

Frecuencia de mosaicismos de baja proporción del cromosoma x en parejas con antecedente de aborto recurrente

Frequency of Low-level Mosaicism in X-Chromosome in Couples with Antecedent of Recurrent Miscarriages

Maribel Forero C. Biol. MSc., Elkin Lucena Q. M.D., PhD., Clara Esteban Pérez BSc., MSc.*

Resumen

El aborto recurrente se presenta entre el 1 y 7% de las parejas. Su etiología comprende factores genéticos, inmunológicos, anatómicos, hormonales, metabólicos, trombofílicos e infecciosos. Con el objetivo de establecer la frecuencia de mosaicismos de baja proporción en cromosomas sexuales, en una población de parejas con antecedente de aborto recurrente, se hizo un estudio citogenético prospectivo caso-control en 20 parejas, remitidas al Laboratorio de Biogenética del Centro Colombiano de Fertilidad y Esterilidad (CECOLFES). Se hizo valoración clínico-patológica, estudios anatómicos, hormonales, infecciosos, andrológicos y genéticos. Como técnicas citogenéticas se usaron el método convencional de bandedo GTG para el estudio de anomalías cromosómicas numéricas y estructurales y el método molecular de Hibridación *in situ* con Fluorescencia (FISH) para confirmar los mosaicismos en cromosomas sexuales. De acuerdo con los hallazgos paraclínicos de las parejas estudiadas, el diagnóstico mostró factores inmunológicos (75%), anatómicos (30%), hormonales (25%), masculinos (25%), infecciosos (25%), genéticos (15%) e idiopático (10%). Como resultados del estudio citogenético de las parejas, hubo un 10% de mosaicismos de baja proporción en cromosomas sexuales en dos mujeres abortadoras cuyo diagnóstico final incluyó factor genético e infeccioso y factor genético e inmune respectivamente. Sólo se es-

tudió citogenéticamente el 10% de los productos de aborto de todas las parejas. Se concluye 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

Palabras clave: Aborto recurrente, anomalía cromosómica, citogenética, mosaicismo en cromosoma sexual, mosaicismo de baja proporción.

Abstract

Recurrent miscarriage occurs in around 1 to 7 percent of couples. The etiology involves genetic, immunologic, anatomic, hormonal, metabolic, thrombophilic and infectious factors. With the aim of establishing the frequency of low-level

Recibido: 17 de agosto de 2006.

Aceptado: 11 de septiembre de 2006.

* Unidad de Biogenética Molecular Reproductiva. Centro Colombiano de Fertilidad y Esterilidad CECOLFES. Bogotá D.C., Colombia.

Se atribuye el trabajo a: Centro Colombiano de Fertilidad y Esterilidad CECOLFES Unidad de Biogenética. Correspondencia: Maribel Forero. Biol. MSc. rumafoca@hotmail.com. Calle 102 No 15-15 Trabajo presentado como sustentación de tesis de maestría en el Departamento de Postgrado de Ciencias Básicas de la Pontificia Universidad Javeriana, el día 14 de diciembre de 2005, en la ciudad de Bogotá D.C.

mosaicism in the X-chromosome, in a population of couples with prior recurrent miscarriages, a prospective case-control cytogenetic study took place on 20 couples, at the biogenetic laboratory in CECOLFES (Colombian Center of Fertility and Sterility). Clinical pathologic evaluation, anatomic, hormonal, infectious, andrologic and genetic studies were performed. As a conventional method in cytogenetic techniques, banding GTG was used for the study of structural and numeric chromosomal abnormalities whereas the molecular method of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) was used to confirm the mosaicism in sexual chromosomes. According to paraclinical results from the participating couples, diagnosis showed immunologic (75%), anatomic (30%), hormonal (25%), male (25%), infectious (25%), genetic (15%) and idiopathic factors (10%).

Results from the cytogenetic analysis, were 10% of low-level mosaicism in the X-chromosome in two women whose final diagnosis included genetic and infectious factors for one and genetic and immunologic factors for the other. Only 10% of the total miscarriages from the couples were evaluated. Conclusions include aspects such as multifactorial evidence of pathogenesis in recurrent miscarriage, the sub-diagnosis of genetic factors and the need to focus future investigations on cytogenetic interpretation and the clinical-pathological association between low-level mosaicism in the X-chromosome and recurrent miscarriage.

Key Words: Recurrent miscarriages, chromosomal abnormality, cytogenetics, sex chromosome mosaicism, low level mosaicism.

INTRODUCCIÓN

El aborto recurrente, es definido cuando una pareja presenta tres o más pérdidas consecutivas antes de las 20 semanas de gestación (1,2). No obstante en la literatura mundial y en la práctica médica dichos criterios varían en cuanto al número de pérdidas (dos o más) (3,4), edad gestacional (20 a 28 semanas) (3,5,6,7,8,9) y recurrencia (consecutivos o no consecutivos) (6). Por ello, recientemente la Sociedad Europea de Embriología y Reproducción Humana planteó la necesidad de promover un consenso sobre la definición del aborto recurrente dentro de la comunidad médica y científica (5). A nivel mundial, la incidencia de un aborto espontáneo ha sido estimada entre un 10 a 15% de todas las gestaciones (2,7,8), mientras que la prevalencia de dos pérdidas oscila entre un 2 a 5% y las de tres pérdidas consecutivas se sitúa menos del 1% (1,10).

