estudia todo comportamiento o evento celular, basado en el análisis de la estructura y función de los cromosomas y sus asociaciones con fenómenos genéticos y el desarrollo orgánico, físico y poblacional de los organismos. Los avances históricos en este campo son los siguientes:

- 1875, *Eduard Strasburger*, registró las primeras observaciones de cromosomas en plantas.
- En 1879 – 1889 *Walter Flemming*, reportó observaciones cromosómicas en animales.
- 1952, *Hsu T.C. y Tjio J.H.*, identificaron 48 cromosomas humanos
- 1956, *Levan A.*, identificó los 46 cromosomas humanos
- 1959, *Lejeune J. y col.*, reportaron la trisomía 21 como primera cromosomopatía y a partir de allí se constituyó en un campo propio de estudio dentro de la Genética Médica.
- 1960, Primera conferencia en Denver sobre el Sistema de Nomenclatura Citogenética Internacional para Cromosomas Humanos (ISCN).
- 1968 *Caspersson y col.*, implementaron las técnicas de bandeado cromosómico.
- 1981, *Langner et al.*, describieron la técnica de Hibridación in situ con Fluorescencia (FISH)
- 1986, *Pinkel, et al.*, mejoraron la descripción de la técnica de FISH
- 1990, *Nederlof, et al.*, describieron el FISH multicolor
- 1990, *Senger, G et al.*, reportó la técnica de microdissección sobre cromosomas bandeados.
- 1996, *Schrock et al.*, implementaron la técnica de Cariotipo Espectral (SKY) e Hibridización Genómica Comparativa (CGH) (Barch, *et al.*, 1997)

### 4.2 CARIOTIPO

El análisis cromosómico se puede realizar en diferentes tejidos como, sangre periférica, líquido amniótico, piel (Dermis), médula ósea, nódulos linfáticos, testículos, sangres leucémicas, tumores sólidos, fluidos pleurales y sangre fetal o de recién nacido; pero también en células que han sido estimuladas en cultivo para entrar en activa división como linfocitos sanguíneos (Barch, *et al.*, 1997).

El cariotipo es una forma de análisis cromosómico que se basa en el ordenamiento estándar de los cromosomas contenidos en una célula, de acuerdo con su tamaño, localización del centrómero y patrón de bandeo. Comprende técnicas de cultivo celular in vitro para analizar cromosomas durante la profase tardía o la metafase, estadios en los cuales están más condensados y con una morfología más definida que permite ordenarlos, compararlos y analizarlos. Con base en el criterio de tamaño y posición del centrómero los cromosomas pueden ser de cuatro tipos:

- Metacéntricos: Si el centrómero está localizado en la parte media del cromosoma designando dos brazos sensiblemente iguales.
- Submetacéntrico: Si el centrómero está mas cerca de uno de los extremos del cromosoma, determinando claramente un brazo corto o p (petit) y uno largo o q (por ser la letra del alfabeto que le sigue a la p).
- Acrocéntrico: Si el centrómero está situado hacia uno de los extremos quedando un brazo p muy reducido poco observable. En el caso de los humanos se observan dos pequeñas estructuras similares a palillos de tambor denominados satélites.
- Telocéntricos: Si carece totalmente de brazo corto. En el caso de los humanos no existe este tipo de cromosomas (Salamanca, 1993)

Al aplicar los criterios de organización aportados por el cariotipo y el patrón de bandas ha sido más fácil la ubicación de los pares homólogos en grupos morfológicos que en el caso de los humanos comprende 7 grupos designados con letras así:

- Grupo A: Son los metacéntricos grandes, que incluyen los pares homólogos 1, 2 y 3, aunque el 2 es submetacéntrico
- Grupo B: Son los submetacéntricos grandes, que incluyen los pares homólogos 4 y 5.
- Grupo C: Son los submetacéntricos medianos, que incluyen los pares autosómicos del 6 al 12 y el cromosoma X.
- Grupo D: Son los acrocéntricos grandes, que incluyen los pares homólogos 13, 14 y 15 caracterizados por presentar satélites en sus brazos cortos.
- Grupo E: Son los submetacéntricos pequeños, que incluyen los pares homólogos 16, 17 y 18, aunque el par 16 tiende a ser metacéntrico.
- Grupo F: Son los metacéntricos pequeños, que incluyen los pares homólogos 19 y 20.

- Grupo G: Son los acrocéntricos pequeños, que incluyen los pares homólogos 21 y 22 que presentan satélites en sus brazos cortos y el cromosoma Y, que aunque es morfológicamente acrocéntrico carece de satélites y constituye junto con el X el par 23, único del cariotipo no homólogo estructuralmente (Barch, *et. al.*, 1997, Solari, 1999, Rooney, 2001, Therman, *and* Susman, 1993).

Existen polimorfismos cromosómicos que se definen como variantes cromosómicas en tamaño, estructura y forma, a los que no se les ha asociado ningún tipo de patología específica o anormalidad cromosómica. Su frecuencia en la población, es más elevada de lo que se esperaría en una tasa normal de mutación recurrente (es decir que es mucho más habitual que una mutación común). En algunos casos, dichos polimorfismos contribuyen a identificar el origen paterno o materno de las anormalidades cromosómicas. Algunos de los polimorfismos más habituales son los relacionados con:

- Tamaño: (Longitud del cromosoma) son cambios en la longitud de algunos segmentos cromosómicos.
- Brazos cortos, tallos y satélites: en cromosomas acrocéntricos, cuando los brazos cortos aparecen de tamaño aumentado (p+) o con aparente delección (p-) y los tallos y satélites aparecen duplicados en tandem o separados. También pueden presentar variación en la intensidad de tinción o fluorescencia.
- Constricciones secundarias o zonas heterocromáticas: Corresponden a zonas de heterocromatina constitutiva, son ampliamente polimórficas en la población humana en cuanto a su tamaño, se encuentran en las regiones proximales de los brazos largos de los cromosomas 1, 9 y 16, la porción distal del brazo largo del cromosoma Y y los brazos cortos y satélites de los cromosomas acrocéntricos. Estas regiones portan distintos tipos de ADN satélite o altamente repetitivo (Barch, *et. al.*, 1997, Rooney, 2001).

#### 4.2.1 TÉCNICAS DE BANDEO CROMÓSOMICO

Las técnicas de bandeo, permiten visualizar un patrón característico de cada cromosoma, haciendo posible comparar los cromosomas individualmente y los miembros de un par homólogo. La identificación de las bandas toma como referencia ideogramas estándar (esquema que representa la distribución normal de las bandas cromosómicas obtenidas bajo una técnica particular) los cuales varían según el nivel

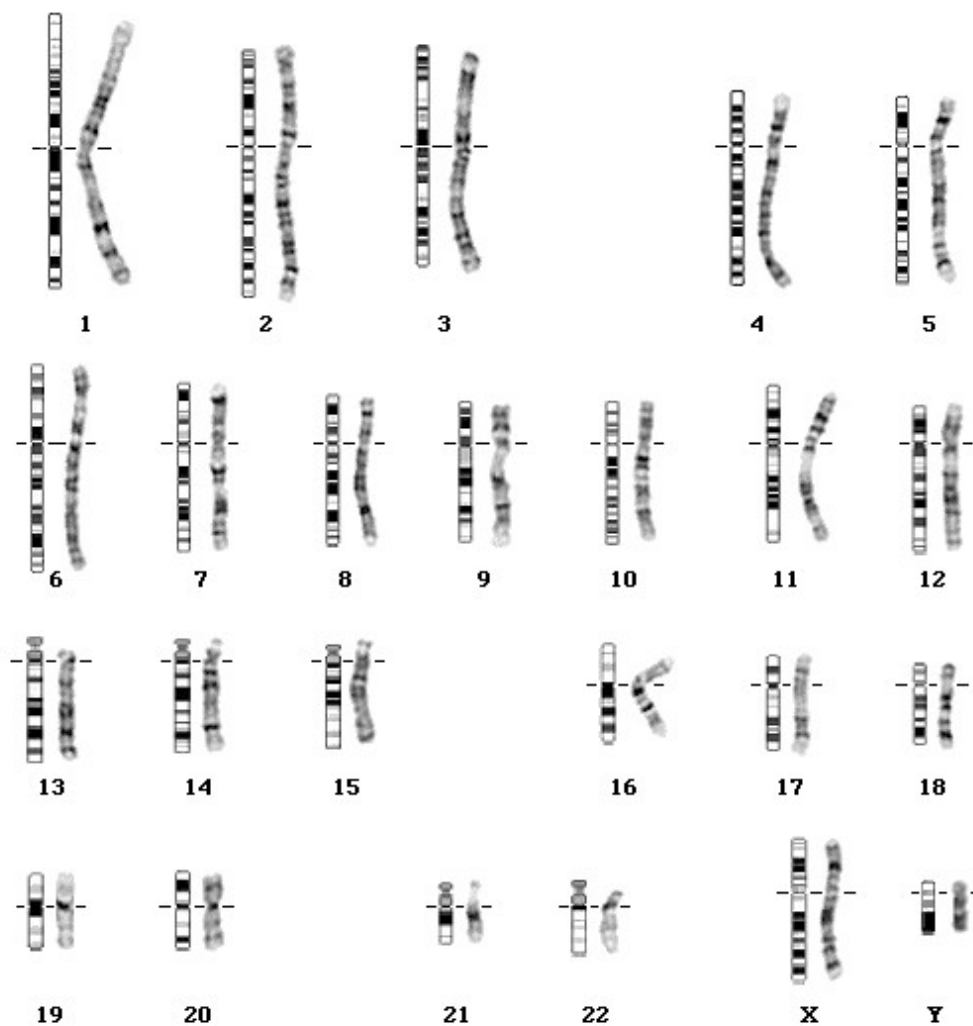
de resolución de los cromosomas. Es así como en cromosomas metafásicos, el número total de bandas detectables en todo el cariotipo humano no pasa de 400. Sin embargo, cuando se observan cromosomas prometafásicos, el número de bandas puede llegar a sobrepasar las 1000, siendo un patrón de bandeado de alta resolución que difiere del anterior por el desdoblamiento de bandas metafásicas en subbandas (Solari, 1999, Rooney, 2001). (Figura 1)

Las técnicas de bandeado cromosómico más utilizadas sobre cromosomas metafásicos y prometafásicos son bandeado GTG (Giemsa – Tripsina), bandeado RT (Replicación tardía), bandeado Q (Quinacrina), bandeado C (Centromérico), bandeado T (Telomérico) y bandeado NOR (Organizadores nucleolares). (Salamanca, 1993, Verma, R.S. and Babu, A. 1995).

#### 4.2.2 CARIOTIPO ANORMAL

Las anomalías cromosómicas o cromosomopatías son interesantes desde varios puntos de vista biológicos; resultan útiles para profundizar en la función génica a escala genómica, revelan aspectos importantes de la meiosis y de la arquitectura cromosómica, constituyen herramientas muy útiles para la manipulación genómica experimental y permiten profundizar en los procesos evolutivos. De igual forma, su conocimiento es básico para la genética médica y para la evaluación de las enfermedades de causa cromosómica (Griffiths, *et. al.*, 2000, Moreno García y col., 2004).

El amplio rango de anormalidades cromosómicas, dado a partir del complemento diploide normal de la especie humana conduce a fetos no viables que usualmente se abortan en el primer trimestre, sin embargo, las pequeñas variaciones del patrón normal que conducen al nacimiento de niños con diferentes tipos de defectos o malformaciones, dependen de la naturaleza de la anormalidad y de los cromosomas involucrados en la alteración. Desde 1959, se describió la primera anormalidad cromosómica humana, la trisomía 21, que caracteriza el Síndrome de Down y a partir de allí la citogenética humana se constituyó en un campo de gran interés para la completar los análisis acerca del origen y patogenia de muchas anormalidades. Las cromosomopatías se observan en un 0.5 a 0.7% de los recién nacidos vivos; se encuentran en un 6% de los fallecimientos en la época perinatal y en un 50% de los abortos espontáneos (Moreno García y col., 2004).



**Figura 1. Cariotipo e Idiograma humano en bandeo G con complemento cromosómico de sexo masculino 46,XY** (Tomado de <http://www2.alcala.es/biomodel/citogene/dynacare/ideogrm2.htm>)

Las anomalías cromosómicas humanas se dividen en tres grupos; las numéricas, las estructurales y los mosaicismos:

#### 4.2.2.1 ANOMALÍAS NUMÉRICAS:

Las anomalías numéricas son causadas por la pérdida o ganancia de contenido cromosómico, pueden ser a nivel sómico (aneuploidías) involucrando monosomías, trisomías, tetrasomías y doble trisomías) y a nivel ploídico (euploidías aberrantes) como triploidías, tetraploidías y poliploidías.

#### 4.2.2.2 ANOMALÍAS ESTRUCTURALES:

Las anomalías estructurales son causadas por rompimientos cromosómicos, seguidos por la pérdida o reordenación de los fragmentos afectados, ocasionando una alteración en el patrón morfológico y distribución del bandeo normal de los cromosomas. Pueden ser estables, es decir, que se mantienen constantes durante las sucesivas divisiones celulares del organismo (deleción, duplicación, translocación, inserción, inversión e isocromosoma) o inestables cuando no se mantienen constantes durante las sucesivas divisiones celulares del organismo conllevando a que el individuo pueda tener muchas poblaciones celulares con diferentes constituciones con respecto a la anomalía original (cromosoma en anillo, dicéntrico, tricéntrico, fragmento acéntrico, triradio y cuadriradio) (Barch,1997).

#### 4.2.2.3 MOSAICOS O MIXOPLOIDIAS:

Son anomalías en las cuales coexisten en un mismo organismo dos o más líneas celulares cromosómicamente diferentes, cada condición detectada en el mosaico debe ser vista como mínimo en dos células. Las líneas celulares presentes en un mosaico, pueden presentar diferentes complementos cromosómicos, de tal forma que no siempre se encuentra una línea celular normal. Los mosaicos pueden contener células normales, con líneas aneuploides y/o euploides aberrantes, o solo líneas celulares anormales con aneuploidías y/o euploidías aberrantes e incluso con rearrreglos estructurales (Solari, 1999, Thompson MW., 1991, Moreno García y col., 2004).

Los principales efectos genéticos de estos diferentes tipos de rearrreglos cromosómicos pueden conducirse hacia la pérdida de material genético, ganancia de material o relocalización de segmentos cromosómicos. La pérdida de material cromosómico, puede ser causada por pérdida de cromosomas enteros (monosomías),

deleciones o translocaciones no balanceadas. La teoría patogenética estándar sostiene que tales cambios pueden remover genes vitales para el funcionamiento normal del individuo. La ganancia de material genético puede darse por errores en la segregación dando lugar a trisomías o polisomías más extensivas. La duplicación de regiones o segmentos cromosómicos particulares pueden también conducir a un producto génico desbalanceado o sobreexpresado. En todos los casos, un simple efecto de dosis puede ser un mecanismo por medio del cual el DNA extra es influyente en el fenotipo del individuo. La relocalización de secuencias a nivel intracromosomal (inversiones) o intercromosomal (translocaciones e inserciones) interfieren en la alteración de la regulación génica o conllevan a formar nuevos genes de fusión patogenéticamente importantes (Klung, *and* Cummings, 2000, Moreno García M. y col., 2004).

#### 4.2.3 NOMENCLATURA CITOGÉNÉTICA

Se ha establecido un “Sistema Internacional de Nomenclatura para Citogenética Humana” (SINCH = ISCN en inglés) por medio del cual la descripción del cariotipo normal y anormal está estandarizada. Este Sistema de Nomenclatura se creó a partir de la necesidad de categorizar los casos normales y anormales y de lograr una comunicación común entre investigadores, médicos, citogenetistas y demás profesionales relacionados con el área. El comité de soporte del ISCN recomienda que este sistema de nomenclatura sea usado en otras especies.

Las primeras conferencias fueron llevadas a cabo en 1960 en Denver, 1963 en London y 1966 en Chicago y debido a que en esa época aún no se habían estandarizado las técnicas de bandeado cromosómico, la nomenclatura se basó sobre cromosomas no bandeados, describiendo y organizándolos por tamaño, localización del centrómero y proporción del brazo. En 1971, un año después de reportarse las técnicas de bandeado cromosómico se realizó en París la conferencia que estableció el primer marco de referencia que señaló las reglas para describir los cromosomas bandeados por coloraciones fluorescentes y no fluorescentes. Este sistema original se sometió a varias revisiones y redefiniciones (París 1975, Stockholm 1977, París 1970, Memphis 1994), la última revisión reportada en 1995 produjo el manual de uso actual para Nomenclatura Citogenética Internacional (*ISCN.*, 1995).

La denominación de un cariotipo comienza con el número cromosómico, continúa con la fórmula sexual y después se inscriben las diferentes anomalías cromosómicas designadas por sus respectivas abreviaturas en letra minúscula y

especificando los cromosomas, regiones, bandas y subbandas implicadas (46, XX o 46,XY). El ISCN, estableció para descripción de las anomalías parámetros específicos para la designación del cariotipo, éstos usan símbolos de comprensión internacional encaminados a explicar el tipo de rearrreglo, puntos de rotura y estructura morfológica de los cromosomas derivados que intervinieron en los rearrreglos. Para descripción de las anomalías estructurales existe tanto un sistema corto como un sistema detallado de nomenclatura.(Tabla 1)

#### 4.2.3.1 NOMENCLATURA DE MOSAICISMOS DE BAJA PROPORCIÓN

Si bien el Sistema actual de nomenclatura define un mosaico cromosómico como la presencia de dos o más líneas celulares con un complemento cromosómico particular hallado en por lo menos dos células, no da un número mínimo de metafases a analizar para excluir un mosaico, ni muestra porcentajes mínimos y máximos de células aneuploides requeridas para definir un mosaicismo de baja proporción. En la práctica citogenética es notorio, que al observarse una anomalía en cromosoma sexual en un bajo porcentaje de las células, se sospeche que sea un artefacto. Sin embargo, en reportes sobre estudios citogenéticos en parejas con aborto recurrente o infertilidad, el manejo de sus resultados, deja como evidencia que no existe un consenso sobre la definición de mosaicismo ni mosaicismo de bajo nivel (Morel F., *et al.*, 2002).

En varias investigaciones en parejas con aborto recurrente e infertilidad, los autores consideran que para incluir una anomalía en un mosaico, deben observarse dos o más células con la misma alteración, no obstante, el número de metafases analizadas de base es diferente entre los estudios (15, 20, 25 y 30 metafases), así como el número de metafases leídas cuando se extiende el conteo para confirmar un posible mosaico (50, 100 o 150) y el criterio para extender o no el conteo (hallazgo de 2 células con la misma anomalía en las primeras 15 metafases leídas o de 1 anomalía en las primeras 16, 20 o 30 metafases). Todas estas variaciones, en muchos de los casos limita la comparación de los resultados. Igualmente, la definición de mosaicismo de baja proporción es variable en la comunidad científica, la mayoría de los autores lo definen como la presencia de menos del 10% de células anormales y otros menos del 6% (Morel F., *et al.*, 2002).

<b>ABREVIACIONES USADAS POR EL ISCN 1995</b>	
ace	Fragmento acéntrico
del	Delección
der	Cromosoma derivativo
dic	Dicéntrico
dup	Duplicación
fra	Sitio Frágil
i	Isocromosoma
ins	Inserción
inv	Inversión o Invertido
mar	Cromosoma marcador
p	Brazo corto
q	Brazo largo
qr	Cuadriradial
r	Cromosoma en anillo
trc	Tricéntrico
t	Translocación
tr	Triradial
<b>SÍMBOLOS</b>	
;	Separa cromosomas alterados y puntos de rompimiento en rearrreglos estructurales involucrando más de un cromosoma
( )	Rodea cromosomas alterados estructuralmente y rompimientos
+	Ganancia
-	Pérdida de material
: :	Se rompió y se reunió
/	Separa líneas celulares en la descripción del mosaico
→	Desde hasta

**Tabla 1. Símbolos y abreviaciones más comunes usados en el Sistema Internacional de Nomenclatura para Citogenética Humana (ISCN., 1995).**  
Abreviaciones y símbolos a tener en cuenta en la descripción de los cariotipos, según las normas actuales de nomenclatura.

Se conoce desde 1961 que las aneuploidías en cromosomas sexuales en cultivos de linfocitos están relacionadas con la edad en ambos sexos, no obstante, son más incrementadas en mujeres que en hombres, siendo la pérdida del cromosoma X más frecuente que la ganancia en mujeres. Un profundo incremento de células hipodiploides ha sido observada en mujeres entre 45 y 60 años de edad por algunos citogenetistas mientras que por otros se ha observado en mujeres mayores de 60 años. Por estas razones es importante que estudios de aneuploidías en caso control, los individuos control tengan la misma edad de las pacientes en orden a eliminar el efecto de la edad sobre el riesgo de aneuploidía (Morel F., *et al.*, 2002).

#### 4.3 ABORTO ESPONTÁNEO

De acuerdo con la definición planteada por la Organización Mundial de la Salud desde 1977, en la comunidad científica el aborto es definido como “la expulsión o extracción de su madre de un embrión o feto que pese 500g o menos”. En Estados Unidos y Australia el término aborto espontáneo es usado para la pérdida inesperada y no planeada del embarazo antes de las 20 semanas de gestación, después de este tiempo la pérdida es definida como muerte fetal intrauterina o parto prematuro (Cramer, D.W., and Wise, L. A., 2000, Schreck and Silverman, 2002).

A nivel mundial, la incidencia de un aborto espontáneo ha sido estimada por varios autores entre un 10 a 15% de todas las gestaciones, mientras que la prevalencia de dos pérdidas oscila entre un 2 a 4% y las de tres pérdidas consecutivas en menos del 1%. Los datos epidemiológicos muestran que el riesgo de un subsiguiente aborto en una mujer con al menos un hijo recién nacido es aproximadamente del 24% después de una pérdida clínica, 40% después de dos y 32% después de tres abortos espontáneos consecutivos, en las mujeres que no tienen hijos nacidos vivos, la tasa de pérdida fetal es del 46% si la mujer tiene al menos una pérdida fetal anterior. El riesgo de incidencia incrementa con la edad para mujeres después de los 33 años y para los hombres después de los 53 años (Roberts, C.P. and Murphy A.A., 2000).

Estas prevalencias varían dependiendo las diferencias en los métodos de estimación de la tasa de pérdida fetal; pues el aborto espontáneo se ha subdefinido sobre hallazgos patológicos y edad gestacional de la pérdida, los cuales contemplan la evaluación de la subunidad beta Gonadotropina Coriónica Humana ( $\beta$ -HCG) en la gestación temprana o evaluación de embarazos reconocidos clínicamente. Del 10 al

15% de los embarazos clínicamente reconocidos, culminan en aborto, frecuentemente durante el primer trimestre del embarazo:

- EMBARAZO BIOQUÍMICO: Se presenta cuando la subunidad  $\beta$  - HCG materna es positiva dentro de los 10 días después de la ovulación sin evidencia adicional de embarazo ni subsecuente disrupción del ciclo menstrual.
- ABORTO PRECLÍNICO: Ocurre anterior a la sexta semana de gestación debido a falla en implantación o aborto seguido de la implantación.
- EMBARAZO ANEMBRIONADO: Se presenta saco gestacional vacío usualmente diagnosticado por ultrasonido entre las 5 y las 7 semanas de gestación.
- ABORTO SILENCIOSO: Se evidencia partes fetales desorganizadas sin actividad cardíaca retenido en el útero por varias semanas, más allá del tiempo de la muerte fetal.
- ABORTO INEVITABLE COMPLETO E INCOMPLETO: Expulsión completa o incompleta del feto entre las semanas 7 y 10 de gestación por contracción del útero y dilatación del cervix (Schreck and Silverman, 2002).

#### 4.3.1 ANORMALIDADES CROMOSÓMICAS EN PÉRDIDA FETAL

La causa más común de aborto es la presencia de complementos cromosómicos anormales. Aunque la frecuencia de anomalías cromosómicas en recién nacidos examinados está en un rango entre 0.5 a 0.7%, se ha estimado que la tasa de concepción es muchas veces más alta. Esta, reducción de hasta 40 veces en la frecuencia de cromosomopatías entre la concepción y el parto se debe a la pérdida selectiva de fetos anormales durante la gestación (Schreck and Silverman, 2002, Rubio C., *et. al.*, 2003).

Las anomalías cromosómicas son responsables del 60% de todos los abortos esporádicos y del 29% al 60% de los abortos recurrentes. Un estudio retrospectivo norteamericano realizado por Hogge, W.A. *et.al.*, en 489 muestras de aborto, pone en evidencia que las alteraciones cromosómicas son causa de la pérdida del embarazo entre un 50 a 80% de los casos, dependiendo de la edad materna y la edad gestacional en el momento de la pérdida. Goddijn *and* Leschot recopilaron datos citogenéticos de 4696 abortos espontáneos reportados en 11 estudios a nivel mundial entre 1987 y 1998, el porcentaje acumulado de anomalía cromosómica, que mostró un rango de

38 a 83%, fue del 49%. En una recopilación similar realizada por Yusuf *and* Naeem de 10 estudios de aborto entre 1986 a 2002, exhibió un porcentaje de anomalías del 50% con un rango de 28 a 80% (Goddijn *and* Leschot, 2000, Schreck *and* Silverman, 2002, Hogge, W.A. *et. al.*, 2003, Yusuf *and* Naeem, 2004, Carp H., *et. al.*, 2004).

