



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**“DETECCIÓN DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS EN
ABORTOS ESPONTÁNEOS MEDIANTE HIBRIDACIÓN
GENÓMICA COMPARATIVA”**

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

Mara Sue Moreno Gonzalez

DIRECTOR: M. en C. Mónica Sierra Martínez

ASESOR INTERNO: Biol. Dora Alicia Longares Méndez

CIUDAD DE MEXICO. Mayo del 2016





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS FUE REALIZADO EN EL HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO, BAJO LA GUÍA Y TUTORÍA DE LA M. EN C. MÓNICA SIERRA MARTÍNEZ.



*“Todo lo que somos es el resultado de lo que hemos
pensado; está fundado en nuestros pensamientos y está
hecho de nuestros pensamientos.”*

(BUDA)

DEDICATORIA

*Primeramente agradecer al ángel que Dios me mando y que con su sonrisa alegra mis días... mi pequeña hija **Mia Zoe Castañeda Moreno**, quien me ha enseñado lo que es amar incondicionalmente y se ha convertido en la fuerza para perseguir mis sueños sin detenerme. Gracias por ser la luz de mi vida, lo que me anima a ser mejor día a día. No hay día que no agradezca a Dios por elegirme como tu madre. TE AMO HIJA.*

*A mi madre la **Sr. María del Roció Gonzalez Barradas** quien en todo momento me alentó a seguir adelante y me da día a día el mejor regalo que es la vida; agradezco todo el amor y el cariño que me ha brindado, por su confianza al creer en mi todo este tiempo, por inculcarme el valor de una educación pero sobre todo por tu apoyo incondicional en las decisiones que me han llevado hasta aquí. Sin tus abrazos en los peores y mejores momentos, tus sonrisas y correcciones no sería la mujer que ahora soy. Eres mi ejemplo a seguir, agradezco todos los días a Dios el placer de poder decirte Mama. Te amo.*

*A mi padre el **Ing. Marcelino Moreno López** quien me ha dado ese ejemplo de lucha y sabiduría, demostrándome que las mejores oportunidades se generan con esfuerzo, sin importar lo difícil que sea el camino. Gracias por tu paciencia, dedicación, por ser mi protector, compañero, amigo y maestro. La mujer con dedicación que soy, te lo debo a ti porque jamás permitiste que abandonara mis sueños al contrario siempre fuiste mi guía sin dudar de mis capacidades. Eres un hombre increíblemente maravilloso, me siento la mujer más afortunada de poder llamarte a ti Papa. Te amo.*

*A mis hermanos. **Majaira Moreno Gonzalez** quien en todo momento confió en mis capacidades y que jamás dejo de apoyarme como la gran mujer que es. Gracias por todos los consejos que me has brindado y sobre todo por darme parte de ese gran corazón noble que tienes.*

***Ezequiel Moreno Gonzalez** que a pesar de que somos muy diferentes, me has protegido y apoyado en todo momento. Agradezco el que me ha demostrado que a pesar de todo se debe mantener una gran sonrisa y seguir adelante, sin importar los obstáculos de la vida. Los amo.*

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer a la **Universidad Nacional Autónoma de México** que me abrió sus puertas desde hace 8 años y que me ha permitido formarme como una persona con valores y educación para servir a la sociedad.

A la **Fes- Zaragoza** por darme las herramientas necesarias en mi formación como Bióloga para ser una profesionista integra.

Quiero agradecer a la **M. en C. Mónica Sierra Martínez** quien hasta el día de hoy me ha brindado su confianza, paciencia, consejos y sabiduría para conmigo. Agradezco su dirección y apoyo para la realización de mi trabajo de tesis.

Agradezco el apoyo del **M. en C. Juan Carlos Bravata Alcántara** quien hasta el momento me ha apoyado, brindándome sus conocimientos en el área y apoyándome en todo momento para que el presente trabajo fuera posible.

Gracias a la **Biol. Dora Alicia Longares Méndez** quien desde mi ingreso a la carrera me ha dado una gran orientación, consejos y apoyo. Le agradezco la confianza brindada.

A mis sinodales **M. en C. Carlos Bautista Reyes, Dra. Helia Roldan Reyes y a la Biol. Reynalda Roldan Pérez** quienes con sus revisiones y sabiduría hicieron de mi trabajo mejor. Gracias.

A todos mis amigos biólogos que me apoyaron durante la carrera y hasta el momento siguen presentes, pero sobre todo a **Erick, Ariana, Liliana, Fany y Christian**. Los quiero amigos gracias por su sincera amistad. Gracias por todos los momentos gratos y les deseo todo el éxito que merecen por el gran esfuerzo que día a día realizan. Los quiero.

También agradecer a los amigos y colegas que tuve la oportunidad de convivir durante mi trabajo de tesis en el Hospital Juárez de México como **Sadai, Daniela, Gabriela, Bruno y Juan**. Quienes son magníficas personas y merecen todo lo mejor de este mundo. Muchas gracias.

INDICE

INDICE DE TABLAS..... 8

INDICE DE FIGURAS 9

ABREVIATURAS 10

RESUMEN 11

1. INTRODUCCIÓN 12

2. MARCO TEÓRICO 13

 2.1. Epidemiología e incidencia 13

 2.2. Etiología 15

 2.2.1 Factores uterinos (anatómicos)..... 15

 2.2.2 Factores endocrinos..... 15

 2.2.3. Factores inmunológicos..... 16

 2.2.4. Edad materna..... 16

 2.2.5. Otros factores..... 17

 2.3. Factores genéticos en abortos 17

 2.3.1. Alteraciones cromosómicas numéricas..... 18

 2.3.2. Alteraciones cromosómicas estructurales 21

3. DIAGNÓSTICO DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS 23

 3.1 Citogenética clásica: cariotipo..... 24

4. CITOGENÉTICA MOLECULAR 26

 4.1 FISH (Hibridación *in situ* con Fluorescencia) 27

 2.2 CGH (Hibridación Genómica Comparativa) 29

 4.3 Hibridación Genómica Comparativa (CGH)- Array..... 32

5. ANTECEDENTES 35

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 36

8. HIPÓTESIS..... 37

9. OBJETIVO GENERAL 37

 9.1 OBJETIVOS PARTICULARES..... 37

10. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
10.1. Definición de criterios	37
10.2 Población de estudio.....	37
10.3. Organigrama de trabajo	38
10.4. Extracción de ADN en tejidos.....	39
10.5. Marcaje de ADN (sonda).....	39
10.6. Electroforesis en gel de agarosa.....	40
10.7. Preparación de cromosomas en metafase.....	40
10.8. Pretratamiento de las laminillas	41
10.9 Purificación e hibridación de la sonda	41
10.10 Lavado de las laminillas	41
10.11. Captura de imágenes.	41
10.12. Análisis de las imágenes digitales.....	42
10.13. Análisis estadístico.....	42
10.14. Reporte	42
11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
11.1. Controles.....	43
11.2. Marcaje del DNA de los controles con “Nick Translation”	44
11.3. Extracción de ADN de las muestras recolectadas	45
11.4. Datos clínicos de las muestras recolectadas.	49
11.5. Resultado de Hibridación Genómica Comparativa (CGH) de controles....	51
11.6. Resultado de la Hibridación Genómica Comparativa (CGH) de abortos espontáneos.	53
11.7 Distribución de alteraciones cromosómicas.	66
12. CONCLUSIONES :	72
13. PERSPECTIVAS.....	73
14. REFERENCIAS.....	73
ANEXO 1.....	82

INDICE DE TABLAS

Cuadro No. 1. Egresos Hospitalarios en el sector salud en un periodo del 2004-2009 en México..... 14

Cuadro No. 2. Ventajas y desventajas de la citogenética convencional y técnicas de citogenética molecular..... 34

Cuadro No. 3. Reactivos y cantidad a incorporar de acuerdo al Kit “Nick Translation” para la realización de la sonda..... 39

Cuadro No. 4. Cuantificación de DNA del control negativo y cantidad de microlitros que se agregaron en la mezcla de “Nick Translation” para la realización de la sonda 43

Cuadro No. 5. Historial clínico del control positivo 43

Cuadro No. 6. Cuantificación de DNA del control positivo y cantidad de microlitros que se agregaron en la mezcla de “Nick Translation” para la realización de la sonda 44

Cuadro No. 7. Condiciones óptimas para la realización del marcaje de ADN con el kit “Nick Translation” 45

Cuadro No. 8. Cuantificación de ADN extraído en cada una de las 11 muestras recolectadas..... 46

Cuadro No. 9. Dilución de DNA y cantidad de μl que se agregaron para un total de 1000 ng en la reacción. 47

Cuadro No. 10. Base de datos clínicos de las muestras recolectadas..... 50

Cuadro No. 11. Tipos de alteraciones cromosómicas estructurales y numéricas que se presentaron en las muestras recolectadas..... 70

Cuadro No. 12. Cantidad de abortos espontáneos en pacientes que presentaron un producto con alteraciones cromosómicas. 70

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Alteraciones cromosómicas numéricas. 19

Figura 2. Aneuploidía: no disyunción meiótica. 20

Figura 3. Alteraciones Cromosómicas Estructurales. 23

Figura 4. Cariotipo masculino con tinción de bandas G. 26

Figura 5. Técnica de Hibridación Fluorescente *In Situ* (FISH)..... 29

Figura 6. Técnica Hibridación Genómica Comparativa (CGH)..... 31

Figura 7. Representación esquemática de la técnica de CGH-Array 33

Figura 8. Gel de agarosa al 1% tenido con EtBr 48

Figura 9. Resultado de análisis de CGH del control positivo con múltiples alteraciones cromosómicas..... 52

Figura 10. Resultado del análisis de CGH del control negativo normal..... 53

Figura 11. Resultado de CGH de caso 1..... 55

Figura 12. Resultado de CGH del caso No.2 56

Figura 13. Resultado de CGH del caso 3..... 58

Figura 14. Resultado de CGH del caso 4..... 59

Figura 15. Resultado de CGH del caso 5..... 59

Figura 16. Resultado del análisis de CGH del caso 6 61

Figura 17. Resultado del análisis de CGH del caso 7 62

Figura 18. Resultado del análisis de CGH del caso 8 63

Figura 19. Resultado del análisis de CGH del caso 11 66

Figura 20. Porcentaje de muestras con alteraciones y sin alteraciones cromosómicas 67

Figura 21. Porcentaje de alteraciones numéricas, estructurales y ambas. 68

ABREVIATURAS

ADN. Ácido Desoxirribonucleico

ADN Cot 1-1. ADN de placenta de 50 a 300pb, rico en secuencias repetitivas

ADNs. Plural de Ácido Desoxirribonucleico

CGH. Hibridación Genómica Comparativa

CNV. Número de Copias Variables

DAPI-II. 4', 6-diamino-2-fenilindol

dUTP. 2'-deoxiurina 5'-trifosfato

dNTP. Desoxinucleotidotrifosfato.

dTTP. Desoxitimidina trifosfato.

EtBr. Bromuro de Etídio

FISH. Hibridación Fluorescente *In situ*.

FITC. Isotiocianato fluoresceína

HLA. Antígeno de Leucocitos Humanos

KCl. Cloruro de Potasio

MSA. Microsatelite

Mb. Megabase

ng. Nanogramos

NP-40. Nonit. Detergente no iónico

OMS: Organización Mundial de la Salud

pb. Pares de bases.

RNAsa. Enzima Ribonucleasa.

sdg. Semanas de Gestación.

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2

CA: Cáncer

RESUMEN

El aborto espontáneo es un problema clínico común, el cual sucede en un 10 a 15% de los embarazos conocidos, a pesar de existen factores etiológicos asociados, se conoce que cerca de un 50% de estos ocurre por alteraciones cromosómicas ya sean del tipo numérico o estructural.

El estudio que se realiza para la detección de estas es el cariotipo con bandas G; a través del cultivo de tejido del feto, líquido amniótico o cordón umbilical; sin embargo presenta algunas desventajas, como la contaminación celular, y una resolución de 5-10 Mb, no detectando algunas microdeleciones. Por ello se ha implementado en este estudio una técnica que con ayuda de la biología molecular, como lo es la técnica de Hibridación Genómica Comparativa (CGH), evitando el cultivo de tejidos, es decir el uso del ADN genómico con una resolución de 3-5 Mb.

En este estudio se estandarizó la técnica de CGH para ser implementada en el Hospital Juárez de México, con un total de 11 muestras recolectadas con menos de 20 sdg; encontrando que cerca del 77.7% presentó anomalías cromosómicas y únicamente un 32.3% presentó un cariotipo normal, descartándose dos muestras que no contaban con el material suficiente (metafases) para el análisis.

Se encontró que 71.4% pertenece a anomalías del tipo numérico, 14.2% del tipo estructural y otro 14.2% ambas.

Las monosomías se encuentran mayormente presentes en los casos examinados, como lo son en el cromosoma X, 14 y una doble monosomía X y 21, seguido por la única trisomía 18 y anomalías del tipo estructural representadas con adiciones y disminuciones en la intensidad de la señal de grandes segmentos de bases.

Por lo tanto se concluye que la técnica de CGH, permite identificar alteraciones cromosómicas desbalanceadas, utilizando el ADN genómico, convirtiéndose en una técnica complementaria al cariotipo, para dar una explicación a los padres y una guía al médico del probable factor etiológico que tiene esta patología.

1. INTRODUCCIÓN

El aborto involuntario es considerado como uno de los problemas más frecuentes que podrían ocurrir durante el embarazo hasta la vigésima semana de gestación en la especie humana, patología definida por Organización Mundial de la Salud (WHO, 2011) desde 1977 como; "la expulsión o extracción del embrión o feto de su madre con un peso de 500g o menos".

Como tal, no se ha determinado exactamente cuál es la etiología o por qué sucede; sin embargo, los dos únicos factores reconocidos hasta ahora por diferentes autores en el aborto involuntario son; malformaciones uterinas y presencia de alteraciones cromosómicas en productos que pueden ser heredadas por los padres con reordenamientos cromosómicos equilibrados, aunque existen una gran cantidad de estudios de investigación de otro tipo de riesgos o factores etiológicos a los que se asume el aborto (García y col., 2002).

Las alteraciones estructurales se presentan en un 65-70% de los casos; estas pueden ser del tipo numérico estructural (Levy y col., 2009) se diagnostican a través del clásico cariotipo de bandas G, que permite analizar el genoma tras la muerte fetal del organismo con una resolución de hasta 5Mb, sin embargo, este método ha presentado desventajas, debido al cultivo celular de tejido, de tiempo prolongado, además de la contaminación con células de la madre. Por ello surgieron metodologías de citogenética molecular como; la hibridación genómica comparativa (CGH por sus siglas en ingles) el cual permite a través del ADN genómico la detección de pérdidas y ganancias de ADN en el número de copias de uno o varios cromosomas (Van Der Ber y col., 2008), siendo útil cuando los cultivos para la realización del cariotipo no son buenos y se obtienen pocas metafases o son de baja calidad, lo cual permite así obtener un análisis completo (Nikitina y Lebedev, 2014).

2. MARCO TEÓRICO

El aborto espontáneo es un problema clínico común. Se estima que entre el 10% - 15% de los embarazos clínicamente reconocidos son interrumpidos durante el primer trimestre (Menten y col., 2009). Este número debería aumentar si se tiene en cuenta aquellos que sucedieron al principio del embarazo, aquellas pérdidas de embarazo aproximadamente 14 días después de la concepción, en la siguiente menstruación, y que podría ser confundida con esta. Sin embargo lo poco que se ha determinado es que este tipo de incidencias es de aproximadamente del 17% al 22% (García y col., 2002). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud se denomina “aborto espontaneo” el término de la gestación antes de la vigésima semana, o si la edad de gestación no se conoce, el embrión o feto con un peso menor de 500 gramos (Zeger y col., 2009). Otra definición según el Royal College de Obstetricia y Ginecología, el aborto espontáneo se puede la pérdida del embarazo antes de las 24 semanas completas de gestación (RCOG, 2000). Una definición alternativa es la de un embarazo que falla, resultando en la muerte y la expulsión del embrión o de un feto de 500 gramos de peso o menos, correspondiente a una edad gestacional de hasta 20 semanas. Los abortos se clasifican como tempranos si ocurren en el primer trimestre (hasta 12 semanas de gestación) o tardíos (entre las semanas 12 a 24 de la gestación) (Vargas y Rubio, 2009). Se ha descrito que alrededor del 90% ocurren antes de la semana 12-14 (desde la última menstruación), y sólo el 2.5% se producen después. El momento de aborto involuntario las pérdidas rara vez ocurren entre 8,5 y 14 semanas de gestación (Porter y Scott, 2005).

2.1. Epidemiología e incidencia

Cada año a nivel mundial, 210 millones de mujeres aproximadamente se encuentran embarazadas y alrededor de 135 millones concluyen exitosamente su proceso de gestación. Los 75 millones de los embarazos restantes terminan en muerte fetal, espontáneo o inducido, de éstos aproximadamente 33 millones son espontáneos (WHO, 2011). Se estima que entre el 10% -15% de los embarazos

clínicamente reconocidos son interrumpidos durante el primer trimestre (Menten y col., 2009).

En México en los últimos años los egresos hospitalarios para esta patología, se han aumentado progresivamente encontrándose para el 2009 16,798 casos (Fernández y col., 2012) (Cuadro No. 1). La ENADID (Encuesta Nacional Dinámica Demográfica) revela que en el periodo 2004-2009, 45.1% de las mujeres de 15 a 49 años reportó al menos un embarazo; 97.3% de éstas tuvo revisión prenatal. En ese lapso, más de la cuarta parte de las mujeres de 45 a 49 años que se embarazó experimentó una pérdida antes de que el producto fuera viable (INEGI, 2011).

Para el año 2011 se ha encontrado que cerca del 14 a 22% de las mujeres embarazadas experimenta una amenaza de aborto antes de la semana 18 de gestación, de estos entre el 73 al 90% de los casos, tal signo corresponde a amenaza de aborto y, en cerca de la mitad, hay pérdida de la gestación por aborto espontáneo (García y col., 2002).

Finalmente en el año 2013 en caso específico del Hospital Juárez de la Ciudad de México se reportaron 1982 nacimientos y 301 abortos (15.18%).

Cuadro No. 1. Egresos Hospitalarios en el sector salud en un periodo del 2004-2009 en México.

CAUSA	Egresos Hospitalarios en el sector salud 2004-2009					
	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Aborto espontáneo	12,735	11,382	11,781	14,374	15,366	16,798
Aborto medico	476	384	255	549	360	433
Otro aborto	693	794	842	1,350	1,850	2,054
Aborto no especificado	87,231	94,176	99,455	97,760	105,440	104,737
Intento fallido de aborto	65	64	38	26	26	36
Complicaciones consecutivas al aborto	559	662	607	707	695	741
Total general	101,759	107,462	112,978	114,766	123,737	124,799

(Tomado de Fernández y col., 2012)

2.2. Etiología

Las causas del aborto espontáneo son diversas y complicadas, por ello siguen siendo una dificultad tanto para el paciente como para el médico determinarlas. Los factores ya estimados que dan paso a esta patología son los trastornos genéticos o alteraciones genéticas, las cuales son responsables de la mitad o más de las pérdidas gestacionales durante el primer trimestre del embarazo (Castro y col., 2010), otros son los factores anatómicos que hasta ahora han sido los de mayor relevancia, pero aun con lo anterior no se descartan algunos problemas endocrinos, inmunológicos e infecciosos (Pathak y col., 2010). También es realmente importante destacar que existe una relación exponencial de acuerdo a la edad de la madre y la probabilidad de no llegar con éxito al final del embarazo, es decir cuando se incrementa la edad la probabilidad de sufrir un aborto espontáneo es mayor (Castro y col., 2010). Existen otro tipo de factores que son controversiales y se ven relacionados de acuerdo al entorno de la madre como la asociación positiva a la exposición ocupacional a pesticidas; y otros que son debatidos es el consumo o exposición de determinadas sustancias durante el embarazo como lo es el café, el tabaco, el alcohol, ciertas drogas, e incluso el someter a la madre a cierto estrés psicosocial puede tener como resultado infertilidad o el fracaso del producto (Arck y col., 2008; Castro y col., 2010).