Los factores etiológicos de la pérdida habitual del embarazo son muy heterogéneos, los

más reconocidos comprenden: factores genéticos (60%) (10,11), desórdenes hormonales (20 al 40%) (2,10), anormalidades anatómicas (15% a 30%) (2,12), desórdenes autoinmunes (30%) (9,13) y desórdenes trombofílicos (9,14). No obstante, existen casos con factor idiopático en más del 50% de las parejas (1,3,15,16). Están en controversia el reconocimiento de las infecciones maternas, deficiencia de cuerpo lúteo, incompetencia cervical, 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 (5,17).

Actualmente, los análisis citogenéticos de rutina sobre productos de aborto son 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 recolección y envío in-

apropiado 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 (7,18,19).

A esta gran problemática, se suma la poca disponibilidad de estudios genéticos en el campo citogenético y molecular, que diagnostiquen en las parejas, factores etiológicos relacionados con la pérdida habitual de la gestación. Desde el punto de vista citogenético, la presencia de mosaicismos de baja proporción con aneuploidías en cromosomas sexuales, se ha asociado con desarrollo sexual anormal y falla reproductiva, evidenciada en amenorrea primaria o secundaria, infertilidad y/o falla ovárica prematura (17,20,21,22), sin embargo, permanece muy oscura su relación con el aborto recurrente. Por ello, surgió 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 llevar a un subdiagnóstico o a generar dudas sobre la veracidad de sus hallazgos (23). El objetivo de esta investigación fue establecer la frecuencia de mosaicismos de baja proporción en cromosomas sexuales, en una población colombiana de parejas con antecedente de aborto recurrente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio: Se realizó un estudio Prospectivo Caso–Control en parejas remitidas al Laboratorio de Biogenética del Centro Colombiano de Fertilidad y Esterilidad (CECOLFES), para análisis citogenético por aborto recurrente, en el periodo comprendido entre Enero y Sep-

tiembre de 2005. Se incluyeron parejas con antecedente de 2 o más pérdidas antes de las 22 semanas de la gestación, en proceso diagnóstico, con posible factor genético a descartar, antecedente de 2 o más abortos con la misma pareja y sin restricción de edad. Se excluyeron parejas abortadoras recurrentes sin acceso a datos clínicos completos y que no desearon participar en el estudio.

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, con el fin de 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 desde hace tres años, no haber tenido historia de aborto espontáneo o un cariotipo embrionario o fetal anormal en ellas o en su familia (17). Al igual que las parejas abortadoras, las mujeres control no tuvieron exposición ocupacional o médica a agentes clastogénicos o genotóxicos. Los pacientes y el grupo control firmaron el formato de consentimiento informado de la institución para participar en la investigación, siguiendo los parámetros éticos exigidos por el comité de ética de la institución.

Valoración clínico-patológica de las parejas: Las parejas fueron sujetas a exámenes físicos, hormonales, inmunológicos, andrológicos y/o anatómicos que orientaron el diagnóstico de cada una de ellas: Los estudios hormonales incluyeron Gonadotropinas (LH, FSH), Progesterona, Prolac-

tina, 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 sonografía pélvica y laparoscopia. En todas las parejas los antecedentes familiares se indagaron mediante la realización de genealogías.

Análisis citogenéticos en las parejas: *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 (24). Al extendido cromosómico se le realizó bandeo GTG en un nivel de resolución de 450–550 bandas por genoma. Para la lectura de metafases, 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 no sesgar la observación de aneuploidías, se tuvo presente no leer láminas reventadas, ni metafases hiperdiploides con algún cromosomas de diferente nivel de condensación (25).

Se definió un mosaicismo como el hallazgo clonal de líneas celulares con diferente complemento cromosómico, cada uno, presente en por lo menos dos células, dicho criterio corresponde al señalado por el Sistema de Nomenclatura de Citogenética Internacional de 1995 (ISCN) (26). No obstante, se aplicó la excepción propuesta por Peschka *et al* (1999) (27), la cual establece que, si en el conteo se halla sólo una célula con una aneuploidía gonosomal ésta se descarta y el paciente se cataloga negativo para mosaicismo, pero si se encuentran dos o más líneas celulares

con anomalías numéricas en cromosoma sexual, la presencia de una sólo 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 la presente investigación las conclusiones definitivas sobre estos posibles mosaicismos se establecieron una vez realizada la Hibridación *In Situ* con Fluorescencia (FISH) en los individuos afectados. El criterio para definir un mosaicismo de baja proporción fue la presencia de menos del 10% de células anormales, que es el más frecuentemente reportado por la comunidad científica en este tipo de estudios (23, 27,28,29,30,31).

Estudio por citogenética molecular (FISH). El fish, se usó como prueba confirmatoria para establecer el diagnóstico de mosaicismo de baja proporción en cromosoma sexual. Para esta técnica se emplearon sondas de cromosomas sexuales (X y Y), siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial *Vysis*. Se leyeron 1000 núcleos interfásicos; como criterios de lectura se tuvieron en cuenta: la intensidad homogénea de las señales, núcleos de buena morfología, no superpuestos y extendidos cromosómicos sin ruido de fondo (32).