Además, estos autores como muchos otros, han observado en los abortos estudiados, mayor frecuencia de cultivos con complemento 46,XX, Yusuf *and* Naeem, reportan en productos de aborto una tasa de cariotipos normales de 0.75, igualmente Stephenson publica un 53.3% de complementos femeninos normales con una tasa de 0.87. Yusuf *and* Naeem plantean que el exceso de complementos cromosómicos femeninos detectados en material abortado es un resultado que contrasta con el porcentaje casi idéntico entre cariotipos femeninos y masculinos detectados tanto en estudios prenatales en vellosidades coriónicas en embarazos continuados como en población de recién nacidos (Stephenson M.D., *et al.*, 2002).

Los posibles mecanismos que pueden estar involucrados en este fenómeno: son la inactivación anormal del cromosoma X o la presencia de rearrreglos submicroscópicos. Goddijn *and* Leschot muestran que la inactivación anormalmente sesgada del cromosoma X durante las primeras etapas del desarrollo embrionario ha sido encontrada con mayor frecuencia en abortos recurrentes cuando es comparado con controles ( $7/48=14.6\%$  vs.  $1/68=1.5\%$   $p < 0.01$ ) y ( $14/76 =18\%$  vs.  $6/111=5\%$ ,  $p < 0.001$ ). Así mismo, Bell *et al.* en 1999, plantean que los cariotipos de abortos femeninos “normales” de productos de aborto, pueden portar rearrreglos submicroscópicos no detectados por citogenética convencional, tal como fue demostrado a través de técnicas de Reacción de Cadena Polimerasa (PCR) e Hibridación *in situ* con Fluorescencia (FISH) donde en muestras archivadas de abortos femeninos normales, estudiados por citogenética convencional, se ubicaron en un 29% secuencias específicas de cromosoma Y, indicadoras de una translocación no evidente. Sin embargo, a pesar de estas explicaciones, no se puede descartar del todo que el exceso de complementos cromosómicos normales femeninos, representen posiblemente la contaminación de los cultivos con células maternas. (Goddijn M. *and* Leschot N.J., 2000, Schreck *and* Silverman, 2002, Yusuf *and* Naeem, 2004 ).

La clasificación de las anomalías cromosómicas en los reportes internacionales, se subdividen en alteraciones numéricas, estructurales y mosaicismos. En la literatura mundial se muestra en orden descendente de frecuencia,

un mayor porcentaje de anomalías numéricas, estructurales y mosaicos, aún en estudios con poco número de pérdidas. En el reporte israelí de Carp, H. *et. al.* (2001), sobre 125 abortos espontáneos, 36 (29%) fueron anormales, predominando las anomalías numéricas (94%) sobre las estructurales (6%), este estudio no reporta mosaicos. Igualmente en la recopilación realizada por Goddijn *and* Leschot de 4696 abortos reportados mundialmente, predominan las anomalías numéricas (86%) sobre las estructurales (6%) y otras, donde se incluyen los mosaicismos (8%) (Goddijn M. *and* Leschot N.J., 2000, Carp, H. *et. al.*, 2001).

Las cromosomopatías en aborto incluyen en su mayor parte aneuploidías, particularmente trisomías en cromosomas autosómicos, las cuales abarcan el 50% de los fetos anormales citogenéticamente. Todas las trisomías autosómicas han sido documentadas en abortos, frecuentemente las incluyen los cromosomas 13, 14, 15, 16, 21 y 22, sin embargo, hasta la actualidad no se ha documentado la trisomía 1. La mayoría de las trisomías autosómicas se pierden entre las semanas 7 y 12 de la gestación, la trisomía más común (30% de todas las trisomías) vista en los abortos de primer trimestre es la trisomía 16, la cual sólo ha sido asociada con un desarrollo embrionario mínimo y letalidad embrionaria. Las trisomías con complementos cromosómicos 47,XXX, 47,XXY y 47,XYY son raramente observadas en abortos (0.2%) y frecuentemente sobreviven a término (Goddijn M. *and* Leschot N.J., 2000, Carp, H. *et. al.*, 2001, Schreck *and* Silverman, 2002, Yusuf *and* Naeem, 2004, Rubio C., *et. al.*, 2003).

Después de las trisomías, la monosomía del cromosoma X, evidenciada cromosómicamente como 45,X, es la alteración más frecuente, la cual ocurre en un 20% de las pérdidas dadas en el primer trimestre principalmente entre las 12 a 14 semanas de gestación. Las monosomías autosómicas son raramente encontradas y se piensa que son responsables de los abortos preclínicos. Las triploidías abarcan el 15% de abortos citogenéticamente anormales y se presentan entre las 7 a 17 semanas de gestación, las triploidías más frecuentes (66%) son resultado del fenómeno de dispermia principalmente o de espermias diploides que producen complementos 69,XXX y 69,XXY en el cigoto. Las tetraploidías, observadas sobre el 5% de los abortos cariotipados, cuyos complementos cromosómicos son 92,XXXX o 92,XXYY, son dadas por fallo en el clivaje celular durante la primera división mitótica posfecundación, los abortos tetraploides ocurren entre las 10 a 14 semanas de gestación.

Sólo 2% de los abortos espontáneos cariotipados son caracterizados por anomalías estructurales no balanceadas, donde la mitad de éstas son de *novo*. Las familias que portan anomalías cromosómicas estructurales, tienen un riesgo incrementado de presentar aborto recurrente (Schreck and Silverman, 2002, Rubio C., *et. al.*, 2003).

Los mosaicismos cromosómicos son poco frecuentes en productos de aborto. Dependiendo si el evento “mutacional” es anterior o posterior a la diferenciación de los compartimentos embriónicos y coriónicos, el mosaicismo puede ser confinado en la placenta, en el embrión o en ambos. Goddijn *and* Leschot y Cuur han reportado que la localización de las diferentes líneas celulares que constituyen el mosaico permiten formular posibles fenómenos para explicar la naturaleza de los mosaicos. Así como las líneas celulares normales de los mosaicismos pueden denotar un mecanismo de supervivencia gestacional cuando éstas se encuentran confinadas en la placenta, las líneas celulares anormales también pueden ser indicadoras de un mosaicismo fetal generalizado, de un evento anormal *in vitro* o de un error cromosómico que es restringido a tejidos extraembrionarios. Frente a estos dos últimos aspectos, Goddijn *and* Leschot indican que los mosaicismos confinados en la placenta a pesar de ser el principal origen de resultados falsos positivos en embarazos viables, de igual forma, tienen una importante correlación con la muerte de células fetales, pues se ha comprobado un alto porcentaje (19%) de aborto en mosaicismos confinados en la placenta (10/54 abortos), con respecto a los confinados en el embrión (2% - 1/54) y en la placenta y embrión (1% - 1/54) (Goddijn *and* Leschot, 2000)

Las líneas celulares 46,XX presentes en los mosaicos posiblemente son indicadoras de contaminación celular materna, puesto que en muchos casos son muestras de legrado que entremezclan altamente el material fetal y materno, y a pesar de seleccionar cuidadosamente los tejidos fetales en el momento de la siembra, pueden cultivarse células maternas de las cuales se derivarían probablemente las líneas celulares 46,XX.

Las pérdidas del embarazo después de la semana 15 de gestación comúnmente no son de origen cromosómico. Aunque se ha recomendado desde 1990 por Stirrat realizar el estudio citogenético a partir del segundo aborto espontáneo, en la actualidad cada vez son más los especialistas que recomiendan dicho estudio en todas

las pérdidas (Goddijin M. *and* Leschot N.J., 2000, Silvestre E. Y col., 2002, Muñeton C. y col., 1998).

#### 4.3.1.1 ANORMALIDADES CROMOSÓMICAS EN PÉRDIDA FETAL REPORTADAS A NIVEL NACIONAL

Mediante una búsqueda manual de los antecedentes bibliográficos en Colombia. Se encontró un estudio citogenético en Aborto Espontáneo, reportado por Muñeton C.M. y col. en 1998, el cual fue realizado en el Laboratorio de Genética Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia.

El objetivo de la investigación fue realizar un estudio citogenético y morfológico en productos de aborto espontáneo con edad gestacional menor de 20 semanas, recolectadas en el periodo de Septiembre de 1996 y Octubre de 1997. Este trabajo surgió por el antecedente de que en algunos casos los hallazgos macro y microscópicos en productos de aborto se pueden correlacionar con el cariotipo, permitiendo sospechar de esta forma una determinada alteración cromosómica cuando por razones técnicas fallan los estudios citogenéticos.

Las muestras obtenidas contenían embriones, fetos y/o membranas o material proveniente de curetajes realizados después de un aborto espontáneo incompleto e inevitable. Los estudios morfológicos para caracterización fenotípica de los productos incluyó análisis de fotografías, medidas biométricas, caracterización del tejido macroscópicamente (en membranas o sacos gestacionales rotos). Además en cada caso se procedió a completar un formato con información sobre antecedentes de las gestantes (edad, abortos previos y evolución de la gestación hasta el momento de la pérdida).

A las preparaciones cromosómicas obtenidas de los cultivos de tejidos se les realizó bandeo G y RT, analizando entre 10 y 50 metafases. Posteriormente se compararon los estudios morfológicos y citogenéticos para establecer una correlación entre el fenotipo y el cariotipo.

De los 84 abortos espontáneos remitidos, 16 fueron descartados por contaminación (9) o por ausencia de tejidos adecuados (7) y 68 fueron estudiados. De este último grupo, 47 carecían de embrión o feto y de los 21 restantes, 3 fueron embriones y 18 fueron fetos. A los 21 productos mencionados, se les pudo realizar estudio morfológico y a 60 estudios citogenéticos, de los cuales 26 fueron no exitosos y 34 exitosos. Es importante mencionar que la correlación cariotipo-fenotipo sólo se pudo realizar en 3 productos, puesto que de los 21 estudiados morfológicamente, sólo

3 fueron remitidos para estudio citogenético debido a que los restantes presentaban maceración, muerte temprana con retención o condiciones inadecuadas de recolección y envío (Formol) que imposibilitaron el cultivo celular o mostraron pobre crecimiento.

De los 34 productos de aborto espontáneo que presentaron cariotipo, el 50% fueron normales y el otro 50% fueron anormales. Dentro de las alteraciones encontradas se reporta un 58.8% de monosomía X (10 productos), un 29,4% de mosaicismos (46,XX/45,X en 2 productos, 46,XX/46,XY en 2 productos y 46,XY/45,X en 1 producto), 5.9% de trisomía (47,XX,+C) y 5.9% de tetraploidia (92,XXYY) correspondientes a un producto respectivamente.

De los 21 casos examinados, 12 (57.1%) presentaron algún tipo de anomalía morfológica o del desarrollo, siendo un porcentaje alto para un número de muestra tan pequeño. En cuanto a la asociación cariotipo-fenotipo, realizada en los 3 productos mencionados, se señaló que un feto de 12 semanas morfológicamente normal presentó cariotipo 46,XX, un feto de 16 semanas con rasgos morfológicos de posible Síndrome de Turner presentó efectivamente un cariotipo 45,X y el feto restante de 10 semanas estaba macerado y mostró un complemento cromosómico normal 46,XX.

Se concluyen aspectos como presencia de muestras no aptas para estudio citogenético que limitan la correlación morfológica con el cariotipo, frecuencia alta (75%) de aborto en el primer trimestre del embarazo y existencia de alta probabilidad de presentar anomalías cromosómicas en aquellos productos de aborto espontáneo que muestren evidencia de retardo en el crecimiento o malformaciones (Muñeton, y col., 1998, Ramirez J.L., 1998).

#### 4.4 ABORTO RECURRENTE

La definición ginecológica clásica del aborto recurrente es la pérdida consecutiva de tres o más embarazos antes de la semana 20 de gestación, sin embargo, en la práctica médica algunos especialistas incluyen en esta categoría a las parejas que presentan dos pérdidas consecutivas, incluso la mayoría de médicos consideran apropiado considerar una pareja como abortadora recurrente aún si las pérdidas no son consecutivas. Un estimado del 1% de las parejas que logran el embarazo sufren tres o más pérdidas consecutivas y un 5% tienen dos o más pérdidas consecutivas. La diferencia entre aborto recurrente y aborto espontáneo se ha realizado sobre la presunción que el aborto recurrente tiene una etiología distinta al

aborto esporádico dado de manera espontánea (Lee R.M. and Silver R.M., 2000, Cramer, D.W., and Wise, L. A, 2000).

Los datos empíricos muestran que una historia de pérdida del embarazo incrementa el riesgo de aborto en subsecuentes embarazos, éste riesgo va aumentando a medida que se suman las pérdidas consecutivas, es decir que el riesgo de aborto sin una historia previa de aborto es del 12%, después de una pérdida es del 24%, de tres del 32% y de 6 o más el riesgo es incrementado a un 53%. Los factores que pueden influenciar sobre este riesgo recurrente de pérdida del embarazo, incluyen la pérdida después del primer trimestre, historia de un parto pretérmino, problemas de infertilidad, edad materna y la pérdida de un feto cromosómicamente normal.

Tradicionalmente, la evaluación y tratamiento comienza después de la tercera pérdida de la gestación. Sin embargo, se ha demostrado que el riesgo de aborto espontáneo después de dos pérdidas sucesivas es similar al riesgo después de tres o más abortos consecutivos, así dependiendo de la edad de los pacientes, las mujeres con dos o más abortos son candidatas para una evaluación de las causas reconocidas de pérdida recurrente de la gestación.

La evaluación de parejas con aborto recurrente contempla la indagación de causas como factores genéticos (60%), desórdenes metabólicos y hormonales (20 al 40%), anormalidades anatómicas (15 a 27%), factores infecciosos (1 a 2%), desórdenes autoinmunes (20 al 40%), desórdenes trombofílicos y causas aloinmunes. No obstante, existen casos de causa idiopática en más del 50% de las parejas (Lee R.M. and Silver R.M., 2000, Lanasa, M.C. and Hogge W. A., 2000, Stephenson M.D. *et. al.*, 2002). (Tabla 2)

#### 4.4.1 ASPECTOS GENÉTICOS DEL ABORTO RECURRENTE

Desde el punto de vista genético, en la evaluación de parejas con aborto recurrente, han sido identificado dentro de un 3 a 5% factores como las anomalías cromosómicas (numéricas, estructurales y mosaicismos), las cuales son la causa más común de pérdida del embarazo en el primer trimestre, defectos monogénicos (ej: mutaciones en genes que predisponen a la no – disyunción y al origen de aneuploidías), inactivación preferencial del cromosoma X (18% de las parejas) e impronta génica.

<b>CAUSAS GENÉTICAS</b> <b>60%</b>	Anormalidades cromosómicas fetales o mutaciones monogénicas
	Anomalías estructurales parentales (translocaciones e inversiones)
	Mosaicismos cromosómicos (Mosaicismos en línea germinal)
	Inactivación preferencial del cromosoma X
	Impronta génica
	Desórdenes letales ligados a X
	Desórdenes monogénicos
<b>CAUSAS ANATÓMICAS</b> <b>15 al 27%</b>	<b>Mullerianas:</b>
	Útero doble (bicórneo, septado y didelfo), arqueado o unicórneo
	Agnesia segmental o hipoplasia (cervix incompetente)
	Exposición a Dietilestilbestrol (DES)
	<b>Adquiridas:</b>
	Síndrome Asherman's (Sinerquia uterina severa)
	Leiomiomatosis
	Endometriosis y Miomas
<b>CAUSAS HORMONALES</b> <b>20 al 40%</b>	Defecto Fase Luteal
	Desórdenes tiroideos
	Diabetes mellitus no controlada
	Hiperprolactinemia
	Síndrome de ovario poliquístico
	Hiperandrogenismo

<b>CAUSAS INMUNOLÓGICAS</b> <b>20 al 40%</b>	Autoinmunes:
	Síndrome de antifosfolípidos (Anticoagulante lúcido y Anticardiolipina)
	Autoanticuerpos de tejido tiroideo (anti-tiroglobulina y peroxidasa tiroidea)
	Alloinmunes:
	Compatibilidad de Antígenos Leucocitarios Humanos (HLAs) entre parejas
	Ausencia de anticuerpos maternos leucocitotóxicos
	Ausencia de anticuerpos bloqueadores maternos
	Inmunodesviación Th1 o Th2
<b>CAUSAS TROMBOFÍLICAS</b>	Estados de hipercoagulación
	Hiperhomocistinemia
	Deficiencia del factor XII activado
	Mutación en el factor V de Leiden
	Deficiencia de Antitrombina III
	Deficiencia de Proteína C
	Deficiencia de Proteína S
	Mutación en el gen de Protrombina (factor II)
	Mutación en el gen metilen tetrahidrofolato reductasa (MTHFR)
<b>CAUSAS INFECCIOSAS</b> <b>1 a 2%</b>	<i>Toxoplasma gondii</i>
	<i>Chlamidia trachomatis</i>
	<i>Micoplasma hominis</i>
	<i>Ureoplasma urealyticum</i>
	<i>Brucella abortus</i>
	Rubéola

	Virus Herpes Simple
	Citomegalovirus
	Virus melas
	Coxsackievirus
	Papilomavirus
	Virus adenoasociados
<b>CAUSAS AMBIENTALES O QUÍMICAS</b>	Exposición prolongada a alcohol, cigarrillo o cocaína
	Radiaciones ionizantes
	<b>Químicos:</b> Arsénico, Benceno, Anilina, Oxido de Etileno, formaldehído, Mercurio
	<b>Drogas:</b> Colchicina
<b>FACTOR MASCULINO</b>	Polizoospermia
	Oligospermia
	Hinchamiento Hipo-osmótico bajo
<b>CAUSAS IDIOPÁTICAS</b> >50%	¿?

**Tabla 2. Factores etiológicos asociados con pérdida fetal.** Los factores están clasificados en las categorías genéticas, hormonales, inmunes, infecciosas, trombofílicas, anatómicas, masculinas, ambientales y químicas. La significancia de muchas de ellas son debatidas o pendientes por comprobar en estudios más extensivos.

#### 4.4.1.1 ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS

El proceso diagnóstico de anomalías cromosómicas involucra el estudio citogenético para determinar si uno de los miembros de la pareja es portador de una anomalía cromosómica que pueda explicar las pérdidas. La pérdida de un feto cromosómicamente normal, aumenta el riesgo de pérdida en un subsecuente embarazo, lo que sugiere la influencia de otros factores, en este tipo de pérdidas (Fryns and Van Buggenhout, 1998, Hogge W.A. *et. al.*, 2003, Stephenson M.D: *et. al.*, 2002). Son muchos los estudios citogenéticos prospectivos y retrospectivos reportados a nivel mundial en parejas con diagnóstico de aborto recurrente, que reportan la alta incidencia de anomalías cromosómicas constitucionales, éstas contemplan con mayor frecuencia rearrreglos estructurales balanceados. Los más comunes son las translocaciones balanceadas, cubriendo las translocaciones recíprocas un 60% y las translocaciones robertsonianas un 40%. También se han reportado inversiones, que no implican la pérdida ni ganancia de material genético o en los casos donde ocurre pérdida de material cromosómico, ésta llega a ser no significativa clínicamente. En la pareja, estos rearrreglos son detectados con una frecuencia dos veces mayor en la mujer con historia de pérdida de la gestación, pues los rearrreglos estructurales masculinos están más frecuentemente asociados con infertilidad (Fryns and Van Buggenhout, 1998, Lee R.M. and Silver R.M., 2000, Schreck R. And Silverman N., 2002).

Las translocaciones balanceadas en cromosomas autosómicos y translocaciones robertsonianas predisponen a la alteración en conformación estructural de las tétradas durante la meiosis y la consecuente producción de gametos genéticamente no balanceados que dan como resultado fetos no viables con condiciones trisómicas o monosómicas o fetos portadores del rearrreglo que pueden llegar a término. El riesgo de aborto en parejas con translocaciones recíprocas está aproximadamente entre el 25 al 50% y con translocaciones robertsonianas es aproximadamente el 25%. Estudios prospectivos de parejas portadoras de translocaciones balanceadas indican que el 80% de sus embarazos culminan en aborto, 16% conducen al nacimiento de descendencia saludable y del 4 al 6% pueden presentar nacimientos con rearrreglos cromosómicos no balanceados, particularmente cuando el rearrreglo parental ha sido evaluado por su historial de pérdidas más que por

la presencia de nacimientos anormales. (Lee R.M. and Silver R.M., 2000, Schreck R. and Silverman N., 2002).

En las parejas con inversiones cromosómicas no se ha establecido un riesgo preciso de pérdida de la gestación. Estas han sido identificadas sobre el 0,3% de abortos recurrentes y las parejas que las portan tienen un riesgo entre el 4% al 8% de tener recién nacidos anormales. Este riesgo es altamente dependiente sobre el tipo de inversión, así, las inversiones paracentricas casi siempre originan gametos no viables con cromosomas acéntricos o dicéntricos a diferencia de las inversiones pericéntricas donde se pueden producir gametos no balanceados, con duplicaciones o deleciones. Las inversiones comúnmente reportadas son inv(9)(p12q13) y inv(2)(p11q12), se piensa que su asociación con pérdida recurrente o descendencia anormal es poco probable debido a que el *loop* creado durante la profase I de la meiosis contiene heterocromatina, en la cual el entrecruzamiento es suprimido, además se han reportado en población normal; catalogándose por la gran mayoría de los autores como un polimorfismo cromosómico (Thompson M:W. et al., 1991, Barch M., 1997, Schreck R. and Silverman N., 2002, Fryns, J.P. and Buggenhout G.V., 1998). La presencia de desórdenes heredados con baja viabilidad están también asociadas con pérdida recurrente del embarazo. Esto ocurre frecuentemente en casos con desórdenes dominantes ligados a X como por ejemplo, el Síndrome de Aicardi, Condrosplasia Punctata, Hipoplasia Dermal Focal, Incontinencia Pigmentaria, Síndrome Orofaciodigital o el Síndrome Rett. También en mujeres con pérdida recurrente, se ha asociado la inactivación sesgada del cromosoma X (> 90% de las células muestran el mismo X activo como rasgo opuesto al 50% esperado por azar). Este fenómeno anormal es dado posiblemente por la presencia de una deleción deletérea en un cromosoma X, sin embargo, este mecanismo de selección a partir del cual resulta una inactivación preferencial, se ha asociado con aborto espontáneo (Schreck R. And Silverman N., 2002).

#### 4.4.1.1.1 MOSAICISMOS DE BAJA PROPORCIÓN EN CROMOSOMAS SEXUALES EN PAREJAS CON ABORTO RECURRENTE

También se ha reportado en estos pacientes un bajo porcentaje de anomalías en cromosomas sexuales, entre las cuales se incluyen los mosaicismos de baja proporción en cromosomas sexuales cuya significancia en este tipo de pacientes está por elucidar, pues aún son controversiales las observaciones sobre si los mosaicismos son artefactos del cultivo, un fenómeno relacionado con la edad o es

una indicación de disfunción ovárica. Algunos reportes muestran frecuencias de mosaicismos de baja proporción en pacientes con pérdida recurrente o infertilidad (Schreck R. *And* Silverman N.,2002, Kuo P.L. *and* Guo H.R.,2004).

En el estudio oriental de Kuo P.L. *and* Guo H.R., se repota en 18 mujeres con mosaicismo en el cromosoma X, 16 tenían líneas celulares 45,X, incluyendo 14 con mosaicismo 45,X/47,XXX/46,XX y dos con mosaicismo 45,X/46,XX. Dos pacientes presentaron mosaico 47,XXX/46,XX. Las parejas de estas mujeres presentaron cariotipo normal. Según el punto de corte establecido con una población control sin antecedente de aborto, estos autores definieron como cambios clonales, la presencia de 3 o más células 45,X y 2 o más células para determinar una línea 47,XXX. Ellos proponen que estas aneuploidías en cromosoma X tienen un efecto adverso sobre la calidad de los oocitos y el resultado del embarazo (Kuo P.L. *and* Guo H.R.,2004).

#### 4.4.1.1.2 ABORTO RECURRENTE EN MUJERES CON MOSAICISMO DE BAJA PROPORCIÓN EN CROMOSOMAS SEXUALES

El reciente estudio oriental de Kuo P.L. *and* Guo H.R, ha sido el primero que ha direccionado los mecanismos y factores de riesgo para pérdida habitual de la gestación en madres con mosaicismos de baja proporción en cromosoma X. Comparando estos pacientes con mujeres portadoras de rearrreglos estructurales balanceados en cromosomas autosómicos, establecieron una incidencia significativamente más alta de reserva ovárica disminuida (44.4% de los casos) y anormalidades uterinas como útero septado y bicórneo (16.7% de los casos), los cuales son factores comúnmente implicados en la etiología del aborto recurrente espontáneo. Además encontraron que la tasa de aborto en mujeres con reserva ovárica disminuida fue más alta con respecto a aquellas que no presentaban esta alteración (68.6% vs. 44.1%) y complementario a ello tienen una sutil elevación en el porcentaje de cariotipos anormales en sus productos de aborto (73.7% vs. 42.9%), los cuales presentaron primordialmente aneuploidías como trisomías 13, 15, 16, 18, 21 y 22 y la monosomía de X (45,X) como la anormalidad más frecuente. Ésto es respaldado por la valoración de los científicos Freeman *et al.* y Kline *et al.*, quienes consideran que existen factores de riesgo adicionales a la edad materna avanzada que influyen sobre la presencia de aneuploidías (trisomías) en productos de aborto, entre ellos se encuentran el número folicular reducido en los ovarios, alteraciones en proteínas que afectan la metilación del DNA o la segregación cromosómica durante la meiosis (Kuo P.L. *and* Guo H.R.,2004, Robinson W.P., *et al.*, 2001).