2.2.1 Factores uterinos (anatómicos).

La prevalencia de anomalías uterinas congénitas es 6,7% a 7,3% en mujeres infértiles y 16,7% en mujeres que ya han presentado algún aborto espontáneo, lo que señala su importancia relativa en el estudio del trastorno (Pacheco y col., 2009). Las anomalías más pronunciadas son la fusión del conducto Mülleriano o cérvix incompetente. El cérvix incompetente es una causa bien reconocida de pérdida de embarazo al inicio o final del segundo trimestre (Menéndez, 2003).

2.2.2 Factores endocrinos.

Los factores endocrinológicos pueden originarse en los componentes del eje sistema nervioso central-hipotálamo hipófisis-ovario, tal como la controvertida

deficiencia de la fase lútea; pero también pueden deberse a alteraciones en la tiroides, glándulas suprarrenales, prolactina, insulina, entre otros (Pacheco, 2009). Tradicionalmente, como parte del estudio de los factores desencadenantes de aborto, se busca un factor endocrino, pero la prevalencia de alteraciones de dicho factor no es mayor en quien aborta que en la población general, por lo que dicho estudio algunos autores no lo consideran necesario (Rai y Regan, 2006).

2.2.3. Factores inmunológicos

Se describen dos problemas inmunológicos como causas (García y col., 2002):

- **Alloinmunes:** La respuesta inmunológica de la madre hacia el feto, al cual no se desarrolla inmunotolerancia hacia el embrión. Cuando el padre y la madre comparten antígenos HLA, la madre y el feto resultan homocigotos entre sí para varios de estos loci, hecho que paradójicamente parece dificultar la protección inmunológica de la madre hacia el feto, produciéndose un aborto espontáneo, por rechazo inmunológico.
- **Autoinmunes:** estima que el síndrome antifosfolipídico puede ser causa en 3 a 15% de abortos recurrentes. Con relación a los mecanismos patogénicos de los anticuerpos antifosfolipídicos, estos actúan sobre los fosfolípidos de las células endoteliales y plaquetas, produciendo enfermedades tromboembólicas e hipercoagulación (Rai y Rejan, 2006).

2.2.4. Edad materna

El riesgo aumenta al mismo tiempo que la edad de la madre, de manera exponencial (Castro y col., 2010). Se ha calculado que el riesgo de pérdida fetal en una paciente de 30-32 años de edad tiene un aparente riesgo de aborto involuntario del 2,1%. Sin embargo, el riesgo en pacientes con más de 35 esta medida aumenta abruptamente. Pero en un paciente con más de 40 este es cinco veces más alto que entre 31 y 35, alcanzando un riesgo de 20-40%. Esto se debe a que el comportamiento reproductivo en nuestra sociedad ha cambiado; muchas mujeres ahora optan por retrasar la maternidad (Rai y Regan, 2006).

2.2.5. Otros factores

Se ha reportado que el consumo de café durante el embarazo da como resultado un aborto involuntario, aumentando el riesgo cuando hay dosis más altas de cafeína. Sin embargo otros autores lo rechazan y no encontraron ninguna asociación clara que se pudiera considerar. Otro factor que se toma en cuenta es el consumo del tabaco debido a la gran cantidad de toxinas que contiene, la más importante la nicotina, que se ha descrito como posible causante de espasmos vasculares, pero aun con lo anterior la hipótesis sigue abierta. El alcohol, sin embargo se ha decretado como un factor de retraso de desarrollo fetal, pero el hecho de que provoque pérdidas gestacionales no ha sido decretado en su totalidad, solo investigaciones acentúan que niveles de alcohol en sangre superior a 200 mg/dl podría provocar directamente un aborto espontáneo.

Otro factor muy estudiado es el uso de drogas, se ha observado una tasa de aborto involuntario con el consumo más alto de cocaína, ya que funciona bloqueando la recaptación de catecolaminas en terminales nerviosas, aumentando así sus concentraciones a las terminales efectoras o en el torrente sanguíneo, por lo tanto, podría aparecer como una vasoconstricción placentaria (García y col., 2010)

2.3. Factores genéticos en abortos

Cerca del 50% de los abortos involuntarios en el primer trimestre son causados por alteraciones cromosómicas. En el 96% de los casos se trata de alteraciones numéricas: el 54% de trisomías, el 19% de triploidías, el 16% de monosomías, el 4% de tetraploidías y el 3% de trisomías dobles. Las alteraciones estructurales solo representan un 4%, es decir se presentan en un número menor de casos (Čulić y col., 2011; Dhillon y col., 2014). Sin embargo el riesgo de presentar cualquiera de las aberraciones cromosómicas anteriores aumenta cuando uno de los progenitores tiene más de 35 años, factor conocido sobre todo en lo que se refiere a la mujer.

2.3.1 Alteraciones cromosómicas numéricas

Suceden cuando hay una ganancia o una pérdida de uno o varios cromosomas completos (Luthardt y Keitges, 2001).

Este tipo de alteración puede dividirse en dos (Luthardt y Keitges, 2001) (Fig. 1):

a) Aneuploidías: consisten en la ganancia (trisomía) o pérdida (monosomía) de uno o más cromosomas resultando en una dotación cromosómica no múltiple del número haploide (n) en la célula. Se ha descrito que la causa es de origen meiótico debido a una no disyunción durante la gametogénesis, un gameto resultante carece ya sea de un cromosoma o tiene dos copias del mismo, dando como producto una anomalía monosómica o trisómica en el cigoto, respectivamente (Figura 2). Este tipo de problemas se asocia frecuentemente con la edad materna y constituye una parte significativa de las alteraciones cromosómicas en abortos espontáneos. El mosaicismo se asocia a accidentes de la mitosis producidos tras la fecundación, lo que supone que dos o más líneas celulares pueden tener cariotipos distintos. Puede afectar a la placenta, al embrión o a ambos, y el de la placenta es el que provoca con mayor frecuencia abortos espontáneos (Azmanov y col., 2007).

b) Euploidía: se refieren a la presencia de uno o más juegos haploides completos de cromosomas extra. En el caso de los organismos eucariontes llevan en sus células bien una sola dotación cromosómica (condición haploide) o dos dotaciones (condición diploide). Es así como en estas especies las condiciones haploide o diploide constituyen situaciones de euploidía normales. Anormalmente el conjunto puede estar formado por más de dos juegos haploide; a esto se le denomina poliploidía la cual puede dar lugar a tres juegos cromosómicos, triploidía ($3n$), una tetraploidía ($4n$), y así sucesivamente.

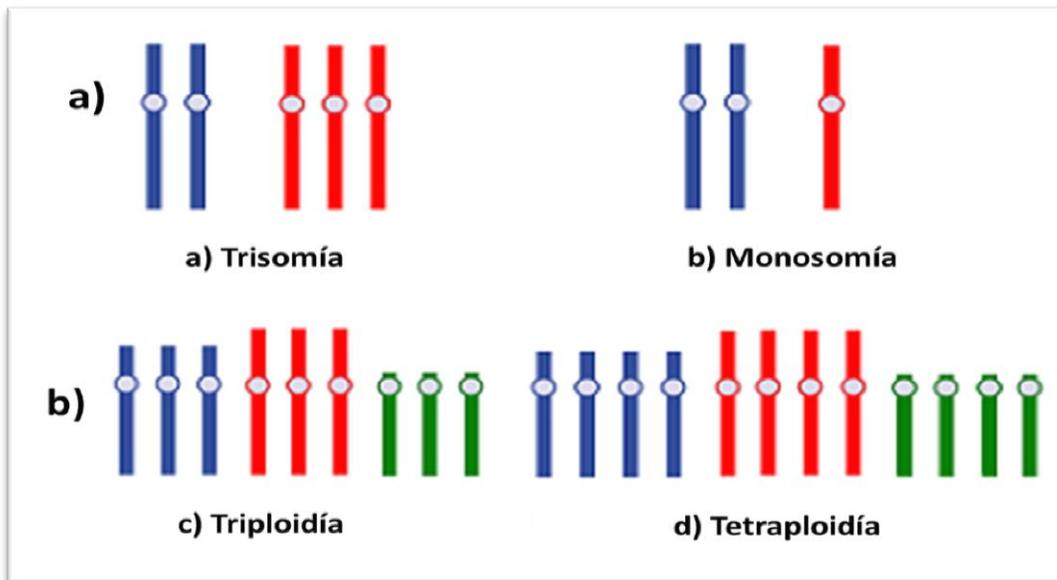
La triploidía ($3n$) puede tener un origen tanto diagénico (origen materno) como diándrico (origen paterno); en el caso de origen materno, ésta puede ser debida a errores en la primera división meiótica como en la segunda. En el caso de las paternas, suelen ser el resultado de la fecundación de un óvulo por dos

espermatozoides (diándrica dispérmica) o por la fertilización del óvulo por un gameto diploide (diándrica monospérmica).

La triploidía es la forma más frecuente de poliploidía, que se observa en un 15 a 18% de los abortos espontáneos. Casi el 1% de todas las concepciones diagnosticadas son triploides, pero más del 99% de las mismas mueren antes de nacer, debido a su letalidad y sólo 1 de cada 10 000 nacidos vivos es un ser humano triploide donde el tiempo de supervivencia es muy corto.

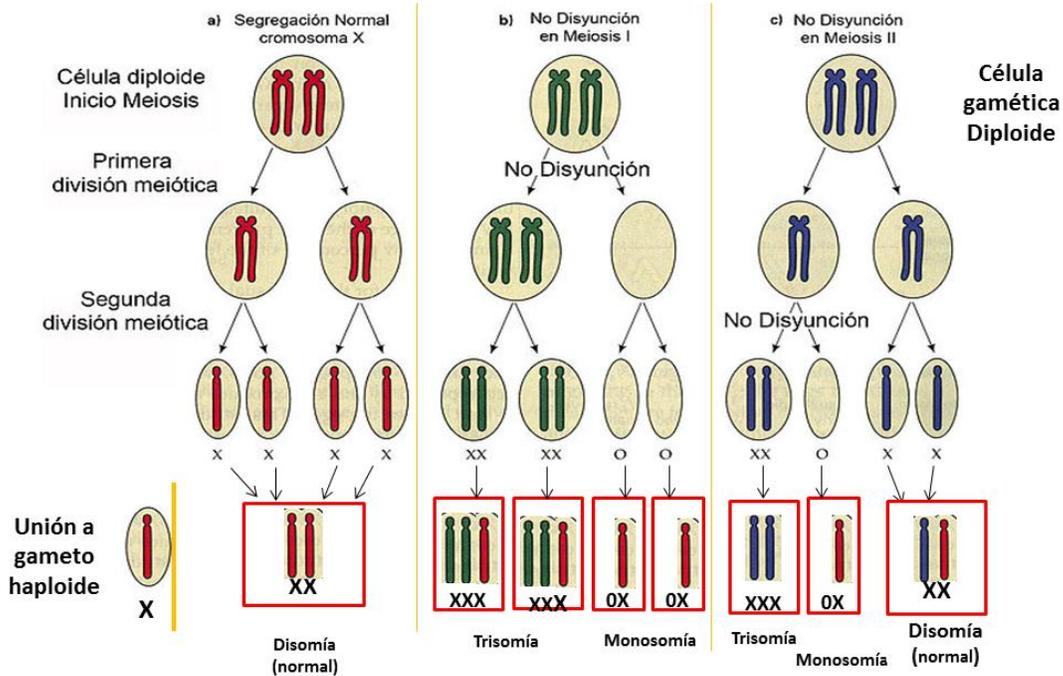
Finalmente en el caso de las tetraploidías, estas son muy raras, es decir, solo presentan un 12% de las euploidías y es probable que se produzca cuando hay un fallo durante la citocinesis de la célula. En teoría puede suceder tanto en mitosis como en meiosis, que no se produzca la división del citoplasma (citocinesis) después de la replicación, dando pie a que la célula se reduplique en sí misma (Levy y col., 2006).

Figura 1. Alteraciones cromosómicas numéricas. a) Aneuploidía. b) Euploidía.



(Tomado y modificado de Moore y Best, 2001)

Figura 2 . Aneuploidía: Mecanismo de no disyunción meiótica durante la gametogénesis. Se muestra en la figura a) La segregación normal del cromosoma X durante la meiosis. b) Mecanismo de no disyunción durante la Meiosis I y c) Mecanismo de no disyunción durante la meiosis II.



(Tomado y modificado de www.ucm.es)

Se ha informado que las aneuploidías son la causa más común de aborto espontáneo. Los cromosomas que se han visto involucrados en el caso de las trisomías son el 1, 7, 13, 14, 15, 16, 18, 21 y 22. Siendo las trisomías 7, 14, 15, 16, 18, 21 y 22, las más comunes. Por el contrario la trisomía 1 y 19 están muy raramente reportados en la literatura (Kandpal y col., 2010). Se sugiere que los embriones con trisomía 1 y 19 terminan como aborto espontáneo que no se detecta o que no logran establecer un embarazo viable a una edad gestacional temprana, por lo que estas trisomías pueden ser altamente letales a pesar de que el cromosoma 19 es pequeño en comparación con los cromosomas del grupo A, B, y C, sin embargo estructuralmente cuenta con alrededor de 26 genes por cada millón de pares de bases. Una hipótesis es que el cromosoma 19 contiene genes

que son reguladores del desarrollo y letales si la dosis de genes se ven afectados (Castro y col., 2010; Subramaniam y col., 2014).

Por lo general las alteraciones numéricas que son compatibles con la vida dependiendo de su gravedad, dan como resultado malformaciones congénitas y/o alteraciones cognitivas o de comportamiento; de hecho, la aneuploidía es la causa más frecuente de retraso mental y defectos congénitos en los seres humanos, en comparación con los cromosomas sexuales las aneuploidías autosómicas producen más efectos fenotípicos adversos y son menos compatibles con el curso del embarazo (Al-Asmar y col., 2012).

En el caso de las monosomías se ha visto que el cromosoma 21 y el cromosoma X son los responsables de aproximadamente el 15 al 20% de los abortos cromosómicamente anormales.

De acuerdo a estudios recientes, la incidencia de la monosomía del cromosoma X parece ser comparable con la proporción de triploidías que aparecen en esta patología. El 99% de este tipo de monosomias son letales, sin embargo porcentaje restante podría depender de la presencia de un mosaicismo con una línea celular normal en un segundo cromosoma sexual (Y). Se ha sugerido que las hembras con Síndrome de Turner presentan mosaicismos hecho que también podría explicar el fenotipo variable.

También, se ha estimado que se pueden encontrar la ganancia y / o pérdida de dos o más cromosomas a lo cual se le conoce como aneuploidía múltiple, donde las trisomías dobles representan casi 70% de los casos y aneuploidías múltiples en combinación con otro tipo de anomalías, que son reportadas con poca frecuencia en la literatura (Levy y col., 2006).

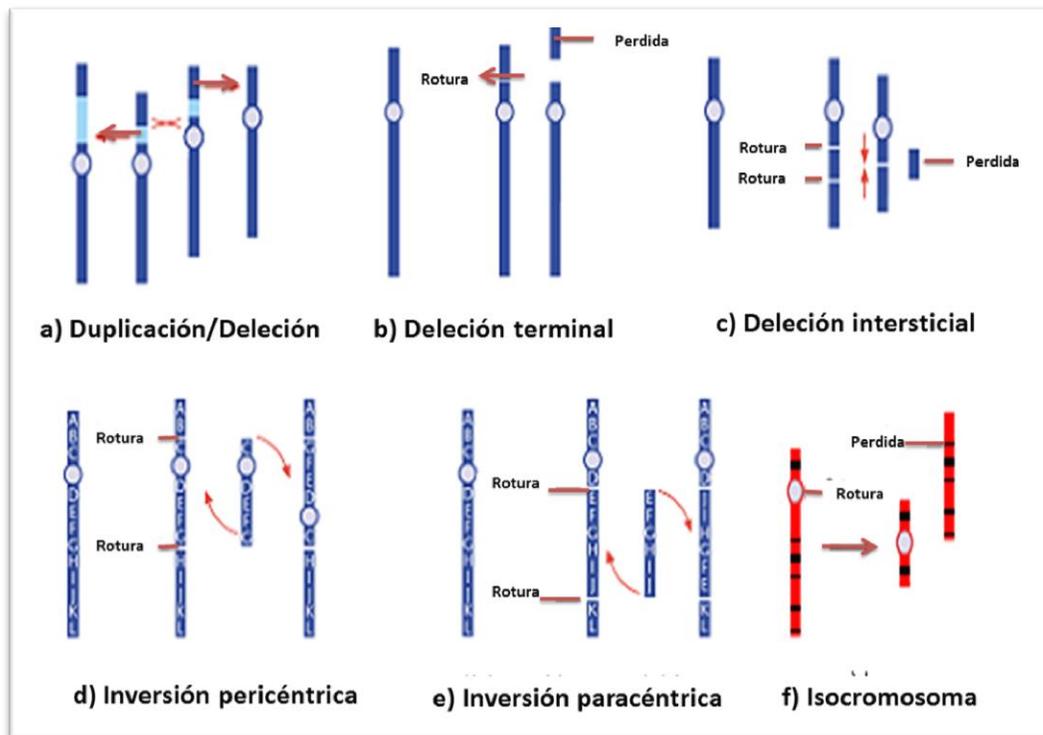
2.3.2. Alteraciones cromosómicas estructurales

Son reordenamientos estructurales que con frecuencia alteran la morfología del cromosoma por causa de roturas o uniones de cromosomas aberrantes. Esto puede implicar un cromosoma, dos cromosomas y, rara vez, más de dos (Luthardt y Keitges, 2010). Estos rearrreglos pueden ser de varios tipos (Fig. 3):

- a. Delección/Duplicación: Cuando hay una pérdida de un fragmento o duplicación en donde un solo cromosoma es involucrado.
- b. Delección terminal: Implica la supresión del extremo de un cromosoma.
- c. Delección Intersticial: Implica la supresión de una porción interna.
- d. Inversión: Es una anomalía en la que un segmento cromosómico ha sufrido una rotación de 180° con respecto a su orientación normal, esto implica dos sitios de rompimiento y subsecuente reunión del segmento invertido
- e. Inversión pericéntrica: son las inversiones que implican el centrómero.
- f. inversión paracéntrica: son las inversiones que ocurren en sólo uno de los brazos del cromosoma.
- g. Isocromosomas: Estos surgen de la división anormal del centrómero y resulta en la duplicación de cualquiera de los brazos del cromosoma (Moore y Best, 2001).