Evaluación de la reserva ovárica: A las pacientes con mosaicismo gonosomal se les cuantificó 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 (17).

Sistematización y análisis estadísticos de los datos: La colección de información se hizo de manera prospectiva durante el proceso diagnóstico de las parejas, ésta fue registrada en una base de datos de Excel y para su análisis se procesaron algunos datos en el programa Access. 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, lo que permitió analizar de manera global los factores diagnósticos en el grupo de parejas remitidas por aborto recurrente. Para el cálculo de significancia estadística entre casos y controles se aplicó la prueba de chi cuadrado (X^2). El valor de $p < 0.05$ fue considerado como una diferencia significativa. (4,33).

RESULTADOS

Aspectos clínicos de las parejas con aborto recurrente: Entre enero y septiembre de 2005, se remitieron al laboratorio de Biogenética de CECOLFES 20 parejas con diagnóstico de aborto recurrente. En el tiempo del examen citogenético, la edad de los hombres osciló entre 27 a 49 años con un promedio de 36,2 años y la edad de las mujeres tuvo un rango entre 25 a 42 años con un promedio de 32,8.

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 (75%), anatómicos (30%), hormonales (25%), masculinos (25%), infecciosos (25%), genéticos (15%) e

idiopático (10%). En el 25% (5/20) de los casos se adjudicó la causa de las pérdidas a uno sólo de estos factores y en el 75% (15/20) restante el diagnóstico contempló más de un factor etiológico (Tabla 1).

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 el de partos entre un rango de 0 a 1 con un promedio de 0,25. Las pérdidas ocurridas en el primer trimestre (= 12 semanas) abarcaron un 91% (53) y sólo el 9% (5) comprendieron abortos entre las 13 y 21 semanas de gestación. (Tablas 2 y 3)

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, es decir que, de los 58 abortos ocurridos en las 20 parejas, sólo el 10% (6) fueron cariotipados. (Tabla 4)

Hallazgos citogenéticos en las parejas abortadoras: De las 20 parejas, 18 (90%) presentaron cariotipo normal y 2 (10%) cariotipo anormal. En uno de los hombres se observó la inversión pericéntrica del cromosoma 9 (46,XY, inv(9)(p12q13)), 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 (2,34,35, 36). Las anormalidades correspondieron a mosaicismos de baja proporción en cromosoma sexual, presentes en dos mujeres abortadoras de 36 y 37 años de edad. Los complementos cromosómicos observados por citogenética convencional fueron 45,X[5]/46,XX[95] (paciente

mos1) y 47,XXX[2]/46,XX[98] (paciente *mos2*) y por FISH fueron ish nuc *mos45,X*[166]/47,XXX[8]/46,XX[826] (paciente *mos1*) y ish nuc *mos45,X*[56]/47,XXX[9]/46,XX[935] (paciente *mos2*). Las aneuploidías observadas por FISH, mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las pacientes abortadoras con respecto a las mujeres control: *mos1* 17,4% vs. 0,8% ($p < 0.05$) y *mos2* 6,5% vs. 0,6% ($p < 0.05$). (Tablas 5, 6 y Figura 1)

Grupo control: Las 20 mujeres control presentaron cariotipo normal a excepción de la mujer control de una paciente abortadora de 42 años, a quien se le observó coincidentalmente un mosaicismo de baja proporción en cromosoma sexual con complemento: *mos 45,X*[2]/47,XXX[1]/46,XX[97]. Debido a que su constitución cromosómica se relacionó con el criterio planteado por Peschka B. *et al.* (1999): (27), se confirmó este hallazgo por FISH, arrojando un complemento: ish nuc *mos45,X*[34]/47,XXX[4]/46,XX[962], con un 3,8% de patrón de hibridación anormal para cromosoma X. Para la interpretación de los anteriores hallazgos, se realizó una comparación del porcentaje de aneuploidía del cromosoma X en cinco mujeres control, representativas de los grupos de edad de las pacientes abortadoras, empleando la técnica de FISH. (Tabla 7).

DISCUSIÓN

Factores diagnosticados en las 20 parejas abortadoras: En las parejas, la edad de las mujeres fue menor (32,8 años) con respecto a la edad de los hombres (36,2), aspecto similar al observado por Holzgreve W. *et al.* (1984) (37) en el estudio de 144 parejas (mujeres 30,5+/-6,3 y hombres 35,8 +/-7,4). Esto indica que los facto-

res causales de la pérdida de la gestación en estas pacientes van más allá de la edad materna avanzada. Los resultados clínicos reafirman que el aborto recurrente es una entidad multifactorial donde se conjugan varios factores causales sobre las pérdidas, pues no sólo el 70% de las parejas tuvo más de dos pérdidas sino que al 75% se le señaló más de un factor diagnóstico. Esta observación, se respalda por la Sociedad Europea de Embriología y Reproducción Humana y la Sociedad Nacional de Consejería Genética (Estados Unidos), quienes han promocionado la evaluación multidisciplinar en este tipo de parejas (5,6).