Adicionalmente, existen otros reportes internacionales que comprueban la alta incidencia de aborto espontáneo con respecto a nacidos vivos de madres con mosaicismos en cromosomas sexuales, sin embargo, en sus nacimientos vivos se reporta alta incidencia de muerte neonatal, anormalidades congénitas y cromosómicas. El estudio Singh *et. al.* analizó 97 concepciones en 31 madres con mosaicismo en cromosoma X y encontró que el 75% de los fetos fueron anormales, 50% culminaron en aborto espontáneo y 25% presentaron anomalías genéticas o congénitas. Un estudio retrospectivo francés realizado por Nivelon – Chevallier A. *et. al.* (1988), sobre seguimiento obstétrico de 60 pacientes con mosaicismo en cromosoma X, puso en evidencia que el 23% de ellas podrían tener hijos nacidos con anomalía cromosómica (Trisomía 21, Trisomía 13, Monosomía X, Mosaico 45,X/46,X,i (Xq), 48,XXXX, 49,XXXXXY y del5p-) (Singh D.N. *et. al.*,1980, Nivelon – Chevallier A. *et. al.*, 1988).

#### 4.4.1.1.3 FACTORES DE RIESGO Y CONSEJERÍA GENÉTICA EN MUJERES CON MOSAICISMOS DE BAJA PROPORCIÓN EN CROMOSOMAS SEXUALES

La presencia de mosaicismos de baja proporción con aneuploidías en cromosomas sexuales, se ha asociado con desarrollo sexual anormal y falla reproductiva, que se evidencia en factores de riesgo como; aborto espontáneo, amenorrea primaria o secundaria, disminución de la reserva ovárica, infertilidad y falla ovárica prematura. La asociación entre mosaicismos de baja proporción en cromosoma X y daños gonadales actualmente han sido explicados desde diferentes hipótesis:

- La primera fue planteada por Burgoyne y Baker en 1984, quienes proponen que durante el emparejamiento meiótico en células aneuploides 45,X y 47,XXX se puede causar muerte prematura de células germinales.
- La segunda hipótesis es que la calidad de los oocitos puede estar influenciada por deficiencia o sobreexpresión de productos génicos específicos sobre el cromosoma X.
- La tercera hipótesis está basada en que los mosaicismos en cromosoma X pueden ser una manifestación de un control genético anormal en la disyunción cromosómica. Los defectos en los procesos de mitosis o meiosis, pueden ocasionar un daño gonadal incluyendo meiosis aberrantes y atresias oocíticas.

La significancia clínica de los mosaicismos de baja proporción en cromosoma X, tanto para las pacientes mismas como para su descendencia a la hora de establecer el

riesgo genético individual, se fundamenta actualmente en estas tres hipótesis: En primera instancia, el factor clínico - patológico relacionado con la reserva ovárica disminuida (disminución en el pool de oocitos) y la falla ovárica prematura (pérdida de la funcionalidad folicular en mujeres menores de 40 años de edad), conllevan a la implementación de terapias encaminadas a optimizar la función ovárica en estas pacientes quienes buscan extender su espacio de vida reproductiva o mejorar su fertilidad.

Además, teniendo en cuenta que los mosaicismos en cromosoma X pueden conducir a la disminución de la reserva ovárica y a un control genético anormal en la disyunción cromosómica, existe el riesgo que un oocito en estado subóptimo del desarrollo pueda llegar a ser folículo dominante y sea propenso a sufrir no disyunción cromosómica, lo cual estaría ligado con letalidad embrionaria, evidenciada en el aborto recurrente y la alta frecuencia de aneuploidías en los productos de aborto espontáneo de estas mujeres. Por tales razones, la consejería genética debe promover la realización de un diagnóstico prenatal en este tipo de pacientes, para descartar la presencia de aneuploidías en su descendencia (Niverlon –Chevallier *et. al.*, 1988, Wu R.C., 1993, Mau U.A., *et. al.*, 1997, Peschka B., *et. al.*, 1999, Burton K., *et. al.* 2000 y Kuo P.L. and Guo H.R., 2004).

#### 4.4.1.2 DESÓRDENES UNIGÉNICOS

Existen desórdenes monogénicos asociados con aborto recurrente, tales como, distrofia miotónica (enfermedad autosómica dominante), Alfa Talasemia Mayor y displasias esqueléticas letales (Displasia Tanatofórica y Osteogénesis imperfecta tipo II). También una anomalía monogénica que tiene un posible rol en aborto recurrente, es la mutación en el factor V de Leiden (abordada en la sección de desórdenes trombofílicos) (Goddijn M. and Leschot N.J., 2000, Laurino M.Y. *et al.*, 2005).

#### 4.4.1.3 INACTIVACIÓN PREFERENCIAL DEL CROMOSOMA X

La inactivación del cromosoma X (Lionización) es un proceso a través del cual se inactiva en el desarrollo embrionario temprano uno de los dos cromosomas X presente en cada una de las células femeninas de mamíferos, esto ocurre como parte de un evento de compensación de dosis. Aunque este proceso es al azar, en promedio el cromosoma X materno es inactivado con mayor frecuencia que el cromosoma

paterno. Ocasionalmente, cuando se presenta la inactivación de un alelo en >90%, se habla de un proceso anormal inactivación preferencial, no azarosa del cromosoma X, esto ha sido observado en el 2% de recién nacidos y 4,5% de mujeres en edad reproductiva (Ward, K.J., 2000).

La inactivación preferencial del cromosoma X se puede dar por azar o por anomalías cromosómicas sutiles sobre el cromosoma X, siendo éstas la causa del incremento en la tasa de aborto espontáneo. Entre ellas se encuentran, las deleciones en el cromosoma X o mutaciones que son letales para fetos masculinos hemicingóticos portadores del cromosoma X anormal, translocaciones X-autosoma y mosaicismos trisómicos en línea germinal (Ward, K.J., 2000). Se ha comprobado con ensayos moleculares de restricción, sensibles a metilación, que mujeres con aborto recurrente presentan mayor porcentaje de inactivación preferencial con respecto a individuos control y todas ellas tienen cariotipo normal, presumiblemente, se piensa que estas mujeres portan mutaciones ligadas a X o mosaicismo en línea germinal. En complemento a lo anterior, se han estudiado productos de aborto espontáneo de mujeres con inactivación preferencial en el cromosoma X y 7 de 9 (78%) muestras fueron aneuploides, mientras 15 de 40 (21%) abortos de mujeres con inactivación normal fueron aneuploides ( $p=0.03$ ). También de manera global, la inactivación preferencial del cromosoma X ha sido encontrada con mayor frecuencia en abortos recurrentes cuando son comparados con controles (7/48(14,6%) vs. 1/68(1,5%)  $p<0,01$ ) y (14/76(18%) vs. 6/111(5%)  $p<0.001$ ) (Goddijn M. and Leschot N.J., 2000, Ward, K.J., 2000).

#### 4.4.1.4 IMPRONTA GENÓMICA

La impronta genómica se refiere a la expresión diferencial de material genético a nivel génico o cromosómico, que da como resultado un cambio en la estructura o función de un organismo. Este efecto se basa sobre el origen parental de los genes involucrados y se piensa que es resultado de la metilación diferencial de los diferentes puntos del genoma. La contribución genética parental parece ser esencial para el desarrollo y función de la placenta y tejidos extraembrionarios, mientras que la contribución materna es requerida para el desarrollo embrionario (Ward, K.J., 2000).

Varias alteraciones se han asociado con impronta genómica, es el caso de los teratomas de ovario los cuales son caracterizados por un cariotipo diploide con ambos

juegos haploides de origen materno, las molas hidatidiformes son usualmente diploides pero tienen dos juegos haploides paternos, también en triploidías humanas demuestran que existe una función diferencial en la contribución parental de cada cromosoma, pues concepciones androides presentan dos juegos paternos y uno materno mientras las ginoideas presentan dos maternos y uno paterno, cada una tiene una expresión fenotípica particular (Ward, K.J., 2000).

Otro posible mecanismo de aborto relacionado con efecto de impronta génica es la disomía uniparental, en la cual ambos pares homólogos son heredados de un solo parental. Esta condición puede resultar en una anomalía letal en la concepción, dependiendo si las regiones con impronta están involucradas. Debido a que la impronta causa que un área o secuencia genómica sea inactivada reversiblemente, un evento mutacional puede silenciar una secuencia vital en el desarrollo embrionario temprano o contrariamente, causar una inapropiada expresión de uno o varios genes (Ward, K.J., 2000).

#### 4.4.1.5 OTROS MECANISMOS GENÉTICOS

Otros mecanismos genéticos que pueden jugar un rol importante en la etiología de los abortos son los desórdenes multifactoriales y anomalías en los cromosomas espermáticos. En los desórdenes multifactoriales los mecanismos genéticos involucran mutaciones o variantes génicas de varios loci en combinación con factores ambientales desconocidos. Un ejemplo de ello, son los defectos en el tubo neural asociado con ingesta insuficiente de ácido fólico y con una incidencia 10 veces más alta en abortos que en nacimientos vivos.

En cuanto a anomalías en cromosomas espermáticos se ha visto que en parejas con aborto recurrente, los hombres presentan con respecto a un grupo control, mayor frecuencia de roturas (18/308(6%) vs. 10/413(2%)) y fragmentos acéntricos (25/308(8%) vs. 10/413(2%)) en los espermatozoides, lo que da indicios de inestabilidades genómicas que de una u otra forma pueden llegar a ser responsables de las pérdidas. Carrell *et al.* (2003) encontraron un incremento en la tasa de aneuploidías para los cromosomas 13, 18, 21, X y Y por Hibridación *in situ* con Fluorescencia en espermatozoides de los padres de los embarazos que culminaron en aborto. Se ha especulado que las aneuploidías pueden ser resultado de mosaicismos en línea germinal o de un proceso más general de no disyunción. La prevalencia observada de anomalías cariotípicas identificadas en parejas con aborto

recurrente, podrían incrementar con la implementación rutinaria de técnicas de citogenética molecular (ej.: Hibridización genómica comparativa o sondas subteloméricas) para aumentar la detección de pequeños rearrreglos y desbalances cromosómicos (Goddijn M. *and* Leschot N.J., 2000, Laurino M.Y. *et al.*, 2005).

#### 4.4.2 CAUSAS ANATÓMICAS

La mayoría de malformaciones uterinas ocurren esporádicamente y abarcan el 15 a 27% de los abortos recurrentes. Las pérdidas debidas a anomalías uterinas parecen ocurrir con mayor frecuencia en el segundo trimestre y del 10 al 15% en el primer trimestre, sin embargo, la edad gestacional de las pérdidas depende del tipo de anomalía uterina presentada.

Las anomalías anatómicas pueden clasificarse como congénitas y adquiridas. En el primer grupo se encuentran las fallas en el desarrollo Mulleriano, tales como; Agenesia segmental o hipoplasia, útero didelfo, bicórneo, septado, arqueado y las anomalías relacionadas con exposición a Dietilestilbestrol (DES), aunque actualmente este agente no es usado con frecuencia. Dentro de las adquiridas se encuentran las adhesiones intrauterinas postraumáticas (Síndrome de Asherman's) o Leiomiomatosis. Aún sigue siendo motivo de discusión si los miomas son una causa de aborto recurrente, se piensa que grandes y múltiples miomas localizados en la región submucosa pueden afectar la implantación y de esta forma incrementar el riesgo de aborto (Propst, A.M. *and* Hill III, J.A., 2000, Laurino M.Y. *et al.*, 2005).

Las anomalías congénitas más comunes son el útero doble septado y bicórneo y en menores casos el didelfo, ya que cuentan con el 50% de las anomalías uterinas en estas mujeres. Las frecuencias de embarazos en mujeres con útero septado varían entre un rango del 25% a >90%, incluso se ha visto que las mujeres con útero septado tienen más pobre éxito en los embarazos con respecto a las mujeres con útero bicórneo. El tratamiento de las malformaciones uterinas contemplan la metroplastia y con mejor recomendación, la resección histeroscópica para el útero septado, el clivaje cervical y unificación quirúrgica de las cavidades uterinas en el útero bicórneo (Lee R.M. *and* Silver R.M., 2000).

Algunas mujeres expuestas a Dietilestilbestrol (DES), desarrollan una estructura uterina anormal, que contempla útero en forma de T, pobre ensanchamiento del segmento uterino, márgenes uterinas irregulares, constricciones uterinas e hipoplasia uterina. Las sinequias uterinas severas (Síndrome de

Asherman's) pueden ser corregidas con lisis histeroscópica, colocación de un aparato intrauterino y administración de estrógenos seguido por cirugía (Lee R.M. and Silver R.M., 2000).

Otras anormalidades uterinas contempla los ovarios poliquísticos asociados con aumento en la concentración basal de la hormona luteinizante y cervix incompetente, los cuales están asociadas con pérdidas en el segundo trimestre del embarazo (Lee R.M. and Silver R.M., 2000).

#### 4.4.3 CAUSAS HORMONALES Y DESÓRDENES METABÓLICOS

El defecto en la fase luteal ha sido hasta el momento una causa controversial de la pérdida recurrente de la gestación. Es bien conocido que la progesterona es necesaria para la implantación exitosa del embrión y el mantenimiento del embarazo temprano, por ello se ha considerado por algunos científicos que la deficiencia de progesterona durante la fase luteal puede ser una causa común de aborto recurrente, pues cuenta con el 25 a 40% de las pérdidas durante el primer trimestre. Aunque la efectividad de tratamientos hormonales no ha sido comprobada con amplios estudios prospectivos, se ha recomendado la progesterona solamente para pacientes en quienes se ha diagnosticado firmemente el defecto en la fase luteal por biopsia endometrial o niveles seriales de progesterona (Lee R.M. and Silver R.M., 2000, Roberts, C.P. and Murphy A.A., 2000, Stephenson M.D. *et. al.*, 2002).

Varias disfunciones tiroideas son asociadas usualmente con infertilidad, más que con aborto recurrente, no obstante, la presencia de autoanticuerpos de tejido tiroideo (ej., anti-tiroglobulina y peroxidasa tiroidea) ha sido implicada con aborto recurrente, al igual que el hiper o hipotiroidismo se han asociado con la pérdida temprana del embarazo. Adicionalmente, la diabetes poco controlada también se ha visto relacionada con esta etiología. No hay evidencia convincente sobre la influencia de desórdenes endocrinológicos sistémicos asintomáticos ni de los desórdenes metabólicos como causa de pérdida recurrente de la gestación (Lee R.M. and Silver R.M., 2000, Roberts, C.P. and Murphy A.A., 2000, Laurino M.Y. *et al.*, 2005).

Rai *et al.* (2000) reportaron que la prevalencia de Síndrome de Ovario Poliquístico en mujeres con aborto recurrente en un 40.7% (n = 895/2199), sin embargo como la tasa de nacidos vivos no es estadísticamente diferente entre mujeres con ovarios normales y aquellas con ovarios poliquísticos, la morfología ovarica no parece ser un factor de riesgo para aborto recurrente (Laurino M.Y. *et al.*, 2005).

Finalmente, varios estudios han mostrado una correlación entre elevados niveles de andrógenos (Hiperandrogenismo) y/o hormona LH en aborto recurrente. Uno de los mecanismos es que la maduración del oocito puede ser activada prematuramente y esto puede conducir a la ovulación y fertilización de oocitos inmaduros. Sagle M. *et al.*, (1988) asociaron el alto nivel de androstenediona con pérdida recurrente en comparación con individuos control normalmente fértiles, aún en ausencia de ovario poliquístico. La diferencia fue mucho más alta en la fase folicular. Una explicación puede ser que la insulina y el factor de crecimiento semejante a la insulina son capaces de estimular la producción de andrógenos, pero parece ser que la elevación de la LH es requerida también para este efecto. Así mismo, es importante el efecto antagonista que los andrógenos pueden tener sobre los receptores de estrógenos del endometrio, a través de su interacción con los receptores de estrógenos. Igualmente, los andrógenos pueden trabajar directamente sobre el endometrio a través del receptor de andrógenos (Roberts, C.P. *and* Murphya A.A., 2000).

#### 4.4.4 CAUSAS INMUNOLOGICAS

Las causas inmunológicas parece ser un significativo componente en aborto recurrente, pero hasta la fecha, no existe un diagnóstico definitivo ni regímenes de tratamiento efectivos (Laurino M.Y., *et al.*, 2005).

##### 4.4.4.1 CAUSAS AUTOINMUNES

El Síndrome de Antifosfolípidos es un desorden autoinmune caracterizado por la presencia de niveles significativos de anticuerpos antifosfolípidos y se ha relacionado clínicamente con pérdida recurrente de la gestación en un 15 a 40% de las mujeres afectadas. También se ha relacionado con muerte fetal inexplicada o trombosis. Específicamente, el Síndrome de Antifosfolípidos se ha asociado con muerte fetal de segundo trimestre. Las mujeres con previas pérdidas por muerte fetal y altos niveles de anticuerpos anticardiolipina inmunoglobulina G tienen en mayor riesgo de pérdida fetal en embarazos subsiguientes en todos los tres trimestres (Lee R.M. *and* Silver R.M., 2000, Fausett, B.M. *and* Branch, W.D., 2000, Laurino M.Y., *et al.*, 2005).

Aunque el Síndrome de Antifosfolípidos se presenta en mujeres sin enfermedades autoinmunes (Síndrome de Antifosfolípidos primario) también se ha asociado con enfermedades autoinmunes (Síndrome de Antifosfolípidos secundario), como por ejemplo el Lupus sistémico eritromatoso. El anticoagulante lúpico y anticardiolipina

son los dos anticuerpos antifosfolípidos mejor caracterizados y son recomendados para confirmar este síndrome. Algunos autores han propuesto que mujeres con anticuerpos antinucleares (ANAs) positivos, anti-SS-A, autoanticuerpos para antígenos tiroideos (tiroglobulina y peroxidasa tiroidea) y perfiles de anticuerpos positivos, pueden presentar una condición autoinmune subclínica asociada con pérdida recurrente de la gestación, sin embargo, faltan estudios extensivos sobre este aspecto (Lee R.M. *and* Silver R.M., 2000, Fausett, B.M. *and* Branch, W.D., 2000)

#### 4.4.4.2 CAUSAS ALOINMUNES

Varios autores han propuesto que la compatibilidad del Antígeno Leucocitario Humano entre parejas, la ausencia de anticuerpos maternos leucocitotóxicos o la ausencia de anticuerpos bloqueadores maternos, son factores ligados a pérdida gestacional recurrente, no obstante, sobre estas causas existen muchas controversias sobre su asociación real con el aborto recurrente (Porter, T.F. *and* Scott, J.R. 2000).

La respuesta inmune materna ante antígenos fetales (paternos) es un fenómeno común en embarazos normales de mamíferos. Los anticuerpos son frecuentemente citotóxicos y están dirigidos contra los antígenos pertenecientes o no al complejo mayor de histocompatibilidad. Se ha propuesto que estos anticuerpos citotóxicos interfieren en la iniciación exitosa o mantenimiento del embarazo. Sin embargo, éstos no son capaces de dañar el trofoblasto u otros tejidos fetales. El hecho es que estos anticuerpos están presentes en muchas mujeres con embarazos normales y son más comunes en parejas fértiles que en aquellas con aborto recurrente. La mayoría de investigadores han concluido que la presencia de anticuerpos linfotóxicos es una función del número y duración de embarazos y que ellos no se relacionan con los subsecuentes resultados del embarazo (Porter, T.F. *and* Scott, J.R. 2000).

También se ha sugerido que los anticuerpos bloqueadores antifetales bloquean el desarrollo de una respuesta inmune celular. Si los anticuerpos bloqueadores no son encontrados, puede ocurrir una respuesta aloinmune que podría ocasionar la pérdida del embarazo. Se han formulado varias inconsistencias frente a la teoría. La primera es que ellos no están universalmente presentes en el suero de mujeres con embarazos normales pero están frecuentemente presentes en pacientes con pérdida fetal. Segundo, es que no hay evidencia que ellos sean la causa de la inhibición en la respuesta linfocítica mezclada. Tercero, que ratones con deficiencia de células B tienen capacidad reproductiva normal. Finalmente, la presencia de estos anticuerpos

no predice el resultado de subsecuentes embarazos. Al igual que los anticuerpos linfocitotóxicos, los bloqueadores pueden ser simplemente una consecuencia más que la causa del éxito del embarazo (Porter, T.F. *and* Scott, J.R. 2000).

Una observación que se piensa consistente con la hipótesis de los anticuerpos bloqueadores, es el hecho que algunas parejas con aborto recurrente tienen la tendencia a compartir antígenos leucocitarios humanos (HLAs). Si la madre y el padre son antigénicamente similares, es menos probable que la madre desarrolle anticuerpos bloqueadores hacia feto y así incrementa su riesgo de aborto.

Algunos investigadores han encontrado en parejas con aborto recurrente emparejamientos en regiones HLA del complejo mayor de histocompatibilidad, especialmente loci HLA-B y HLA-DR, al igual que se han establecido relaciones entre diversos haplotipos HLA específicos y un riesgo incrementado de aborto. Por ejemplo, se ha especulado que el rechazo del feto/embrión puede ocurrir en casos donde el hombre y la mujer tienen alelos HLA-DQ estrechamente compartidos. Estos antecedentes reportados, aún difieren en sus resultados con otros estudios, donde el emparejamiento de HLA en este tipo de parejas no tuvo asociación con las pérdidas recurrentes (Porter, T.F. *and* Scott, J.R. 2000, Ward, K.J., 2000, Laurino M.Y., *et al.*, 2005).

A pesar de no haberse comprobado hasta ahora la importancia clínica de la compatibilidad del Antígeno Leucocitario Humano entre parejas y haberse demostrado por muchos estudios que la inmunización con células leucocitarias humanas no mejoran el éxito del embarazo en mujeres con pérdida recurrente idiopática, se siguen empleado empíricamente varios regímenes inmunoterapéuticos en este tipo de parejas, siendo esto un punto caliente de debate (Lee R.M. *and* Silver R.M., 2000).

Con respecto a las causas aloinmunes, se ha involucrado la inmunidad tipo Th1 (células T ayudadoras) hacia el trofoblasto estas citoquinas pueden directa o indirectamente ir en detrimento del crecimiento y diferenciación celular placentario temprano y ser tóxicas para el desarrollo del embrión. No obstante, se requieren estudios más extensivos sobre esta hipótesis y su relación con el aborto recurrente (Hill, J.A. *and* Choi B.C., 2000).

#### 4.4.5 DESÓRDENES TROMBOFÍLICOS

Los estados de hipercoagulación, la hiperhomocistinemia y deficiencias en el factor XII activado (Factor Hageman) se han relacionado con pérdida recurrente. La asociación de trombofilia y pérdida del embarazo fue confirmada por Schved JF., *et al.*, en un estudio prospectivo realizado en una cohorte de mujeres (n=843) con desórdenes trombofílicos hereditarios. La mayoría de defectos en la coagulación se han asociado con mutaciones G1691A en el factor V de Leiden (trombosis placentaria), la mutación G20210A de gen de la Protrombina (factor II) (disminución de la integridad vascular durante el desarrollo embrionario causando necrosis de tejidos y muerte fetal) y la mutación C677T en el gen metilen tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) (hiperhomocistinemia y desarrollo temprano de arterioesclerosis) (Rai, R. *and* Regan, L. 2000).

Entre el 3 al 6% de individuos con ancestros europeos presentan la mutación en el factor V de Leiden, la cual fue descrita en 1994 por los grupos de Bertina RM, *et. al.* y Dahlback B. *et al.* La mutación involucra la sustitución de un simple nucleótido en el gen del factor V en el nucleótido 1691 (G a A) que causa sustitución de aminoácido (Glutamina por Arginina) en la posición 506 de la proteína del factor V, ocasionando que la proteína sea resistente a la inactivación proteolítica y por ende al efecto anticoagulante, ejercido por la proteína C activada (Resistencia a APC). La mutación en el factor V de Leiden es la predisposición genética más común a la preclamsia severa, aborto espontáneo, infarto placentario y trombosis, pues es bien conocido que cualquier factor materno que incremente la probabilidad de coagulación sanguínea, puede provocar trombosis en la placenta, posible insuficiencia placentaria e infarto, muerte fetal y pérdida del embarazo (Lee R.M. *and* Silver R.M., 2000, Goddijn M. *and* Leschot N.J., 2000, Ward K.J., 2000)

La mutación en el factor V de Leiden tiene un riesgo incrementado de pérdida tardía del embarazo, mientras que deficiencias de Antitrombina III, Proteína C o Proteína S presentaron un riesgo significativamente incrementado de pérdida de embarazo en el primer trimestre y muerte fetal (Lee R.M. *and* Silver R.M., 2000, Rai, R. *and* Regan, L. 2000).