Las alteraciones cromosómicas estructurales, cuya incidencia en abortos espontáneos se estima en algo más del 4% y en 1 de cada 400 recién nacidos vivos, son debidas a la rotura de uno o más cromosomas o a fenómenos de sobrecruzamiento desigual, que afectan al contenido y a la forma de los cromosomas, además de en ocasiones alterar la distribución, expresión y dosis de los genes en el genoma. Estos eventos pueden llevar a distintos tipos de alteraciones y reordenamientos, que si resultan en la pérdida o ganancia de material cromosómico se consideran desequilibrados; o equilibrados si por el contrario no resultan alterados ni el contenido ni la expresión génica. Además la mitad de las aberraciones estructurales pueden ser heredadas de un padre portador de alguna de las anomalías ya mencionadas, así el riesgo de aborto espontáneo en los portadores de translocaciones dependerá del tamaño de la sección cromosómica afectada. Se ha descrito que más del 50% de estos casos afectados son por la translocación 13 o 14 (la translocación más frecuente en la especie humana) donde el aborto aparecerá en el 99% de los casos (García y col., 2002)

Figura 3. Alteraciones Cromosómicas Estructurales.



(Tomada y modificada de Moore y Best, 2001.)

3. DIAGNÓSTICO DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

El aumento de las tasas de embarazo, la disminución de la incidencia obstétrica, el aborto involuntario y el tratar de evitar la obtención de fetos con defectos de nacimiento u otras deficiencias da paso a que la medicina reproductiva desempeñe el papel de pruebas genéticas para guiar la toma de decisiones médicas.

Las evaluaciones genéticas dentro de la medicina reproductiva pueden subdividirse en 4 principales categorías (Brezina y Kearns, 2014):

1. Pruebas genéticas de preconcepción: La evaluación genética de los futuros padres antes del embarazo.
2. Pruebas genéticas prenatales: La evaluación genética de las mujeres que están actualmente embarazadas para determinar la composición genética del feto en desarrollo.

3. Pruebas genéticas preimplantacionales: La evaluación genética de un embrión, antes de transferirse al útero, a través de una biopsia del embrión durante la fertilización in vitro.

4. El análisis genético tras la muerte fetal: La evaluación genética de los productos de concepción después de un embarazo fallido.

De acuerdo a la información anterior los estudios Citogenéticos resultan de valiosa importancia debido a que los resultados que proporcionan permiten dar a conocer las posibles causas genéticas del aborto involuntario y al mismo tiempo puede determinar la existencia de riesgos recurrentes, siendo a menudo la técnica primaria de evaluación para determinar un diagnóstico en este tipo de casos (Gao y col., 2012).

3.1 Citogenética clásica: cariotipo

Las técnicas citogenéticas fueron ideadas por primera vez en la década de los cincuenta, cuando accidentalmente se descubrió el uso de la solución hipotónica para la liberación del material genético de la célula (cromosomas), permitiendo confirmar que el número de cromosomas humanos es 46.

Después en la década de los sesentas y principios de ochentas se revelan los patrones cromosómicos mediante Giemsa para la preparación del cariotipo y finalmente mediante tinción de bandas G donde expertos pueden identificar deleciones cromosómicas, duplicaciones, inversiones y translocaciones (Fruhman y Van den Veyver, 2014) con un tamaño de resolución de entre 5 a 10 Mb (Azmanov y col., 2007).

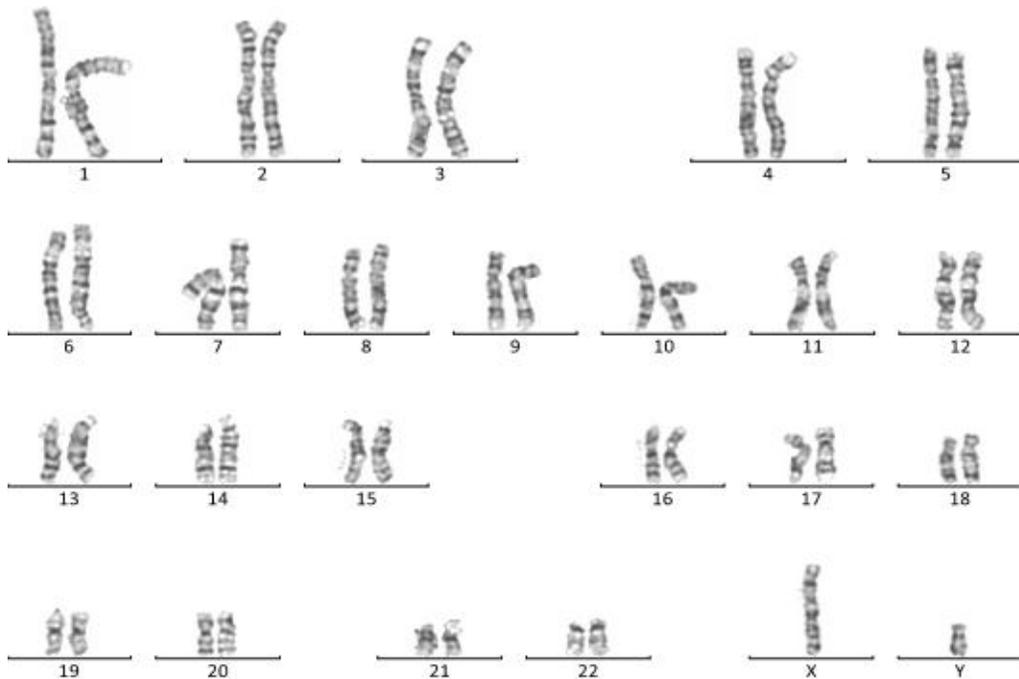
En la actualidad la citogenética clásica es una de las más implementadas para la obtención y evaluación del cariotipo humano; consiste en realizar un cultivo celular de linfocitos permitiendo su división y viabilidad para la cosecha de cromosomas arrestados en metafase del ciclo celular y culminar así con su análisis (Fig. 4).

Pero como técnica de diagnóstico prenatal fue introducida en 1996 cuando Steel y Breg demostraron que la constitución cromosómica de los fetos puede ser determinada mediante el análisis de cultivo celular a partir de células de líquido amniótico. Un año después Jacobson y Barter desarrollan el primer diagnóstico

prenatal de anomalías cromosómicas y con ello al paso de los años estas técnicas se fueron empleando en vellosidades corionicas, cordocentesis y tejidos del producto. Sin embargo se han presentado bastantes limitaciones en su empleo debido a que se necesita de una mano de obra intensiva o un experto analista lo que puede llegar a aumentar los costos , el tiempo del estudio es extenso y puede tardar entre 10 días a tres semanas para cultivar las células, visualizar los cromosomas y realizar el análisis, lo que lleva a la ansiedad de las mujeres embarazadas o en etapa reproductiva (Zuffardi y col., 2011); además los cultivos son bastante vulnerables a la contaminación externa permitiendo el fracaso del cultivo, también puede ocurrir el crecimiento selectivo de células maternas inhibiendo la realización del cariotipo. Se ha estimado que solamente 24-36% de los tejidos embrionarios producen metafases con la suficiente calidad para una cuantificación de cromosomas precisa y en menos del 25% de los embriones puede analizarse todas las metafases. Esto implica que el mosaicismo es subestimado ya que no se pueden evaluar las suficientes metafases (Munne, 2006).

Otra desventaja es que existen algunas alteraciones cromosómicas sutiles como las microdelecciones, que se pasan por alto debido a la resolución limitada en bandas con cambios menores de 5 Mb (Azmanov y col., 2007).

Figura 4. Cariotipo masculino con tinción de bandas G.



Representación de Cariotipo de sexo masculino con tinción bandas G. Tomado del Laboratorio de Genética y diagnóstico Molecular. De la unidad de investigación Hospital Juárez de México.

3. CITOGÉNÉTICA MOLECULAR

De acuerdo a estudios basados en laboratorios el fallo en cultivos celulares para la realización de un cariotipo es muy alta, esta puede variar entre un 5 a 42%, el cual puede depender también del tipo de tejido. Por ello se han desarrollado técnicas que con la ayuda de la biología molecular (uso de DNA genómico) , basándose en la hibridación en la cadena de ADN del cromosoma metafásico con la de una sonda adecuada cuya secuencia de nucleótidos es complementaria de la región cromosómica que nos interesa localizar (Oliva y col., 2004), con ello, han permitido a nivel clínico dar resultados favorables a pacientes con retraso del desarrollo / discapacidad intelectual inexplicable, trastornos del tipo autista, y múltiples anomalías congénitas (Zuffardi y col., 2011).

Así, surge el diagnóstico citogenético molecular, convirtiéndose en una parte integral de la atención médica moderna además que se requiere para numerosos campos de la medicina (Varsonova, 2010). Las técnicas de gran relevancia en la citogenética molecular son:

- FISH (Hibridación Fluorescente *in situ*)
- CGH (Hibridación Genómica Comparativa)
- Array- CGH

En el caso del diagnóstico prenatal, el uso de la biología molecular en conjunto con la citogenética, resulta una alternativa al cariotipo, proporcionando una visualización de los desequilibrios cromosómicos en todo el genoma con una resolución más alta, lo que permite la detección de microdeleciones y microduplicaciones, además permite una caracterización más precisa de los desequilibrios, proporcionando una mejor predicción del fenotipo, o la severidad de la enfermedad (Zuffardi y col., 2011). De acuerdo a estudios basados en los laboratorios de todo el mundo el llevar a cabo un análisis citogenético convencional de estos tiene como principal problemática la tasa de fallo en el cultivo, por ello la aplicación de citogenética molecular en este tipo de patologías resulta más que conveniente con el uso del DNA genómico y así evitar la falta de dicha información que afecta en gran medida a las parejas con pérdidas de embarazos y al médico ya que no tienen la oportunidad de un diagnóstico certero que les permita dar una solución a su problema (Lebedev y col., 2004).

4.1 FISH (Hibridación *in situ* con Fluorescencia)

Una técnica de citogenética molecular, es la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) es un método de diagnóstico fiable. Esta técnica implica que una sonda ya marcada y fabricada se incorpore a los cromosomas en metafase ya fijados previamente, o en células en interfase que se encuentren en una laminilla a través de la desnaturalización en la superficie de esta. Al finalizar se emitirá una señal la cual se interpreta a través de un contraste de color (Fig.5).

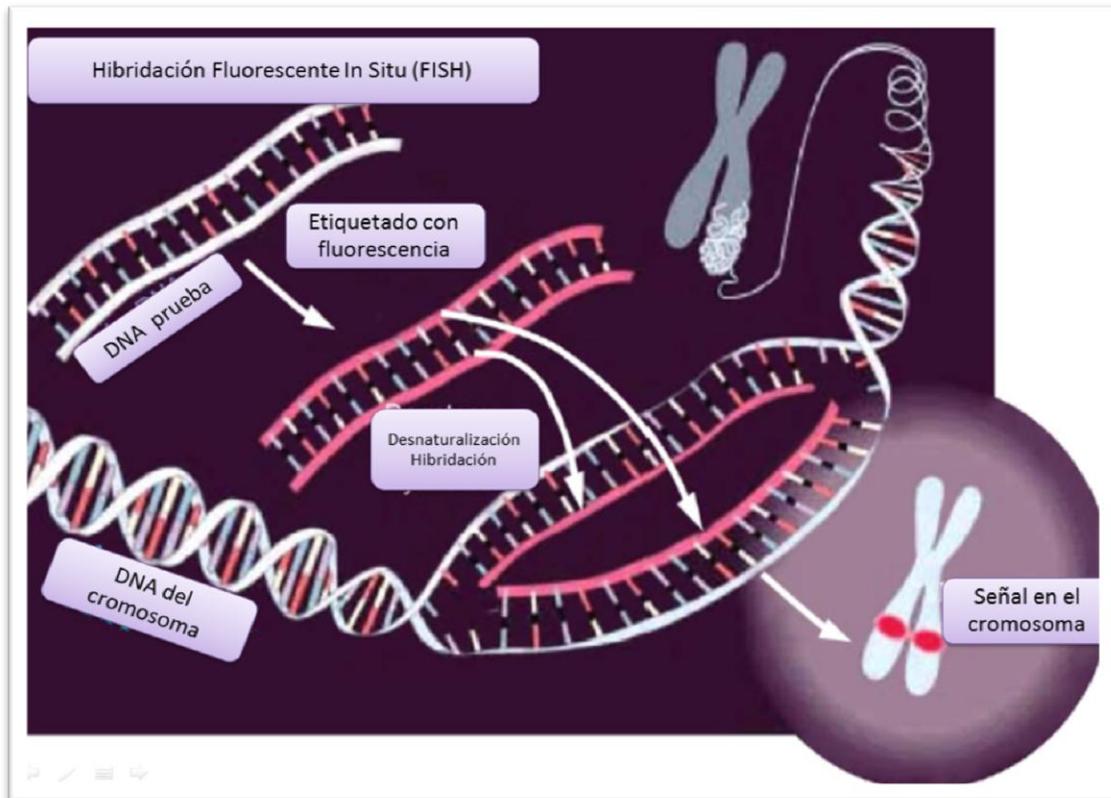
FISH es una técnica capaz de utilizar núcleos en interfase y no solo es llevado a cabo para las muestras prenatales obtenidas por amniocentesis o vellosidades coriónicas, sino también muestras de tejido de aborto.

Este procedimiento permite la identificación rápida de aneuploidías comunes utilizando cantidades relativamente pequeñas de células, evitando mayores inconvenientes de la citogenética clásica como la insuficiencia de células del cultivo. Ha permitido el diagnóstico preciso de euploidías o la frecuencia de líneas celulares anormales en casos de mosaicismo, que sólo es posible con este método.

Esta técnica ha sido de rutina para identificar, confirmar y caracterizar alteraciones con sospecha clínica ya conocidas, por ello se utilizan sondas específicas y dirigidas a cierta anomalía que se requiere corroborar (Vermeesch y col., 2007) , sin embargo si se requiere fabricar la sonda el tiempo requerido es demasiado largo; además aún depende de un cultivo celular, lo que con lleva a una tasa elevada de fracaso, e incluso se ha detectado que también pueden ocurrir fallas durante la hibridación del material afectando la precisión en la interpretación de las pruebas (Jobanputra, 2011)

Otras limitaciones de esta técnica es que tiene un número limitado de cromosomas destino que se pueden probar en un solo ensayo, debido a que depende de fluorocromos que pueden ser utilizados en un núcleo de forma simultánea, que generalmente son 4 para evitar fallas en su interpretación convirtiéndose en un método demasiado costoso (Carvalho y col., 2010).

Figura 5. Técnica de Hibridación Fluorescente *In Situ* (FISH)



(Tomado y Modificado de Smeets, 2004.)

2.2 CGH (Hibridación Genómica Comparativa)

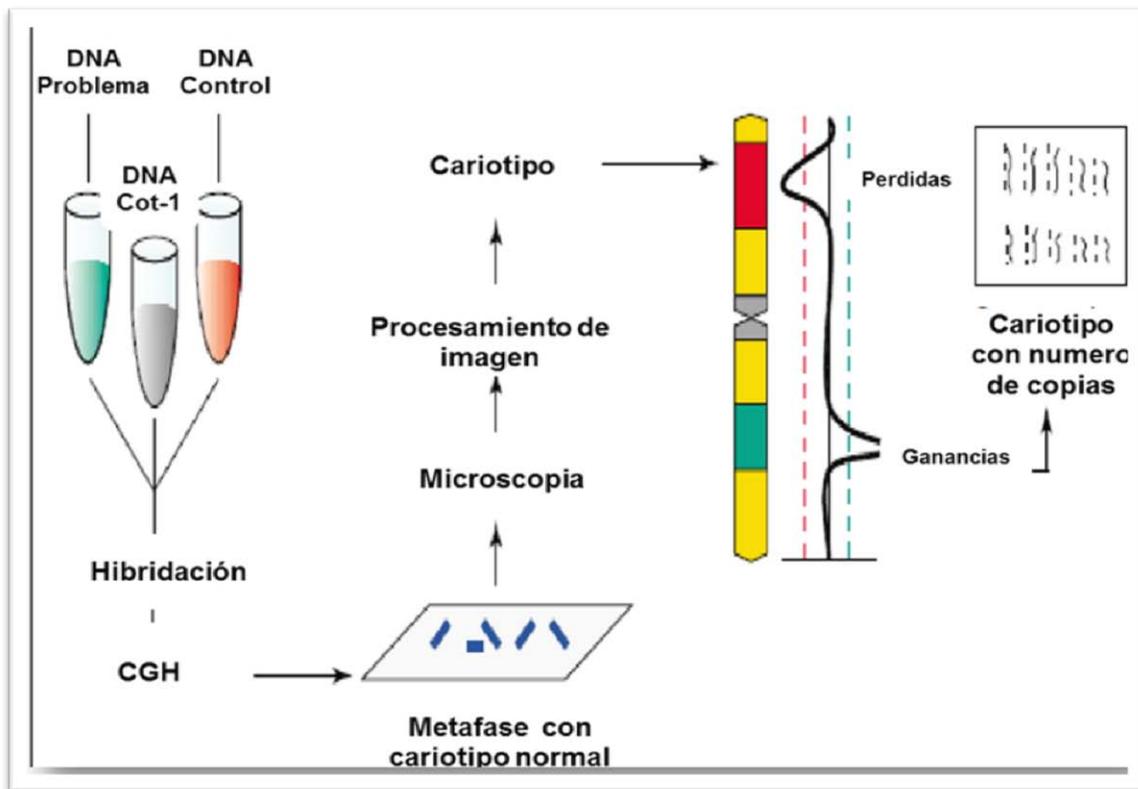
Una nueva técnica de Citogenética Molecular es la Hibridación Genómica Comparativa (CGH) derivada de la técnica de FISH, esta es empleada para detectar cambios en el número de copias (deleciones o duplicaciones cromosómicas) a lo largo del genoma a partir de una sola hibridación directa. Descrita por primera vez en 1992 por Kallioniemi y colaboradores (Lomax y col., 2000), la técnica se basa en la comparación de dos muestras de ADN genómico: una obtenida a partir del tejido objeto de análisis y la otra a partir de un control normal como referencia. Ambos ADNs son diferencialmente marcados con fluorocromos, digeridos y mezclados en proporción 1:1. Posteriormente, son hibridados sobre preparaciones de cromosomas metafásicos normales en presencia de Cot-1 para bloquear secuencias altamente repetidas (telómeros y

centrómeros de los cromosomas). Durante esta cohibridación, ambos ADN van a competir por hibridar con las secuencias diana de los cromosomas metafásicos; la cantidad relativa de cada tipo de ADN unido a una región cromosómica dada dependerá de la cantidad relativa de esas secuencias en cada ADN. De este modo, las diferencias en intensidad de fluorescencia de los patrones del ADN test y referencia se pueden interpretar como diferencias en el número de copias entre ambos genomas (si el ADN test se marcó en verde y el de referencia en rojo, las regiones normales aparecerán amarillo-anaranjadas, mientras que las pérdidas lo harán en rojo y las ganancias en verde) (Azmanov y col., 2007; Alvarez, 2007). Durante el análisis, en condiciones de normalidad en el ensayo se encuentra en condiciones 1:1. Si hay un aumento de material o por el contrario, la proporción se desvía en más uno (>1) o en menos (<1) obteniéndose unas graficas características (Azmanov y col., 2007) (Fig. 6).