Aunque el mayor factor involucrado en la pérdida de la gestación es el genético (60%) (10,11), las 20 parejas analizadas exhibieron 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, lo que contribuye a subestimar el factor genético en las parejas. Esto, debe alertar a la comunidad médica involucrada con este tipo de pacientes en dos aspectos; el primero consiste en divulgar a las parejas la opción de hacer este tipo de estudio sobre cualquier producto de aborto, independientemente del número de pérdidas presentadas y el segundo consiste en realizar la recolección adecuada de las muestras de aborto que serán remitidas para estudio citogenético, ya que, para desarrollar la técnica de cultivo celular, es determinante su buena preservación, adecuada selección de tejido y condiciones de asepsia.

Aspectos genéticos 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 han representado mayores problemas de interpretación a la

hora de establecer un diagnóstico y consejería genética a los pacientes afectados (23). 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% (27), en menos del 10% (23,28,29,30,31) y en menos del 15% (38). 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 (17, 23,28,29,30,31,37). Tampoco hay acuerdo sobre las técnicas de apoyo diagnóstico más apropiadas para el estudio de esta alteración, ni sobre el tipo de muestras apropiadas para confirmarlos (ejemplo, sangre periférica y biopsia de piel) (35,37,39,40,41). Incluso en el ISCN (1995) (26) no 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 citogenética, ni clínico. Incluso algunos autores como Peschka *et. al.* (1999) (27) y Voigt R. *et. al.* (2004) (38) 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 que participó en esta investigación. Además, el ISCN (1995) (26) no indica los porcentajes mínimos ni máximos de células aneuploides requeridas para definir un mosaicismo de baja proporción.

Existen varios estudios prospectivos y retrospectivos en el campo citogenético en parejas con aborto recurrente, la tabla No. 8 resume

seis reportes mundiales realizados entre 1980 y 2003 (35,37,39,40,41,42). Los reportes revelaron 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 son un reflejo de la gran heterogeneidad de conceptos en cuanto a la definición de aborto y mosaicismo de baja proporción. (Tabla 8).

A pesar de estas limitaciones, es importante rescatar algunas particularidades observadas al comparar los reportes con el presente trabajo: Aunque el porcentaje de anormalidad cromosómica en las parejas con aborto recurrente varió entre el 5 y 7% (1,2,35), en algunos reportes se muestra un porcentaje más alto que osciló entre el 10 al 22%, lo cual es comparable con el valor calculado en las 20 parejas estudiadas (10%); ésto se justifica por el pequeño tamaño de la muestra. Con respecto a la cromosopatía más frecuente, en 4 de 6 investigaciones las translocaciones evidenciaron el mayor porcentaje (44 al 76,3%) (35,40,41 y 42). En los 2 estudios restantes, se observó que los mosaicismos de baja proporción en cromosomas sexuales ocuparon el mayor porcentaje de anormalidad cromosómica, fluctuando entre el 75 a 100% (37,39), no obstante en los demás reportes hubo presencia de este tipo de alteración en las parejas analizadas, en un 4,3% a 36% (35,40,41,42).

En el presente estudio, se reportan dos pacientes con mosaicismos de baja proporción en cromosomas sexuales como única cromosopatía reportada, similar a lo reportado por Singh, D.H. *et. al.* (1980) (39) sobre 23 parejas analizadas. Holzgreve W. *et. al.* (1984) (37) a pesar de

encontrar otras anomalías en sus 144 parejas diagnosticadas, tuvo mayor porcentaje (75%) de mosaicismo con respecto a las demás alteraciones.

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 estos mosaicismos son más frecuentes en mujeres que en hombres pues las frecuencias oscilan entre el 89 y el 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.* y Sachs E.S. *et al.* a pesar de mostrar mayor frecuencia de mosaicismo en mujeres (11/12 y 16/18) también encontraron repercusión en hombres (92% vs. 8% y 89% vs. 11%) aunque en un porcentaje claramente menor. Este comportamiento, se ha relacionado con el fenómeno de separación prematura del centrómero de los cromosomas sexuales, el cual ocurre con mayor frecuencia sobre el cromosoma X inactivo que sobre el cromosoma Y, incrementando el riesgo de no-disyunción y por ende de generar aneuploidías gonosomales. Esto se respalda en que las células con monosomía de X en la mayoría de los casos han perdido el cromosoma X inactivo (42,44).

Interpretación de los mosaicismos de baja proporción en cromosomas sexuales como anomalías constitucionales: El hallazgo de aneuploidías gonosomales en dos de las pacientes abortadoras y en una mujer control, usando la citogenética convencional, reflejó los problemas de interpretación a la hora de catalogar dichas alteraciones como mosaicismos constitucionales o anomalías desarrolladas durante la vida del individuo por efectos de la edad.

Como se mencionó anteriormente, los mosaicismos de baja proporción en cromosomas sexuales hacen parte del grupo de cromosomopatías reportadas mundialmente en parejas con aborto recurrente mediante técnicas convencionales. Sin embargo, el estudio de FISH implementado en las pacientes y en las mujeres control, permitió dar mayores elementos valorativos a la hora de definir desde el punto de vista citogenético, el diagnóstico de las dos pacientes abortadoras.