#### 4.4.6 CAUSAS INFECCIOSAS

Las asociaciones entre ciertas infecciones maternas con el aborto recurrente aún no están del todo claras, ni mucho menos, los mecanismos por los cuales estos

microorganismos causan el aborto. Por ejemplo, la infección materna con *Mycoplasma hominis* se ha asociado más comúnmente con una simple pérdida del embarazo que con aborto recurrente, igualmente el citomegalovirus ha sido asociado con aborto esporádico pero no recurrente, la infección con *Ureoplasma urealyticum* y endometriosis subclínica también ha sido notada, pero su rol en aborto recurrente es incierto. También se han incluido como posibles causas de aborto recurrente, infecciones con *Toxoplasma gondii*, rubéola, virus del herpes simple, virus melas, coxsackievirus y *Brucella abortus*, virus adenoasociados, Papilomavirus y *Chlamidia trachomatis*. Actualmente, los cultivos o pruebas serológicas ya se han sustituido por las pruebas moleculares que clarifican el status de colonización e infección de los bacterias, parásitos y virus (Lee R.M. and Silver R.M., 2000, Laurino M.Y., *et al.*, 2005, Pandey, M.K., *et al.*, 2005).

#### 4.4.7 AGENTES QUÍMICOS Y AMBIENTALES

Las valoraciones sobre la incidencia de un factor ambiental en el aborto recurrente, reúne observaciones en las cuales existe una exposición prolongada de los padres frente a este tipo de agentes. Sin embargo, la incorporación de nuevas variables como edad materna, dosis de una toxina potencial, duración de la exposición, factores psicológicos y documentación sobre las pérdidas de embarazo, entran a jugar a la hora de relacionar un factor ambiental como posible responsable de las pérdidas. Por las anteriores interacciones, no se puede señalar un agente ambiental como único responsable del aborto recurrente en un individuo, por ejemplo, la frecuencia de aborto es 20 a 80% más alta en mujeres fumadoras, sin embargo este factor es estadísticamente insignificante cuando se cuentan con otros factores de riesgo. No obstante, algunos factores de vital atención en este aspecto podrían ser el hábito de fumar crónico, excesiva cafeína, consumo de alcohol o cocaína y ciertas exposiciones crónicas ocupacionales (Laurino M.Y., *et al.*, 2005, Pandey, M.K., *et al.*, 2005).

También se han propuesto como posibles causas la exposición a químicos como Colchicina, Arsénico, Benceno, Anilina, Oxido de Etileno, Mercurio y Formaldehído. También exposición a radiaciones ionizantes (Roberts, C.P. and Murphya A.A., 2000).

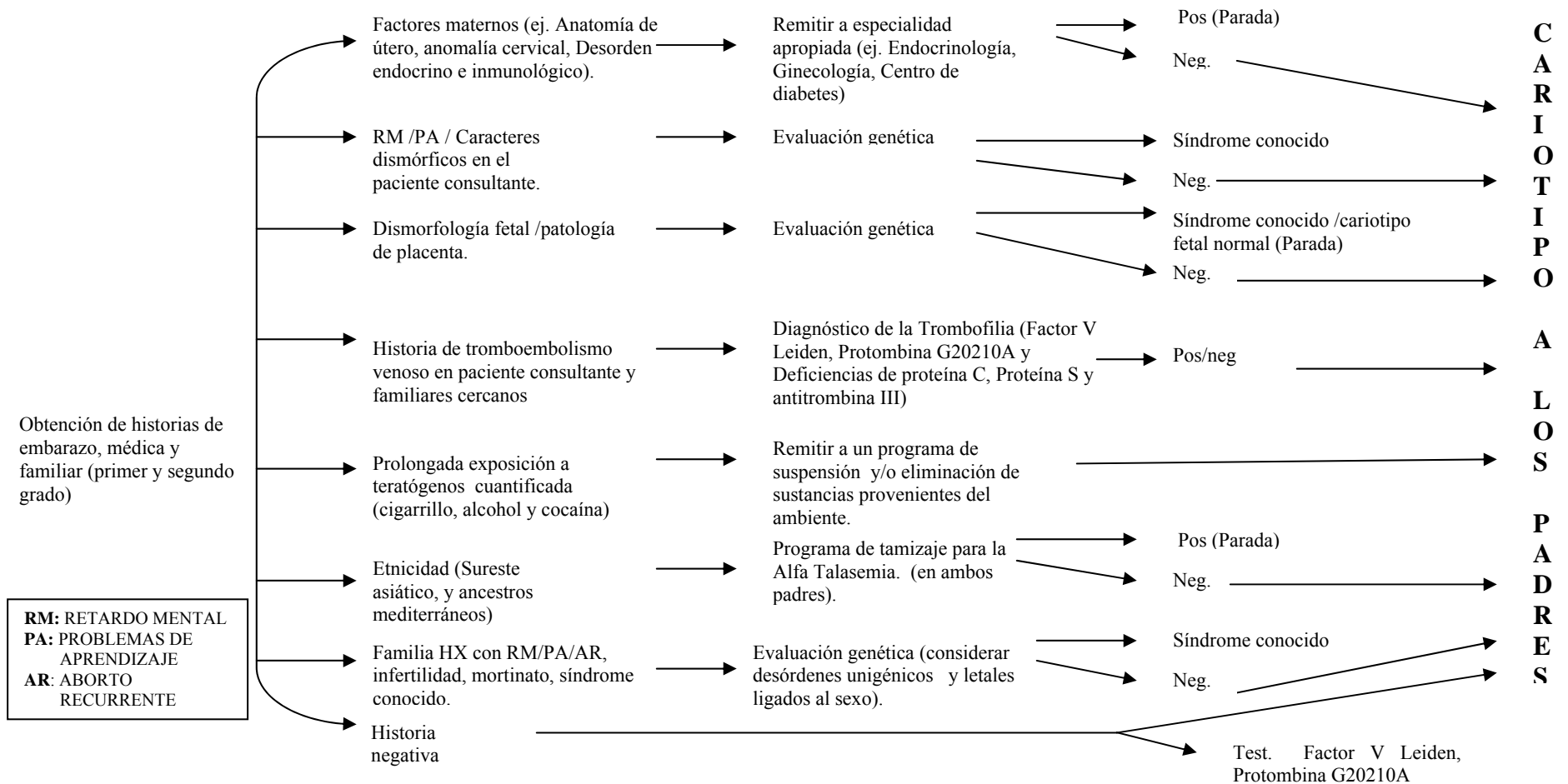
#### 4.4.8 FACTOR MASCULINO

Los factores masculinos frecuentemente asociados con aborto recurrente son polizoospermia (conteo espermático >250 mill/ml) y oligospermia (conteo espermático <20 mill/ml). Buckett WM, et al. (1997) encontraron que la prueba de hinchamiento hipo-osmótico fue significativamente más baja en muestras de semen de hombres en quienes su pareja experimenta aborto recurrente inexplicable en el primer trimestre (Pandey, M.K., *et al.*, 2005).

#### 4.4.9 CAUSAS IDIOPÁTICAS

En más del 50% de las parejas con pérdida gestacional recurrente no se ha determinado la etiología a pesar de una evaluación extensiva que incluye los cariotipos parentales, histerosalpingografías o histeroscopias, biopsia endometrial y pruebas de anticuerpos antifosfolípidos, convirtiéndose el abordaje clínico y psicológico en este tipo de parejas una situación muy frustrante tanto para las parejas como para la comunidad científica. Sin embargo, se ha visto una tasa del 70% de nacimientos vivos en este tipo de parejas quienes intentan y sin ningún tipo de tratamiento quedan en embarazo (Lee R.M. *and* Silver R.M., 2000, A. García-Enguádanos, 2002).

Este año la Sociedad Nacional de Consejería Genética de Estados Unidos, sugirió el proceso de evaluación y pruebas diagnósticas para el seguimiento de parejas con aborto recurrente, igualmente la Sociedad Europea de Embriología y Reproducción Humana ha fomentado un proceso de evaluación multifactorial del aborto recurrente en cambio del modelo mono – etiológico tradicional (Laurino M.Y. *et. al.*, 2005, Christiansen O.B. *et. al.*, 2005) (Figura 2).



**Figura 2. Proceso de evaluación y pruebas diagnósticas sugeridas para el seguimiento de parejas con aborto recurrente.** Recomendado por la Sociedad de Consejería Genética (Tomado de Laurino M.Y. *et. al.*, 2005).

## 5 METODOLOGÍA

### 5.1 TIPO DE ESTUDIO:

Estudio Prospectivo Caso – Control.

### 5.2 POBLACIÓN:

Parejas con antecedente de aborto recurrente

### 5.3 MUESTRA:

Parejas remitidas al Laboratorio de Biogenética del Centro Colombiano de Fertilidad y Esterilidad (CECOLFES) para estudio citogenético por aborto recurrente, en el periodo entre Enero a Septiembre de 2005.

### 5.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Parejas con antecedente de 2 o más pérdidas antes de las 22 semanas de la gestación.
- Parejas abortadoras recurrentes en proceso diagnóstico, con posible factor genético.
- Parejas con antecedente de 2 o más abortos con la misma pareja.
- Parejas abortadoras recurrentes sin restricción de edad.

### 5.5 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Parejas abortadoras recurrentes sin acceso a datos clínicos completos.
- Parejas abortadoras recurrentes que no desearon participar en el estudio.

### 5.6 POBLACIÓN CONTROL PARA ESTUDIO CITOGENÉTICO:

Con el propósito de evaluar en el grupo control la presencia de mosaicismos de baja proporción en cromosomas sexuales, se tuvo en cuenta que las mujeres de la población control, tuvieran la misma edad de las pacientes abortadoras, en orden a eliminar el efecto de la edad sobre el riesgo de presentar aneuploidías. Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

Mujeres que tuvieran mínimo dos hijos, sin antecedentes de hijos ni familiares con malformaciones congénitas, ciclos menstruales regulares por lo menos hace tres años, no haber tenido historia de aborto espontáneo o un cariotipo embrionario o fetal

anormal en ellas o en su familia. Al igual que las parejas abortadoras, las mujeres control no tuvieron exposición ocupacional o médica a agentes clastogénicos o genotóxicos.

## 5.7 VALORACIÓN CLÍNICO – PATOLÓGICA DE LAS PAREJAS

Las parejas fueron sujetas a un proceso diagnóstico de rutina que involucró examen físico, sonografía pélvica, ecografía transvaginal y permeabilidad tubárica. Según criterio médico, se realizaron exámenes hormonales, inmunológicos, andrológicos y/o anatómicos que orientaran el proceso diagnóstico de cada pareja: Los estudios hormonales incluyeron Gonadotropinas (LH, FSH), Progesterona, Prolactina, TSH y DHEA'S. Los inmunológicos; anticuerpos antinucleares (ANAS), anticuerpos antineutrófilos (ANCAS), anticuerpos antifosfolípidos, anticoagulante Lúpico, perfil de inmunidad humoral y celular y/o anticuerpos bloqueadores. Los andrológicos el espermograma y el acrosinograma y dentro de los anatómicos la laparoscopia.

En todas las parejas los antecedentes familiares se indagaron mediante la realización de genealogías.

## 5.8 ANÁLISIS CITOGENÉTICOS EN LAS PAREJAS

### 5.8.1 ESTUDIO POR CITOGENÉTICA CONVENCIONAL (BANDEO GTG)

El examen citogenético a la pareja y al grupo control comprendió el protocolo estándar de cultivo de linfocitos de sangre periférica. Las células sanguíneas fueron cultivadas a 37°C con medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium 1640), Suero Fetal Bovino y el mitógeno Fitohemaglutinina M. Después 72 horas de incubación, el cultivo fue procesado con Colchicina (10µg/ml), Solución Hipotónica (KCl 0.075 M) y Fijador de Carnoy (Metanol: Acido Acético Glacial 3:1) hasta obtener en una lámina el extendido cromosómico al cual se le realizó protocolo de coloración diferencial por bandeo GTG. La lectura se realizó en un nivel de resolución de 450 –550 bandas por genoma.

Para la lectura de metafases, de inicio se analizaron 30 metafases y en los casos en que se observaba la ganancia o pérdida de un cromosoma sexual en por lo menos una célula u otro rearrreglo cromosómico, el conteo fue extendido a 100 metafases para confirmar el mosaicismo cromosómico de baja proporción.

Para no sesgar la observación de aneuploidías, se tuvo presente no leer láminas reventadas, ni metafases hiperdiploides con algún cromosoma de nivel de condensación diferente.

El criterio inicial para definir un mosaicismo tuvo en cuenta lo estipulado por el ISCN de 1995. No obstante, se aplicó el criterio de excepción propuesto por Peschka *et al* (1999), el cual plantea que si en el conteo se halla sólo una célula con una aneuploidía gonosomal ésta se descarta y el paciente será catalogado negativo para mosaicismo, pero si se encuentran dos o más líneas celulares con anomalías numéricas en cromosoma sexual, la presencia de una sola célula anormal característica de cada línea celular, es suficiente para ser clasificada como mosaicismo (Ej: 45,X[2]/47,XXX[1]/46,XX[n>2] ó 45,X[1]/47,XXX[1]/46,XX[n>2]). Debido a que en estos casos no se observa clonalidad según lo estipula el ISCN de 1995, en el presente estudio, las conclusiones definitivas sobre estos posibles mosaicismos, se establecieron una vez realizado el FISH en estos individuos.

El criterio para definir un mosaicismo de baja proporción fue la presencia de menos del 10% de células anormales, éste es el más frecuentemente reportado por la comunidad científica en este tipo de estudios (Morel F., et al., 2002, Peschka B. Et al., 1999).

### 5.8.2 ESTUDIO POR CITOGENÉTICA MOLECULAR (FISH)

Antes de descartar o aprobar cualquier caso como mosaicismo, se realizó prueba confirmatoria por Hibridación In Situ con Fluorescencia (FISH). El FISH, se usó como prueba concluyente para establecer desde el punto de vista citogenético el diagnóstico de mosaicismo de baja proporción en cromosoma sexual.

El estudio de Hibridación In Situ con Fluorescencia (FISH) se hizo empleando sondas de cromosomas sexuales (X y Y) de la marca comercial *Vysis*. Cada paciente tuvo su individuo control, de la misma edad y condiciones de cultivo, para orientar la interpretación del FISH. De manera general, después de obtener el extendido cromosómico, se incuban las láminas en una solución de desnaturalización (Formamida-2XSSC) por 5 minutos a 73°C, luego se deshidratan en tres concentraciones diferentes de Etanol absoluto por 1 minuto a temperatura ambiente (75%, 85% y 100%). Una vez preparada la sonda (7µl de Buffer de Hibridación, 2µl de agua desionizada estéril y 1 µl de sonda) se incubaba por 5 min a 73°C y se

agrega la solución de 10 µl a la zona demarcada de la lámina, se cubre con laminilla 22X22 y se sella con cemento de goma para incubación en cámara húmeda a 42 °C por 17 horas. Pasado el periodo de hibridación, se retira la laminilla y se incuba en soluciones de lavado (0,4XSSC-NP40 0.3%) por 2 minutos a 73°C y por 1 minuto (2XSSC-NP40 0.1%) a temperatura ambiente respectivamente, sin dejar secar las láminas se agrega 10µl de solución contrastante DAPI I. Finalmente se hace la lectura en microscopio de Fluorescencia de 1000 núcleos interfásicos.

La lectura se realizó a ciegas, desconociendo la proveniencia de cada uno de los extendidos, además cuando fue necesario se observaron las células a juicio de un segundo observador. Como criterios de lectura se tuvo en cuenta, intensidad homogénea de las señales, núcleos de buena morfología, no superpuestos y extendidos cromosómicos sin ruido de fondo.

#### 5.9 EVALUACIÓN DE LA RESERVA OVÁRICA

Medición en las pacientes con mosaicismo de baja proporción en cromosomas sexuales de la concentración de FSH en suero, el día tres del ciclo menstrual. Cada paciente, tuvo como control una abortadora con cariotipo normal y una mujer normal con criterios de inclusión del grupo control. Se define reserva ovárica disminuida cuando se hallan concentraciones de FSH mayores a 12.0 mIU/ml. Se verifica que la paciente haya tenido al menos 3 ciclos menstruales consecutivos después del último aborto espontáneo (Fanchin,R. *et.al.*, 2003 y Kuo P.L. *and* Guo H.R., 2004).

#### 5.10 SISTEMATIZACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

La colección de información completa se hizo de manera prospectiva a través de entrevistas o cuestionarios a los pacientes que iban ingresando a la institución para análisis citogenético. Esto último permitió tener un modelo estandarizado y probado para la recolección de datos, que aseguró la obtención completa de información requerida para el análisis de los resultados. La información se registró en una base de datos en Excel y para su análisis se procesaron algunos datos en el programa Access (Tabla 3).

<b>DATOS PERSONALES Y ANTECEDENTES FAMILIARES</b>
Nombre del paciente
Fecha de Nacimiento
Fecha del exámen citogenético
Número de Historia Clínica
Edad del paciente
Consanguinidad
Infecciones obstétricas o ginecológicas
Menarquia
Ciclos menstruales
Historia reproductiva (Antecedentes obstétricos)
Hijos de Otra Unión
Edad gestacional y edad materna en cada uno de los abortos
Datos citogenéticos sobre los productos de aborto
Tipo de abortos presentados
Evaluaciones fetales y placentarias en las pérdidas
Antecedentes familiares de aborto, falla reproductiva o síndomes asociados con pérdida fetal o embriónica.
Antecedentes Personales
Antecedente de patologías o tratamientos influyentes sobre la fertilidad en la pareja o en su familia, retardo mental, discapacidades en el aprendizaje, debilidad progresiva en los músculos, cataratas tempranas, motinatos, diabetes y desórdenes de coagulación.
Anormalidades reproductivas en la pareja
Exposición a agentes químicos, clastogénicos o genotóxicos durante los embarazos o a nivel médico, ocupacional o ambiental.
<b>REGISTROS DE LOS ESTUDIOS CITOGENÉTICOS</b>
Complemento cromosómico
Número de mitosis analizadas
Mosaicismos (Porcentaje del mosaico)
Anomalías cromosómicas numéricas

Anomalías cromosómicas estructurales
Complemento cromosómico por FISH
REGISTROS PARA – CLINICOS
Motivo de la consulta
Exámen Físico
Útero, Ovario y Permeabilidad Tubárica
Perfil Hormonal
Resultados Inmunológicos
Estudios Andrológicos
Diagnóstico clínico final

**Tabla 3. Registro de información del proyecto.** Datos personales, para-clínicos y genéticos tenidos en cuenta en la recolección de información y útiles para el análisis de los resultados de la investigación.

#### 5.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS

Este es un estudio prospectivo clínico observacional en el cual se calcularon frecuencias relativas y absolutas para el análisis de los hallazgos citogenéticos de los pacientes afectados por mosaicismo de baja proporción en cromosomas sexuales. También permitieron analizar de manera global los factores diagnósticos en el grupo de parejas remitidas por aborto recurrente (Gómez, C. y Ardila, J. 2001).

#### 5.12 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Los pacientes y el grupo control firmaron el formato de consentimiento informado de la institución para participar en la investigación, éste especificó los objetivos del presente trabajo, pautas y metodología de investigación. Debido al criterio ético de la confidencialidad, no se revelaron los nombres de los pacientes diagnosticados ni datos personales que pusieran en riesgo la divulgación de su identidad, ellos fueron identificados a través de un código asignado en el proceso de recepción de la muestra para el análisis citogenético.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 ASPECTOS CLÍNICOS DE LAS PAREJAS CON ABORTO RECURRENTE

Entre Enero a Septiembre de 2005, se remitieron al laboratorio de Biogenética Molecular de CECOLFES 20 parejas con diagnóstico de aborto recurrente. La edad osciló entre 25 a 49 años con un promedio de 34,5 años, la edad materna de las 20 mujeres en el momento del exámen citogenético, estuvo entre un rango de 25 a 42 años con un promedio de 32,8 años y la edad paterna estuvo en un rango de 27 a 49 años con un promedio de 36,2 años.

En las mujeres abortadoras la menarquia ocurrió entre los 11 a los 15 años con un promedio de 12,9 años. Los ciclos menstruales reportaron un periodo entre 20 a 35 días (promedio de 27,1 días) con sangrado entre 2 a 6 días (Promedio 3,9 días) respectivamente. El 65% (13) de las mujeres presentaron dismenorrea en diferentes grados de severidad, el 35% (7) restante manifestaron que sus ciclos menstruales eran normales. En el grupo control de estas mujeres, la menarquia ocurrió entre los 11 a los 16 años con un promedio de 12,7 años, con ciclos de 22 a 30 días (Promedio 28,4 días) con un tiempo de sangrado entre 3 a 8 días (Promedio 4,4 días) de duración. No hubo diferencias significativas entre las medias de la menarquia, duración del ciclo, duración de sangrado ni media de embarazos. La media de aborto y de nacimientos no fueron comparables para el estudio. (Tabla 4)

ANTECEDENTES	ABORTADORAS	CONTROLES	VALOR DE p
MEDIA MENARQUIA	12,9(+/-1,3)	12,7(+/-1,4)	0,64(NS)
MEDIA DURACIÓN CICLO	27,1(+/-3,4)	28,4(+/-2,4)	0,20(NS)
MEDIA DURACIÓN DE SANGRADO	3,9(+/-0,9)	4,4(+/-1,5)	0,23(NS)
MEDIA EMBARAZOS	3,2(+/-0,8)	2,7(+/-2,4)	0,06(NS)
MEDIA ABORTOS	2,9(+/-0,8)	0,0	-----
MEDIA NACIMIENTOS	0,25(+/-0,4)	2,7(+/-0,8)	-----

**Tabla 4. Datos obstétricos de las 20 abortadoras con respecto al grupo control.** Se realizó t student para análisis de significancia estadística. No hubo diferencias significativas entre las medias comparadas (NS: No significativo). Se consideró significativo valores  $p < 0.05$ .

## 6.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS ABORTOS

En total, las 20 parejas presentaron 63 gestaciones, 58 abortos y 5 partos. El antecedente de gestación osciló entre un rango de 2 a 5, con un promedio de 3,2. El antecedente de abortos osciló entre 2 a 5 con un promedio de 2,9 y de Partos entre un rango de 0 a 1 con un promedio de 0,25.

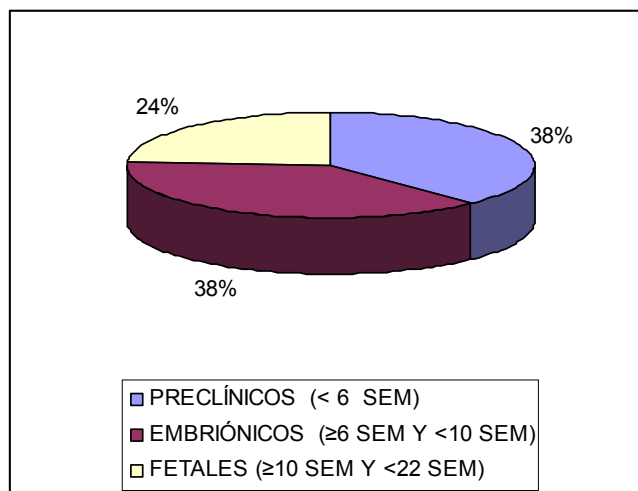
De las 20 mujeres, 15 (75%) son abortadoras primarias debido a que no han tenido nacimientos vivos. Las 5 mujeres que presentaron parto, en 4 de ellas, la gestación correspondió a su primer embarazo, los cuales evolucionaron sin complicaciones y sin reportarse malformaciones congénitas en su descendencia, dos de ellas tuvieron sus hijos de otra unión. La mujer restante tuvo un embarazo a los 31 años de edad, intermedio a las pérdidas, el cual fue atendido por cesárea en la semana 28 por preclamsia severa pero su hija falleció con diagnóstico de muerte neonatal tardía sin malformaciones.