El enfoque de esta técnica permite superar los problemas relacionados con el de cultivo de tejidos, proporcionando una nueva proyección de todo el genoma en el caso de las alteraciones cromosómicas desequilibradas además no depende de las células en división y se puede emplear el ADN que esté disponible en cualquier momento, dando un nuevo enfoque a el análisis citogenético convencional. Además la resolución de esta técnica va de 3 Mb a 5 Mb, tienen una resolución mejor que la citogenética convencional, pero la principal ventaja que presenta esta técnica es que no requiere un conocimiento previo sobre la constitución genética de la muestra objeto de estudio y que el genoma completo es analizado en un único experimento, al contrario que en el caso de otras técnicas moleculares altamente específicas y que analizan regiones muy concretas de genes o de cromosomas de interés. Además, permite el estudio a partir de especímenes embebidos en parafina (Mathur y col., 2014) y ha sido demostrada una elevada concordancia entre los resultados obtenidos mediante CGH y el cariotipo convencional, para la detección de alteraciones desequilibradas microscópicas (Azmanov y col., 2007).

Una limitación del CGH es que no detecta translocaciones balanceadas, en las cuales únicamente existe un cambio en la localización de las secuencias afectadas por la translocación pero la cantidad de ADN no varía. Las técnicas moleculares (de cualquier tipo) precisan de mayor información clínica previa a su utilización pero no sustituyen, ni excluyen al cariotipo, sino que lo complementan. Éstas son útiles cuando los cultivos para la realización del cariotipo no son buenos y se obtienen pocas metafases o son de baja calidad (Hu y col., 2006).

Figura 6. Técnica Hibridación Genómica Comparativa (CGH)



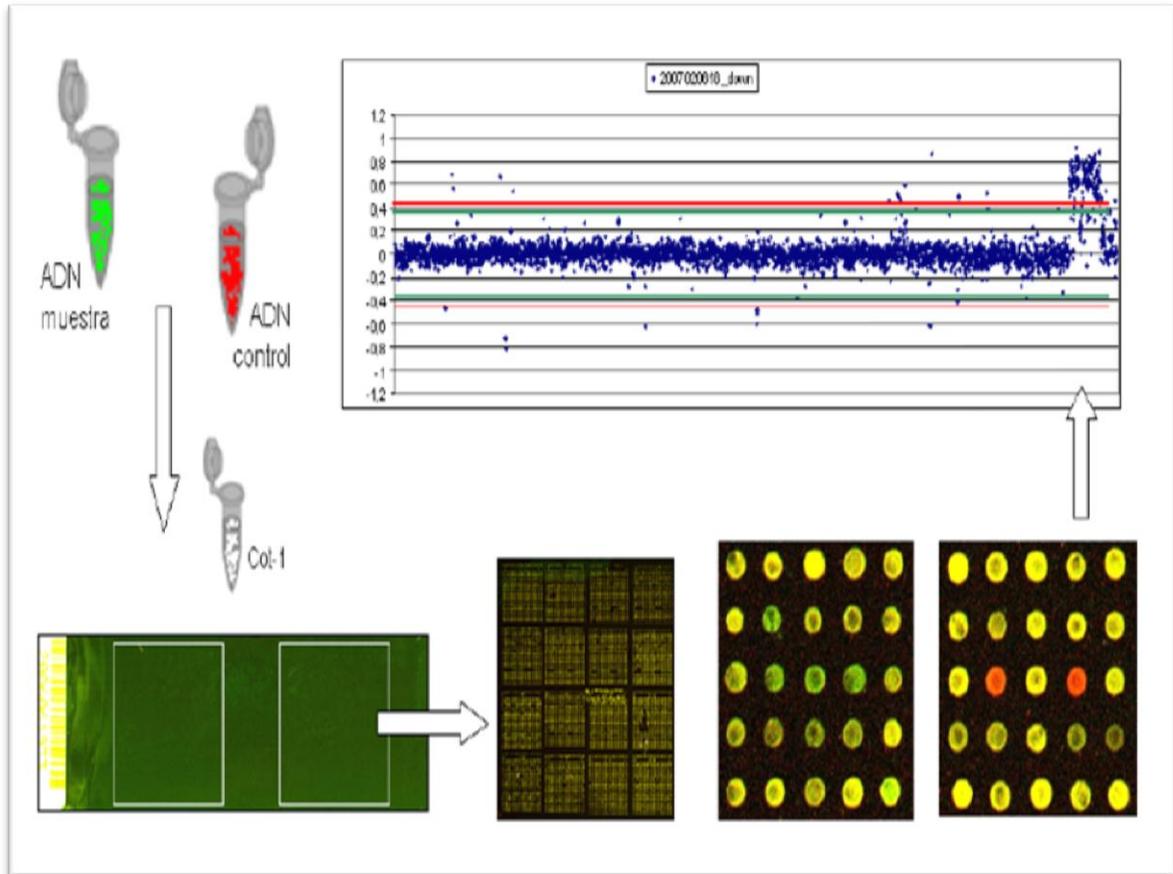
(Tomado y modificado de Tönnies, 2002.)

4.3 Hibridación Genómica Comparativa (CGH)- Array

La Hibridación Genómica Comparada basada en microarreglos (CGH array) es una plataforma revolucionaria que fue adoptada recientemente en el laboratorio clínico. Esta tecnología fue desarrollada por primera vez como una herramienta de investigación para detección de alteraciones genómicas en el cáncer. Esta técnica se basa en el mismo fundamento que el CGH convencional (cohibridación de dos muestras de ADN en proporción 1:1 marcadas con fluorocromos diferencialmente), a diferencia que en esta técnica la hibridación genómica comparativa se realiza sobre una matriz o plataforma (microarray) en lugar de una laminilla con metafases como sustrato para la detección de deleciones y duplicaciones cromosómicas (Fig. 7), lo que permite la evaluación en alta resolución en el número de copias variables del ADN que están asociadas con anomalías cromosómicas, esto a una resolución ~150 kb (Bejjein y Shaffer, 2006). Tras el marcaje de las muestras e hibridación y lavado de la sonda, la intensidad de fluorescencia de ambas muestras por cada punto se registra mediante un escáner y la interpretación de los resultados con un software específico (Álvarez, 2007; Riegel, 2014)

Las limitaciones que presenta esta técnica son su incapacidad para detectar alteraciones cromosómicas equilibradas, si bien es cierto que al contrario que en el caso de la CGH convencional, permite el estudio de las regiones subteloméricas y pericentroméricas de los cromosomas además de la detección de ciertas (euploidías). Otras limitaciones en su uso clínico son la necesidad de confirmar los resultados anómalos obtenidos mediante otras técnicas (deleciones mediante FISH y duplicaciones por PCR a Tiempo Real) y la dificultad de interpretar éstos debido a la posibilidad de tratarse de regiones del genoma aparentemente polimórficas en el número de copia (CNV) (Álvarez, 2007).

Figura 7. Representación esquemática de la técnica de CGH-Array



(Tomado de Álvarez, 2007.)

Cuadro No. 2. Ventajas y desventajas de la citogenética convencional y técnicas de citogenética molecular.

TECNICAS	VENTAJA	DESVENTAJA
Citogenética Convencional	<ul style="list-style-type: none"> • Técnica establecida • Detección de anomalías cromosómicas por medio de bandedo G . 	<ul style="list-style-type: none"> • Resolución de 5 a 10 Mb • Origen de marcadores cromosómicos no detectable • Probabilidad de fallo de cultivo por contaminación. • Tiempo extenso (10 a 21 días). • Procedimiento laborioso.
Hibridación Fluorescente in situ (FISH)	<ul style="list-style-type: none"> • Capaz de detectar poliploidías, monosomías y trisomías. • Se realiza directamente sobre las células en interfase y elimina el requisito de metafases • Resultado rápido 	<ul style="list-style-type: none"> • No detecta anomalías distintas a las que se ha diseñado la sonda . • Es dirigido
Hibridación Genómica Comparativa (CGH)	<ul style="list-style-type: none"> • Resolución de 3 a 5 Mb • Detecta anomalías cromosómicas en todo el genoma. • Detecta deleciones y duplicaciones de material genético. • Resultados rápidos (5 días). • Uso de DNA genómico a partir de tejidos embidos en parafina. 	<ul style="list-style-type: none"> • No detecta rearrreglos balanceados. • Contaminación de tejidos
Array-CGH (Hibridación Genómica Comparativa)	<ul style="list-style-type: none"> • Detecta alteraciones a lo largo de todo el genoma. • Detecta deleciones , duplicaciones o amplificaciones (incluyendo desequilibrios microscópicos). • Uso de DNA en tejidos fijados ya sea formol o parafina. • Resultados rápidos (5 días). 	<ul style="list-style-type: none"> • No detecta reordenamientos equilibrados. • Los altos costos (procedimiento mas caro)

(Tomado y modificado de: Van Der Berg, 2012)

4. ANTECEDENTES

Lomax y col., (2000) de acuerdo a investigaciones se plantearon como objetivo el determinar si la técnica de CGH es tan eficaz como la citogenética tradicional para el análisis de abortos espontáneos. Fue así como se encontró que la tasa de fracaso de CGH fue menor (2%) que para el análisis citogenético (12%), debido a que sólo 7 de 301 muestras eran demasiado pequeñas para extracción de ADN adecuado para el análisis de CGH, en comparación con 35 de 301 muestras que no pudieron crecer o producir suficientes cromosomas en metafase para el análisis convencional. Este hallazgo indica que el manejo de las muestras para el análisis de CGH es más fácil que para métodos convencionales, debido a que el principal factor limitante es el tamaño del tejido problema.

Años más tarde, Trussler y col.,(2004) decidieron combinar las técnicas de CGH y otras pruebas de citogenética molecular como lo es FISH aplicado en cultivos celulares de 40 embriones con el objetivo de determinar si eran viables para fertilidad, por ello compararon los resultados obtenidos, determinando que el 42,5% de los embriones fueron normales y el 57,5% anormales, siendo todos consistentes con los resultados tanto de FISH como de CGH, proporcionando evidencia adicional de que la técnica de CGH produce resultados fiables y precisos.

Posteriormente Azmanov y col., (2007) aplicaron la técnica de CGH para identificar alteraciones cromosómicas en 106 abortos espontáneos de diferentes edades gestacionales, revelando un 37,7% de frecuencia global de aberraciones cromosómicas (40 de 106 casos), distribuidos de la siguiente manera: 82,5% aberraciones numéricas (aneuploidías 47,5%, monosomía X 25,0% y hiperdiploidía 10,0%) y el 17,6% aberraciones estructurales. Afirmando que la hibridación genómica comparativa (CGH) es una técnica de citogenética molecular alternativa capaz de detectar desequilibrios cromosómicos debido a que utiliza DNA genómico para la evaluación no se basa en los cromosomas en metafase y así elude los problemas técnicos asociados con cultivo de tejidos.

Con el aumento de los años esta metodología continuó en uso e investigación, un ejemplo es que Mathur y col., (2014) llevaron a cabo el método de CGH en conjunto con MSA (análisis de microsatélite) para determinar si hay contaminación materna, para la obtención de resultados cromosómicos de tejidos de aborto involuntario embebidos en parafina, concluyendo que es una técnica ventajosa ya que en 77 muestras el 79% de ella resultó informativa, además puede proporcionar un resultado incluso después de meses o años más tarde de la obtención de la muestra dando la razón del porqué de un aborto involuntario.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente el aborto espontáneo es considerado como uno de los problemas más frecuentes que pueden ocurrir durante el embarazo, mediante citogenética clásica se ha revelado que cerca del 50-60% de los casos se deben a la presencia de aberraciones cromosómicas, sin embargo este estudio presenta limitaciones para la obtención y análisis del cariotipo, por ello resulta de gran importancia implementar un método complementario como lo es la hibridación genómica comparativa (CGH) que permite identificar alteraciones desbalanceadas (duplicaciones y deleciones) e incluso confirmar sospechas clínicas que proporcionó el cariotipo, para guiar en la toma de decisiones médicas, dar alternativas al problema e incluso para la prevención de futuros embarazos en parejas que han sufrido algún aborto involuntario.

6. JUSTIFICACIÓN

La hibridación genómica comparativa proporciona una evidencia adicional al cariotipo, siendo una técnica eficaz y reproducible; capaz de detectar alteraciones cromosómicas del tipo desbalanceadas (duplicaciones y deleciones) y alteraciones complejas en ADN genómico ya que cuenta con una resolución mayor a 5 Mb y no se basa en métodos de cultivo para la obtención de metafases por lo tanto no es necesario el uso de un experto en ello, disminuyendo así sus costos siendo más accesible y dando un resultado rápido (5 días) , seguro y certero.

7. HIPÓTESIS

La CGH es una técnica capaz de detectar ganancias y pérdidas de ADN además de ser segura y eficaz, por lo tanto permitirá detectar cambios genómicos en el ADN en productos de abortos espontáneos con una etiología desconocida.

8. OBJETIVO GENERAL

Determinar las alteraciones genómicas desbalanceadas en tejidos de abortos por medio de hibridación genómica comparativa (CGH).

9.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Estandarizar la técnica de hibridación genómica comparativa en muestras de tejidos de productos de aborto
- Identificar las alteraciones cromosómicas desbalanceadas utilizando el software Isis (Metasystem) que dan como resultado un aborto espontáneo.
- Determinar el posible origen de las alteraciones cromosómicas identificadas.

10. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1 Definición de criterios

Criterios de inclusión:

- Tejido de aborto espontáneo 20 sdg con una etiología desconocida
- Firma de la carta de consentimiento informado.

Criterios de exclusión: Aquellos pacientes donde la muestra sea insuficiente para realizar las metodologías planteadas.

10.2 Población de estudio

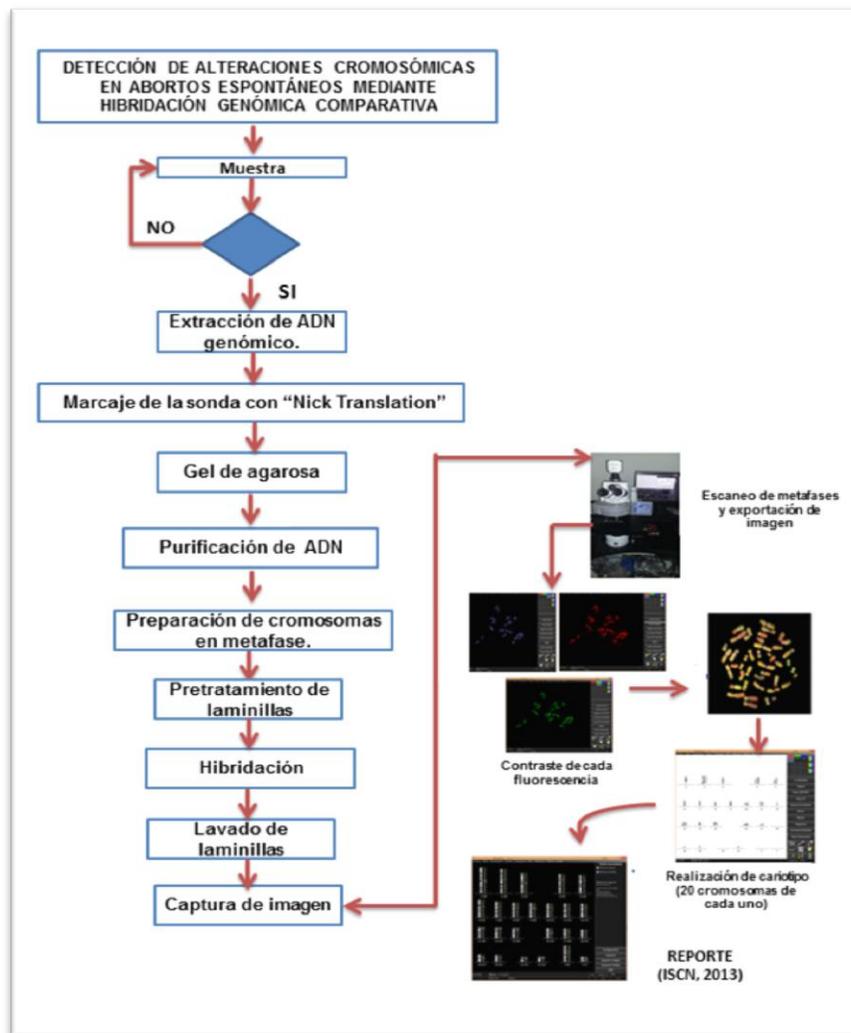
Se evaluaron 11 productos de abortos con hasta 20 semanas de gestación con una etiología indeterminada. Las muestras empleadas proceden de tejido externo

fetal, conservadas en tubos con solución salina del servicio de Ginecología del Hospital Juárez de la ciudad de México.

Los individuos de estudio fueron informados de los motivos de este proyecto y voluntariamente aceptaron participar, mediante una carta de consentimiento informado. Los resultados obtenidos se manejaron de manera confidencial.

10.3. Organigrama de trabajo

A continuación se presenta la organización del trabajo para lograr los objetivos propuestos.



10.4. Extracción de ADN en tejidos

Se aisló el ADN genómico a partir del Kit Wizard Genomic ADN Purification (PROMEGA), para ello se colocó de 10-20 mg de tejido fresco en un tubo con 600µL de Nuclei Lysis Solution y 60 µl de Proteinasa K (marca Invitrogen U.S.A) para su incubación durante 24 hrs a 50°C. Al término se agregó 3 µl de RNase Solution para incubarse de 15-30 min a 37°C, al término se adiciono 200 µl de Protein Precipitation Solution, se agitó y colocó en frio durante 5 min para así centrifugarse a 13 000 rpm por 10 min.

Posteriormente se agregó 600 µl del sobrenadante a un tubo nuevo con 600 µl de Isopropanol frio, se mezclararon por inversión y se centrifugó a 13 000 rpm, para remover el sobrenadante y adicionar 600 µl de etanol al 70% frio, para así centrifugarse de nuevo. Finalmente se aspiró el etanol y se rehidrató el ADN con 60 µl de ADN Rehydration Solution por 5 minutos a 65°C.

10.5. Marcaje de ADN (sonda)

Se utilizó el kit “Nick translation” (Vysis) el cual permitió incorporar el marcaje fluorescente con 2'-deoxiurina 5'-trifosfato (dUTP) dentro del ADN genómico problema para la producción de fragmentos genómicos de 300 a 3000 pb de longitud. De acuerdo al Kit ya mencionado se incorporó lo siguiente para un volumen total de 50 µl de sonda (Cuadro No. 3.):

Cuadro No. 3. Reactivos y cantidad a incorporar de acuerdo al Kit “Nick Translation” para la realización de la sonda.

Cantidad	Reactivo
(20.5– X) µl	Agua
X µl	1µg de DNA
2.5 µl	Green dUTP
5 µl	0.1 m MdTTP
10 µl	dNTPmix
5µl	10 X buffer Nick Translation
10 µl	Enzima Nick Translation
50 µl	TOTAL

Posteriormente la sonda se pudo incubar durante 2-4 hrs a 15°C, y para detener la reacción se sometió a calentamiento a 70°C por 10 min y se guardó a -20°C hasta su uso.