El análisis de los resultados obtenidos en las mujeres control, se apoyó en los datos reportados por Guttenbach M. *et al.* (1995) (32) y Devi A.S. *et al.* (1998) (20), para mujeres y hombres saludables mediante la técnica de FISH, quienes correlacionaron la pérdida de los cromosomas sexuales con respecto a la edad, mediante el conteo de 1000 núcleos interfásicos en cada individuo. En el reporte de Guttenbach M. *et al.* se evaluó 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.* reportó en 30 mujeres 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.

Comparando el porcentaje de monosomía de X entre las mujeres control estudiadas en estos dos reportes y las evaluadas en el estudio, se observó que las dos mujeres control analizadas por FISH dentro del rango de edad de 21 a 25 y 36 a 40 años, tuvieron menor porcentaje de monosomía y la mujer control entre el rango de 41 a 45 años aunque mostró un mayor porcentaje de hipodi-

ploidía (3,4%), 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%). Esto soporta la idea que el mosaico observado en la mujer control de 42 años es producto de un efecto adquirido por la edad. Además, lo anterior se respalda por el hecho que esta mujer se encontró 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. (Figura 2).

Las frecuencias de monosomía de X observadas en las dos pacientes abortadoras con mosaicismo, con respecto a las mujeres control de su misma edad (36 y 37 años), mostraron diferencias estadísticamente significativas, lo que permitió confirmar mediante la técnica del FISH, la presencia de mosaicismo gonosomal en estas pacientes. (Tabla 6).

Adicionalmente, al comparar el porcentaje de monosomía de X entre las dos pacientes y las mujeres analizadas por Guttenbach *et. al.*, Devi A.S.*et. al.* en este grupo de edad, se observa que la frecuencia de hipodiploidías es mayor en las pacientes (*mos 1*: 16,6% y *mos2*: 5,6%) y sus valores superan la frecuencia límite de monosomía de X reportada mundialmente en mujeres de edad avanzada (5,1% y 4,6%) (Figuras 2 y 3). Además, la paciente de 37 años se había realizado un cariotipo previo a los 35 años donde se reportó el mismo mosaico 47,XXX/46,XX, observación que contribuye a confirmar que éste es independiente de la edad avanzada.

En cuanto a los tipos y proporción de mosaicismos encontrados entre los estudios de citogenética convencional y molecular; en la paciente *mos1*, 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 pa-

ciente, pues fue la anomalía que sobresalió mediante ambas técnicas. En la paciente *mos2* 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 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 de 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.

Los hallazgos citogenéticos a nivel molecular dan mayor indicio que los mosaicismos en las dos mujeres abortadoras son una anomalía constitucional más no una anomalía desarrollada durante la vida, por efecto de la edad. Sin embargo, un estudio cromosómico en fibroblastos de biopsia de piel, no sólo confirmaría la alteración como un rasgo constitucional sino que daría una aproximación, hacia el comportamiento del mosaicismo en la línea germinal, para evaluar el efecto sobre su desarrollo y capacidad de fertilización (39).

Posibles implicaciones biológicas de los mosaicismos de baja proporción en cromosoma sexual en las mujeres abortadoras

Peschka B *et. al.* (1999) expone que no es clara la significancia de los mosaicismos de cromosoma sexual para establecer el riesgo genético individual en la descendencia, por lo cual, se dificulta la consejería genética de esta

entidad, a la hora de valorar su repercusión sobre el desarrollo de síndromes cromosómicos y por ende su relevancia clínica. Kuo P.L. and Guo H.R. (2004), plantean que la significancia clínica de los mosaicismos de baja proporción en cromosoma X, tanto para las pacientes mismas como para su descendencia, se fundamenta actualmente en 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 se basa 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 (17). Se consideró importante discutir los resultados obtenidos en el presente estudio, tomando como referencia estas tres hipótesis:

Según Wolstenholme J. and Burn J. (2001) (43) los cariotipos en mosaico se desencadenan en las etapas tempranas del desarrollo embrionario por mutaciones somáticas (mitóticas) durante un embarazo normal o por corrección de una concepción anormal, generalmente trisomías, dada por un error meiótico y por subsecuente pérdida de uno de los cromosomas homólogos trisómicos. Debido a que los mosaicismos de baja proporción en cromosoma sexual implican un pequeño número de células anormales, tienen un pobre efecto sobre el desarrollo fetal y no afectan el fenotipo de la persona afectada, entonces se puede afirmar que éstos son de origen postcigótico por errores mitóticos de no-disyunción, ocurridos durante el

desarrollo embrionario temprano. No obstante, estas células anormales tienen el riesgo ocasional de desencadenar cambios malignos y si están presentes en línea germinal producir gametos anormales, lo que representa un riesgo tanto para las pacientes mismas, como para su descendencia (44). El cultivo de fibroblastos como técnica diagnóstica complementaria para los mosaicismos gonosomales de baja proporción, ayudaría a esclarecer aún más sobre su origen, sobre la presencia o no de las aneuploidías en otro tipo de tejidos y sobre la repercusión sobre la línea germinal de las pacientes afectadas.

El efecto de los mosaicismos sobre la descendencia, es un reflejo de una inestabilidad genética que predispone a las mujeres afectadas a un riesgo mayor de producir embarazos anormales que culminan en aborto o en la concepción de hijos con anomalías congénitas. Las explicaciones más plausibles 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(44).