La clasificación de los 58 productos se realizó con respecto a la edad gestacional, de acuerdo con el criterio de Stephenson M.D., *et al* (2002). preclínicos (pérdida < de las 6 semana de gestación), embriónicos ( $\geq$  de la 6 semana pero < de la 10 semana) y fetales ( $\geq$  a 10 semanas pero < de 22 semanas de gestación). En el presente estudio, la variación al criterio formulado por estos autores, fue con respecto al límite de edad gestacional de los abortos fetales, pues se tuvo en cuenta que fueran < de 22 semanas y no de 20 semanas como ellos lo indican en su reporte (Stephenson M.D., *et. al.*, 2002). (Figura 3, Tabla 5)

Las 58 pérdidas ocurridas en las 20 parejas se presentaron entre la 1<sup>a</sup> y 21<sup>a</sup> semana de gestación con un promedio de 7,3 semanas. Las pérdidas ocurridas en el primer trimestre ( $\leq$  12 semanas) abarcaron un 91% (53) y sólo el 9% (5) comprendieron abortos entre las 13 y 21 semanas de gestación. La edad materna de las abortadoras al momento de las pérdidas osciló entre los 21 a 42 años con un promedio de 30 años. En relación a la cantidad de abortos por pareja, 11 (55%) sufrieron 3 abortos (Promedio 6,5 semanas de gestación y 31 años de edad materna), 6 (30%) presentaron 2 abortos (Promedio 8,4 semanas y 30 años), dos (10%) tuvieron 4 pérdidas (Promedio 8,4 semanas y 33 años) y 1 (5%) sola reportó 5 pérdidas (Promedio 8,6 semanas y 28 años). (Figura 4, Tabla 6)

En 15 (75%) parejas no se le realizó ningún estudio genético a los productos de aborto pues sólo en 5 (25%) se analizaron citogenéticamente 6 pérdidas. En términos de porcentaje, de los 58 abortos ocurridos en las 20 parejas, el 10% (6)

fueron cariotipados. El 16,7% (1) fue anormal con complemento 45,X y el 83,3% (5) restante era normal; donde el 50,0% (3) fue 46,XY y el 33,3% (2) 46,XX. El producto que presentó monosomía de X se perdió en la semana 10, los 3 abortos de cariotipo normal 46,XY, se perdieron en las semanas 6, 13 y 21 y los dos abortos 46,XX sucedieron a las 8 y 12 semanas de gestación respectivamente. En cuanto a los tipos de aborto de cada uno de estos productos estudiados, de los cinco normales; 2 fueron abortos embriónicos (semana 6 y 8) y tres fueron fetales (semanas 12, 13 y 21) y el único producto anormal fue un aborto fetal pues ocurrió a las 10 semanas de gestación (Tabla 7).

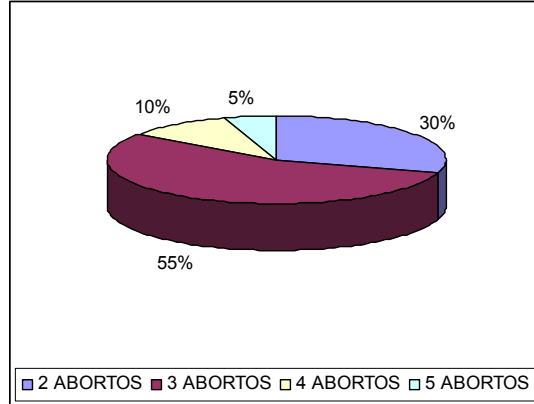


**Figura 3. Frecuencia de abortos preclínicos, embriónicos y fetales ocurridos en las 20 parejas con aborto recurrente. La frecuencia fue calculada sobre un total de 58 abortos presentados.**

TIPO DE ABORTO	No ABORTOS		EDAD MATERNA			EDAD GESTACIONAL			CARIOTIPO			
	No.	%	PROMEDIO	DS	RANGO	PROMEDIO	DS	RANGO	NO	%	SI	%
PRECLÍNICOS (< 6 SEM)	22	38	29,7	6,1	21 - 37	3,8	1,0	1 - 5	22	42,3	0	0
EMBRIÓNICOS (≥6 SEM Y <10 SEM)	22	38	30,6	4,8	24 - 42	7,3	1,1	6 - 9	20	38,5	2	33,3
FETALES (≥10 SEM Y <22 SEM)	14	24	31,0	3,7	23 - 31	12,9	3,2	10 - 21	10	19,2	4	66,7
TOTALES	58	100							52	100	6	100

TOTAL DE ABORTOS	58		30,0	5,1	21 A 42	7	4,0	1 A 21	52	90,0	6	10
------------------	----	--	------	-----	---------	---	-----	--------	----	------	---	----

**Tabla 5. Relación entre tipo de aborto, edad materna, edad gestacional y estudio citogenético. Se especifica en cada uno de los tres tipos de aborto, el número de pérdidas presentadas.**



**Figura 4. Relación entre la cantidad de abortos presentados y el número de parejas afectadas.**

No ABORTOS	No PAREJAS	TOTAL ABORTOS (%)	PROMEDIO EDAD GESTACIONAL (RANGO)	PROMEDIO EDAD MATERNA (RANGO)
2	6(30%)	12(20,7%)	8,4 (5 A 12)	30 (24 A 38)
3	11(55%)	33(56,9%)	6,5 (1 A 21)	31(21 A 42)
4	2(10%)	8(13,8%)	8,4 (4 A 16)	33 (30 A 35)
5	1(5%)	5(8,6%)	8,6 (4 A 18)	28 (21 A 35)
<b>TOTAL</b>	<b>20(100%)</b>	<b>58</b>	<b>7,3 (1 A 21)</b>	<b>30,4 (21 A 42)</b>

**Tabla 6. Relación entre la cantidad de abortos presentados y el número de parejas afectadas con especificación de promedio de edad gestacional y edad materna en el momento de las pérdidas.**

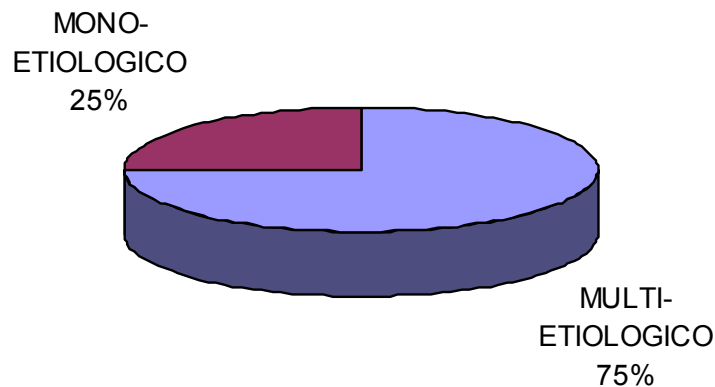
CARIOTIPO	No (%)	%	COMPLEMENTO CROMOSÓMICO	EDAD GESTACIONAL	EDAD MATERNA
NORMAL	5(83,3%)	50,0	46,XY	13	30
				21	31
				6	35
		33,3	46,XX	8	28
				12	38
ANORMAL	1(16,7%)	16,7	45,X	10	28
<b>TOTAL</b>	<b>6(100%)</b>	<b>100</b>			

**Tabla 7. Hallazgos citogenéticos en los 6 productos de aborto estudiados. Se especifica edad gestacional y materna de cada producto.**

### 6.3 FACTORES DIAGNÓSTICOS INFLUYENTES SOBRE LOS ABORTOS

De acuerdo con los estudios paraclínicos el diagnóstico de las parejas remitidas para estudio de aborto recurrente, contempló la influencia de factores inmunológicos en un 75%, anatómicos en un 30%, hormonal en un 25%, masculino en un 25%, infecciosos en un 25%, genéticos en un 15% e idiopáticos en un 10%. En el 25%(5) de los casos se adjudicó la causa de las pérdidas a uno sólo de estos factores y en el 75% (15) restante los factores influyentes sobre las pérdidas están combinados. (Figura 5 y Tabla 8).

Con respecto al estudio del factor masculino es importante mencionar que el semen fue estudiado en 9 hombres, de los cuales el 44,4%(4) fue normal y en el 55,5%(5) fue anormal. En los 11 hombres restantes el semen no fue estudiado, en algunos de estos casos existía el antecedente de hijo o hija de otra unión (3 de 11 casos) y en otros no se ordenó estudio seminal por criterio médico. Ninguna pareja reporta trombofilia ni desórdenes metabólicos dentro de sus estudios clínicos.



**Figura 5. Frecuencia de factores diagnósticos señalados en las 20 parejas estudiadas por aborto recurrente.**

FACTOR	ESPECIFICACIÓN	FRECUENCIA
INMUNE 15/20(75%)	BLOQUEADORES	9/15(60,0%)
	INMUNIDAD CELULAR	4/15( 26,6%)
	INMUNIDAD HUMORAL (INMUNODESVIACION Th1 – Th2)	2/15(13,3%)
	ANTICUERPOS ANTINUCLEARES (ANAS)	2/15(13,3%)
	ANTICUERPOS ANTITIROIDEOS	1/15(6,6%)
ANATOMICO 6/20(30%)	MIOMATOSIS	3/6(50%)
	OBSTRUCCION TUBARICA UNILATERAL	3/6(50%)
	OBSTRUCCION TUBARICA BILATERAL	1/6(17%)
HORMONAL 5/20(25%)	POSIBLE DEFECTO FASE LUTEAL	5/5(100%)
MASCULINO 5/20(25%)	TERATOZOOSPERMIA	2/5(40%)
	ASTENOZOOSPERMIA, REDUCCION DE VIABILIDAD ESPERMATICA	1/5(20%)
	ELEVADO DAÑO ACROSOMAL	1/5(20%)
	POLIZOOSPERMIA INTENSA CON TERATOZOOSPERMIA ACENTUADA EN EL AREA ACROSOMAL	1/5(20%)
INFECCIOSO 5/20(25%)	VAGINITIS	1/5(20%)
	<i>Brucella abortus</i>	1/5(20%)
	CLAMIDIA Y CANDIDA	1/5(20%)
	INFECCIONES GENITOURINARIAS	1/5(20%)
	TOXOPLASMOSIS	1/5(20%)
GENÉTICO 3/20(15%)	MOSAICISMO GONOSOMAL DE BAJA PROPORCIÓN	2/3(67%)
	ABORTO CON MONOSOMIA DE X	1/3 (33%)
IDIOPÁTICO 2/20(10%)	DESCONOCIDO	2/2(100%)

**Tabla 8. Frecuencia de factores diagnósticos señalados en las 20 parejas estudiadas por aborto recurrente.**

#### 6.4 ANTECEDENTES PATOLÓGICOS, FAMILIARES Y PERSONALES

Se presentó un 30%(6/20) de mujeres con antecedentes de posibles patologías que influyen la fertilidad y un 35% en los hombres. Y con respecto a los antecedentes familiares se presentó en mujeres un 85% y en hombres un 20%. El antecedente familiar de aborto se presentó en 10 mujeres abortadoras lo cual representa el 50% de los casos, sin embargo sólo en 5 casos se presentó dos o más abortos en hermanos, hermanas o padres. En los 5 casos restantes el antecedente familiar fue de un solo aborto. De los 20 hombres, sólo 2 reportaron antecedente familiar de aborto, en un caso una hermana presentó 2 pérdidas y en el otro caso una hermana tuvo una sola pérdida, no hay antecedentes de aborto en los padres de los 20 hombres estudiados.

Ninguna pareja reporta exposición o dosificación clínica a agentes químicos, clastogénicos, ni radiaciones ionizantes durante los embarazos y/o actividades habituales. La actividad laboral de los miembros de las parejas no evidenció mayor influencia sobre las pérdidas, no obstante en una de las mujeres con mosaicismos particularmente se conoció el antecedente de haber trabajado durante 9 años en una clínica veterinaria y presenta una infección con *Brucella abortus*, el cual es un microorganismo asociado con aborto en animales y de posible afectación en humanos. Finalmente, en cuanto a factores de riesgo, se reporta el uso de cigarrillo durante 15 años por parte de una paciente y el antecedente de fumadora pasiva en otra (Tabla 9).

ANTECEDENTES PATOLÓGICOS		ANTECEDENTES FAMILIARES	
<b>MUJERES</b>			
GALACTORREA	3/20	ABORTO	10/20
STRESS	1/20	DIABETES	5/20
HEPATITIS	1/20	INFERTILIDAD	3/20
MENINGITIS	1/20	CANCER (LEUCEMIA Y PRECANCER)	3/20
HIPERCOLESTEROLEMIA	1/20	EMBARAZOS ECTOPICOS	1/20
		TIROIDES SIN ESPECIFICAR	1/20
		FALLA OVARICA PREMATURA	1/20
		MORTINATO	1/20
		HIPERTENSION	1/20
<b>TOTAL</b>	<b>6/20(30%)</b>		<b>17/20(85%)</b>
<b>HOMBRES</b>			
VARICOCELE	4/20	ABORTO	2/20
PAROTIDITIS	2/20	RETINITIS PIGMENTOSA	1/20
GONORREA	1/20	MUERTE NEONATAL (CARDIOPATIA)	1/20
ORQUITIS	1/20		
RETINITIS PIGMENTOSA	1/20		
INFERTILIDAD EN OTRA UNION	1/20		
<b>TOTAL</b>	<b>7/20(35%)</b>		<b>4/20(20%)</b>

**Tabla 9. Antecedentes patológicos y familiares reportados por las 20 parejas con aborto recurrente.**

## 6.5 ASPECTOS GENÉTICOS

De las 20 parejas remitidas, 18 (90%) presentaron cariotipo normal y 2(10%) cariotipo anormal. En uno de los hombres de una de las parejas se observó la inversión del cromosoma 9 la cual se incluyó dentro de los cariotipos normales por ser reconocida a nivel mundial como un polimorfismo cromosómico que hasta ahora no tiene repercusión clínica significativa en ningún grupo poblacional. Las anomalías se observaron en dos mujeres, quienes presentaron mosaicismos de baja proporción en cromosomas sexuales. No se observaron anomalías numéricas ni estructurales de carácter universal. (Tabla 10)

CARIOTIPO	No PAREJAS		No MUJERES		No HOMBRES	
	No.	%	No.	%	No.	%
NORMAL	18	90	18	90	20 <sup>2</sup>	100
ANORMAL	2 <sup>1</sup>	10	2	10	0	0
TOTAL	20	100	20	100	20	100
<sup>1</sup> Mosaicismos de baja proporción en cromosomas sexuales						
<sup>2</sup> Un cariotipo con complemento: 46,XY,inv(9)(p11q13)						

**Tabla 10. Descripción del porcentaje de anomalía cromosómica encontrado en las 20 parejas remitidas para estudio citogenético.**

Los mosaicismos de baja proporción en cromosomas sexuales fueron observados en dos mujeres abortadoras de 36 y 37 años de edad con antecedente de 5 y 3 pérdidas respectivamente (Tabla 11).

CARIOTIPO	No PAREJAS	No DE PAREJAS CON X No DE ABORTOS			
		X=2	X=3	X=4	X=5
Normal	18 (90%)	6	10	2	0
Anormal	2 (10%)	0	1	0	1
TOTAL	20 (100%)	6	11	2	1

**Tabla 11. Especificación de los resultados citogenéticos de acuerdo con la cantidad de abortos presentados en las 20 parejas remitidas.**

Los mosaicos encontrados en las dos mujeres abortadoras se confirmaron mediante la técnica de la hibridación in situ con Fluorescencia (FISH). (Tabla 12)

Para la interpretación de los resultados, se realizó el FISH en las dos pacientes con su respectivo control de la misma edad y se observó mayor porcentaje

de aneuploidía en las pacientes con respecto a las controles: *mos1* 17,3% vs. 0,8% y *mos2* 6,5% vs. 0,6%. (Tabla 13)

#### 6.5.1 GRUPO CONTROL

Se analizaron 20 mujeres control con antecedente obstétrico de 2 a 5 embarazos exitosos, con un promedio de 2,7 hijos (+/- 0,8). En todas se observó cariotipo normal a excepción de la mujer control de la abortadora de 42 años, en quien se detectó en sus 100 metafases analizadas con bandeado GTG, un mosaicismo de baja proporción en cromosoma X con complemento *mos45,X[2]/47,XXX[1]/46,XX[97]*. Para confirmar este hallazgo particular se leyeron 1000 núcleos interfásicos por técnica de FISH, lo que arrojó como resultado un complemento ish nuc *mos45,X[34]/47,XXX[4]/46,XX[962]*, observándose un 3,8% de patrón de hibridización anormal para cromosoma X, de éste el 3,4%(34 núcleos) correspondió a una sola señal (45,X) y el 0,4%(4 núcleos) a tres señales (47,XXX). En el 96,2%(962 núcleos) restante se observó patrón de hibridización normal para cromosoma X con dos señales respectivamente.

Para la interpretación de los hallazgos, se realizó una comparación de los análisis citogenéticos en cinco mujeres control, representativas de los grupos de edad de las pacientes abortadoras (Tabla 14).

PAC	EDAD	BANDEO G PACIENTE	BANDEO G CONTROL	FISH PACIENTE	FISH CONTROL
mos 1	36	mos45,X[5]/46,XX[95]	46,XX	Ish nuc mos45,X[166]/47,XXX[8]/46,XX[826]	ish nuc mos45,X[8]/46,XX[992]
mos 2	37	mos47,XXX[2]/46,XX[98]	46,XX	Ish nuc mos45,X[56]/47,XXX[9]/46,XX[935]	ish nuc mos45,X[4]/47,XXX[2]/46,XX[994]

**Tabla 12. Hallazgos citogenéticos de las mujeres con mosaicismo de baja proporción en cromosomas sexuales.**

Se describen los resultados obtenidos en los análisis por citogenética convencional (Bandeo GTG) y por citogenética molecular (FISH). Para la interpretación del FISH se empleó como referencia una mujer control de la misma edad con los criterios de inclusión descritos en la metodología.

FISH ANORMAL EN CROMOSOMA X	<i>mos 1</i>		<i>mos 2</i>	
	PACIENTE	CONTROL	PACIENTE	CONTROL
% MONOSOMIA (45,X)	16,6	0,8	5,6	0,4
% TRISOMIA (47,XXX)	0,8	0	0,9	0,2
% TOTAL ANEUPLOIDIA	17,3	0,8	6,5	0,6

**Tabla 13. Comparación entre el porcentaje de aneuploidía observado por FISH en 1000 núcleos interfásicos en las pacientes con mosaicismo de baja proporción en cromosoma sexual (mos1 y mos2) y sus respectivas controles.** Se especifica el porcentaje de monosomía de X (Hipodiploidía) y trisomía de X (Hiperdiploidía) y el porcentaje de aneuploidía totalizado.

EDAD	BANDEO GTG	FISH	PATRON DE HIBRIDIZACIÓN ANORMAL EN CROMOSOMA X (%)
23	46,XX	Ish nuc mos45,X[4]/47,XXX[4]/46,XX[992]	0,8% (8 núcleos)
25	46,XX	Ish nuc mos45,X[4]/47,XXX[2]/46,XX[994]	0,6% (6 núcleos)
36	46,XX	Ish nuc mos45,X[8]/46,XX[992]	0,8% (8 núcleos)
37	46,XX	Ish nuc mos45,X[4]/47,XXX[2]/46,XX[994]	0,6% (6 núcleos)
42	mos45,X[2]/47,XXX[1]/46,XX[97]	Ish nuc mos45,X[34]/47,XXX[4]/46,XX[962]	3,8% (38 núcleos)

**Tabla 14. Comparación de los hallazgos citogenéticos convencionales (Bandeo GTG) y moleculares (FISH) en mujeres control entre las edades de 23 a 42 años.**

### 6.5.2 PRESENTACIÓN DE CASO PACIENTE *mos 1*

Paciente con edad actual de 37 años. Trabajó 9 años en una clínica veterinaria y ahora se dedica al hogar. El esposo de 40 años de edad, tiene una hija de otra unión de 17 años quien a la vez tiene un hijo varón, no tiene antecedentes familiares de problemas reproductivos ni enfermedades asociadas. Reporta una historia obstétrica de G5P0A5. En el exámen patológico del cuarto aborto se reportó en un feto de sexo femenino no malformado, un proceso infeccioso ascendente y en el material de legrado del quinto aborto no se observaron vellosidades coriales en el material examinado. En ninguna pérdida se realizó estudio citogenético. (Tabla 15).

La paciente es de tipo de sangre A positivo. Presentó desarrollo normal de caracteres sexuales secundarios, su menarquia fue a los 13 años de edad con ciclos menstruales cada 24 a 27 días y duración de sangrado de 3 días. En el exámen anatómico se observó útero, ovarios y cavidad uterina normales, con permeabilidad positiva.

Como antecedente patológico reporta infecciones urinarias en los embarazos, reporta antígenos antifebriles positivos (Flagelar H, Parafítico A, Somático O, Proteus OX19 y *Brucella abortus*). En las citologías vaginales recientes evidencian Metaplasia Escamosa como anomalía del epitelio glandular. Presentó Galactorrea 6 meses después del último aborto. Como antecedente quirúrgico, la paciente fue sometida a una cirugía facial por herida de bala y a legrados en los 5 abortos. Como antecedentes familiares, la mujer tiene hermanos con hijos y dos hermanos infértiles de 35 y 39 años de edad, con falla espermática estudiada, uno de ellos (39 años) se hizo tratamiento de Fertilización In Vitro (IVF) y tiene un hijo varón. Se les realizó cariotipo a los hermanos y fueron normales en ambos casos (46,XY). La mamá de la paciente a los 36,5 años tuvo un mortinato no malformado. (Figura 6)

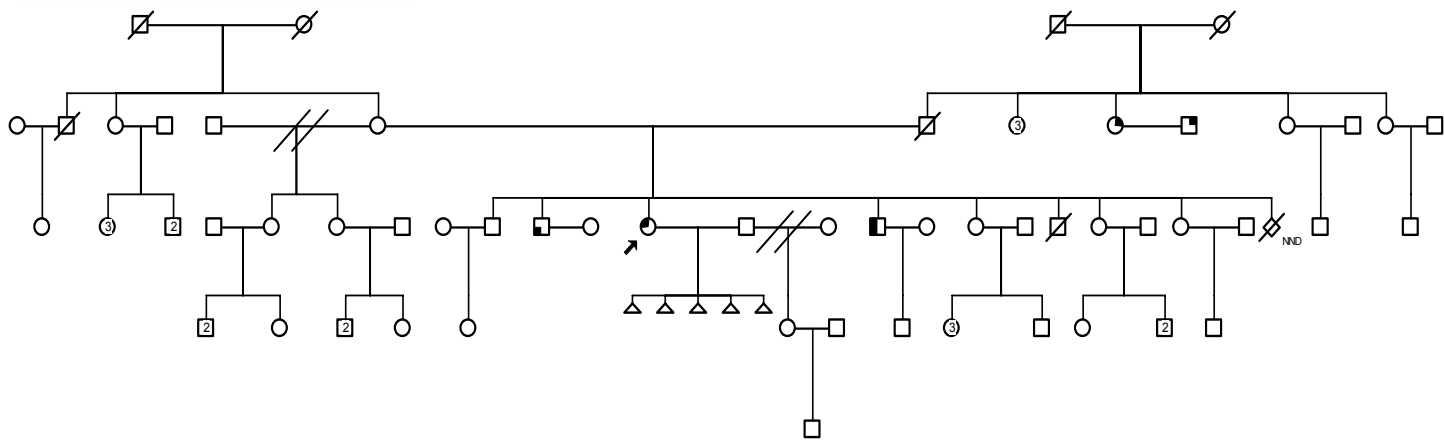
El análisis cromosómico de la paciente y su esposo, fue realizado a los 36 años de edad, en muestra de sangre periférica únicamente. En lo referente al análisis citogenético de la paciente *mos 1*, en el estudio convencional con bandeo GTG se leyeron 100 metafases a partir de las cuales se reportó el complemento cromosómico anormal:  $mos45,X[5]/46,XX[95]$ , con un 95% de células normales y un 5% de células aneuploides con monosomía de cromosoma X. Por FISH se leyeron 1000 núcleos interfásicos con resultado  $ish\ nuc\ mos45,X[166]/47,XXX[8]/46,XX[826]$ , observándose un 17,4% de patrón de hibridización anormal para cromosoma X, del

cual el 16,6% (166 núcleos) correspondió a una sola señal (45,X) y el 0,8% (8 núcleos) a tres señales (47,XXX); en el 82,6% (826 núcleos) restante se observó patrón de hibridización normal para cromosoma X con dos señales respectivamente. En la mujer control empleada para este caso, se encontró un patrón de hibridización anormal de tan sólo el 0,8% (8 núcleos) correspondiente a una señal (45,X), no se observaron núcleos con otro patrón de hibridación anormal para cromosoma X, el 99,2% (992 núcleos) restante evidenció patrón de hibridización normal con dos señales (Figura 7, Tablas 12 y 13).