10.6 Electroforesis en gel de agarosa

Se verificó a través de un gel de agarosa (marca BIO-RAD U.S.A) al 1%, teñido con bromuro de Etidio (EtBr), el tamaño de los fragmentos generados, los cuales deberán de estar de un rango de 300 a 3000 pb. La preparación de los geles se realizó con TAE 1 X (Tris Base marca BIO-RAD U.S.A, ácido acético glacial y EDTA 0.5 M pH 8 marca BIO-RAD U.S.A) como tampón gel y tampón de corrida en una cámara de electroforesis. Los productos de sonda de ADN se mezclaron con buffer de carga. El tamaño de los fragmentos se determinó mediante un marcador que va de 500 a 5000 pb marca Data Sheet. y se visualizó finalmente mediante un analizador de imagen.

10.7. Preparación de cromosomas en metafase

Se utilizó sangre periférica de un donante masculino con cariotipo normal para realizar un cultivo en suspensión. Se realizó la siembra de linfocitos adicionando 4.5 ml de medio RPMI-1640 (Gibco) el cual fue suplementado con 20% de suero fetal de ternera, 1.3 ml de antibiótico, se agregó 0.2 ml de fitohemaglutinina para estimular la replicación de las células y 10 gotas (0.5 ml) de sangre periférica. Posteriormente se incubó el cultivo en una estufa a 37°C y a 5% de CO₂, durante 72hrs horas. Pasado este tiempo se añadió 0.2 ml de colchicina, 2 hrs antes de la cosecha. Las células se recogieron por centrifugación (5 min a 2500 rpm), y se trataron con solución hipotónica (KCl 0.075 M), se incubaron a una temperatura de 37°C durante 40 min, al término del tiempo se centrifugó (5 min a 2500 rpm) y se extrajo el sobrenadante para su fijación con solución de Carnoy (Metanol: Ácido Acético 3:1 v/v), se incubó durante 15 min y las células recolectadas finalmente se lavaron con solución de Carnoy durante 4 veces seguidas por su respectiva centrifugación (5min. A 1500 rpm), y finalmente se gotearon las láminas en el centro y se colocan en refrigeración a -20°C

10.8. Pretratamiento de las laminillas

Las laminillas se colocaron en una solución de maduración (2XSSC con pH de 7-8) durante 30 min. a 37°C , se deshidrataron en una serie de etanoles (diluido al 70%, 80% y 100%) 1 a 3 min cada uno y se secaron para colocarlas en solución de desnaturalización de Formamida durante 2 min a 73°C, se secaron las laminillas y realizo su posterior deshidratación con etanol (diluido al 70%, 80% y 100%) de 1 min cada uno.

10.9 Purificación e hibridación de la sonda

Se colocó en un tubo 10µL de la sonda marcada con verde (Green) de ADN problema, 1µl de ADN de referencia; (Spectrum Red Male Total de Vysis), 10µl de Cot 1-1 (Vysis, U.S.A), 2.1µl de acetato de sodio 3M y 52.5µl de etanol; se colocó en hielo por 15 min, se centrifugó a 12000 rpm a 4°C por 30 min., se desechó el sobrenadante y secó a temperatura ambiente, una vez seco se agregaron 3µl de agua y 7µl de buffer de hibridación de CGH, la sonda se colocó durante 5 min a 73°C. Colocar 10µl en la laminilla previamente goteada y desnaturalizada, ésta se cubrirá con el cubreobjetos y se depositará en una cámara húmeda a 37°C durante 72 hrs.

10.10 Lavado de las laminillas

Las laminillas se colocaron en solución NP-40 al 1% en baño María a 73°C durante 1min, al término se sacaron y colocaron en NP-40 al 0.3% en baño María a 73°C durante 1:30 min., una vez terminado el tiempo se retirarán las laminillas y se agregó 10µL de DAPI II (Aboott Molecular Inc. U.S.A) y se almacenó a 20°C antes del análisis.

10.11 Captura de imágenes.

Se buscaron de 40 a 60 metafases del objetivo de 10X con un microscopio de Axiolmager 2 (CarlZeiss, Alemania), las mejores metafases se capturaron a 63X. mediante filtros de excitación específicos para DAPÍ II, Texas Red y FITC; las

imágenes en tres colores fueron captadas, automáticamente utilizando el software Metasystem (GmbH, Alemania)

10.12 Análisis de las imágenes digitales

Se analizaron un mínimo de 20 imágenes de cada uno de los 23, estas fueron organizadas y analizadas utilizando el software Isis (Metasystem GmbH, Alemania).

10.13 Análisis estadístico.

El presente trabajo es un estudio descriptivo por lo tanto solo se realizó un análisis estadístico descriptivo.

10.14 REPORTE

Se reportó utilizando el sistema de nomenclatura internacional cromosómica (ISCN, 2013)

11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

11.1. Controles

Lo primero que se realizó fue la estandarización de la técnica y esto fue utilizando un control negativo y positivo:

Para el caso del control **negativo** se tomó sangre periférica de un paciente del género femenino, aparentemente sana. Se extrajo el ADN y posteriormente se cuantificó (Cuadro No. 4), esto con la finalidad de realizar después su marcaje.

Cuadro No. 4. Cuantificación de DNA del control negativo y cantidad de microlitros que se agregaron en la mezcla de “Nick Translation” para la realización de la sonda

CASO	Concentración ADN ng/μl	Cantidad que se pondrá en reacción (μl)
Control (-)	260	4

En el caso del control **positivo** se obtuvo una muestra de tejido de un recién nacido con 35. 2 sdg del género femenino, que falleció a unas cuantas horas de haber nacido, debido a múltiples malformaciones congénitas detectadas como: gastrosquisis y malformaciones cráneo faciales, esto confirmado por su historial clínico (Cuadro No. 5). Posteriormente se procedió a la extracción del DNA para su cuantificación (Cuadro No. 6) y marcaje.

Cuadro No. 5. Historial clínico del control positivo

Caso	Edad Madre	Edad Padre	Talla y peso	Historia Reproductiva	Enf. Hereditarias	SDG	Malformaciones
Ctrl (+)	24 a	S/D	80 Kg/1.60m	G1/P0/C0/A1	Negado	35.2	<ul style="list-style-type: none">• Gastrosquisis• Malformaciones cráneo Faciales

Cuadro No. 6. Cuantificación de DNA del control positivo y cantidad de microlitros que se agregaron en la mezcla de “Nick Translation” para la realización de la sonda

CASO	Concentración ADN ng/μl	Cantidad que se pondrá en reacción (μl)
Control (+)	724.3	1.5

11.2 Marcaje del DNA de los controles con “Nick Translation”

Lo primero que se realizó fue la estandarización de la actividad enzimática (enzima polimerasa 1), tal y como lo indica el kit “Nick Translation”, utilizando como variables, la concentración y el tiempo, esto con la finalidad de obtener una sonda que se encuentre en un rango de 300 a 3000 pb en 10 μl. Ya que Ramos. 2006, menciona que uno de los factores que afecta la estabilidad de la hibridación es la longitud de las cadenas marcadas, ya que a un mayor número de enlaces de H entre la hebras, mayor será la estabilidad entre los híbridos, y al mismo se tendrá una intensidad de señal más fuerte, por el mayor número de nucleótidos marcados dentro de ella. Si se tiene lo contrario las señales emitidas serán débiles, debido a que la sonda penetra menos eficientemente en el tejido (Ramos., 2006).

De acuerdo a lo anterior y los resultados obtenidos se observó que finalmente con tiempo de una hora 30 minutos y una concentración de 7 μl de enzima, se obtiene el tamaño (300 a 3000 pb) y marcaje óptimo de la sonda (Cuadro No.7).

Ya estandarizado lo anterior se procedió a realizar el marcaje de las muestras problema

Cuadro No. 7. Condiciones óptimas para la realización del marcaje de ADN con el kit “Nick Translation”

Cantidad	Reactivo
(20.5– X) μ l	Agua
X μ l	1 μ g de DNA
2.5 μ l	Green dUTP
5 μ l	0.1 mMdTTP
10 μ l	dNTPmix
5 μ l	10 X buffer Nick Translation
7 μ l	Enzima Nick Translation
50 μl	TOTAL

Se incubó durante una hora con 30 min. a 15°C

11.3 Extracción de ADN de las muestras recolectadas

Se obtuvo un total de 11 muestras de tejido de aborto espontaneo, a las cuales se realizó la extracción del ADN genómico de cada una de las muestras, para posteriormente realizar su cuantificación y obtener la cantidad de ADN (ng). Obteniendo los siguientes valores (Cuadro No. 8):

Cuadro No. 8. Cuantificación de ADN extraído en cada una de las 11 muestras recolectadas.

CASO	Cantidad de ADN (ng/μL)	Pureza
1	3057.9	1.8
2	3227.4	1.8
3	1726.1	1.9
4	3336.8	1.6
5	2673	1.9
6	2728	1.8
7	2942	1.7
8	840	1.9
9	1883.5	1.8
10	3327.7	1.10
11	3419.4	1.6

Para la realización de la sonda a través del Kit CGH Nick Translation Reagent fue necesario partir de 1000 ng del ADN problema, por lo tanto se realizaron diluciones a excepción de la muestra 8 (Cuadro No.9) a través de la siguiente fórmula:

$$V1 = \frac{(10\mu l) (1000ng/\mu l)}{\text{Cantidad de DNA cuantificado } (\mu g/\mu l)}$$

Cuadro No. 9. Dilución de DNA y cantidad de μl que se agregaron para un total de 1000ng en la reacción.

CASO	Cuantificación DNA ng/μl diluido	Cantidad que se pondrá en reacción (μl)
1	1005.5	1
2	900.1	1
3	893.1	1.2
4	1521	0.8
5	1004	1
6	1026.7	1
7	1058.9	1
8	No se diluyo	1.2 (directo)
9	1008.3	1
10	1259.2	1
11	1509	1

Posteriormente se realizó la reacción de “Nick translación” de acuerdo a las condiciones ya estandarizadas con los controles y se corroboró a través de un gel de agarosa con la finalidad de observar el patrón de marcaje que va de 300pb a 3000pb como se muestra en la fig. 8

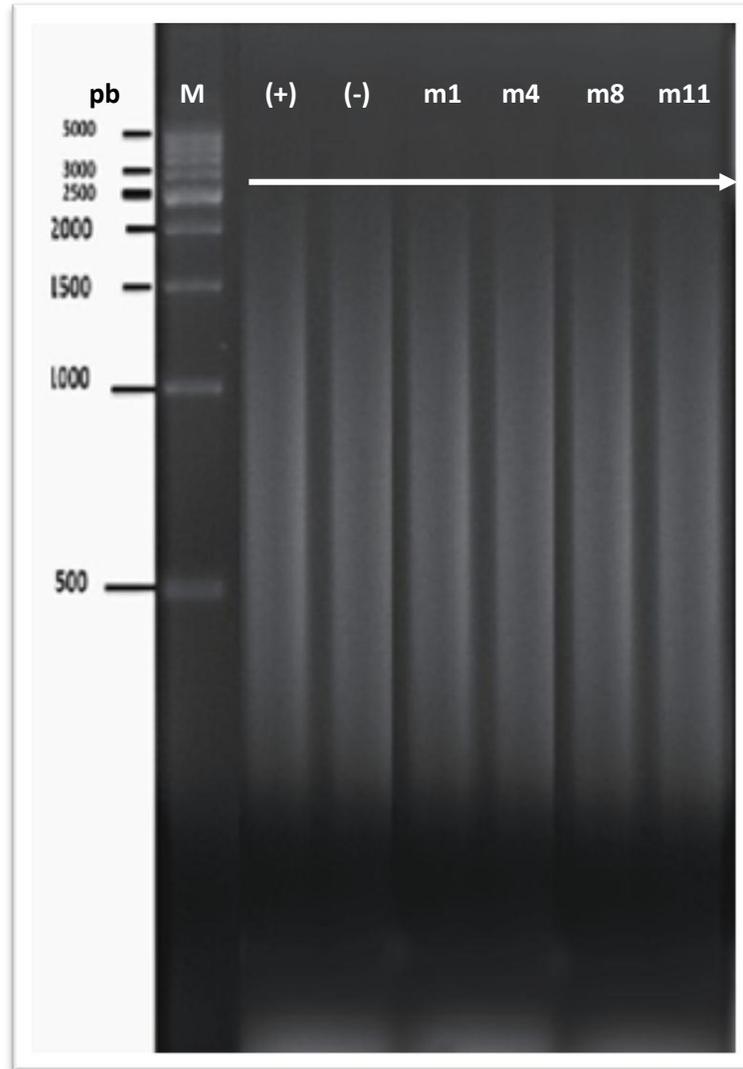


Figura 8. Gel de agarosa al 1% tenido con EtBr con los productos del marcaje de la sonda con “Nick Translation”. Donde M es el marcador que va de 500 a 5000pb. Se muestra el negativo (-) y positivo (+) con un tamaño aproximado de 3000 pb en 10 μ l. En los siguientes posos se encuentran las muestras 1, 4, 8 y 11, presentando un tamaño cercano a 3000pb en 10 μ l de muestra lo que coincide con los controles.

Después de verificar con el gel de agarosa que el tamaño de la sonda correspondió a lo más 3000 pb en 10 μ l, se procedió a realizar la purificación con el human Cot-1 DNA, el cual tiene la función de bloquear secuencias repetitivas en los centrómeros para evitar hibridar secuencias no específicas, debido que al

analizar mediante el software Isis se cuantifica la intensidad de la fluorescencia en longitud de cada cromosoma calculando el Número de copias en el cariotipo' reflejando desequilibrios cromosómicos, en los brazos del cromosoma y no en los centrómeros , evitando así, interpretar como duplicación estas secuencias repetitivas (Tönnies., 2002)

Posterior a la purificación se realizó la hibridación en las laminillas, lo cual resulto óptima y exitosa, por ello, cada una de las laminillas obtenidas se sometieron a evaluación en el microscopio para el análisis de las metafases enfocadas obteniendo de acuerdo al programa Isis el contraste de la sonda Texas Red y FICT con el DAPI II para realizar el cariotipo y así examinar pérdidas (rojo) y ganancias (Verde).

11.4 Datos clínicos de las muestras recolectadas.

Las 11 muestras biológicas de tejido de aborto con etiología desconocida presentaron los criterios de inclusión ya establecidos para realizar el estudio. Obteniendo así los datos clínicos que se muestran en el cuadro No. 10.

Todas las muestras recolectadas no exceden las 20 semanas de gestación, de acuerdo a la OMS (2011), ya que solo se determina como aborto espontaneo a aquellos productos que no fueron viables antes de la vigésima semana de gestación.

Por otro lado se encuentra la descripción de enfermedades hereditarias que podían presentar las pacientes y que podrían afectar o provocar la pérdida del producto, este dato es importante ya que podría informar sobre los antecedentes familiares que podrían ayudar al diagnóstico de alteraciones cromosómicas. Sin embargo no existe ninguna enfermedad hereditaria en la madre directamente si no en familiares. La más mencionada es la Diabetes Mellitus que con mayor frecuencia coincide con el embarazo. Estimándose que afecta de un 6 a 12% de las gestantes. De igual manera la severidad de esta enfermedad varía de una a otras mujeres. Esto afecta al feto que sustrae de la circulación materna la glucosa. Por ende se hace pruebas de sangre a la madre para detectar esta enfermedad, sin embargo ninguna de las madres lo padece, solo familiares externos que no

perjudican directamente al embrión por ende esta etiología se descartó como probable causa de aborto.

Se muestra una edad variable en las pacientes que va desde 18 hasta 43 años de edad, este dato es de suma importancia ya que de acuerdo a García y col., 2002, existe un riesgo de presentar un aborto espontáneo por múltiples anomalías cromosómicas que se pueden presentar en el feto con el aumento de la edad materna. Se ha calculado que el riesgo en las pacientes con más de 35 años se dispara en gran medida a diferencia de mujeres con menos de 30 años.

También se tomó como base clínica el peso y altura de cada una de las mujeres involucradas en el estudio ya que el índice de masa corporal (IMC) en la categoría de sobrepeso u obesidad es un hallazgo frecuente en las mujeres en edad reproductiva, y un aumento del riesgo de aborto involuntario esto de acuerdo a Kroon, (2011).

Cuadro No. 10. Base de datos clínicos de las muestras recolectadas.

CASO	Edad madre	Edad padre	Talla y peso	Historia Reproductiva	Adicciones	Enf. Hereditarias	SDG
1	29 a	37 a	70Kg/ 1.50 m	G1/P0/C0/A1	Negado	Negado	5.5 sdg
2	41a	41 a	80Kg/ 1.62 m	G6/P3/C0/A2	Negado	DM2 madre y dos hermanos	9 sdg
3	19 a	S/D	85Kg/ 1.62 m	G2/P0/C0/A2	Negado	Bisabuela CA pulmón, tío CA pleural y madre CA de mama	13 sdg
4	42 a	S/D	64Kg / 1.60m	G2/P0/C1/A1	Negado	Abuelos, padre y hermano con DM2	12sdg
5	43 a	S7D	62Kg/ 1.50m	G5/P3/C0/A2	Negado	Un hijo de 5 a prematuro con leucomalacia	11 sdg
6	24 a	S/D	78 Kg/1.73m	G2/P0/C1/A1	Fumar y Beber	Negado	6.5 sdg
7	18 a	21 a	60Kg / 1.51m	G1/P0/C0/A1	Negado	Negado	12 sdg
8	32 a	26 a	57kg/ 1.49m	G1/P0/C0/A1	Negado	Negado	11 sdg
9	26 a	22 a	66 Kg/1.60m	G2/P0/C1/A1	Negado	Abuela con DM2, madre con CA de mama y tiroides, sobrino con CA	17.1 sdg
10	40 a	48 a	62 Kg/1.59m	G2/P1/C0/A1	Negado	Mama y hermano con DM2, padre con Parkinson	6.6 sdg
11	18 a	S/D	47kg/1.54m	G1/P0/C0/A1	Negado	Abuelo materno con DM2	7.2 sdg

11.5 Resultado de Hibridación Genómica Comparativa (CGH) de los controles

CONTROL (+)

46, XX, ish cgh, del (1) (p35→p36.1), add (6) (q13→q22.3), del (16) (p11.2→p13.1), del (20) (q13.3→q11.2), del (22) (q12→q13)

Este paciente mostró a la exploración física; gastrosquisis y malformaciones de cráneo, (Cuadro No. 4). En la Fig. 10 se muestra el ideograma del CGH, donde se identificó que pertenece al género femenino con una disminución de la intensidad de señal en el cromosoma 1p de las bandas 35→p36.1, se ha visto que es una de las deleciones subteloméricas más común y se asocia con múltiples anomalías congénitas y retraso mental, esta tiene una frecuencia estimada de 1 de cada 5.000 nacidos vivos y se caracteriza por una dismorfía cráneo facial (Chen y col., 2010).

También se muestra una adición de un segmento del cromosoma 6 q13→q22.3, de acuerdo a Chen (2007) cuando ocurren supresiones parciales y duplicaciones de este cromosoma pueden asociados con la espina bífida, encefalocele, y cráneo.

Por otra parte también se encuentra una disminución de intensidad de señal en el cromosoma 16 p 11.2→13.1, el cual que de acuerdo a la literatura citada de Sung y col. (2012) es un factor importante de anomalías congénitas.