Estas valoraciones son respaldadas por los datos de Singh, D.H. *et. al.*,(1980)(39), en donde se analizaron 97 concepciones de 31 madres con mosaicismo gonosomal de baja proporción, encontrándose en el 75% de los fetos anomalía cromosómica, de los cuales el 50% culminó en aborto espontáneo y el 25% tuvo anomalías genéticas o congénitas detectadas al momento del 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)(17) 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 anormalidad. 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). La historia obstétrica de la paciente *mos1* fue 5 gestaciones, 0 partos y 5 abortos (G5P0A5) y de la paciente *mos2* fue 4 gestaciones, 1 parto y 3 abortos (G4P1A3). Debido a que estos ocho productos de aborto no se estudiaron citogenéticamente, no fue posible compararlos con estos antecedentes, sin embargo, en los dos casos el promedio de edad gestacional de las pérdidas está entre 7 y 12 semanas (*mos1* 8,6 y *mos2* 10,6 semanas), período durante el cual se han reportado el mayor número de cromosopatías en productos de aborto analizados.

Los árboles genealógicos evidenciaron en ambos casos antecedentes de infertilidad, lo cual representa en las pacientes algún tipo de inestabilidad genética heredada a nivel familiar. Esto fue 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 u otro tipo de cromosopatía, 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 (45).

Aspectos clínicos 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 gonosomal es el reportado por Kuo P.L and Guo H.G. (2004) (17). Estos autores estudiaron integralmente 18 mujeres afectadas por esta anormalidad y compararon sus datos con respecto a dos grupos control con antecedente de aborto recurrente, uno con rearrreglos autosómicos estructurales balanceados y otro sin anormalidades cromosómicas. Sólo dos factores fueron implicados en el aborto recurrente de las mujeres con mosaicismo; la reserva ovárica disminuida y las anormalidades 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 (10,5 mUI/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 mostraron 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. Con respecto a las 18 abortadoras con cariotipo normal no hubo rasgos clínicos particulares en estas dos pacientes afectadas por mosaicismo de baja proporción, incluso entre ellas no hubo una homogeneidad clínica, pues 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 permite afirmar 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.

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. Además, 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, muestra que la perspectiva multifactorial deja de lado la visión mono-etiológica tradicional, a la hora de explicar la patogénesis del aborto recurrente.

El bajo porcentaje (10%) de cariotipos realizados en los productos de aborto de las 20 parejas con aborto recurrente, hace notar que en el diagnóstico rutinario, se está subestimando el factor genético en este tipo de parejas. Por ello, es importante promover no sólo el estudio cromosómico a largo plazo de los abortos sino el estudio citogenético de FISH 5 colores sobre los cromosomas 13, 18, 21, X y Y, para diagnóstico directo en núcleos interfásicos de las aneuploidías más frecuentemente asociadas con el aborto.

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 una muestra de mayor tamaño, 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 y la citogenética molecular, pues como se hizo evidente en el estudio caso control, éstas 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, debido a 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*; se-

ría interesante confirmar en otro tipo de tejido dichos hallazgos.

Para otorgarle a la monosomía de X un rol patogénico, debe tener en las mujeres estudiadas un punto de corte mayor del 5,1% sobre 1000 núcleos interfásicos, valor máximo reportado en la literatura mundial en población normal. No obstante, es necesario realizar sobre una población normal de mujeres colombianas, un estudio citogenético molecular que correlacione la edad, con el porcentaje de aneuploidía en los cromosomas sexuales, pues estos valores serían un gran referente a la hora de asociar los mosaicismos de baja proporción en pacientes con aborto recurrente.

REFERENCIAS

1. Lee R. M., and Silver R.M. 2000. Recurrent Pregnancy Loss: Summary and Clinical Recommendations. *Seminars in Reproductive Medicine*. 18(4): 433-439.
2. Schreck R. and Silverman N. 2002. Fetal loss. In: Principles and Practice of Medical Genetics. Emery and Rimoin's. 4a Edición. pp. 982-993.
3. Bricker, L. and Farquharson R.G. 2002. Types of pregnancy loss in recurrent miscarriage: implications for research and clinical practice. *Human Reproduction*. 17 (5): 1345-1350.
4. Cramer, D.W. and Wise, L. A. 2000. The Epidemiology of Recurrent Pregnancy Loss. *Seminars In Reproductive Medicine*. 18(4): 331-339.
5. 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.
6. 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.
7. Quenby, S., et. al. 2002. Recurrent miscarriage: a defect in nature's quality control?. *Human Reproduction*. 17(8): 1959-1963.
8. 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.