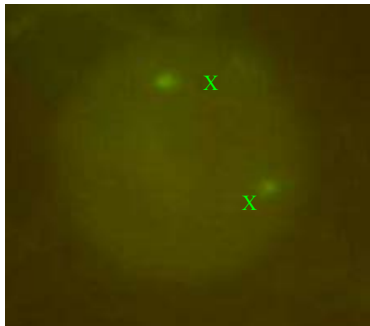

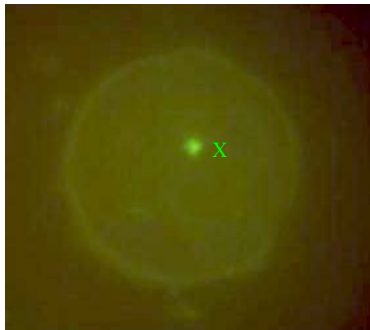
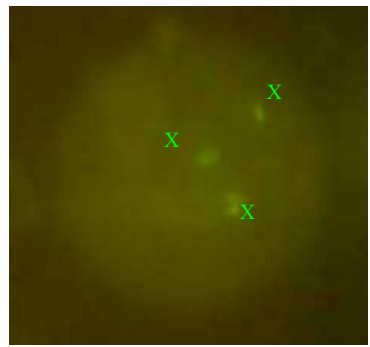
PACIENTE	No DE	EDAD	CARIOTIPO	EDAD
	ABORTOS	GESTACIONAL		MATERNA
<i>mos1</i>	1	SEMANAS	NO	21
	2	4	NO	24
	3	4	NO	29
	4	6	NO	30
	5	18	NO	35
		11		

**Tabla 15. Datos acerca de los abortos padecidos por la paciente mos1.**

DEFINICION DE SIMBOLOS	
□	○ No afectado
◻	◐ Infertilidad no estudiada
◻	◐ Falla espermatica. Infer. no tratada
◻	◐ Mosaicismo en cromosoma sexual
◼	◐ Falla espermatica. Inf tratada con IVF
△	△ Aborto
◻	◐ Mortinato no malformado
NND	NND



**Figura 6. Árbol genealógico paciente *mos1*.**

PACIENTE <i>mos1</i>	ESTUDIO CITOGÉNÉTICO CONVENCIONAL (BANDEO GTG)	ESTUDIO CITOGÉNÉTICO MOLECULAR (FISH)
REPORTE	mos45,X[5]/46,XX[95]	ish nuc mos45,X[166]/47,XXX[8]/46,XX[826]
CELULAS 46,XX		
CELULAS 45,X		
CELULAS 47,XXX	No se observaron	

**Figura 7. Fotos de los estudios citogenéticos realizados en la paciente *mos1*.**

### 6.5.3 PRESENTACIÓN DE CASO PACIENTE *mos 2*

Paciente con edad actual de 38 años, ocupación hogar. Fue atendida en CECOLFES por infertilidad secundaria de 5 años de evolución. El esposo tiene 44 años de edad, es Ingeniero Eléctrico con antecedente de enfermedad venérea (gonorrea) a los 18 años sin estudio de espermograma. Reporta una historia obstétrica de G4P1A3. En los tres abortos espontáneos se detectó por ecografía embriocardia positiva. (Tabla 16)

La primera hija nació a los 29 años de edad por parto vaginal sin complicaciones es fenotípicamente normal y actualmente tiene 8 años de edad. La paciente presentó telarquia y pubarquia normal, la menarquia fue a los 13 años de edad con ciclos menstruales cada 30 días con duración de sangrado de 3 días, refiriendo dismenorrea I. El tipo de sangre es O positivo.

A nivel familiar tiene una tía con infertilidad no estudiada. Como antecedente patológico se encontró hipercolesterolemia controlada y como antecedente quirúrgico amigdalectomía. (Figura 8)

El examen anatómico mostró útero, ovarios, cavidad uterina normal y permeabilidad positiva. El estudio inmunológico mostró factor inmune celular por activación inmune, respuesta citotóxica antiviral y fuerte autoinmunidad secundaria Th1.

El examen citogenético fue realizado en CECOLFES a los 37 años de edad, en muestra de sangre periférica únicamente, aunque comentó que se hizo a sus 35 años un estudio previo en otra institución con el mismo resultado. En el estudio convencional con bandejo GTG se leyeron 100 metafases a partir de las cuales se reportó el complemento cromosómico anormal:  $mos47,XXX[2]/46,XX[98]$ , con un 98% de células normales y sólo un 2% de células aneuploides con trisomía de cromosoma X. Por FISH se leyeron 1000 núcleos interfásicos con resultado ish nuc  $mos45,X[56]/47,XXX[9]/46,XX[935]$ , observándose un 6,5% de patrón de hibridización anormal para cromosoma X, del cual el 5,6%(56 núcleos) correspondió a una sola señal (45,X) y el 0,9% (9 núcleos) a tres señales (47,XXX); en el 93,5% (935 núcleos) restante se observó patrón de hibridización normal para cromosoma X con dos señales respectivamente. En la mujer control empleada para este caso, se encontró un patrón de hibridización anormal de tan sólo el 0,6%, el cual se distribuyó en un 0,4% (4 núcleos) para una señal y un 0,2% (2 núcleos) para tres señales; el

99,4%(994 núcleos) restante evidenció patrón de hibridización normal para cromosoma X. (Figura 9 y Tablas 12 y 13)

PACIENTE	No DE ABORTOS	EDAD GESTACIONAL SEMANAS	CARIOTIPO	EDAD MATERNA
<i>mos2</i>	1	12	NO	31
	2	8	NO	33
	3	12	NO	35

**Tabla 16. Datos acerca de los abortos padecidos por la paciente *mos2*.**

#### 6.6 MEDICIÓN DE LA RESERVA OVÁRICA EN LAS PACIENTES *mos1* y *mos2*

Los valores obtenidos en la medición de la hormona FSH en el día tres del ciclo menstrual, no mostró niveles de FSH >12mUI/ml indicador de reserva ovárica disminuida.

	EDAD ACTUAL	PACIENTE	ABORTADORA CONTROL	CONTROL NORMAL
<i>mos1</i>	37	6,5	8,0	5,3
<i>mos 2</i>	38	10,5	5,7	5,3

**Tabla 17. Medición de la FSH en el día tres del ciclo menstrual en las pacientes *mos1* y *mos2* con sus respectivos controles de la misma edad.**

DEFINICION DE SIMBOLOS	
□	○ No afectado
◻	◐ Infertilidad no estudiada en pareja
◼	◑ Cancer Linfático
◽	◒ Mosaicismo en cromosoma sexual
▲	▲ Aborto

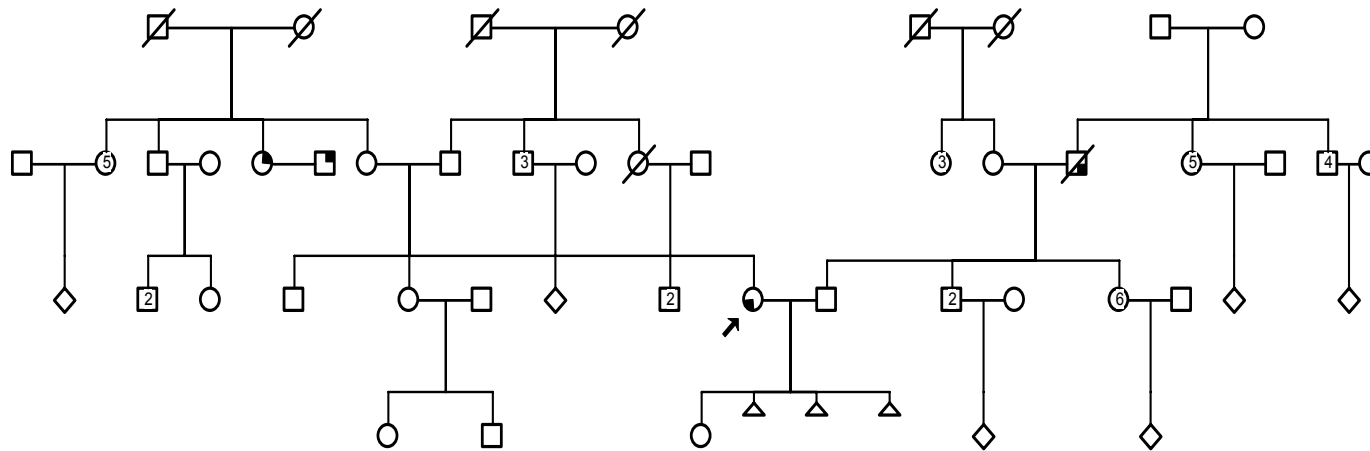
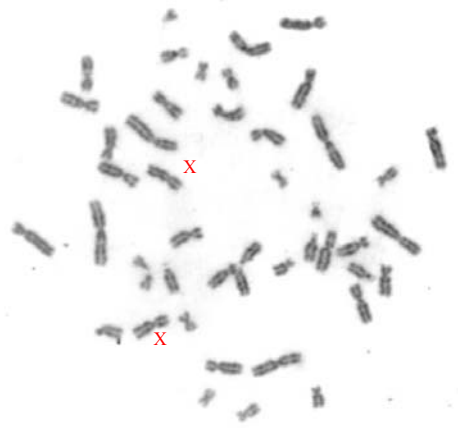
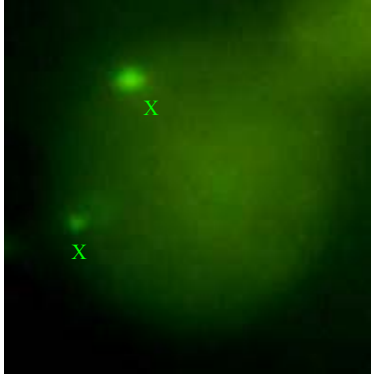


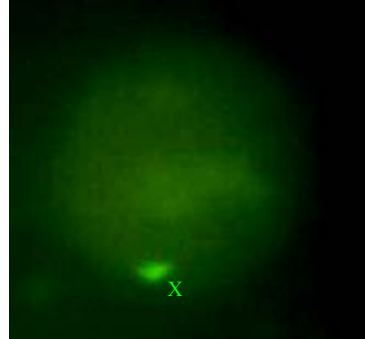


Figura 8. Árbol Genealógico de paciente *mos 2*.

PACIENTE <i>mos2</i>	ESTUDIO CITOGENÉTICO CONVENCIONAL (BANDEO GTG)	ESTUDIO CITOGENÉTICO MOLECULAR (FISH)
REPORTE	mos47,XXX[2]/46,XX[98]	ish nuc mos45,X[56]/47,XXX[9]/46,XX[935]
CELULAS 46,XX		
CELULAS 47,XXX		
CELULAS 45,X	No se observaron	

**Figura 9. Fotos de los estudios citogenéticos realizados en la paciente *mos2*.**

## 7 ANALISIS DE RESULTADOS

### 7.1 FACTORES DIAGNOSTICADOS EN LAS 20 PAREJAS ABORTADORAS

Los resultados clínicos arrojados en el presente estudio, permitieron notar que definitivamente la pérdida recurrente de la gestación es una entidad multifactorial, donde se involucran en una misma pareja diversos factores causales, pues en el 75% de las estudiadas se encontró más de un factor diagnóstico, esta observación es soportada por la Sociedad Europea de Embriología y Reproducción Humana y la Sociedad Nacional de Consejería Genética (Estados Unidos), quienes en reportes recientes han promocionado la evaluación e investigación multidisciplinar de las parejas con aborto, recurrente (Christiansen O.B. *et. al.*, 2005 y Laurino M.Y., 2005).

En las parejas con aborto recurrente la edad de las mujeres es menor (32,8 años) con respecto a la de los hombres (36,2), aspecto similar al observado por Holzgreve W. *et. al.* (1984) en el estudio de 144 parejas (mujeres 30,5+/-6,3 y hombres 35,8 +/-7,4). Esto indica que los factores causales de la pérdida de la gestación van más allá de la edad materna avanzada. También se sustenta por el hecho que en 20 parejas remitidas el 70% presentó más de dos pérdidas, esto es un buen indicador de la presencia conjugada de varios factores influyentes sobre las pérdidas.

Entre los factores diagnosticados en las 20 parejas se resaltan como factores inmune los anticuerpos bloqueadores bajos y la inmunidad celular activada (citotoxicidad celular, respuesta inmune autoinmune y activación inmune), los cuales son indicadores del desarrollo de una respuesta aloinmune derivada de antígenos paternos expresados sobre el desarrollo del feto, evitando la iniciación exitosa del embarazo y promoviendo la regresión fetal, lo que termina desencadenando el aborto. En la actualidad, la asociación de estos factores inmunes con el aborto recurrente aún no ha sido demostrada ampliamente, por lo cual existen muchas controversias sobre su papel causal y por ende sobre su intervención terapéutica. La linfoterapia es aplicada en el mundo entero por muchas instituciones, Ogasawara M. *et al.*(2000) reporta que la inmunoterapia es efectiva para aproximadamente el 10% de las mujeres con aborto recurrente de causa desconocida, este bajo porcentaje se debe posiblemente a la carencia de índices alógenicos predictores de pérdida del embarazo, siendo imposible escoger pacientes apropiadas para este tratamiento.

Los demás factores diagnosticados como inmunodesviación Th1 y Th2, anticuerpos antinucleares (ANAS) y anticuerpos antitiroideos son causas predictivas en la literatura. Con respecto a las causas aloinmunes, se ha propuesto una nueva hipótesis para explicar la pérdida recurrente de la gestación, la cual involucra inmunidad tipo Th1 (células T ayudadoras) hacia el trofoblasto: En la decidua hay millares de células presentadoras de antígeno y otras células de respuesta inmune. En respuesta a la invasión trofoblástica, estas células pueden llegar a ser activadas y el producto de esta activación es la secreción por parte de estas células de un perfil de citoquinas de tipo Th1 o Th2. En casos donde predomina el perfil de citoquinas Th1, principalmente interferón-gamma, factor de necrosis tumoral o interleuquina-12, estas citoquinas pueden directa o indirectamente ir en detrimento del crecimiento y diferenciación celular placentario temprano y ser tóxicas para el desarrollo del embrión. No obstante, se requieren estudios más extensivos sobre esta hipótesis y su relación con el aborto recurrente (Hill, J.A. *and* Choi B.C., 2000).

Finalmente, algunos autores han propuesto que mujeres con anticuerpos antinucleares (ANAS) positivos, y autoanticuerpos para antígenos tiroideos pueden presentar una condición autoinmune subclínica asociada con pérdida recurrente de la gestación, sin embargo, faltan estudios extensivos sobre este aspecto (Lee R.M. *and* Silver R.M., 2000, Fausett, B.M. *and* Branch, W.D., 2000).

Con respecto al factor anatómico, se observó miomatosis y obstrucción tubárica. Aún sigue siendo motivo de discusión si los miomas son una causa de aborto recurrente, se piensa que grandes y múltiples miomas localizados en la región submucosa pueden afectar la implantación y de esta forma incrementar el riesgo de aborto, las pacientes presentaron miomas intramurales y suberosos, cuya implicación no es definitiva como factor causal de las pérdidas. De las 4 mujeres con obstrucción tubárica, dos presentaron embarazos ectópicos en trompa derecha y fueron estirpadas, en las dos restantes una con obstrucción bilateral y otra con obstrucción tubárica izquierda no hay causa concreta que explique dichas alteraciones. Estas alteraciones anatómicas explican uno de los factores de riesgo en mujeres abortadoras como es la dificultad de concebir (Propst, A.M. *and* Hill III, J.A., 2000, Stepheson M.D., *et al.*, 2002, Laurino M.Y. *et al.*, 2005).

El posible defecto en la fase luteal en las abortadoras remitidas (5/20), se sospechó por los bajos niveles de progesterona en día 22 del ciclo y durante el embarazo temprano, sin embargo esta causa hasta el momento es controversial pues si

bien, la progesterona es necesaria para la implantación exitosa del embrión y el mantenimiento del embarazo temprano y cuenta con el 25 a 40% de las pérdidas durante el primer trimestre, se propone realizar un diagnóstico confiable por biopsia endometrial o niveles seriales de progesterona antes de incursionar a las pacientes en algún tipo de tratamiento (Lee R.M. and Silver R.M., 2000, Roberts, C.P. and Murphy A.A., 2000, Stephenson M.D. *et. al.*, 2002).

Con respecto al factor masculino observado en el 25% de las parejas (5/20), la teratozoospermia, astenozoospermia, reducción de la viabilidad espermática y el elevado daño acrosomal encontrado en cuatro de los pacientes, contribuyen a explicar uno de los factores de riesgo en estas parejas abortadoras como es la dificultad de concebir, mientras que la detección de polizoospermia en uno de los pacientes, es un factor masculino asociado en la literatura con aborto recurrente que podría contribuir a la formación de defectos cromosómicos en los abortos. La gran proliferación espermática dada por un incremento en la división meiótica, aumenta el riesgo de no – disyunción u otros errores durante la espermatogénesis, que ocasionarían productos cromosómicamente anormales. La anterior valoración se respalda porque una de las pérdidas de esta pareja fue un embarazo anembrionado en la octava semana de gestación, se sabe que las molas hidatidiformes son usualmente diploides pero tienen dos juegos haploides paternos, por lo cual una contribución paterna desequilibrada, pudo ser responsable de dicha pérdida.

En 5 de las 20 parejas (25%) existió un posible factor infeccioso, sin embargo las asociaciones entre vaginitis, infecciones genitourinarias e infecciones maternas con *Toxoplasma gondii*, *Brucella abortus* y *Chlamidia trachomatis* aún no tienen una clara asociación con el aborto recurrente y por ende hay pocas herramientas para discutir sobre los mecanismos por los cuales estos microorganismos causan el aborto en estas mujeres. Pandey M.K. *et. al.* (2005) han dicho que infecciones con *Chlamidia trachomatis* puede provocar aborto debido a la fuerte reacción inmune hacia proteínas bacterianas específicas, Cramer D.W. and Wise L.A. (2000) plantean que *Brucella abortus* es un microorganismo asociado con aborto en animales y de posible afectación en humanos, la paciente afectada (*mos1*) adquirió la infección durante su estancia laboral de 9 años en una clínica veterinaria. Con respecto a la vaginosis bacteriana estos autores, plantean que es una alteración de la flora bacteriana vaginal asociada con la pérdida de lactobacilus y sobrecrecimiento de bacterias anaeróbicas como *Gardnerella vaginalis* y *Micoplasma hominis*. Un estudio

prospectivo en mujeres sometidas a Fertilización in Vitro (IVF), sugirió la alta frecuencia de aborto espontáneo en mujeres con vaginosis bacteriana, sin embargo la relevancia de esta observación con respecto a la concepción natural está aún debatida.

Aunque el mayor factor involucrado en la pérdida de la gestación es el genético (60%), las 20 parejas analizadas presentaron con mayor frecuencia el factor inmune con un 75% (15/20). La explicación de tal diferencia se justifica por la baja frecuencia de abortos estudiados, pues sólo en 5 de 20 parejas (25%) se analizaron 6 pérdidas, porcentaje que contribuye a subestimar el factor genético en las demás parejas, e incluso en las 5 mencionadas porque a excepción de un caso, en ellas se analizó un sólo producto.

La carencia de los estudios citogenéticos es limitante en nuestro país debido a que no están contemplados dentro del régimen de salud actual y por su alto costo o desinformación, no es asequible para muchas de las parejas afectadas, además algunas parejas comunicaron que no hubo crecimiento o se contaminaron las muestras remitidas para el estudio. Con respecto a los 58 abortos reportados, en algunos casos la carencia de este análisis se justifica por la poca factibilidad de la obtención de la muestra apropiada, como pudo haber ocurrido en alguno de los 22 abortos preclínicos presentados, sin embargo, las anteriores limitantes, si se reflejan en los 36 abortos embriónicos y fetales restantes, donde el promedio de edad gestacional en cada caso (7,3 y 12,9 respectivamente) están contemplados dentro del rango de abortos reportados con cromosomopatía (7 a 12 semanas), esto indica que muy probablemente parte de los 52 abortos no estudiados (90%) tenían compromiso citogenético y por lo tanto las parejas tendrían el factor genético subestimado en su diagnóstico.

Con respecto a los seis abortos analizados, el 83,3% fueron citogenéticamente normales, sobre ello hay dos aspectos a analizar. En primer lugar, el hecho que se valore que los cariotipos normales no evidencian factor citogenético en la pérdida, no descarta definitivamente la presencia de un factor genético en la pareja, que sea de diagnóstico netamente molecular como por ejemplo; mutaciones letales en genes ligados a X en el caso de los dos abortos consecutivos 46,XY, analizados en una misma paciente a la edad materna de 30 y 31 años respectivamente. Con este ejemplo, se quiere ilustrar la necesidad de implementar otras herramientas diagnósticas a nivel genético molecular, que permitan estudiar completamente la incidencia de este factor sobre la pérdida recurrente y por ende darle el sobrepeso a la

causa genética dada teóricamente en un 60%. En segundo lugar, es importante tener en cuenta que los cariotipos normales en abortos previos es predictor de un subsecuente aborto, por lo tanto, los 5 sobre 6 (83,3%) abortos normales es un factor de riesgo importante para las 5 parejas que los presentaron, esta observación concuerda con el caso de la paciente con tres pérdidas recurrentes, quien tuvo en la primera y segunda pérdida productos 46,XY y subsecuentemente sufrió una tercera pérdida (Ogasawara M. *et. al.* 2000 y Stephenson M.D. *et. al.*, 2002).

La monosomía de X evidenciada en un aborto de 10 semanas de gestación es un hallazgo cromosómico reportado en todos los estudios citogenéticos sobre aborto recurrente, esta anomalía ocupa un segundo lugar en frecuencia (20%), después de las trisomías (50%). Generalmente es reportada en pérdidas de primer trimestre, tal como se evidenció en el producto analizado.

## 7.2 ANTECEDENTES PATOLOGICOS, FAMILIARES Y PERSONALES EN LAS 20 PAREJAS CON ABORTO RECURRENTE

Los antecedentes familiares fueron más frecuentes en mujeres (85%) que en hombres (20%), de los cuales se resaltaron el aborto (10/20) y la diabetes (5/20).

Con respecto al antecedente familiar de dos o más abortos en las 20 parejas, 6 (33,3%) reportaron este antecedente en hermanos, hermanas o padres. En las pacientes *mos1* y *mos2* no hubo antecedente familiar de aborto. Al desconocer a fondo los factores por los cuales se dieron estas pérdidas, es limitante asociar dicho antecedente con las pérdidas de las parejas. Por otro lado, Cramer D.W. *and* Wise L.A. (2000) reportaron un riesgo incrementado de aborto espontáneo del 3% en mujeres con diabetes no controlada, aspecto importante a tener en cuenta en las 5 mujeres abortadoras con antecedente familiar de esta enfermedad.

A diferencia de los antecedentes familiares, los patológicos tuvieron casi el mismo porcentaje en mujeres (30%) y en hombres (35%). Los más frecuentes fueron galactorrea para las mujeres (3/20) y varicocele para los hombres (4/20). Las tres mujeres con galactorrea no presentaron hiperprolactinemia, por lo cual se descartó este factor como posible causa de sus pérdidas. El antecedente patológico de varicocele fue encontrado en 4 hombres de 27, 30, 32 y 36 años de edad. El paciente de 30 años fue sometido a varicocelectomía izquierda a sus 22 años y presenta astenozoospermia y reducción de la viabilidad espermática, aspectos muy relacionados clínicamente que pueden contribuir a explicar la dificultad de

concepción en la pareja y sus dos pérdidas presentadas. En los tres pacientes restantes el varicocele no fue quirúrgicamente tratado, sólo en uno de ellos se reporta semen normal puesto que en los demás no fue estudiado.

### 7.3 ASPECTOS GENETICOS DE LOS MOSAICISMOS DE BAJA PROPORCIÓN EN CROMOSOMAS SEXUALES EN PAREJAS CON ABORTO RECURRENTE

Los mosaicismos cromosómicos de baja proporción son uno de los resultados citogenéticos que ha representado mayores problemas de interpretación a la hora de establecer un diagnóstico y consejería genética a los pacientes afectados. Una de las posibles explicaciones a esto puede ser la falta de consenso en cuanto a la definición como tal de mosaicismo cromosómico de bajo nivel, puesto que algunos autores lo definen como líneas celulares anormales halladas en menos del 6% (Peschka B. *et al.*,1999), en menos del 10% (Meschede *et al.*,1998, Scholtes. *et al.*,1998, Gekas *et al.*,2001, Sonntag *et al.*,2001 y Morel *et. al*, 2002) y en menos del 15% (Voigt R. *et. al.*, 2004), además existen diferencias en el número de metafases analizadas en este tipo de casos, las cuales oscilan entre 6 a 30 metafases con extensión de la lectura entre 50 a 150 mitosis para confirmar los mosaicos. También, no hay consenso sobre las técnicas de apoyo diagnóstico más apropiadas para el estudio de esta clase de alteraciones, ni el tipo de muestras apropiadas para confirmarlos (ejemplo, sangre periférica y biopsia de piel). Incluso en el Sistema de Nomenclatura de Citogenética Internacional tampoco existe un referente claro con respecto a la interpretación de los mosaicismos de baja proporción, pues la definición de los mosaicismos como tal: “*anormalidades en las cuales coexisten en un mismo organismo dos o más líneas celulares cromosómicamente diferentes, detectadas en por lo menos dos células*”, no contribuye del todo a esclarecer este tipo de hallazgos a nivel citogenético ni clínico, incluso algunos autores como Peschka *et. al.* (1999) y Voigt R. *et. al.* (2004) tienen en cuenta dentro del mosaico una sola célula anormal si encuentran más de dos líneas aneuploides relacionadas, criterio aplicado en el estudio de la mujer control de 42 años. Además, el ISCN (1995) no indica los porcentajes mínimos ni máximos de células aneuploides requeridas para definir un mosaicismo de bajo nivel.

Existen varios estudios prospectivos y retrospectivos en el campo citogenético en parejas con aborto recurrente, la tabla No18 resume seis reportes mundiales realizados entre 1980 a 2003.