En el cromosoma 20 se pudo observar una disminución de señal que va de la banda q11.2→ q13.3. Las microdeleciones intersticiales en el brazo q del cromosoma 20 son muy raras. Se ha reportado hasta ahora en solo 17 pacientes en la literatura. Entre ellos, sólo seis llevaba una proximal de pérdida 20q11.21→q11.23, con un tamaño que varía de 2.6 a 6.8 Mb. La existencia de esta microdelección 20q11.2 se ha propuesto, basado en cinco casos, que muestran anomalías de las extremidades, discapacidad intelectual, dificultades de alimentación, dimorfismo cráneo facial y malformaciones variables (Jedraszak y col., 2015).

En el cromosoma 22 también se determinó una pérdida de señal en el brazo q, que va de la región q12→q13 el cual se ha relacionado con la presencia de espina bífida, malformaciones cardíacas y malformaciones de cabeza y cuello (Chen. 2007).

De acuerdo a la información recopilada puede deducirse que las anomalías presentadas en este caso son sobre todo causadas principalmente por el cromosoma 1 debido a las anomalías cráneo-faciales que presenta, seguido por las anomalías morfológicas presentadas que podrían ser causa de los demás cromosomas.

Todo lo anterior corrobora el historial clínico que presentó este caso, lo que puede deducir que la técnica permitió la detección de anomalías cromosómicas, por lo tanto permitió el llevarlo a cabo con las muestras problema con las condiciones previamente estandarizadas.

Figura 9. Resultado de análisis de CGH del control positivo con múltiples alteraciones cromosómicas.



CONTROL (-)

46, XX, ish cgh

De acuerdo al análisis de CGH el control resulta normal con un género femenino (Fig. No. 10), lo que concuerda con lo esperado y confirma que la técnica de CGH de acuerdo a las condiciones de la sonda especificadas en el Cuadro No. 6 son las necesarias, además que la hibridación permitió obtener los resultados necesarios para el montaje de la técnica.

Figura 10. Resultado del análisis de CGH del control negativo normal



11.6. Resultado de la Hibridación Genómica Comparativa (CGH) de abortos espontáneos.

**CASO 1
(45, X, ish cgh)**

El análisis de CGH arrojó adición muy pequeña en el cromosoma 9 (9q11-q13) (Fig. 11). De acuerdo a Baghbani y col. (2014) el cromosoma 9 cuenta con la elevada frecuencia de polimorfismos estructurales, que es una variación natural que se produce en 2.1% de la población general y se transmite a través de la

familia como rasgo mendeliano, esto puede suceder en una ubicación de la banda (9q11-q13). Este no se reporta como causa de aborto, solo puede convertirse en todo lo contrario si los padres portadores al momento del intercambio de genes dan lugar a un rearrreglo cromosómico que involucre genes importantes.

Por otra parte si se ha encontrado que la deleción en el brazo corto (p), puede involucrar múltiples anomalías congénitas que dan lugar a un aborto, esto de acuerdo a Ho y col., (2014). Por lo tanto, se concluye que únicamente es un polimorfismo.

Por otra parte se observó una monosomía del cromosoma X, este tipo de alteraciones a diferencia de lo anterior confiere al feto el denominado Síndrome de Turner. Los pacientes se distinguen por talla baja, disgenesia gonadal y fenotipo característico. La prevalencia al nacimiento es de 1/2000 a 1/5000 RN vivos mujeres. Cerca del 1% de todas las concepciones presentan una monosomía X. De ellas la mayoría terminan en abortos espontáneos, generalmente durante el primer trimestre del embarazo. En las monosomías parciales o totales del cromosoma X suceden por la disyunción incompleta en la gametogénesis o pérdida cromosómica en las mitosis iniciales del feto de acuerdo a Tiro y Guerrero, (2013). Pero en este caso la etiología de las alteraciones no es atribuible en todo aspecto a la edad materna ya que únicamente presenta la edad de 29 años, pero el padre ya que presenta una edad de 37 años y de acuerdo a Slama y col., (2005) la edad paterna influye en tener un aborto espontaneo al aumentar los 35 años de edad.

Figura 11. Resultado de CGH de caso 1



CASO 2

45, X, ish cgh, dim (16) (p12→p13)

El análisis de CGH demostró que es un producto con monosomía X y una disminución de un fragmento del cromosoma 16p12→p13. Lo anterior es importante ya que recientemente se ha encontrado que la región 16p13.11 es recurrente a sufrir una microdelección o duplicación, cuando se presenta una microdelección ha sido reportada como un factor de anomalías congénitas, incluso se ha descrito que este segmento puede involucrar algunos genes relacionados a función o estructura cerebral, dando lugar a una atrofia cerebral, esto de acuerdo a Sung y col., (2012).

También como ya se menciona la monosomía X es un rearrreglo frecuente que se encuentra en este tipo de casos y puede dar lugar a la interrupción del embarazo. Este da como consecuencia el denominado síndrome de Turner. Los pacientes se distinguen por talla baja, disgenesia gonadal y cuello corto. La prevalencia al nacimiento es de 1/2000 a 1/5000 RN vivos mujeres. Cerca del 1% de todas las concepciones presentan una monosomía X. De ellas la mayoría terminan en

abortos espontáneos, generalmente durante el primer trimestre del embarazo, de acuerdo a Tiro y Guerrero, (2013).

En este caso la perdida fetal es atribuida principalmente a la perdida del cromosoma X. Esto puede ser atribuible a la edad de ambos padres que es mayor a 40 años. Se han encontrado estudios en los que se concluye que en mujeres con una edad mayor a 35 años se presenta una alta frecuencia de sufrir algunos efectos adversos reproductivos como: infertilidad, aborto espontáneo, complicaciones en el embarazo, anomalías congénitas y mortalidad a diferencia de las madres jóvenes esto de acuerdo a De la Rochebrochad y Thonneau, (2002). En cuanto a el efecto paterno el riesgo de aborto espontáneo tambien se incrementa cuando la pareja masculina tiene una edad de 35 años o más, de acuerdo a Slama y col., (2005).

Figura 12. Resultado de CGH del caso No.2



CASO 3.

45, XY, ish cgh, dim (14)

De acuerdo al CGH se presenta una monosomía del cromosoma 14 con un género masculino (Fig. 13). La pérdida completa de un cromosoma 14 no se ha reportado en la literatura como un factor de riesgo de un aborto involuntario, sin embargo cuando se presenta una trisomía de este cromosoma es todo lo contrario. Para la trisomía 14 se ha descrito que en la sexta semana de desarrollo se puede observar un embrión con encefalocele y desarrollo de las extremidades tardío y al séptimo con espina bífida, microcefalia anomalías faciales y extremidades con retardo en el desarrollo según Chen, (2007).

Por otra parte se ha encontrado que la perdida de algunos genes que se encuentran en este cromosoma pueden estar involucrados en ciertos factores biológicos de gran importancia un ejemplo de ello es la microdelección 14q23.1 la cual contiene los genes DAAM1 y KIARA que están implicados en la organización del citoesqueleto de actina en las células encargadas del movimiento celular. Por otra parte DAAM1 interactúa con otros genes que son esenciales para el desarrollo embrionario del corazón. Por lo tanto, una delección de solo una de las copias de DAAM1 puede afectar los patrones espaciales y temporales de la cardiogénesis esto de acuerdo a Bao y col., (2012).

Se atribuye que la pérdida fetal está vinculada la pérdida de genes con una gran importancia biológica como a la función cardíaca y otros que afectan el crecimiento (Eventov-Friedman y col., 2015).

Este caso de acuerdo a la tabla de datos clínicos, la madre presenta una edad de 19 años y no se obtuvo el dato del padre por lo tanto no se atribuye directamente la aparición de la pérdida de un cromosoma 14 a esta etiología, por la falta de información.

Figura 13. Resultado de CGH del caso 3.



CASO 4 (46, XX, ish cgh), y CASO 5 (46, XY, ish cgh)

En ambos casos el resultado arrojo un cariotipo normal , siendo que para el caso 4 es un feto de genero femenino (Fig. 14); a diferencia del caso 5 con un género masculino (Fig 15). Ambos cariotipos no presentan alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales , por lo tanto el aborto espontaneo pudo ser resultado de otro tipo de factores, que por mencionar algunos pueden ser endocrinos, inmunológicos e infecciosos en la madre, de acuerdo a Pathak y col. (2010).

Figura 14. Resultado de CGH del caso 4



Figura 15. Resultado de CGH del caso 5



CASO 6

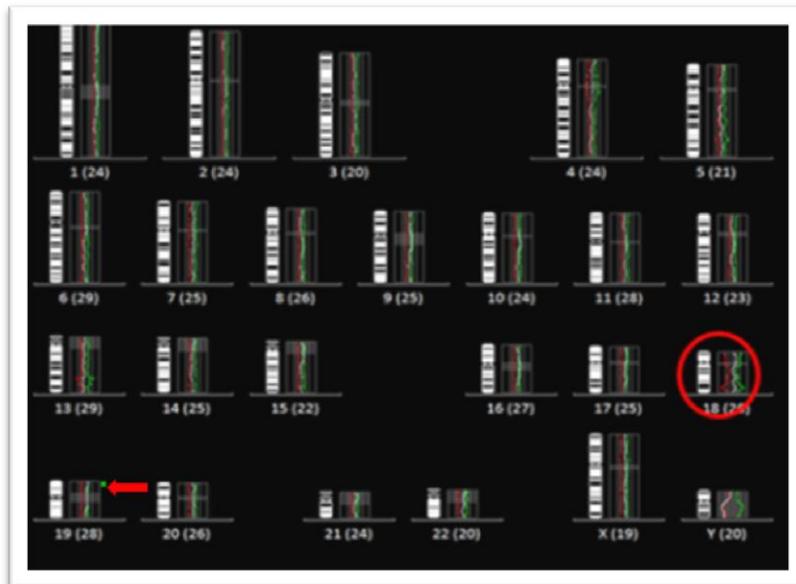
47, XX, ish cgh, enh (18)

El análisis de CGH dio como resultado una trisomía 18 con un género masculino que da como diagnóstico el síndrome de Edwards (Fig. 16), la cual es una rara anomalía cromosómica asociada a una discapacidad intelectual grave y múltiples anomalías congénitas, como dimorfismo craneo facial, microcefalia y micrognatia, orejas implantadas bajas, anomalías esqueléticas o renales y malformaciones cardíacas, este presenta una incidencia de 1/3000-1/8000 recién nacidos. Solo hay una tasa de sobrevivencia neonatal de 30% debido a que muchos que presentan anomalías cardíacas y mueren a las pocas semanas de gestación. Se ha descrito que esta trisomía es letal y una causa del aborto involuntario o tasa de muerte fetal en aproximadamente el 80% de los casos, lo anterior de acuerdo a Tarcă y col. (2014), por ello esta alteración detectada en el idiograma, se determinó como la causa principal de la pérdida fetal.

También se muestra una ganancia en la región 13.3 del brazo p del cromosoma 19, la cual hasta el momento se ha vinculado con la escoliosis que es una deformidad de la columna más frecuente. En la actualidad, no existe un consenso claro sobre la influencia genética sobre la escoliosis, sin embargo Mir y col., (2011) concluyen que el locus genético en el cromosoma 19p 13.3 puede ser una potencial hipótesis como causa en la etiología, por ello no se atribuyó la pérdida fetal a este aumento de señal en el cromosoma, que al mismo tiempo puede ser causa de algunas partículas que aumentan la señal durante la hibridación.

Los datos clínicos obtenidos no son suficientes para determinar si es la causa de la aparición de estas anomalías está relacionado con los padres, ya que la edad paterna no se presenta y en cuanto a la materna, la paciente tenía solo 24 años, es decir se encontró fuera rango de edad problema de acuerdo a García y col., 2002.

Figura 16. Resultado del análisis de CGH del caso 6



CASO 7

44, X, ish cgh, dim (21)

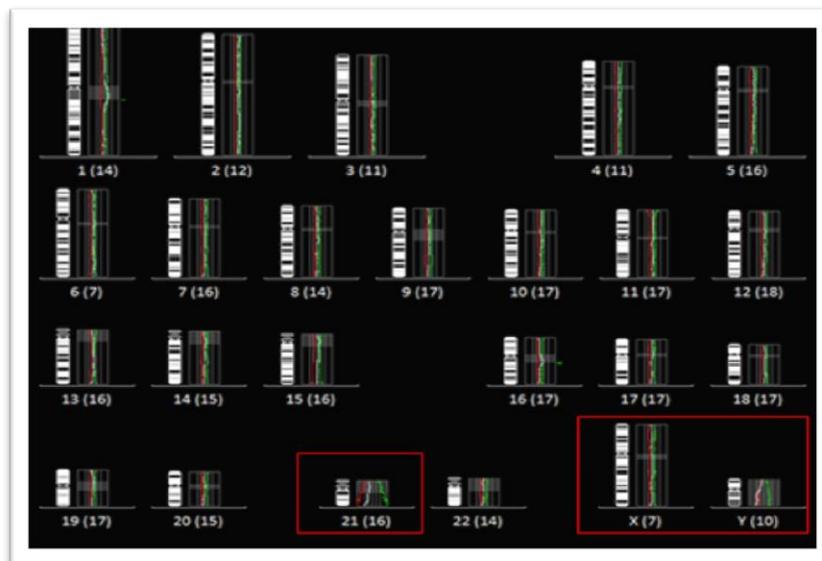
Se presentó una doble monosomía en este caso vinculando a los cromosomas X y 21 (Fig. 17.). La monosomía o pérdida del cromosoma 21 puede ocurrir por una no-disyunción. De acuerdo a Arbogast y col. (2015). La monosomía es una anomalía cromosómica rara que se caracteriza por la pérdida de un segmento variable a lo largo del cromosoma. Los fenotipos clínicos de estas pérdidas son heterogéneas y van desde alteraciones leves a consecuencias letales. Las características más comunes incluyen discapacidad intelectual, dismorfología craneo facial, baja estatura, y defectos musculares y cardíacos.

Sin embargo, de acuerdo a Wang y col. (2014) la monosomía 21 es una alteración letal. La hipótesis de esta alta letalidad es por la insuficiencia de genes esenciales en el desarrollo temprano del feto.

La edad de ambos padres era de 18 y 21 años (padres jóvenes). Aunque se ha encontrado que la edad de ambos padres después de los 35 años aumenta el riesgo que producir anomalías congénitas, existe una hipótesis de acuerdo a Hijona, (2009) donde se estima que las gráficas poblaciones tienen en muchas ocasiones una forma de “U”, observándose un incremento de riesgo a los extremos, es decir en las gestaciones de madres muy jóvenes y en las de madre con una edad avanzada. Además no está muy claro que el riesgo aumenta de forma gradual o si existen puntos de inflexión y es que esto cada vez está más estudiado, según la OMS en las Estadísticas Sanitarias Mundiales 2014 de México, la tasa media de natalidad mundial entre las adolescentes de 15 a 19 años es de 49 por 1000, lo cual aumenta a probabilidad que estas madres jóvenes presenten estas patologías.

En el caso de los padres jóvenes, de acuerdo a Hinoja; (2009) se desconoce porque, pero tienen mayor riesgo de dar lugar a una descendencia con malformaciones congénitas. Los riesgos que se han descrito más consistentemente son: defectos del tubo neural, malformaciones cardíacas y gastroscisis

Figura 17. Resultado del análisis de CGH del caso 7

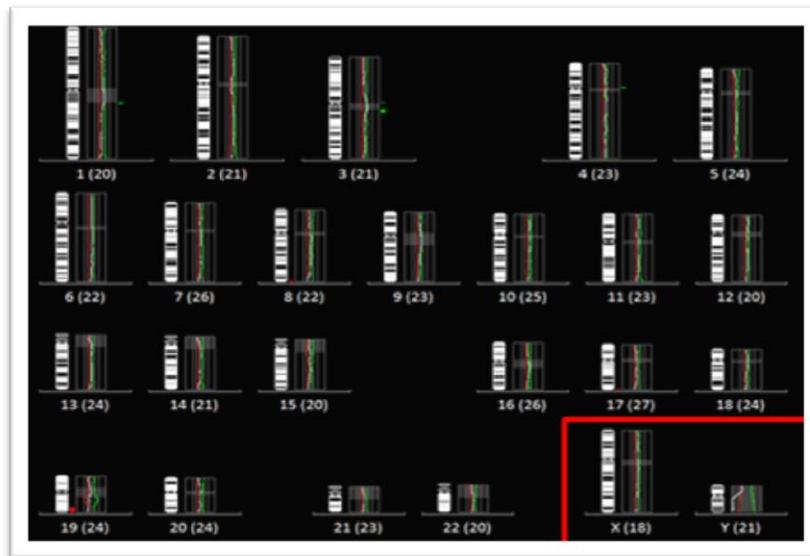


CASO 8

(45, X, ish cgh)

Se determino un ideograma con la perdida del cromosoma X (Fig. 18), es decir, una monosomia, semejante a los casos 1,2 y 7,da como resultado el Sindrome de Turner. Como ya se menciona esta alteración da lugar a la perdida fetal de acuerdo a Tiro y Guerrero (2013).

Figura 18. Resultado del análisis de CGH del caso 8



CASO 9 y CASO 10

En el caso de las muestras 9 y 10 no se obtuvo el resultado necesario para determinar si las anomalías cromosómicas son el factor etiológico del aborto, a pesar de que se obtuvo una cantidad de ADN necesario como se muestra en el Cuadro No.7 y se realizó la metodología de CGH establecida, la ineficiencia de metafases fue un obstáculo para alcanzar el objetivo deseado. Este problema es atribuido a un goteo erróneo de las metafases sobre la laminilla de hibridación. Por lo tanto no se le atribuye a la técnica directamente, sin embargo Álvarez, (2007), menciona que se ha presentado algunas limitantes en este tipo de estudios por la

obtención de una señal de hibridación pobre y poco homogénea, de lo cual este no es el caso.

CASO 11

46, XX, ish cgh, add (2) (q24.1→q34), add (4) (q21.1→q34), add (6) (q13→q23.2), add (9) (p21.2→p22.3), add (12) (q15→q23), dim (22) (q11.2→q13)

El resultado final muestra un feto con género femenino y múltiples alteraciones cromosómicas (Fig. 19). Las anomalías más resaltantes son la adición de material genético el cromosoma 2q24.1→34, no se ha encontrado específicamente alguna anomalías esas bandas en bibliografía, sin embargo, de acuerdo a Romain y col. (1994) este tipo de duplicaciones son muy raros, sin embargo ellos describen una duplicación 2q33.1→q35 en un paciente de *novo* al cual le atribuyen a que los padres pueden ser portadores para esta alteración y las características físicas que determinaron son, epicanto ancho y plano, nariz deprimida, labio superior delgado, cuello corto, clinodactilia y grave discapacidad intelectual y física.

Otra de las ganancias es en el cromosoma 4q 21.1→34, se muestra casi la ganancia de todo el brazo q del cromosoma de acuerdo a Chen (2007). Se ha reportado el caso de una niña de 7 años de edad, con una duplicación de 4q, la cual presenta retraso mental, dismorfía facial, una pequeña hernia umbilical y la espina bífida oculta de la vértebra torácica 10 a 11.

Por otra parte se ha reportado que las supresiones parciales y duplicaciones del cromosoma 6 pueden estar asociadas con la espina bífida, y encefalocele, esto puede ser el caso en la ganancia del cromosoma 6q13→23.2 que en este caso se reportó (Chen, 2007).