9. Pandey, M.K., Rani, R. and Agrawal, S. 2005. An update in recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet.* 272: 95-108.
10. Roberts, C.P. and Murphy A.A. 2000. Endocrinopathies Associated with Recurrent Pregnancy Loss. *Seminars in Reproductive Medicine.* 18(4): 357-362.
11. Ward, K.J. 2000. Genetic Factors in Recurrent Pregnancy Loss. *Seminars in Reproductive Medicine.* 18(4): 425-432.
12. Propst, A.M. and Hill III, J.A., 2000. Anatomic Factors Associated with Recurrent Pregnancy Loss. *Seminars in Reproductive Medicine* 18(4): 341-350.
13. Rubio, C., SimoÂn C., Vidal, F., Rodrigo, L., Pehlivan, T., RemohÃ J., and Pellicer A. 2003. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Human Reproduction.* 18(1): 182-188.
14. Ra, R. and Regan, L. 2000. Thrombophilia and Adverse Pregnancy Outcome. *Seminars In Reproductive Medicine.* 18(4): 369-367.
15. Fausett, B.M. and Branch, W.D. 2000. Autoimmunity and Pregnancy Loss. *Seminars in Reproductive Medicine.* 18(4): 379-392.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Goddijin M. and Leschot N.J. 2000. Genetic aspects of miscarriage. *Bailliere's Clinical Obstetrics and Gynaecology.* 14(5): 855-865.
20. 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.
21. Anasti, J.N. 1998. Premature Ovarian Failure. An update *Fertility and Sterility.* 70(1): 1-15.
22. Goswami R. et. al. 2003. Prevalence of the triple X syndrome in phenotypically normal women with premature ovarian failure and its association with autoimmune thyroid disorders. *Fertility and Sterility* 80(4): 1052-1054.
23. 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.
24. Brown, M.G., Lawce H.J. Peripheral blood cytogenetic methods. En: Barch, M. J., Knutsen, T. and Spurbeck, J.L. 1997. The AGT Cytogenetics Laboratory Manual. Philadelphia: Lippincott-Raven. Tercera Edición. 7-171.
25. Nowinski G.P. et. al. 1990. The Frequency of aneuploidy in cultured lymphocytes is correlated with age and gender but not with reproductive history. *Am J Hum Genet.* 46: 1101-1111.
26. ISCN (1995). An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. (Ed). Karger and Cytogenetics and Cell Genetics. Memphis, Tennessee, USA.

27. 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.
28. 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.
29. 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 intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril*. 74: 933-937.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. Thompson MW., McInnes R.R and Willard H.F. 1991. Genetics in medicine. 5a. Ed. Philadelphia: Thompson & Thompson. WB. Saunders Co.
35. 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.
36. Barch, M. J., Knutsen, T. and Spurbeck, J.L. 1997. The AGT Cytogenetics Laboratory Manual. Philadelphia: Lippincott-Raven. Tercera Edición. 7-171.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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.

43. Wolstenholme J. and Burn J. The application of cytogenetic investigations to clinical practice. En: Rooney D.E. 2001. Human Cytogenetics: constitucional análisis. A Practical Approach: Oxford University Press. Tercera Edición. Pág. 159.
44. Cross I. And Wolstenholme J. An introduction to human chromosomes and their analysis. En: Rooney D.E. 2001. Human Cytogenetics: constitucional análisis. A Practical Approach: Oxford University Press. Tercera Edición. Pág. 5.
45. Lucena E., Esteban Pérez C, Kent First M. 2004. Determinación de deleciones en el cromosoma Y en hombres infértiles candidatos a técnicas de reproducción asistida. Nova. 2(2): 16-27.

Tabla 1. 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%)
ANATÓMICO 6/20(30%)	MIOMATOSIS	3/6(50%)
	OBSTRUCCIÓN TUBARICA UNILATERAL	3/6(50%)
	OBSTRUCCIÓN 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, REDUCCIÓN DE VIABILIDAD ESPERMÁTICA	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 2. Relación entre la cantidad de abortos con 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)
TOTAL	20(100%)	58	7,3 (1 A 21)	30,4 (21 A 42)

Se especifica el promedio de edad gestacional y edad materna en el momento de las pérdidas.

Tabla 3. Relación entre tipo de aborto, edad materna, edad gestacional y estudio citogenético

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

Se clasificaron los 58 productos de aborto por edad gestacional y se describió en cada grupo edad materna, edad gestacional y estudios citogenéticos de las pérdidas. DS: Desviación estándar.

Tabla 4. Hallazgos citogenéticos de los 6 productos de aborto estudiados en las 20 parejas.

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
TOTAL	6(100%)	100			

Se especifica edad gestacional y materna de cada producto.

Figura 1. Microfotografías representativas de los análisis citogenéticos convencionales y moleculares realizados en las pacientes con mosaïcismo de baja proporción en cromosoma sexual. Las metafases tienen bandeado GTG. Las fotografías fueron tomadas bajo un aumento de 100X