	2005 (Colombia)	Singh, D.H. <i>et. al.</i> ,1980 (Tennessee)	Holzgreve W. <i>et.al.</i> ,1984 (California)	Sachs E.S. <i>al.</i> ,1985 (Holanda)	Fryns and Buggenhut, 1998 (Bélgica)	Mahfouz R. <i>et.al.</i> ,2001 (Libano)	Duzcan F. <i>et. al.</i> ,2003 (Turkia)
No PAREJAS	20	23	144	500	1743	561	226
CARIOTIPO NORMAL	18/20 (90%)	18/23 (78%)	128/144 (89%)	450/500 (90%)	1650/1743 (95%)	549/561 (98%)	215/226 (95%)
CARIOTIPO ANORMAL	2/20 (10%)	5/23 (22%)	16/144 (11%)	50/500 (10%)	93/1743 (5%)	12/561 (2%)	11/226 (5%)
MOSACISMO EN CROMOSOMA SEXUAL	2/2 (100%)	5/5(100%)	12/16 (75%)	18/50 (36%)	4/93 (4,3%)	2/12 (16,7%)	1/11 (9%)
MOSACISMO AUTOSOMAL	0/20(0%)	0/5(0%)	2/16 (12,5%)	6/50 (12%)	1/93 (1,1%)	0/12 (0%)	0/11 (0%)
TRANSLOCACIONES	0/20(0%)	0/5(0%)	2/16 (12,5%)	22/50 (44%)	71/93 (76,3%)	8/12 (66,7%)	8/11 (73%)
OTRAS ANOMALIAS	0/20(0%)	0/5(0%)	0/16 (0%)	4/50 (8%)	17/93 (18,3%)	2/12 (16,7%)	2/11(18%)
No ABORTOS	> 2 ABORTOS	> 2 ABORTOS	> 2 ABORTOS	> 2 ABORTOS	> 2 ABORTOS	> 2 ABORTOS	> 2 ABORTOS
EDAD GESTACIONAL	<22 semanas	NR	<20 semanas	NR	<28 semanas	NR	<28 semanas
TECNICA (MUESTRA)	BG y FISH en SP	BR y BQ en SP y en algunos casos BP	BG en SP	BG en SP	BG en SP y en algunos casos BQ, BC y NOR	BG en SP	BG en SP y en algunos casos BC y NOR
LECTURA	30 Metafases y 100 en mosaicismo. FISH 1000 núcleos	55 Metafases	30 Metafases y 50 a 60 en mosaicismos	16 Metafases contadas de las cuales sólo 8 analizadas) y 50 a 100 en mosaicismos	NR	6 Metafases contadas de las cuales 5 analizadas) y 20 en mosaicismos	20 Metafases y 50 en mosaicismos

**Tabla 18. Comparación de hallazgos citogenéticos en estudios mundiales de parejas con aborto recurrente reportados entre 1980 y 2003.** BG, BC y BQ y NOR (Bandeos G, C y Q y NOR), FISH (Hibridación in situ con Fluorescencia), SP (Sangre periférica), NR (No reporta), BP (Biopsia de Piel)

Los reportes presentaron diferencias en cuanto al límite de edad gestacional de los abortos, técnicas empleadas en los estudios, tipo de muestras analizadas en las parejas, número de metafases leídas y número de parejas estudiadas. Estos diversos parámetros no sólo influyen sobre las frecuencias calculadas y por ende dificultan la comparabilidad de los estudios, sino que también es un reflejo de la gran heterogeneidad de conceptos en cuanto a la definición de aborto y mosaicismo de baja proporción, aspecto que ha venido siendo preocupante para la comunidad científica. La Sociedad Europea de Embriología y Reproducción Humana propone la urgente necesidad de hacer un consenso no sólo sobre la evaluación diagnóstica sino también sobre los referentes conceptuales a tener en cuenta en la investigación del aborto recurrente (Christiansen, O.B., 2005).

A pesar de estas limitaciones, es importante rescatar algunas particularidades observadas al comparar los reportes con el presente estudio. Aunque el porcentaje de anormalidad cromosómica en las parejas con aborto recurrente oscila entre el 2 al 5%, en algunos reportes se muestra un porcentaje más alto entre el 10 al 22%, lo cual es comparable con el calculado en las 20 parejas estudiadas (10%), esto se justifica por el pequeño tamaño de muestra. Con respecto a la cromosomopatía más frecuente, en 4 de 6 estudios las translocaciones ocupan el mayor porcentaje, entre el 44 al 76,3%, sin embargo, se encontró la particularidad que los mosaicismos de baja proporción en cromosomas sexuales cubre en los 2 estudios restantes el mayor porcentaje de anormalidad cromosómica, que osciló entre el 75 a 100%, no obstante en los demás estudios hubo presencia de este tipo de alteración en las parejas analizadas oscilando entre un 4,3% a 36%. En el presente estudio, se reportan dos mosaicismos de baja proporción en cromosomas sexuales como única cromosomopatía reportada, aspecto similar a lo reportado por Singh, D.H. *et. al.*(1980) en su estudio sobre 23 parejas analizadas. Holzgreve W. *et.al.* (1984) a pesar de encontrar otras anomalías en las 144 parejas analizadas, tuvo mayor porcentaje (75%) de mosaicismo con respecto a las demás alteraciones.

Es notorio que los mosaicismos en cromosomas autosómicos son menos frecuentes que los mosaicismos en cromosomas sexuales, incluso en 3 reportes no se encontraron y en aquellos donde se presentaron, su porcentaje fue relativamente bajo con respecto a los mosaicismos en cromosomas sexuales (12,5% vs.75%, 12% vs. 36% y 1% vs. 4,3%). Esto puede justificarse por el hecho que una célula puede mantenerse viable aún con la pérdida de cromosomas sexuales ya sea de un

cromosoma X o un cromosoma Y, pues la inactivación del cromosoma X y el alto contenido de heterocromatina constitutiva (no codificante) en el cromosoma Y son factores que pueden entrar a jugar a la hora de seleccionar positivamente una célula aneuploide, llegando a ser factores “a favor” del mantenimiento de la vida de la célula alterada, caso contrario ocurre en los cromosomas autosómicos, donde en cada uno de ellos se presentan miles de genes que regulan continuamente el desarrollo y función de la célula y cualquier alteración en ellos (rearrreglo estructural no balanceado o pérdida) conlleva a la letalidad celular.

Los estudios de Singh D.H. et al. (1980), Holzgreve W. et al. (1984), Sachs E.S. et al. (1985) y Mahfouz R. et al. (2001) ponen en evidencia que los mosaicismos de baja proporción en cromosomas sexuales son más frecuentes en mujeres que en hombres pues las frecuencias oscilan entre el 89 al 100%. Los dos mosaicos encontrados en este estudio pertenecieron a dos mujeres abortadoras (2/2), rasgo similar a los estudios de Singh D.H. et al. (5/5) y Mahfouz R. et al. (2/2); los estudios de Holzgreve W. et al. (11/12) y Sachs E.S. et al. (16/18) a pesar de mostrar mayor frecuencia de mosaicismo en mujeres (11/12 y 16/18) también encontró repercusión en hombres (92% vs. 8% y 89% vs. 11%) aunque en un porcentaje claramente menor. Al igual que en el presente estudio, ningún reporte encontró mosaicismo en los dos integrantes de la pareja.

En los mosaicismos reportados en la literatura es notoria la amplia heterogeneidad de aneuploidías encontradas en cada uno de los mosaicos, no obstante fueron más frecuentes las líneas celulares hiperdiploides que las hipodiploides. En lo que respecta a los mosaicos hallados en el presente estudio, la presencia de líneas celulares hipo e hiperdiploides fue equitativa, pues una mujer presentó dentro de su mosaico, monosomía de X (45,X) y la otra mujer trisomía de X (47,XXX). En los reportes, los complementos cromosómicos 47,XXX/46,XX y 45,X/46,XX no se presentaron en una frecuencia sobresaliente con respecto a los demás mosaicos, sin embargo, en todos los estudios se reportan uno de los dos o ambos mosaicos encontrados en este estudio. Adicionalmente, en las pacientes con mosaicismos, las células aneuploides se observaron por citogenética convencional en un 2%(*mos2*) y 5%(*mos1*) respectivamente, en los reportes mundiales, este tipo de mosaicos se encontraron en menos del 10%, por lo cual caben dentro de la categoría de mosaicismos de baja proporción (Tabla 19).

	45,X/46,XX		47,XXX/46,XX		OTROS MOSAICOS
	Frecuencia (%)	Frecuencia (%)	Frecuencia (%)	Conteo celular (%)	Frecuencia (%)
2005, (Colombia)	½ (50%)	5/95 (5%)	½ (50%)	2/98 (2%)	0/2 (0%)
Sachs E.S. <i>et. al.</i> , 1985 (Netherlands)	7/18 (39%)	3/49 (6%)	1/18 (5,5%)	2/50 (4%)	10/18 (55,5%)
Holzgreve W. <i>et. al.</i> , 1984 (California)	0/12 (0%)	0 (0%)	2/12 (17%)	1/49 (2%)	10/12 (83%)
Duzcan F. <i>et. al.</i> , 2003 (Turquia)	0/1 (0%)	0 (0%)	1/1 (100%)	No reporta (<10%)	0/1 (0%)
Kuo P.L. and Guo H.R., 2004 (Taiwan)*	2/18 (11%)	7/93 (7%)	2/18 (11%)	5/95 (5%) y 18/82(18%)	14/18 (78%)
Voigt R. <i>et.al.</i> , 2004 (Alemania)*	15/25 (60%)	2,5/53 (5%)	0/25 (0%)	0 (0%)	10/25 (40%)

\* Estudios con mujeres con aborto recurrente únicamente

**Tabla 19. Comparación de los mosaicos de baja proporción en cromosomas sexuales hallados en el presente estudio con respecto a los reportados en la literatura mundial mediante análisis convencionales por bandeó GTG.**

Al momento del análisis citogenético las pacientes tenían 36 (*mos1*) y 37 (*mos2*) años de edad, sin embargo la paciente de 37 años se había realizado un cariotipo previo a los 35 años de edad donde se reportó el mismo mosaico 47,XXX/46,XX, observación que contribuye a confirmar que éste es independiente de la edad avanzada.

La anterior valoración también se apoya en los resultados obtenidos por FISH, por Guttenbach M. *et. al.* (1995) y Devi A.S.*et. al.* (1998). En el estudio de Guttenbach M. *et. al.* evaluaron mediante esta técnica en individuos saludables (90 mujeres y 138 hombres), la pérdida del cromosoma X y Y en relación con la edad, estimando que la pérdida del cromosoma X en mujeres es mucho más frecuente que la pérdida del cromosoma Y en hombres, pero esta pérdida sólo mostró relación significativa después de la menopausia. Así mismo, Devi A.S.*et. al.* reportaron en 30 controles entre 18 a 65 años de edad, una asociación entre la edad y el porcentaje de

células con monosomía de X, con una tasa de acumulación de células de aproximadamente 700 por  $10^6$  células por año.

Similarmente, el estudio de Guttenbach *et. al.*, correlacionaron la pérdida del cromosoma X con la edad, a través de estudios de FISH en núcleos interfásicos de 90 mujeres normales entre los 0 a 91 años de edad. El análisis de regresión lineal demostró que existe una fuerte correlación entre la frecuencia de núcleos interfásicos con monosomía de X y la edad, únicamente en mujeres añejas entre los 52 a 91 años. Guttenbach *et. al.* reportan en las mujeres analizadas entre los 21 a 25 años un porcentaje promedio de pérdida del cromosoma X del 2,23% y Devi A.S. *et. al.* entre un 1,7% aproximadamente, en este estudio las dos mujeres control analizadas por FISH dentro de este rango de edad, mostraron una frecuencia del 0,4% y como es notorio, no supera la frecuencia límite publicada en los dos reportes. En las mujeres de 36 a 40 años se reporta un porcentaje de hipodiploidía del 2,95% por Guttenbach *et. al.* y Devi A.S.*et. al.* de un 2,45% aproximadamente, las mujeres control del presente estudio no superan dicho porcentaje pues se halló en un promedio de 0,6%. Finalmente, en mujeres entre 41 a 45 años el porcentaje de núcleos que exhibieron una sola señal fue del 2,52% por Guttenbach *et. al.* y por Devi A.S. *et. al.* de un 2,9% aproximadamente, lo cual soporta la idea que el mosaico observado en la mujer control de 42 años del estudio, es producto de un efecto adquirido por la edad, pues en el FISH se evidenció un porcentaje de hipodiploidía del 3,4% donde a pesar de ser un poco mayor, no sobrepasa la frecuencia máxima de monosomía obtenida por Guttenbach *et. al.* en una mujer de 91 años (5,1%) ni por Devi A.S. *et. al.* en una mujer de 65 años (4,6% aproximadamente) (Figura 10).

Todas estas valoraciones también se respaldan por el hecho que la mujer control de 42 años encuentra en estado premenopáusico, debido a que su valor de FSH fue de 19,5 mUI/ml en el día tres del ciclo menstrual indicador de reserva ovárica disminuida.

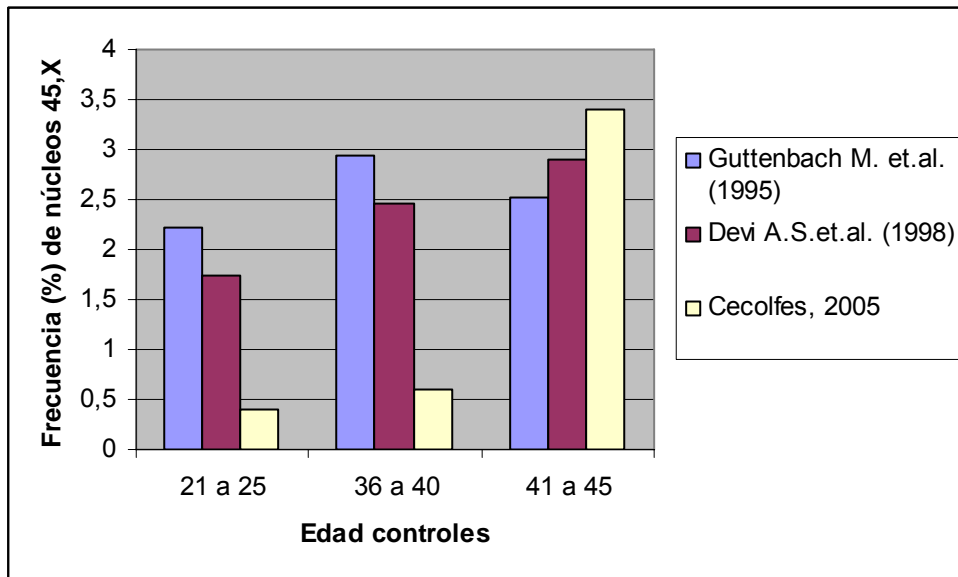
Ahora, comparando las frecuencias de monosomía de X halladas en las dos abortadoras con mosaicismo (*mos 1* y *mos2*), con respecto a las mujeres control de Guttenbach *et. al.*, Devi A.S.*et. al.* y las del presente estudio, se observa que la frecuencia de hipodiploidías se apartan de las frecuencias observadas en los controles pues la mujer *mos 1* presentó un valor de monosomía del 16,6% y la mujer *mos2* del 5,6%. Incluso dichos valores superan la frecuencia límite de monosomía de X reportada por Guttenbach *et. al.* y Devi A.S.*et. al.* en el grupo de mujeres añejas

(5,1% y 4,6% aproximadamente) y además es mayor al porcentaje encontrado en la mujer control de 42 años con mosaicismo (3,8%) (Figura 11).

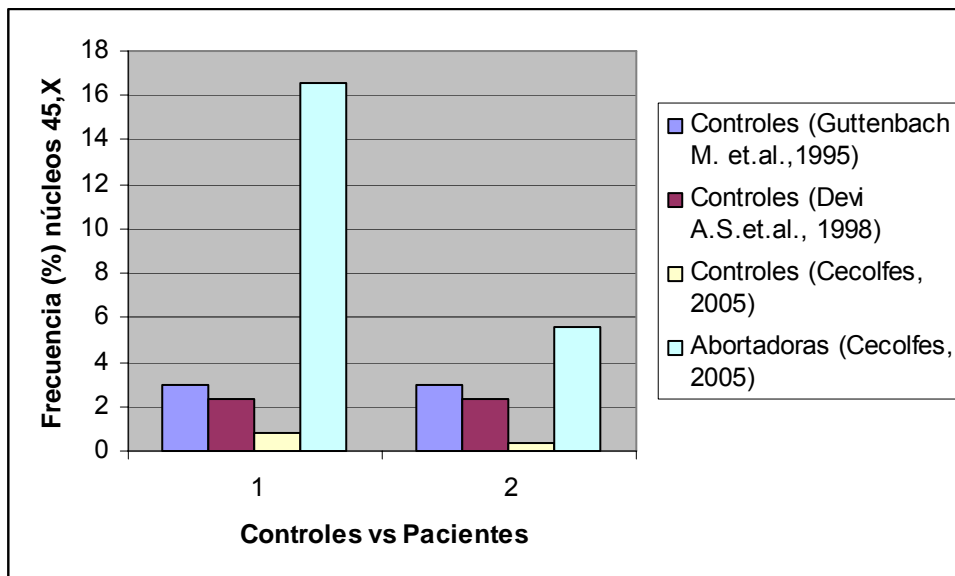
El anterior análisis, da mayor indicio que el mosaicismo en las dos mujeres abortadoras es una anomalía cromosómica constitucional originada desde las primeras etapas del desarrollo embrionario más no por una anomalía adquirida durante la vida por efecto de la edad, sin embargo, esto realmente se llegaría a comprobar mediante un estudio cromosómico en fibroblastos de biopsia de piel que no sólo confirmaría la alteración como un rasgo constitucional sino que también daría una aproximación hacia el señalamiento de un posible mosaicismo cromosómico en línea germinal el cual podría tener un efecto sobre el desarrollo de las células y también sobre la capacidad de fertilización.

Otro aspecto a analizar son los tipos y proporción de mosaicismos encontrados entre los estudios de citogenética convencional y molecular en las pacientes *mos 1* y *mos 2*. En la paciente *mos 1* la monosomía de X se observó en un 5% vs. 16,6%, porcentajes que confirman la presencia de la línea celular 45,X en la paciente, pues fue la anomalía que sobresalió por ambas técnicas. En la paciente *mos 2* se esperaba que por FISH el porcentaje de trisomía de X fuera mayor, pero particularmente se observó mayor frecuencia de monosomía con respecto a trisomía de X (5,6% vs. 0,9%), este comportamiento posiblemente puede deberse a que el amplio número de células analizadas por FISH (1000 núcleos) permitió encontrar líneas celulares anormales no detectables en un conteo metafásico de sólo 100 células, por lo cual, la sensibilidad del FISH en el estudio de mosaicismos cromosómicos de baja proporción es mayor. Además, independientemente que por FISH, las células 47,XXX resultaran menos frecuentes que las células 45,X, ambas líneas fueron mayores en las pacientes con respecto a los controles, lo cual indica que no se pueden interpretar como artefactos de hibridización. Sería importante, confirmar el comportamiento del mosaico en otros tipos de tejido como por ejemplo, fibroblastos de biopsia de piel.

Aunque los resultados citogenéticos fueron comparables con respecto a los estudios internacionales, sería importante realizar sobre nuestra población normal, un estudio citogenético molecular que correlacione la edad, con el porcentaje de aneuploidía en los cromosomas sexuales. Estos valores serían un gran referente a la hora de interpretar los mosaicismos de baja proporción en pacientes colombianas con aborto recurrente.



**Figura 10. Comparación de la frecuencia de hipodiploidías detectadas por FISH en 1000 núcleos interfásicos, entre mujeres controles del presente estudio (Cecolfes, 2005) y mujeres normales reportadas por Guttenbach et.al. (1995) y Devi A.S.et.al. (1998). Las frecuencias comparadas se encuentran en el rango de edad de 21 a 45 años.**



**Figura 11. Comparación de la frecuencia de hipodiploidías detectadas por FISH en 1000 núcleos interfásicos, entre las mujeres abortadoras con mosaicismo y los controles normales del reporte internacional de Guttenbach et.al. (1995) y Devi A.S.et.al. (1998) y del presente estudio (Cecolfes, 2005). Las mujeres control de presentaron la misma edad de las pacientes (36 años para *mos1* y 37 años para *mos2*).**

#### 7.4 POSIBLES IMPLICACIONES BIOLÓGICAS DE LOS MOSAICISMO DE BAJA PROPORCIÓN EN CROMOSOMA SEXUAL EN LAS MUJERES ABORTADORAS

Peschka B *et. al.* (1999) plantea que no es clara la significancia de los mosaicismos de cromosoma sexual para establecer el riesgo genético individual en la descendencia. Por lo tanto la consejería genética de esta entidad representa un problema a la hora de valorar su repercusión sobre el desarrollo de síndromes cromosómicos y por ende su relevancia clínica.

La significancia clínica de los mosaicismos de baja proporción en cromosoma X, tanto para las pacientes mismas como para su descendencia a la hora de establecer el riesgo genético individual, se fundamenta actualmente en estas tres hipótesis: La primera fue planteada por Burgoyne y Baker en 1984, quienes proponen que durante el emparejamiento meiótico en células aneuploides 45,X y 47,XXX se puede causar muerte prematura de células germinales. La segunda hipótesis es que la calidad de los oocitos puede estar influenciada por deficiencia o sobreexpresión de productos génicos específicos en el cromosoma X. Y la tercera hipótesis está basada en que los mosaicismos en cromosoma X pueden ser una manifestación de un control genético anormal en la disyunción cromosómica. Los defectos en los procesos de mitosis o meiosis, pueden ocasionar un daño gonadal incluyendo meiosis aberrantes y atresias oocíticas.

Es importante discutir los resultados obtenidos en el presente estudio, tomando como referencia estas tres hipótesis:

Los mosaicismos de baja proporción en cromosoma sexual se originan posiblemente por un mecanismo de no – disyunción mitótica o anafase prolongada durante el desarrollo embrionario temprano. El fenómeno de separación prematura del centrómero incrementa el riesgo de no – disyunción causando aneuploidía del cromosoma X primordialmente. Debido a que la incidencia de dicho fenómeno es más baja en hombres que en mujeres, es probable que el cromosoma X inactivo sea más propenso a sufrir esta alteración, esto se ha confirmado porque en células con monosomía de X en la mayoría de los casos se ha perdido el cromosoma X inactivo (Guttenbach M. *et. al.*, 1995)

No se puede decir con exactitud el fenómeno responsable del origen de los mosaicos 45,X/46,XX y 47,XXX/46,XX hallados en las pacientes, sólo se pueden formular algunas hipótesis que traten de explicarlos: Dichos mosaicos, pudieron

haber surgido por un fenómeno de no – disyunción poscigótica, de una de las células 46,XX, produciendo un mosaico 45,X/47,XXX/46,XX, esto se respalda con la detección por FISH de complementos 45,X/47,XXX/46,XX en ambas pacientes. También el mosaico 45,X/46,XX pudo haberse producido por una anafase larga que afectó la disyunción normal del cromosoma X en una célula normal 46,XX del embrión. El cultivo de fibroblastos ayudaría a esclarecer aún más el posible origen de los mosaicos, pues no sólo daría información sobre la presencia o no de las aneuploidías en otro tipo de tejidos, sino también de acuerdo a su porcentaje, contribuiría a vislumbrar cómo estaría repercutiendo sobre la línea germinal.

Por otro lado, los mosaicismos repercuten en la descendencia de los individuos que los portan puesto que también son un reflejo de una inestabilidad genética que predispone a las mujeres afectadas a un riesgo incrementado de producir embarazos anormales que culminan en aborto o en la concepción de hijos con anomalías congénitas. Las explicaciones más pausibles de los abortos en las madres con mosaicismo en cromosoma X son en primer lugar la presencia de gen o genes alterados responsables de regular en la meiosis la disyunción o la continuidad del ciclo celular (anafase larga), lo cual produciría abortos con monosomías o trisomías, o en segundo lugar, el fenómeno de no disyunción primaria después de la fecundación, lo cual podría producir un cigoto aneuploide no viable o con algún mosaicismo.

Estas valoraciones se respaldan con los datos de Singh, D.H. *et. al.*,(1980), en donde se analizaron 97 concepciones de 31 madres con mosaicismo encontrándose en el 75% de los fetos anomalía cromosómica, de éstos el 50% culminó en aborto espontáneo y el 25% tuvo anomalías genéticas o congénitas detectadas al nacimiento, porcentaje que es muy alto con respecto a la tasa de aborto reportada para la población general (10 a 15%). Más recientemente, Kuo P.L. *and* Guo H.R. (2004) reportan en 18 mujeres con mosaicismo cromosómico de baja proporción en cromosoma X, 39 abortos, de los cuales 33 tuvieron cariotipo disponible con un 61% (20/33) de anomalía. De los 20 abortos anormales el 55% (11/20) correspondieron a trisomías (13,15, 16, 18, 21y 22), el 35% (7/20) a monosomía de X universal (45,X), el 5% a triploidía (69,XXX) y el 5% restante a un mosaico en cromosoma sexual (45,X/46,XX).

Debido a que los productos de aborto de las pacientes *mos1* y *mos2* no fueron estudiados citogenéticamente, no fue posible compararlos con estos antecedentes, sin

embargo, en los dos casos el promedio de edad gestacional de las pérdidas están entre las 7 a 12 semanas (*mos1* 8,6 y *mos2* 10,6 semanas), periodo en el que se han reportado el mayor número de cromosomopatías en productos de aborto analizados.