Para el cromosoma 9 también se puede observar una adición de intensidad de señal que va de p21.2→22.3. Se ha encontrado que la trisomía parcial 9p se asocia a el retraso mental, pero los genes que van de p21.→pter son directamente implicados también en anomalías faciales, de acuerdo a Feng y col. (2011).

En cuanto a la adición de señal en el cromosoma 12q15→23, se ha descrito que el aumento de material genético en sitios intersticiales de este cromosoma son

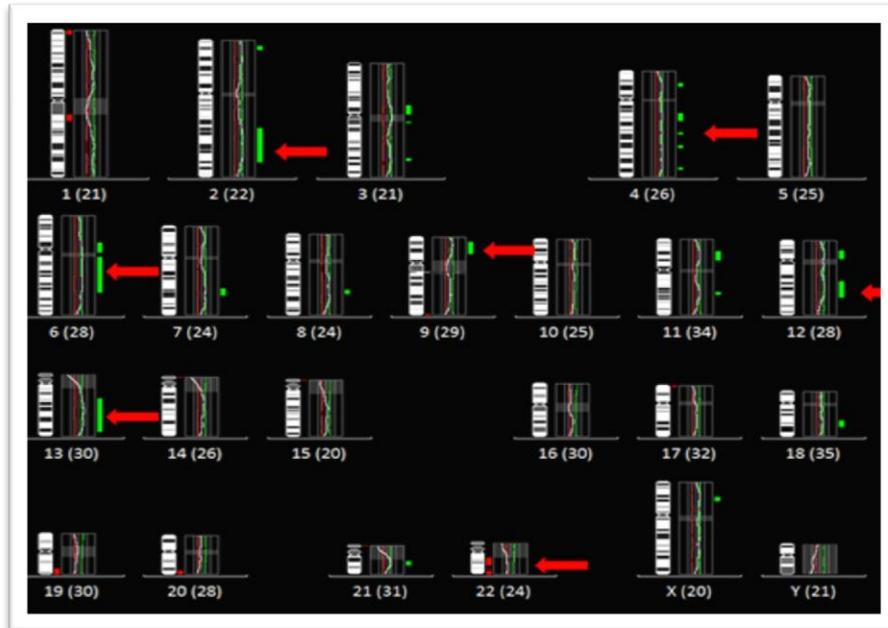
demasiado raros de encontrar, sin embargo, de manera general se ha reportado que la trisomía 12q presenta las siguientes características clínicas: retraso psicomotor, orejas de implantación baja, cuello corto y criptorquidia. Estos rasgos característicos son observables en los recién nacidos o en jóvenes, pero se hacen gradualmente menos notables en la edad adulta y solo se notan algunas anomalías esqueléticas de las extremidades. Se ha encontrado que las duplicaciones en la región 12q21-12q24 son las más detectadas. Debido a la rareza de 12q duplicaciones, se ha sugerido que la alteración significativa del brazo largo sería letal, especialmente en las regiones 12q13 y 12q21.2. Por otro lado, es probable que la duplicación de 12q13→q21 es viable sólo en forma de mosaico y que los efectos de la dosis génica en esta región causen letalidad embrionaria, todo lo anterior de acuerdo a Vermeesch y col. (2002).

Se determinó una deleción en el cromosoma 22q13→11.2. Hasta el momento se ha reportado que una microdeleción 22q11.2 que da como resultado defectos del tubo neural y asociados con la espina, denominado como desorden de Kousseff, (Chen, 2007) en el cual se muestran fenotipos faciales leves, incidencia de anomalías cardíacas, y la discapacidad intelectual de acuerdo a Leoni y col. (2014).

Este caso presenta un gran número de anormalidades con aumento de señal, por ello atribuir a una en específico es muy difícil sin embargo, de acuerdo a la literatura encontrada, presenta múltiples malformaciones que están asociadas a desregulación de la dosis génica y por lo tanto no es compatible con la vida como la adición de señal que se presenta en el brazo q del cromosoma 12, que resulta ser letal por ello son muy raros.

Atribuir que la aparición de todas las anomalías anteriores es a causa paterna es imposible ya que el dato no fue proporcionado sin embargo la madre cuenta con la edad de 18 años y de acuerdo a Hinoja, (2009) menciona que las mujeres muy jóvenes o mayores a 35 años son propensas a sufrir estas patologías.

Figura 19. Resultado del análisis de CGH del caso 11



11.7 Distribución de alteraciones cromosómicas.

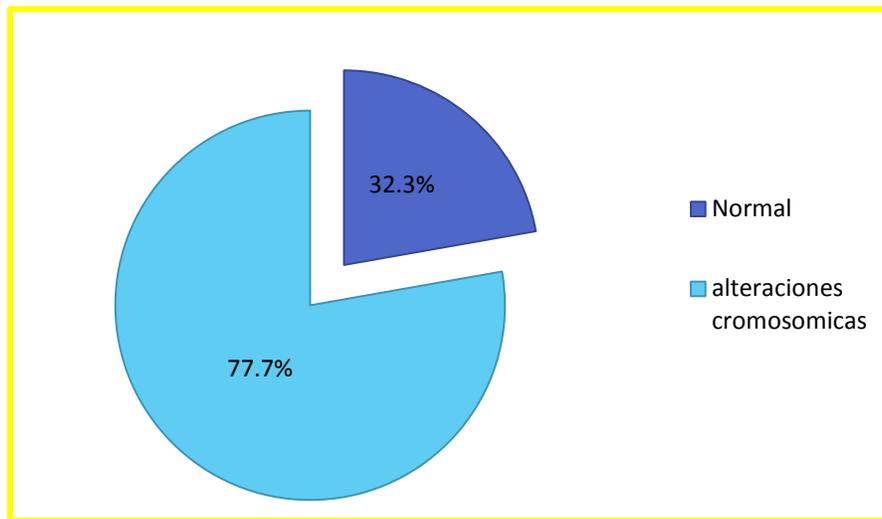
De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, se encontró que 7/9 es decir, un 77.7% de los abortos estudiados mediante la técnica de CGH presentaron alteraciones cromosómicas mientras 2/9 que es un 32.3% resultaron con un cariotipo normal (Fig. 20.), descartando dos muestras (9 y 10) debido a que no se pudo obtener un resultado por falta de material para analizar (metafases).

Lo anterior es confirmado con lo ya establecido en la actualidad, de acuerdo a Álvarez, (2007) el aborto involuntario es considerado como uno de los problemas más frecuentes que podrían ocurrir durante el embarazo hasta la vigésima semana de gestación, se informa que el porcentaje de presentar esta pérdida fetal va más allá del 15 % de los embarazos clínicamente conocidos.

Uno de los factores que provoca esta patología son las alteraciones cromosómicas que se presentan en más de un 50% de los casos, según Castro y col., (2010) y Castillo y col., (2014), lo cual sucedió en esta investigación. Debido a que el cariotipo convencional de bandas G utilizado como un método de oro para detectar anomalías cromosómicas y que presenta un porcentaje de fallo en el

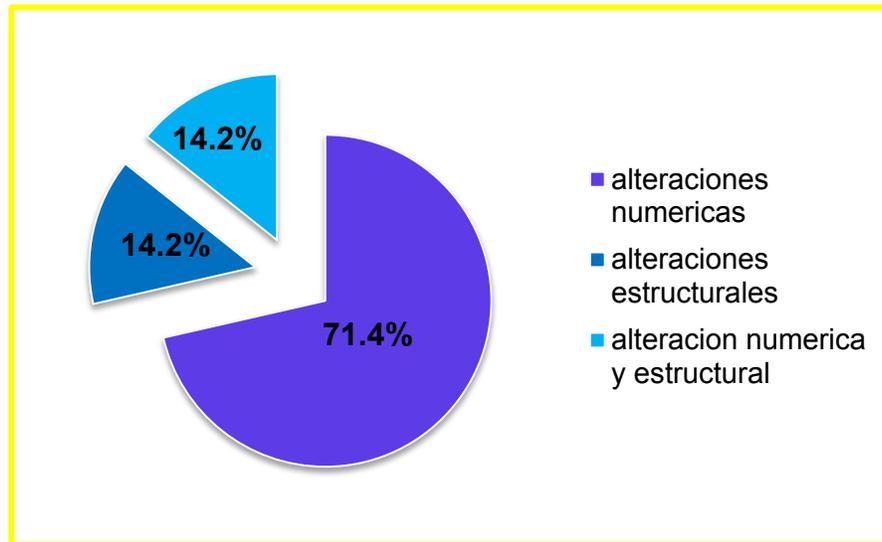
cultivo de acuerdo a Shen y col., 2016; que va hasta un ~ 20%, por ello la técnica de CGH con el manejo del ADN es utilizada para diagnosticar las anomalías desequilibradas, convirtiéndose en un apoyo de la citogenética, como lo es este caso.

Figura 20. Porcentaje de muestras con alteraciones y sin alteraciones cromosómicas.



De acuerdo a los resultados anteriores se encontró que de ese 77% que son 7 de los casos que presento alteraciones cromosómicas, un 71.4% son alteraciones cromosómicas del tipo numérico, por el contrario un 14.2% son del tipo estructural y solo en un caso que es el 14.2% se encontraron ambas (Fig. 21), lo anterior es semejante a lo ya reportado por García y col. (2002) quienes realizaron un estudio citogenético en muestras de abortos espontáneos resultado un 69.5% de ellos alteraciones cromosómicas del tipo estructural y el restante 30.5% al tipo estructural, por otro lado Doria y col. (2009) lo corroboran también pero con la técnica de CGH que aquí se implementó, donde de un total de 85 muestras encontraron que un 95.3% de los casos que presentaron anomalías cromosómicas pertenecen al tipo numérico y únicamente un 4.7% al tipo estructural.

Figura 21. Porcentaje de alteraciones numéricas, estructurales y ambas.



En cuanto a las alteraciones que se presentaron, Cuadro No. 11, se encontró que la monosomías se encuentran mayormente presentes en los casos examinados dejando así que la monosomía del cromosoma X tuvo una mayor incidencia con un 28.4% de los casos, seguido por otro tipo de monosomías como lo fue en el cromosoma 14 y una doble monosomía del cromosoma X y 21. Comparando con los resultados obtenidos con Yacut y col. (2015). Se ha encontrado que el síndrome de Turner y la trisomía 16 son las anomalías más frecuentes en los casos de menores de 35 años de edad, lo cual coincide ya que un 75% de las monosomías X que se presentaron, pertenecen a los grupos de edad menores a los 35 años. Sin embargo la trisomía 16 no aparece en ninguno de los casos, únicamente la monosomía del cromosoma 14, lo cual es importante resaltar que no se encontró literatura que cite a este como un factor de aborto pero se ha descrito que ciertas microdeleciones como sucede en el 14q23.1 presenta algunos genes involucrados en la cardiogénesis del embrión, de acuerdo a Bao y col. (2012).

Únicamente se presentó una trisomía (14.2%) en el cromosoma 18 (caso 6) De acuerdo a Yacut y col. (2015) las trisomías que predominan en este tipo de patologías, se presentan en los cromosomas 8, 13,15,16,18 y 21, en este caso solo se determinó la Trisomía 18 que confiere el denominado Síndrome de Edwards, que para este caso resulto ser letal.

Se determinó que solo un 14.2% de los resultados arrojó alteraciones estructurales en conjunto a una numérica (Caso 2) donde se muestra monosomía X y una delección 16p13.1→12, la cual coincide con una de las deleciones presentadas por el control positivo, la cual de acuerdo a la literatura citada es causante de múltiples anomalías congénitas (Sung y col., 2012). Sugiriendo que la sensibilidad del CGH permite detectar aquellas anomalías numéricas o estructurales muy pequeñas de 3 o hasta un tamaño de 5 Mb. Otro 14.2% de la anomalías presentadas fue del tipo estructural que como se sabe este porcentaje está en un rango normal ya que las alteraciones estructurales que encuentran en un porcentaje bajo a diferencia de las anomalías numéricas, en este caso se muestra la duplicación de varias regiones de distintos cromosomas (Caso 11), dando a conocer un gran número que anomalías cromosómicas, lo anterior proporciona un diagnostico muy desfavorable ya que, de acuerdo a Luthardt y Keitges, (2001) la duplicación de un segmento de un cromosoma se produce por lo general por un intercambio desigual entre cromosomas homólogos o cromátidas hermanas En general, las duplicaciones son menos perjudiciales que las deleciones, sin embargo inevitablemente se asocian con algunas anomalías clínicas y la gravedad se correlaciona con el tamaño de los segmento duplicados, tal es el caso donde se muestra aumento y disminución de señal en grandes segmentos de los cromosomas, es decir, un gran número de bases.

Cuadro No. 11. Tipos de alteraciones cromosómicas estructurales y numéricas que se presentaron en las muestras recolectadas.

Resultado del CGH	Número de casos	Porcentaje
Alteraciones numéricas TOTALES	5	71.4%
Otras monosomías	1	14.2%
Doble monosomía	1	14.2%
Monosomía X	2	28.4%
Trisomía	1	14.2%
Euploidías	0	0%
Alteraciones estructurales TOTALES	1	14.2%
Ganancia	1	14.2%
Perdida	0	0%
Alteración numérica y estructural	1	14.2%
TOTAL	7 CASOS	100%

Cuadro No. 12. Cantidad de abortos espontáneos en pacientes que presentaron un producto con alteraciones cromosómicas.

No de abortos	Número de casos	% positivos
1	5	71.4
2	1	14.2
3	1	14.2

Por otra parte de acuerdo al cuadro No. 12 ,solo un 28.4% de las pacientes que presentaron un producto con alteraciones cromosómicas ha presentado más de un aborto consecutivo, a diferencia de un 71% que es la primera vez que se presenta. Lo anterior es sumamente importante ya que el riesgo que una mujer que ya ha presentado uno, dos, tres o más abortos espontáneos, tiene una alta posibilidad de tener otra pérdida en el siguiente embarazo. Con un antecedente de una pérdida gestacional el riesgo es del 19%, después de dos pérdidas 35% y después de 3 o más pérdidas 47%, esto de acuerdo a Valencia y col. (2007).También es

importante resaltar que aunque en la mayoría de los casos el origen de las anomalías cromosómicas es de *novo*, el estudio de los restos abortivos está recomendado incluso en el caso del primer aborto, como lo dice Álvarez, (2007) que en caso de que se produzca un segundo y habiéndose estudiado cromosómicamente ambos, se podrá precisar con mayor exactitud la probabilidad de que éste se repita ante un nuevo embarazo; para ofrecer un adecuado consejo genético a estas parejas acerca de futuros embarazos.

Se ha visto que la pérdida de un embarazo no esperado es una traumática experiencia para cualquier familia. Por lo tanto, ser capaz de dar explicaciones a los posibles factores etiológicos de aborto espontáneo es de gran ayuda, como en el caso de las alteraciones cromosómicas que son las más comunes. Sin embargo, la información es a menudo inaccesible debido a los fallos frecuentes en cultivo de tejidos para la obtención del cariotipo como lo menciona Hu y col. (2006), por ello como se pudo determinar en este estudio la técnica de CGH que emplea el ADN genómico evita ese tipo de fallas, convirtiéndose en una técnica complementaria al cariotipo y es que Trussler y col. (2004) ha reportado que el porcentaje de detección de anomalías cromosómicas es ligeramente superior, pero asegura la obtención del material genético para su análisis y así dar un resultado.

12. CONCLUSIONES

De acuerdo a lo objetivos planteados se pudo determinar:

- La técnica de CGH fue estandarizada, esto en el Hospital Juárez de México, por lo tanto, tiene la capacidad de orientar a todas aquellas parejas que presenten por lo menos un aborto espontaneo, para así determinar si la causa de ello es por alteraciones genéticas, permitiendo establecer su diagnóstico, planificar futuros embarazos y disminuir costos en exámenes adicionales, que solo serán necesarios en algunos casos.
- A través del software Isis (Metasystem) se puede identificar las alteraciones cromosómicas desbalanceadas para así llevar a cabo un análisis certero. Siempre y cuando el material cromosómico sea el suficiente (metafases) y se tenga la capacidad de analizar el cariotipo.
- Se identificaron una serie de anomalías congénitas en su mayoría numéricas, de las cuales destacan las monosomías en el cromosoma X, 16 y 21. Seguido de la trisomía 18 y en el caso de las anomalías estructurales, se identificó regiones de disminución y adición de intensidad de señal específica que dan lugar a la pérdida fetal.
- Determinar el posible origen de las anomalías numéricas o estructurales presentadas no es posible, ya que asegurar que alguno de los padres es portador de este tipo de problemas es arriesgado, debido a la falta de información de su historial clínico o la correlación del resultado del feto con los padres por medio de una técnica ya sea molecular o citogenética.

13. PERSPECTIVAS.

1. Se implementará una técnica por medio de la biología molecular como lo es PCR para corroborar los resultados obtenidos en las 11 muestras de ADN de tejido de aborto espontáneo, lo cual permitirá determinar si la técnica está totalmente estandarizada y si es sensible para la detección de anomalías cromosómicas.
2. Se incrementará el número de muestras de tejido de aborto espontáneo para su estudio y así, obtener mayores resultados que puedan ayudar al estudio de esta patología.
3. Determinar el origen de las anomalías cromosómicas obteniendo la información necesaria en el historial clínico o implementando una técnica de detección de anomalías cromosómicas en los padres. Por otra parte, sería necesario investigar bibliográficamente el origen genético de cada una de las anomalías.

14. REFERENCIAS

1. Al-Asmar, N., V. Peinado, M. Vera, J. Remohí, A. Pellicer, C. Simón, T. Hassold and C. Rubio (2012). "Chromosomal abnormalities in embryos from couples with a previous aneuploid miscarriage". *Fertility and Sterility* **98**(1): 145-150.
2. Álvarez D. (2007). "Aplicación de nuevas técnicas moleculares al estudio de alteraciones cromosómicas en abortos espontáneos". Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología.
3. Arbogast T., Raveau M, Chevalier C., Nalesso V., Dembele D., Jacobs H., Wendling O., Roux M., Duchon A., Herault Y. (2015). "Deletion of the App-Runx1 region in mice models human partial monosomy 21." *Dis Model Mech.* (6):623-34
4. Arck, P. C., M. Rücke, M. Rose, J. Szekeres-Bartho, A. J. Douglas, M. Pritsch, S. M. Blois, M. K. Pincus, N. Bärenstrauch, J. W. Dudenhausen, K.