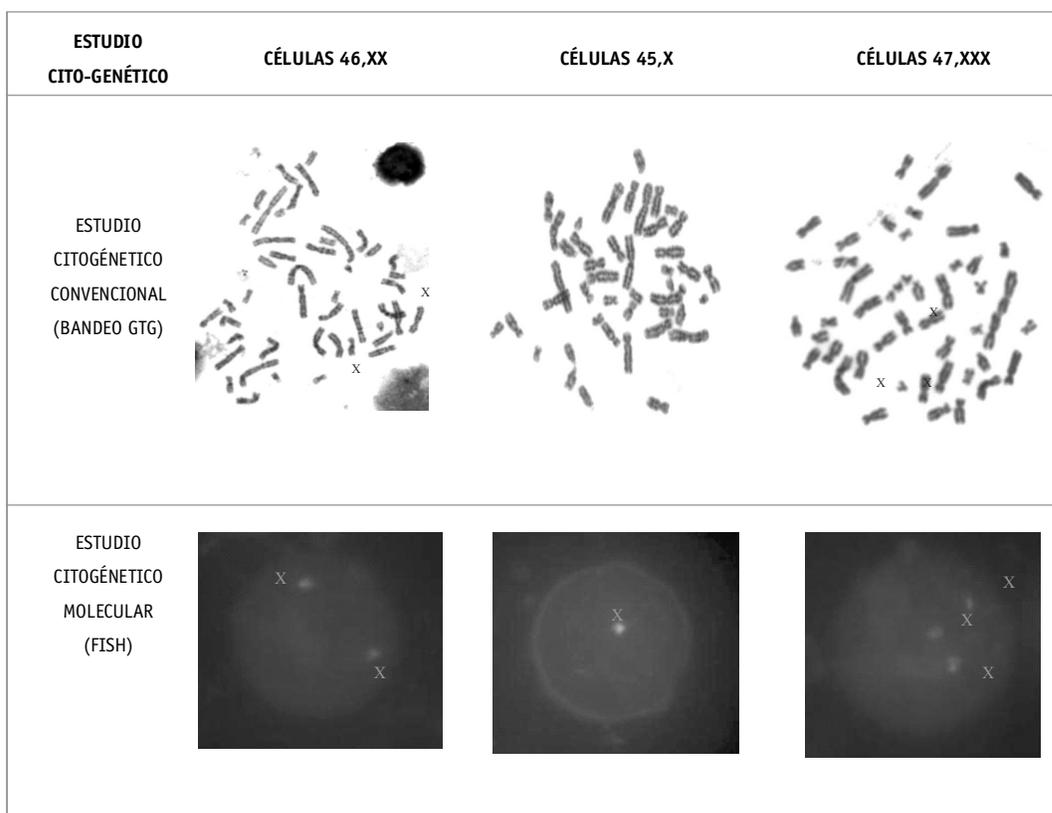


Tabla 5. Hallazgos citogenéticos de las mujeres abortadoras con mosaïcismo de baja proporción en cromosomas sexuales

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]

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.

Tabla 6. Comparación entre el porcentaje de aneuploidía observado por FISH en 1000 núcleos interfásicos en las pacientes con mosaïcismo de baja proporción en cromosoma sexual (*mos1* y *mos2*) y sus respectivas controles

FISH ANORMAL EN CROMOSOMA X	PACIENTE	<i>mos 1</i> CONTROL	VALOR DE p	PACIENTE	<i>mos 2</i> CONTROL	VALOR DE p
% MONOSOMIA (45,X)	16,6	0,8	p<0.001*	5,6	0,4	p<0.001*
% TRISOMIA (47,XXX)	0,8	0	0.004*	0,9	0,2	0.03*
% TOTAL ANEUPLOIDIA	17,4	0,8	p<0.001*	6,5	0,6	p<0.001*

Se especifica el porcentaje de células con monosomía de X (Hipodiploidía), con trisomía de X (Hiperdiploidía) y el porcentaje total de aneuploidía, observados en las pacientes con mosaïcismo de baja proporción en cromosoma sexual (*mos1* y *mos2*) y en sus respectivas mujeres control. Los porcentajes se calcularon sobre 1000 núcleos interfásicos analizados en cada individuo.

* Valor estadísticamente significativo por prueba de chi cuadrado - χ^2 - (p<0.05).

Tabla 7. Comparación de los hallazgos citogenéticos convencionales (Bandeo GTG) y moleculares (FISH) en mujeres control entre las edades de 23 a 42 años

EDAD	BANDEO GTG	FISH	PATRÓN 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)

En las cinco mujeres control analizadas con edades entre 23 a 42 años, el patrón de hibridación anormal del cromosoma X observado por FISH osciló entre 0,6% y 3,8%.

Tabla 8. Comparación de hallazgos citogenéticos en estudios mundiales de parejas con aborto recurrente reportados entre 1980 y 2003

	2005 (Colombia)	Singh, D.H. et. al., 1980 (EEUU)	Holzgreve W. et. al., 1984 (EEUU)	Sachs E.S. et. al., 1985 (Holanda)	Fryns and Buggenhut, 1998 (Bélgica)	Manfouz R. et. al., 2001 (Libano)	Duzcan Fet. et al., 2003 (Turquia)
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 ANOMALÍAS	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
TÉCNICA (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 mosaïcismo. FISH 1000 núcleos	55 Metafases	30 Metafases y 50 a 60 en mosaïcismos	16 Metafases contadas de las cuales sólo 8 analizadas) y 50 a 100 en mosaïcismos	6 Metafases contadas de las cuales 5 analizadas) y 20 en mosaïcismos	20 Metafases y 50 en mosaïcismos	

Las casillas de trama intermedia muestran que en dos estudios internacionales el mayor porcentaje cromosomopatía fue los mosaïcismos en cromosoma X, hallazgo similar al del estudio. En los reportes de las casillas con trama intensa a pesar de hallar mayor frecuencia de translocaciones, en todos se observó estos mosaïcismos entre un 4,3 a 36%. 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)

Figura 2. 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