Los árboles genealógicos evidencian en ambos casos antecedentes de infertilidad, lo cual representa en las pacientes algún tipo de inestabilidad genética heredada a nivel familiar. Esto es más evidente, en el árbol de la paciente *mos1*, quien tiene una tía paterna con infertilidad no estudiada y dos hermanos infértiles con falla espermática. Pensando en la posibilidad de justificar dichos problemas reproductivos por la presencia de mosaicismo, se les realizó a los dos hermanos el cariotipo pero fueron normales (46,XY), lo cual indica que su inestabilidad genética representada en infertilidad podría deberse a otro tipo de daños genéticos. Se ha sustentado que la inestabilidad genética en hombres se refleja en infertilidad mientras que en mujeres se refleja en aborto recurrente, por lo cual es importante contemplar en este tipo de familias el estudio de factores de riesgo como microdeleciones en cromosoma Y, mutaciones en genes que intervienen en la división celular o detección de mosaicismos cromosómicos en línea germinal.

Por todas estas observaciones, se recomienda en este tipo de mujeres, el diagnóstico genético preimplantación o el diagnóstico prenatal para el seguimiento de sus embarazos, sin embargo estas alternativas son ampliamente debatidas desde el punto de vista ético, por lo cual se hace necesario analizar las implicaciones de estos tratamientos dentro del contexto socio-cultural y político de nuestro país.

#### 7.5 ASPECTOS CLINICOS DE LAS PACIENTES CON MOSAICISMO DE BAJA PROPORCIÓN EN CROMOSOMA X

La evaluación diagnóstica de las 18 parejas con cariotipo normal ilustra el comportamiento multifactorial del aborto recurrente al igual que las dos parejas afectadas por el mosaicismo de baja proporción en cromosoma X. El único estudio que ha intentado investigar los mecanismos de aborto recurrente en mujeres con mosaicismo de cromosoma X es el reportado por Kuo P.L and Guo H.G. (2004). Estos autores estudiaron integralmente 18 mujeres afectadas por esta anomalía y compararon sus datos con respecto a dos grupos control con antecedente de aborto recurrente, uno con rearrreglos autosómicos estructurales balanceados y otro sin anomalías cromosómicas. Sólo dos factores fueron implicados en el aborto recurrente de las mujeres con mosaicismo; la reserva ovárica disminuida y las anomalías uterinas. En las dos pacientes con mosaicismo, no se encontró falla

ovárica prematura, la cual fue cuantificada por la medición del nivel de FSH en el día tres del ciclo menstrual. Este valor también fue comparado con dos grupos de mujeres de la misma edad; abortadoras citogenéticamente normales y controles normales sin antecedente de aborto, con ciclos regulares y demás parámetros establecidos para el grupo control de este estudio. Aunque en la paciente *mos2* el valor de FSH fue más alto con respecto a la abortadora cromosómicamente normal y al control normal (10,5mUI/ml vs. 5,7mUI/ml vs. 5,3mUI/ml) fue <12 mUI/ml por lo cual no se puede catalogar como reserva ovárica disminuida, en la paciente *mos1* los valores de FSH no fueron muy diferentes (6,5mUI/ml vs. 8,0mUI/ml vs. 5,3mUI/ml). En relación con las anormalidades uterinas, tampoco presentaron alteraciones.

En todos los estudios referenciados las mujeres con mosaicismos en cromosoma X, fueron fenotípicamente normales, no presentaron en ningún caso fenotipo asociado con Síndrome de Turner, Síndrome de Superhembra, disgenesia gonadal o cualquier otro desorden genético asociado con fallas en el desarrollo sexual. No hubo una homogeneidad clínica en estas dos mujeres afectadas por mosaicismo de baja proporción en cromosoma X. Mientras en la paciente *mos1* se observó además del mosaico un posible factor genético a nivel familiar y un factor infeccioso, en la paciente *mos2* se detectó además del factor genético dado por el mosaico un factor inmune celular (citotoxicidad celular) y humoral (Inmunodesviación Th1). Ésto sustenta que para asociar los mosaicismos de baja proporción en cromosoma X con demás factores clínicos, es necesario estudiar mayor número de pacientes afectadas por esta alteración, lo cual sería un trabajo a largo plazo pues se necesitaría analizar una cohorte de estas pacientes de tamaño significativo. (Tabla 20)

PARAMETROS DESCRIPTIVOS	PACIENTE <i>mos1</i>	PACIENTE <i>mos2</i>
EDAD ACTUAL	37	38
MENARQUIA	14	13
CICLOS MENSTRUALES	24-27X3	30X3
HISTORIA OBSTETRICA	G5P0A5	G4P1A3
CARIOTIPO ABORTOS	NO	NO
PROMEDIO DE EDAD GESTACIONAL EN LAS PERDIDAS	8,6	10,6
PROMEDIO DE EDAD MATERNA EN LAS PERDIDAS	28	33
CITOGÉNÉTICA CONVENCIONAL BANDEO GTG	mos45,X[5]/46,XX[95]	mos47,XXX[2]/46,XX[98]
CITOGÉNÉTICA MOLECULAR FISH	ish nuc mos45,X[166]/47,XXX[8]/46,XX[826]	ish nuc mos45,X[56]/47,XXX[9]/46,XX[935]
% ANEUPLOIDIA BANDEO GTG	5	2
% ANEUPLOIDIA FISH	17,4	6,5
NIVELES DE FSH DIA 3 DEL CICLO MENSTRUAL (mUI/ml)	6,5	10,5
CARIOTIPO DE LA PAREJA	46,XY	46,XY
EDAD ACTUAL DE LA PAREJA	40	44
HIJOS DE OTRA UNION	SI	NO
HIJOS CON ANORMALIDADES CONGENITAS	NO	NO
FENOTIPO	NORMAL	NORMAL
EXAMEN ANATOMICO	NORMAL	NORMAL
ANTECEDENTES FAMILIARES	INFERTILIDAD	INFERTILIDAD
FACTOR DIAGNOSTICO	FACTOR GENETICO E INFECCIOSO	FACTOR GENETICO Y FACTOR INMUNE

**Tabla 20. Descripción clínica y citogenética de las pacientes afectadas por mosaicismo de baja proporción en cromosomas sexuales.**

## 8 CONCLUSIONES

La comparabilidad de los resultados citogenéticos y clínicos obtenidos de las parejas remitidas, pusieron en evidencia la amplia heterogeneidad de conceptos y directrices diagnósticas y de manejo del aborto recurrente, por lo que se hace necesario promover un consenso, que permita avanzar significativamente en el pronóstico y tratamiento de las parejas afectadas, bajo una perspectiva integrada y multifactorial.

El hecho que en el 75% de las parejas remitidas por aborto recurrente, exista un compromiso clínico en más de un factor diagnóstico a nivel inmune, genético, anatómico, hormonal, infeccioso o masculino, ilustró que la perspectiva multifactorial respecto a la patogénesis del aborto recurrente deja de lado la visión mono – etiológica tradicional.

El factor diagnóstico más frecuentemente involucrado en las parejas con aborto recurrente fue el inmunológico (75%), dicha observación hace ver que en el proceso diagnóstico rutinario se está subestimando el factor genético en las parejas afectadas, aspecto evidente por el bajo porcentaje de cariotipos estudiados en los productos de aborto (10%) y por la poca disponibilidad de herramientas diagnósticas a nivel molecular que no sólo aumentarían la factibilidad para la obtención de resultados rápidos y confiables de las pérdidas sino que también contribuirían a descartar otros factores genéticos causales diferentes al citogenético.

En los estudios citogenéticos de las parejas estudiadas por antecedente de aborto recurrente se observó una frecuencia del 10% (2/20) de mosaicismos cromosómicos de baja proporción, sin embargo, aunque se esperaría una disminución de su frecuencia con un número mayor de muestra estudiada, ésta representa una de las cromosopatías sobre las cuales se deben focalizar investigaciones futuras no sólo para su interpretación citogenética sino para su asociación clínico – patológica con el aborto recurrente.

La interpretación citogenética de los mosaicismos de baja proporción requiere la integración de la citogenética convencional (Bandeo G) y la citogenética molecular

(FISH), pues como se hizo evidente en el estudio caso control, permitieron darle en las pacientes afectadas un valor diagnóstico con respecto a la mujer control normal, que lo presentó de manera adquirida por el efecto de edad, no obstante para confirmar en las pacientes abortadoras que esta anomalía es constitucional sería recomendable confirmar de rutina estos hallazgos en otro tipo de tejidos, como por ejemplo fibroblastos de biopsia de piel y tejidos gonadales.

Los mosaicismos cromosómicos 45,X[5]/46,XX[95] y 47,XXX[2]/46,XX[98] de las pacientes afectadas *mos1* y *mos2* fueron confirmados por FISH con un porcentaje del 16,6% y 0,9% sobre 1000 núcleos interfásicos respectivamente, no obstante por la sensibilidad de la técnica fue posible identificar la existencia de otras líneas celulares tales como 47,XXX en la paciente *mos1* y 45,X en la pacientes *mos2*, sería interesante confirmar en otro tipo de tejido dichos hallazgos.

Aunque no se estudiaron los ocho productos de aborto de las dos mujeres afectadas por mosaicismos de baja proporción en cromosoma sexual (5 y 3 respectivamente), varios estudios como el de Singh, D.H. *et. al.*,(1980) y Kuo P.L. *and* Guo H.R. (2004) han demostrado que estas pacientes tienen pérdidas con anormalidad cromosómica entre 50% al 61%, porcentaje incrementado con respecto a la tasa de aborto reportada para la población general (10 a 15%). Por ello, se recomienda promover dentro de la consejería genética de estas pacientes afectadas, un seguimiento ecográfico estricto de sus futuros embarazos.

En las pacientes afectadas por mosaicismo de baja proporción en cromosoma sexual se evidencian independientemente, posibles factores genéticos a nivel familiar, factores inmunes como citotoxicidad celular e inmunodesviación Th1 y factores infecciosos. Se sugiere a largo plazo estudiar una cohorte de estas pacientes para poder realizar asociaciones clínico – patológicas significativas.

## 9 PERSPECTIVAS

De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente investigación se proponen las siguientes perspectivas investigativas encaminadas a mejorar el diagnóstico y consejería genética de las parejas con aborto recurrente:

Realizar diagnóstico de productos de aborto por medio de Hibridación Genómica Comparativa.

Correlacionar la pérdida de los cromosomas sexuales en población colombiana entre 0 a 90 años con respecto a la edad.

Implementar de rutina el diagnóstico molecular de otros factores genéticos influyentes sobre el aborto recurrente.

Analizar una cohorte de pacientes con mosaicismo de baja proporción en cromosomas sexuales, para establecer en las pacientes con este tipo de anomalía, relaciones clínico – patológicas, genéticas y biológicas que permitan reorientar su diagnóstico y tratamiento.

## 10 BIBLIOGRAFÍA

**Ardila E., Abenzoza L.M., Bonilla J., Hurtado M.M., Urrego J. A., Vela M.F.** 2000. Identificación de los estudios clínicos controlados y metaanálisis en las revistas de salud en Colombia 1948-1998. El caso colombiano. *Acta Médica Colombiana*. Marzo-Abril 25( 2): 60-68.

**Barch, M. J., Knutsen, T. and Spurbeck, J.L.** 1997. The AGT Cytogenetics Laboratory Manual. Editorial Lippincott-Raven. Tercera Edición.

**Burton K.A., Van EE. C.C., Purcell K., Winship I. And Schelling A.N.** 2000. Autosomal translocation associated with premature ovarian failure. *J. Med, Genet.* Vol. 37. e2.

**Carp H., Toder V., Aviram A., Daniely M. , Mashiach S. and Barkai G.** 2001. Karyotype of the abortus in recurrent miscarriage. *Fertility and Sterility*. April 75(4): 678 – 682.

**Carp H., Feldman B., Oelsner G. and Schiff E.** 2004. Parental karyotype and subsequent live births in recurrent miscarriage. *Fertility and Sterility*. May 81(5): 1296 – 1300.

**Christiansen O.B., Nybo Andersen A.M., Bosch E., Daya S., Delves P.J., Hviid T.V., Kuttech W.H., Laird S.M., Li T.C. and Ven der Ven K.** 2005. Evidence-based investigations and treatments of recurrent pregnancy loss. *Fertility and Sterility*. April 83(4): 821– 839.

**Cramer, D.W. and Wise, L. A.** 2000. The Epidemiology of Recurrent Pregnancy Loss. *Seminars In Reproductive Medicine*. 18(4): 331-339

**Devi A.S., Metzger D.A., Luciano A.A. and Benn P.A.** 1998. 45,X/46,XX mosaicism in patients with idiopathic premature ovarian failure. *Fertility and Sterility*. July 70(1): 89– 93.

**Duzcan F., Atmaca M., Ozan Cetin G. and Bagci H.** 2003. Cytogenetic studies in patients with reproductive failure. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 82: 53-56.

**Fanchin R., Schnauer L.M., Righini C., Guibourdenche J. Frydman R. and Taieb J.** 2003. Serum anti-Mullerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Human Reprroduction*. 18(2): 323-327.

**Fausett, B.M. and Branch, W.D.** 2000. Autoimmunity and Pregnancy Loss. *Seminars in Reproductive Medicine*. 18(4): 379-392

**Fryns Jean-Pierre and Van Buggenhout Griet.** 1998. Structural chromosome rearrangements in couples with recurrent fetal wastage. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* 81:171–176

**García-Enguádanos A., Calle M.E., Valero J., Luna S. And Domínguez-Rojas V.** 2002. Risk factors in miscarriage: a review. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* 102: 111–119

**Gekas J. Thépot F. Turleau C. Siffroi J.P. Dadoune J.P. Wasels R. Benzacken B. and Association des Cytogénéticiens de Langue Francaise.** 2001. Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men. *Hum. Reprod.* 16:82–90.

**Goddijn M. and Leschot N.J.** 2000. Genetic aspects of miscarriage. *Bailliere's Clinical Obstetrics and Gynaecology.* 14(5): 855 – 865.

**Gómez, C. y Ardila, J.** 2001. Estudio de casos y controles. **En:** Investigación clínica: Epidemiología clínica aplicada. (Ed.) Editorial CEJA. Bogotá, Colombia. pg. 165-186.

**Griffiths, A., Gelbart, W., Miller, J. and Lewontin, R.** 2000. *Genética Moderna.* Mc Graw Hill. Primera Edición.

**Guttenbach M., Koschorz B., Bernthaler U., Grimm T. and Schmid M.** 1995. Sex Chromosome Loss and Aging: In Situ Hybridization Studies on Human Interphase Nuclei. *Am.J.Hum.Genet.* 57:1143-1150.

**Hill, J.A. and Choi B.C.** 2000. Immunodystrophism: Evidence for a Novel Alloimmune Hypothesis for Recurrent Pregnancy Loss Involving Th1-Type Immunity to Trophoblast. *Seminars In Reproductive Medicine.* 18(4): 401-405.

**Hogge W. Allen, Byrnes, Abigail L., Lanasa, Mark C. and Surti, Urvashi.** 2003. The clinical use of karyotyping spontaneous abortions. *Am J Obstet Gynecol.* 189: 397-402.

**Holzgreve W., Schonberg S.A., Douglas R.G. and Golbus M.** 1984. X-Chromosome Hyperploidy in Couples with Multiple Spontaneous Abortions. *Obstetrics & Gynecology.* 63(2): 237-240.

**Hsu L.Y.F., Benn P.A., Tannenbaum H.L. Perlis T.E. and Carlson A.D.** 1987. Chromosomal Polymorphisms of 1, 9, 16 and Y in 4 Major Ethnic groups: A large Prenatal Study. *American Journal of Medical Genetics.* 26:95-101.

**ISCN (1995).** An International System For Human Cytogenetic Nomenclature. (Ed). Karger and Cytogenetics and Cell Genetics. Memphis, Tennessee, USA.

**Kim S.S., Jung S.C. Kim H.J., Moon H. R. and Lee J.S.** 1999. Chromosome Abnormalities in a Referred Population for Suspected Chromosomal Aberrations: A report of 4117 cases. *J Korean Sci.* 14:373-376.

**Klung, W. S. and Cummings, M. R.** 2000. Essentials of Genetics. Editorial Prentice Hall. Tercera Edición.

**Kuo P.L. and Guo H.R.** 2004. Mechanism of recurrent spontaneous abortions in women with mosaicism of X –chromosome aneuploidies. *Fertility and Sterility.* Dec. 82(6): 1594 – 1601.

**Lanasa,M.C. and Hogge W. A.** 2000. X Chromosome Defects as an Etiology of Recurrent Spontaneous Abortion. *Seminars in Reproductive Medicine.* 18(1): 97 - 103.

**Laurino,M. Y., Bennett, R.L., Saraiya, D.S., Baumeister, L., Lochner Doyle, D., Leppig, K., Pettersen, B., Resta, R., Shields,L., Uhrich, S., Varga,E. and Raskind., W. H.** 2005. Genetic Evaluation and Counseling of Couples with Recurrent Miscarriage: Recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *Journal of Genetic Counseling.* 14(3):165 – 181.

**Lee R. M., and Silver R.M.** 2000. Recurrent Pregnancy Loss: Summary and Clinical Recommendations. *Seminars in Reproductive Medicine.* 18(4): 433 -439.

**Lozano, J.M. y Dennis, R.J.** 2001. Medidas de frecuencia, de asociación y de impacto. **En:** Investigación clínica: Epidemiología clínica aplicada. (Ed.) Editorial CEJA. Bogotá, Colombia. pg. 95-112.

**Mahfouz R., Oreibi G.A., Darwiche N., El-Khechen S. and Zahed L.** 2001. Constitutional chromosome abnormal abnormalities among patients referred for blood karyotype analysis: A 5 – year study at the AUBMC. *Lebanese Medical Journal.* 49(1):6-11.

**Mau U.A., Backert I.T., Kaiser P. and Kiesel L.** 1997. Chromosomal findings in 150 couples referred for genetic counseling prior to intracytoplasmic sperm. *Human Reproduction.* 12(5): 930 – 937.

**Meschede D., Lemcke B., Exeler J.R. De Geyter C., Behre H.M., Nieschlag E. and Horst J.** 1998. Chromosome abnormalities in 447 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection – prevalence, types, sex distribution and reproductive relevance. *Human Reproduction.* 13: 576-582.

**Morel F., Gallon F., Amice V., Le Bris M.J., Le Martelot M.T., Roche S., Valery A., Derrien V., Herry A., Amice J. and De Braekeleer M.** 2002. Sex chromosome

mosaicism in couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*. 17(10): 2552 – 2555.

**Moreno García M., Fernández Martínez F.J. y Barreiro Miranda E.** 2004. Repercusión clínica de las anomalías cromosómicas. *An Pediatr (Barc)*. 61(3): 236 – 241.

**Muñeton C., Ramirez J.L., Vasquez G., Agudelo B.** 1998. Estudios citogenético y morfológico en productos de aborto espontáneo procedentes de diferentes servicios de ginecoobstetricia de la Ciudad de Medellín. *Iatreia*. Dic. 11(4):145-160.

**Niverlon –Chevallier A., Sidaner I., Mugneret F. and Turc – Carel C.** 1988. X maternal mosaicism and genetic counseling. *J. Genet Hum*. Aug 36(4): 331-336. *Abstract*.

**Ogasawara M., Aoki K. Okada S. and Suzumori K.** 2000. Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertility and Sterility*. Feb. 73(2): 300-304.

**Pandey, M.K., Rani, R. and Agrawal, S.** 2005. An update in recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet*. 272: 95–108

**Perez-Herrera Norma, Cevallos-Quintal Jose M. y Pinto-Escalante Doris.** 1999. Prevalencia de intercambios de cromátides hermanas en una población libre de exposición a agentes biológicos. *Rev. Biomed*. 10: 71-76.

**Peschka B., Leygraaf J., Van der Ven K., Montag M., Schartmann B., Schubert R., Ven der Ven H and Schwanitz G.** 1999. Type and frequency of chromosome aberrations in 781 couples undergoing intracytoplasmic sperm injectin. *Human Reproduction*. 14(9): 2257 –2263.

**Porter, T.F. and Scott, J.R.** 2000. Alloimmune Causes of Recurrent Pregnancy Loss. *Seminars In Reproductive Medicine* 18(4): 393-400.

**Propst, A.M. and Hill III, J.A., 2000.** Anatomic Factors Associated with Recurrent Pregnancy Loss. *Seminars In Reproductive Medicine* 18(4): 341-350.

**Ra, R. and Regan, L.** 2000. Thrombophilia and Adverse Pregnancy Outcome. *Seminars In Reproductive Medicine*. 18(4): 369-367.

**Roberts, C.P. and Murphya A.A.** 2000. Endocrinopathies Associated with Recurrent Pregnancy Loss. *Seminars in Reproductive Medicine*. 18(4): 357-362.

**Robinson, W. P., McFadden, D. E. and Stephenson M. D.** 2001. The Origin of Abnormalities in Recurrent Aneuploidy/Polyploidy. *Am. J. Hum. Genet.* 69:1245–1254.

**Rooney, D. J.** 2001. Human Cytogenetics: Constitutional Analysis. A Practical Approach. Tercera Edición. Oxford University Press.

**Ruiz, A.** 2001. Introducción a los diseños de investigación en medicina clínica. **En:** Investigación clínica: Epidemiología clínica aplicada. (Ed.) Editorial CEJA. Bogotá, Colombia. pg. 113- 131.

**Rubio, C., SimoÂn C., Vidal, F., Rodrigo, L., Pehlivan, T., RemohõÂ J., and Pellicer A.** 2003. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Human Reproduction.* 18(1): 182-188.

**Sachs E.S., Jahoda M.G.J., Van Hemel O.V., Hoogeboom A.J.M. and Sandkuul L.A.** 1985. Chromosome Studies of 500 couples with two or more abortions. *Obstetrics &Gynecology.* 65(3): 375-378.

**Salamanca, F.** 1993. Citogenética Humana: Fundamentos y Aplicaciones Clínicas. Editorial Médica Panamericana. Primera Edición.

**Schreck R. and Silverman N.** 2002. Fetal loss. **En:** Principles and Practice of Medical Genetics. Emery and Rimoin's. 4a Edición. pp. 982 –993.

**Silvestre E., Cusí V., Antich J. y Caballín M.R.** 2002. Protocolo para el estudio citogenético de los abortos espontáneos. *Prog. Diag. Prenat.* 14(4): 146 – 151.

**Singh D.N., Hara S., Foster H.W. and Grimes E.M.** 1980. Reproductive performance in women with sex chromosome mosaicism. *Obstet Gynecol.* May. 55(5): 608 – 611.

**Scholtes M.C.W., Behrend C., Dietzel-Dahmen J., Van Hoogstraten D.G.Marx K., Wohlers, S., Verhoeven H. and Zeilmaker G.H.** 1998. Chromosomal aberrations in couples undergoing intracytoplasmatic sperm injection. *Fertil. Steril.* 74: 933-937.

**Solari, A. J.** 1999. Genética Humana: Fundamentos Y Aplicaciones en Medicina. Editorial Médica Panamericana. Segunda Edición.

**Sonntag B., Meschede D., Ullmann V., Gassner P., Horst J., Nieschlag E., and Behre H.M.** 2001. Low – level sex chromosome mosaicism in female partners of couples undergoing ICSI therapy does not significantly affect treatment outcome. *Human Reproduction.* 16: 1648-1652.

**Stephenson M.D., Awartani K.A. and Robinson W.P.** 2002. Cytogenetics analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case control study. *Human Reproduction*. 17(2): 446 – 451.

**Therman, E. and Susman, M.**1993. Human Chromosomes: Structure, Behavior and Efeccts. 3a Ed. Springer –Verlag. New York.

**Thompson MW., McInnes R.R and Willard H.F.** 1991. Genetics in medicine. 5a. Ed. Philadelphia: Thompson & Thompson. WB. Saunders Co.

**Toncheva D., Ilieva P. and Mavrudieva M.** 1994. Detection of low level sex – chromosomal mosaicism. *Genetic Counseling*. 5(4): 363-367.

**Verma, R.S. and Babu, A.** 1995. Human Chromosomes: principles and techniques. 2<sup>a</sup>. Ed. Mac Graw Hill. United States.

**Voigt R., Schroder A.K., Hinrichs F. Diedrich K. Schwinger E. and Ludwig M.** 2004. Low – level Gonosomal Mosaicism in women undergoing ICSI cycles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. May. 21(5):149-155.

**Ward, K.J.** 2000. Genetic Factors in Recurrent Pregnancy Loos. *Seminars in Reproductive Medicine*. 18(4): 425-432.

**Wu R.C., Kuo P.L., Lin S.J., Liu C.H. and Tzeng C.C.** 1993. X chromosome mosaicism in patients with recurrent abortion or premature ovarian failure. *J. Formos Med Assoc. Nov.* 92(11): 953 – 956 (*Abstract*).

**Yusuf R.Z. and Naeem R.** 2004. Cytogenetics Abnormalities in Products of Conception: A relationship Revised. *American Journal of Reproductive Immunology*. 52: 88-96.