- Nakamura, S. Sheps and B. F. Klapp (2008). "Early risk factors for miscarriage: a prospective cohort study in pregnant women." *Reproductive BioMedicine Online*. **17**(1): 101-113.
5. Azmanov, D. N., T. V. Milachich, B. M. Zaharieva, G. I. Michailova, V. G. Dimitrova, Z. H. Karagiozova, V. T. Maznejkova, T. A. Chernev and D. I. Toncheva (2007). "Profile of chromosomal aberrations in different gestational age spontaneous abortions detected by comparative genomic hybridization." *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. **131**(2): 127-131.
6. Baghbani F., Mirzaee S., Hassanzadeh-Nazarabadi. (2014). "Association of heteromorphism of chromosome 9 and recurrent abortion (ultrasound diagnosed blighted ovum): A case report". *Iran J Reprod Med*. 12(5):357-60.
7. Bejjan B. A. y Shaffer L. G. (2006). "Application of Array-Based Comparative Genomic Hybridization to Clinical Diagnostics". *Journal of Molecular Diagnostics*, 8 (5): 528-533.
8. Bao Bi., Liang Zhang, Hua Hu, Shuxin Yin, and Zhiqing Liang. (2012). "Deletion of a single-copy DAAM1 gene in congenital heart defect: a case report". *BMC Med Genet*; 13: 63.
9. Brezina, P. R. and W. G. Kearns (2014). "The evolving role of genetics in reproductive medicine." *ObstetGynecolClin North Am*. **41**(1): 41-55.
10. Carvalho, B., S. Dória, C. Ramalho, O. Brandão, M. Sousa, A. Matias, A. Barros and F. Carvalho (2010). "Aneuploidies detection in miscarriages and fetal deaths using multiplex ligation-dependent probe amplification: An alternative for speeding up results?" *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*. **153**(2): 151-155.
11. Castillo T. S., Fuentes S. A, Paulos M. A., De la Rosa Rebaza E.(2014). "Estudio cromosómico en abortos espontáneos" *Rev chil obstet ginecol*; 79(1): 40-46.
12. Castro L. J., Llano R. I; Aguinaga R. M., Ibáñez S. J., Segundo J.J., Beltrán M. J., Moreno V. E., González E. A., Domínguez C. M. (2010). "Estandarización del procedimiento de toma de muestra y cultivo para estudio citogenético de tejido

de abortos del primer trimestre del embarazo". *Perinatología y Reproducción Humana*. 24 (1): 20-27.

13. Carp H, Toder V, Aviram A, Daniely M, Mashiach S and Barkai G (2001). Karyotype of the abortus in recurrent miscarriage. *Fertil Steril*. 75,678–682.

14. Chen Chih-Ping. (2007). "Chromosomal abnormalities associated with neural tube defects full aneuploidy". *Taiwan J Obstet Gynecol*. 46 (4). 325-335.

15. Chen C., Chen M., Su Y N., Hsu C.Y., Tsai F. J. , Chern S. R. , Wu P. C. , Lee C. C. , Wang W. (2010). "Chromosome 1p36 deletion syndrome: prenatal diagnosis, molecular cytogenetic characterization and fetal ultrasound findings". *Taiwan J Obstet Gynecol*; 49(4):473-80.

16. Čulić, V., B. Lozić, I. Kuzmić-Prusac, G. Mijaljica and J. Pavelić (2011). "Full trisomy 5 in a sample of spontaneous abortion and arias stella reaction." *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. **17**(10): CS11.

17. De la Rochebrochad E. y Thonneau P. (2002). "Paternal age and maternal age are risk factor to miscarriage; results of multicentre European study". *Human Reproduction*; 17(6). 1649-1656.

18. Dhillon, R. K., S. C. Hillman, R. K. Morris, D. McMullan, D. Williams, A. Coomarasamy and M. D. Kilby (2014). "Additional information from chromosomal microarray analysis (CMA) over conventional karyotyping when diagnosing chromosomal abnormalities in miscarriage: A systematic review and meta-analysis." *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynecology*. **121**(1): 11-20.

19. Doria S., Carvalho F., Ramalho C., Lima V., Francisco T., Machado A., Branda O., Sousa M., Matías, A., Barros A. (2009). An efficient protocol for the detection of chromosomal abnormalities in spontaneous miscarriages or fetal deaths". *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 147. 144-150.

20. Eventov-Friedman, Frumkin A., Bar-Oz Benjamin and Raas-Rothschild A. (2015). "Mosaic Trisomy 14 in a Newborn with Multiple Malformations: When Chromosomal Microarray is a Clue to Diagnosis".
21. Fernández Cantón, S. B., G. Gutiérrez Trujillo and R. Viguri Uribe (2012). "La mortalidad materna y el aborto en México." Boletín médico del Hospital Infantil de México. **69**: 77-80.
22. Feng A., Dai X., Wang X., Gao Y., Luo R., Li Y., Zhang N., Liu J. (2011). "Molecular genetic analysis of partial 9p trisomy in two Chinese families with mental retardation and facial anomaly". J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci; 31(4):570-7.
23. Fruhman G. y, Van den Veyve I. (2014). Applications of Array Comparative Genomic Hybridization in Obstetrics. IMAJ; 17 (7). 459-461.
24. Gao, J., C. Liu, F. Yao, N. Hao, J. Zhou, Q. Zhou, L. Zhang, X. Liu, X. Bian and J. Liu (2012). "Array-based comparative genomic hybridization is more informative than conventional karyotyping and fluorescence in situ hybridization in the analysis of first-trimester spontaneous abortion." Molecular cytogenetics. **5**(1): 1-7.
25. García Enguádanos, A., M. E. Calle, J. Valero, S. Luna and V. Domínguez-Rojas (2002). "Risk factors in miscarriage: a review." European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. **102**(2): 111-119.
26. Hijona Elósegui J. (2009). "Factores asociados al aborto espontáneo". Tesis doctoral. Universidad de Granada. Facultad de Medicina. Departamento de Farmacología.
27. Hu, Y., X. Chen, L. L. Chen, Z. F. Xu, X. Wang and H. Cui (2006). "Comparative genomic hybridization analysis of spontaneous abortion." Int J GynaecolObstet. **92**(1): 52-57.
28. Genética. Disponible en www.ucm.es. Recuperado el 05 de abril del 2016.
29. INEGI (2011). "Estadísticas a propósito del día internacional de la mujer." Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Aguascalientes, AGS.

30. International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. ISCN. (2013). An international system for human cytogenetic nomenclature. Editorial Basel.
31. Jedraszak G., Demeer B., Mathieu-Dramard M., Andrieux J., Receveur A., Weber A., Maye U., Foulds N., Temple IK., Crolla J., Cordier M. P., Sanlaville D., Ewans L., Wilson M., Armstrong R., Clarkson A., Copin H., Morin G. (2015). "Clinical and molecular characterization of the 20q11.2 microdeletion syndrome: six new patients". *Am J Med Genet A*. 167A (3):504-11.
- Jobanputra, V., Esteves, C., Sobrino, A., Brown, S., Kline, J. & Warburton, D. (2011). Using FISH to increase the yield and accuracy of karyotypes from spontaneous abortion specimens. *PrenatDiagn*, Vol.31, No.8, pp. 755-9,
32. Kandpal, U., M. Mishra, A. Fauzdar, M. Chowdhry, R. N. Makroo and A. Kaul (2010). "Rapid-Fluorescence-in-Situ-Hybridization (FISH) on Uncultured Amniocytes for Avoiding Birth Defects due to Common Chromosomal Aberrations." *Apollo Medicine*. 7(3): 163-168.
33. Kroon Ben. (2011). Miscarriage karyotype and its relationship with maternal body mass index, age, and mode of conception".
34. Lebedev, I. N., N. V. Ostroverkhova, T. V. Nikitina, N. N. Sukhanova and S. A. Nazarenko (2004). "Features of chromosomal abnormalities in spontaneous abortion cell culture failures detected by interphase FISH analysis." *Eur J Hum Genet*. 12(7): 513-520. *Fertility and Sterility*. 95 (5), 18827-18829.
35. Leoni C., Stevenson D., Geiersbach K. B., Paxton C. N., Krock B. L., Mao R., Rope A. F. (2014). "Neural tube defects and atypical deletion on 22q11.2." *Am J Med Genet A*. (11):2701-6.
36. Levy, B., Hirschhorn K. and Kardon N. (2009). "Chromosome abnormalities in spontaneous abortions. " *Cytogenetic in Reproductive Medicine* (D. Wells, ed.) pp: 59-66.
37. Lomax, B., S. Tang, E. Separovic D. Phillips, E. Hillard, T. Thomson and D. K. Kalousek (2000). "Comparative genomic hybridization in combination with flow

cytometry improves results of cytogenetic analysis of spontaneous abortions." American Journal of Human Genetics. **66**(5): 1516-1521.

38. Luthardt Frederick W y Keitges Elisabeth. (2001). "Chromosomal Syndromes and Genetic Disease". Encyclopedia of life sciences. Nature.

39. Mathur, N., L. Triplett and M. D. Stephenson (2014). "Miscarriage chromosome testing: Utility of comparative genomic hybridization with reflex microsatellite analysis in preserved miscarriage tissue." Fertility and Sterility. **101**(5): 1349-1352.

40. Mir S., Abdallah S., and Abdallah A. (2011). "Genetic markers for idiopathic scoliosis on chromosome 19p 13.3 among Saudi Arabian girls: A pilot study". Indian J Hum Genet. 17(1): 13–16.

41. Menten, B., K. Swerts, B. D. Chiaie, S. Janssens, K. Buysse, J. Philippé and F. Speleman (2009). "Array comparative genomic hybridization and flow cytometry analysis of spontaneous abortions and mors in utero samples." BMC Medical Genetics**10**: 89.

42. Menéndez V.F. (2003) El manejo del aborto espontáneo y de sus Jorge Federico complicaciones. Gac Méd Méx Vol.139, Suplemento No. 1. 47-53.

43. Moore, C. M. and R. G. Best (2001). Chromosomal Genetic Disease: Structural Aberrations. eLS, John Wiley & Sons, Ltd.

44. Munne S. (2006) Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. Reproductive BioMedicine Online Vol 12. No 2.234-253.

45. Nikitina, T. V. and I. N. Lebedev. (2014). "Cytogenetics of recurrent

46. pregnancy loss". Russian Journal of Genetics. 50(5): 435-446.

47. Oliva Rafael; et al 2004. Genética Médica. 3ra edición. Editorial Barcelona. España. pp 123-124.

48. Pacheco J. Michelena M., Orihuela P. (2009). Enfoque actual del aborto recurrente. An Fac med; 70(2):123-34.

49. Pathak, R., M. D. Mustafa, R. S. Ahmed, A. K. Tripathi, K. Guleria and B. D. Banerjee (2010). "Association between recurrent miscarriages and organochlorine pesticide levels. "Clinical Biochemistry. **43**(1–2): 131-135.
50. Porter, T. F. and J. R. Scott (2005). "Evidence-based care of recurrent miscarriage. "Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynecology. **19**(1 SPEC. ISS.): 85-101.
51. Rai R., Regan L. (2006). "Recurrent miscarriage" Lancet. 368: 601–11.
52. Ramos C. B. (2006). "Hibridación in situ". Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biotecnología. Programa de posgrado en Ciencias Bioquímicas.
53. Riegel M. (2014). "Human molecular cytogenetics: From cells to nucleotides". Genetics and Molecular Biology, 37, 1 (suppl), 194-209.
54. Romain D., Mackenzie G., Moss D., Columbano-Green L., Smythe, R., Parfitt R., Dixon J. (1994). "Partial trisomy for 2q in a patient with dir dup(2) (q33. lq35)". Journal Genetic Medicin; 31:652-653.
55. Royal College of Obstetricians and Gynecologists. The management of early pregnancy loss. Green-top guidelines No. 25. London: RCOG Press; 2000.
56. Saldarriaga G. y Wilmar (2013). "De la observación microscópica de los cromosomas en el cariotipo a los array-CGH en el diagnóstico prenatal". Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología. 64(3).327-332.
57. Shinawi, M. and S. W. Cheung (2008). "The array CGH and its clinical applications. "Drug Discovery Today. **13**(17–18): 760-770.
58. Slama R., Bouyer J., Windham G., Fenster L., Werwatz A., y Swan S. (2005). "Influence of Paternal Age on the Risk of Spontaneous Abortion". American Journal of Epidemiology. 161(9). 816–823.
59. Shen J., Wu W., Gao C., Ochin H., Qu D., Xie J., Gao L., Zhou Y., Cui Y., Liu J. (2016). "Chromosomal copy number analysis on chorionic villus samples from early spontaneous miscarriages by high throughput genetic technology". Molecular Cytogenetics 9:7.

60. Smeets Dominique F.C.M. (2004).” Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray”. *Clinical Biochemistry* 37. 439– 446
61. Subramaniyam S., Pulijaal V. R., and Mathew S. (2014). “Double and multiple chromosomal aneuploidies in spontaneous abortions: A single institutional experience”. *J Hum Reprod Sci.* 7(4): 262–268.
62. Sung P.Chang C. WangC., Chao K., Wen K., Cheng Y.,Li Y., LinC. (2012). “Prenatal diagnosis of microdeletion 16p13.11 combination with partial monosomy of 2q37.1-qter and partial trisomy of 7p15.3-pter in a fetus withbilateral ventriculomegaly, agenesis of corpus callosum, and polydactyly”. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*: 51. 260-265.
63. Solinas-Toldo, S., S. Lampel, S. Stilgenbauer, J. Nickolenko, A. Benner, H. Döhner, T. Cremer and P. Lichter (1997). "Matrix-based comparative genomic hybridization: Biochips to screen for genomic imbalances." *Genes, Chromosomes and Cancer.* **20**(4): 399-407.
64. Țarcă E., Plămădeală P., Savu B. (2014). “Plurimal formative syndrome associating trisomy 18 and omphalocele. Case report and review of the literature”. *Rom J Morphol Embryol*, 55(1):209–213.
65. Tiro H. D. y Guerrero B. R. (2013). “Síndrome de Turner cariotipo 46XY”. *Rev Mex Reprod*; 5:192-194.
66. Tönnies, H. (2002). "Modern molecular cytogenetic techniques in genetic diagnostics." *Trends in Molecular Medicine.* **8**(6): 246-250.
67. Trussler, J. L., S. J. Pickering and C. Mackie Ogilvie (2004). "Investigation of chromosomal imbalance in human embryos using comparative genomic hybridization". *Reproductive BioMedicine Online.* **8**(6): 701-711.
68. Valencia L., Morales Anastasia., Zagal G., Salomón J., Toledo E., Díaz M. (2007). “Análisis cromosómico en personas con fallas reproductivas”. *Salud en Tabasco.* (1). 573-576.
69. Van Der Ber, K., M. Montag and H. Van Der Ven (2008). "Polar body diagnosis - A step in the right direction?" *Deutsches Arzteblatt.* 105(11): 190-196.

70. Van den Berg M. I; Van Maarle M. C., Van Wely M., Goddijn M. (2012). "Genetics of early miscarriage". *Biochimica et Biophysica. Acta* 1822, 1951–1959.
71. Vargas F. D. y Rubio R. J. (2009) Capitulo 1. Aborto. *Obstetricia integral Siglo XXI*.
72. Vermeesch, J. R., H. Fiegler, N. de Leeuw, K. Szuhai, J. Schoumans, R. Ciccone, F. Speleman, A. Rauch, J. Clayton-Smith, C. Van Ravenswaaij, D. Sanlaville, P. C. Patsalis, H. Firth, K. Devriendt and O. Zuffardi (2007). "Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. "European Journal of Human Genetics. **15**(11): 1105-1114.
73. Vermeesch R. J., Syrrou M., Salden I., Dhondt F., Matthijs G., Fryns J-P. (2002). "Mosaicism for duplication 12q (12q13@12q21.2) accompanied by a pericentric inversion in a dysmorphic female infant". *Med Genet*; 39:72.
74. Vorsanova S, Yurov Y., Solovie I. Iourov Y. (2010) *Molecular Cytogenetic Diagnosis and Somatic Genome Variations. Current Genomics*, 11, 440-446.
75. Wang B., Chong T., Boyar F., Kopita K., Ross L., El-Naggar M., Sahoo T., Wang J., Hemmat M, Haddadin M., Owen R., Anguiano A. (2014). "Abnormalities in spontaneous abortions detected by G-banding and chromosomal microarray analysis (CMA) at a national reference laboratory." *Mol Cytogenet.* 22; 7:33.
76. WHO (2011). "Unsafe abortion: global and regional estimates of incidence of unsafe abortion and associated mortality in 2008".
77. Yakut S., Toru HS., Çetin Z., Özel D., Şimşek M., Mendilcioğlu İ., Lüleci G. (2015). "Chromosome abnormalities identified in 457 spontaneous abortions and their histopathological findings". *Turk Patoloji Derg*; 31(2):111-8.
78. Zegers-Hochschild, F., G. D. Adamson, J. de Mouzon, O. Ishihara, R. Mansour, K. Nygren, E. Sullivan and S. Vanderpoel (2009). "International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009*." *Fertility and sterility.* **92**(5): 1520-1524.
79. Zuffardi, O., A. Vetro, P. Brady and J. Vermeesch (2011). "Array technology in prenatal diagnosis. "Seminars in Fetal and Neonatal Medicine. **16**(2): 94-98.

ANEXO 1

Consentimiento informado para llevar a cabo el protocolo de investigación.



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN:

Detección de alteraciones cromosómicas por hibridación genómica comparativa (CGH) en abortos y recién nacidos malformados de etiología desconocida.

1. Información sobre el estudio.

El aborto es el término de la gestación antes de la vigésima semana, o si la edad de gestación no se conoce, el embrión o feto con un peso menor de 400 gramos, existen diferentes factores que ocasionan el aborto en los que encontramos la edad de los padres y las alteraciones cromosómicas. Este estudio aportará información si existe algún problema cromosómico presentes en embrión abortado, para una prevención de futuros embarazos en las parejas con este problema.

De acuerdo a esto se me ha invitado a participar en un estudio de investigación, éste involucra a parejas que presentan un aborto sin una causa conocida y donar una muestra de sangre periférica o tejido del embrión obtenida durante mi estancia en el hospital este conducto se solicita mí consentimiento para realizar el análisis genómico en el número de copias y los estudios que de ello deriven.

Procedimiento.

Se tomaran de 10 a 20 mg de tejido del embrión siempre y cuando cumplan con las características necesarias para participar en el estudio.

a. Riesgos:

No presenta riesgos debido a que la toma de muestra se realizara únicamente al embrión abortado.

b. Beneficios:

Los resultados de este estudio ayudarán al diagnóstico, ya que aportar información útil para futuros embarazó en las parejas con este problema.

2. Confidencialidad.

La información que se obtenga de este estudio, incluyendo registros clínicos, será tratada como privilegiada y confidencial y no será divulgada o revelada a ninguna persona sin mí consentimiento por escrito.

3. Participación / suspensión.

Mí participación en este estudio es voluntaria. Estoy en libertad de decidir no participar en el mismo al no autorizar el análisis molecular de la muestra de sangre o tejido obtenido del embrión abortado. El rehusarme a participar en este proyecto de investigación no afectará mí atención médica.

4. Contacto

En caso de requerir más información o duda respecto a su participación y derechos, se puede contactar con la M en C. Mónica Sierra Martínez al tel: 57477634

5. Consentimiento.

La M en C. Mónica Sierra, investigador responsable del proyecto y la cual reconoce el compromiso que implica solicitar y aplicar la carta de consentimiento informado, se ha encargado de explicarme los pormenores del mismo. He tenido la oportunidad de hacer preguntas. Si tengo alguna duda deberé comunicarme con ella al teléfono 57477560 ext 7330 o acudir personalmente a la Unidad de Investigación, laboratorio 3 de Genética y Diagnóstico molecular del Hospital Juárez de México.

Al firmar este documento, yo accedo voluntariamente a participar en este estudio.

Lugar: _____

Fecha: _____

Nombre del paciente: _____

Firma del paciente: _____

Nombre del testigo: _____

Firma del testigo: _____