



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

“ANÁLISIS CITOGENÉTICO DE MOSAICISMO DEL  
CROMOSOMA X EN FALLA OVÁRICA PREMATURA”

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

L I C E N C I A D A E N B I O Q U Í M I C A  
D I A G N Ó S T I C A

PRESENTA

MONTSERRAT AGLAÉ LUNA FLORES

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Patricia Grether González.

ASESORA INTERNA: Q.F.B Rosalba Bonilla Sánchez.

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis**

**Análisis citogenético de mosaicismo del cromosoma X en falla ovárica prematura.**

Que presenta la pasante: **Montserrat Aglaé Luna Flores**  
Con número de cuenta: **411008912** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.


**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de Octubre de 2015.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	<u>Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez</u>	
<b>VOCAL</b>	<u>I.A. Miriam Alvarez Velasco</u>	
<b>SECRETARIO</b>	<u>M.C. Maritere Domínguez Rojas</u>	
<b>1er. SUPLENTE</b>	<u>QFB. Alejandro Gutiérrez García</u>	
<b>2do. SUPLENTE</b>	<u>QFB. Ma. Llasbeth Hernández Calderón</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/mgr\*



Este trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes.

“En la vida no hay cosas que temer sólo hay cosas que comprender”.

Marie Curie.

“El hombre vale por lo que sirve, no por lo que sabe y menos por lo que tiene”.

Dr. Manuel Velasco Suárez.

## AGRADECIMIENTOS

---

A mi asesora, la Dra. Patricia Grether González por permitirme participar en este proyecto y acceder a dirigir y haber dedicado su interés, paciencia y tiempo en la revisión de esta tesis. Gracias por su apoyo, es usted un gran ejemplo no solo en el ámbito profesional sino también como persona.

A la Bióloga María de Jesús Zavaleta Abreu por aceptarme como su alumna en el Servicio de Genética y Genómica Humana, por confiar en mí y en mis capacidades e instarme a seguir preparándome. Le agradezco el tiempo que dedicó en desarrollar mis habilidades en citogenética, su paciencia y los conocimientos que me transmitió. Es usted una gran maestra.

A la Dra. Rosalba Sevilla Montoya que también fue mi asesora, gracias por crear este hermoso proyecto y admitir mi estancia en esta su investigación. Le agradezco su empeño por procurar las mejores condiciones de trabajo en el laboratorio; por su atención, dirección, consejos y por atender mis dudas en la elaboración de esta tesis.

A los miembros del equipo del laboratorio de Genética y Genómica Humana del INPer: Manuela Segundo, Guadalupe Razo, Guadalupe Martínez, Juan Carlos Ibáñez, Mónica Quintana, Javier Castro, Clarita y Anita Fernández por darme la bienvenida al departamento, por su trato amable, por su amistad y la enseñanza que me brindaron.

A mi asesora interna, la Q.F.B Rosalba Bonilla Sánchez porque su labor como docente en la FESC me abrió las puertas para conocer la citogenética, porque con cada clase logró que aumentara mi interés y amor por esta área de la genética.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por ser la institución que me formó en esta hermosa y noble carrera. Agradezco a todos mis profesores que se esfuerzan por brindar educación de calidad.

*“Por mi raza hablará el espíritu”*

## DEDICATORIAS

---

Dedico el presente trabajo de manera muy especial a mis padres: Juan Luna Cruz y Ma. Del Socorro Flores Guerrero, porque todo lo que soy y seré es reflejo de su trabajo, su esfuerzo, los valores que me inculcaron y sobre todo del amor que me han dado. Mamá, tu confianza en mis capacidades ha sido el mayor aliciente para continuar día a día, gracias por acompañarme en esta vida y por darme, como un día dijiste, alas para volar. Papá, gracias por enseñarme que la educación es el único camino para mejorar individual y colectivamente. Es un orgullo para mí el llamarme su hija y saber que en cada decisión que he tomado han estado ustedes para apoyarme, el realizar esta tesis es una de esas decisiones y comparto con ustedes este trabajo, los amo.

A mi familia: mis abuelitos Emilia Lara y Ambrosio Rueda, Anabel Flores, Emmanuel Flores y mi hermano Erick Luna. Agradezco que la vida me haya brindado una familia tan hermosa con quienes siempre he encontrado amor y sentido en momentos difíciles, su apoyo y su confianza han sido un impulso para mí. Me siento muy orgullosa de cada uno de ustedes y a lo largo de mi vida han representado un ejemplo a seguir, los admiro y los amo infinitamente. Este trabajo es para ustedes.

A Berenice Abigail Velasco Herrera: Abi, este trabajo es producto del esfuerzo de las dos, juntas aprendimos y adquirimos la responsabilidad de esta investigación, tuvimos errores y éxitos pero estas experiencias ayudaron a formar y consolidar a dos profesionales y a una hermosa amistad. Amiga eres una mujer extraordinaria, agradezco tu compañía, tu cariño, tus enseñanzas y la alegría que irradias; te quiero mucho y eres muy importante en mi vida. Este trabajo es tan tuyo como mío.

A Manuela Segundo por enseñarme que el sentido de mi profesión radica en el servicio, por hacerme sensible a la realidad y a las necesidades de los pacientes que requieren del servicio de salud. Te agradezco por tu amistad y tu amor, por escucharme, orientarme y permitirme ser miembro de una familia.

A Niza, mi persona, y Ana, mis mejores amigas y familia, son unas increíbles mujeres a quienes agradezco su amistad, su amor, su apoyo incondicional. Cada momento que pasamos juntas es invaluable para mí, desde el primer día supe que seríamos un gran equipo. Confío en que el Universo sabía que su amistad me haría un gran bien y por eso las puso en mi camino. Las amo y las admiro.

A Erick Fragoso, una persona muy importante y especial, poco convencional, que ha creído en mí cuando yo dudaba, que me ha apoyado a cualquier hora, desde cualquier lugar y a veces sin que los sospeche. Te agradezco por todo tu amor, por hacerme parte de tu vida, por esas apariciones en la Facultad que aligeraban mis preocupaciones y me alegraban, me exhortaban a seguir. Gracias por estar siempre cerca, yo estaré para ti siempre.

A Betty Sánchez, hermanasa, tu dedicación es un gran ejemplo para mí, te admiro.

A Josué Jiménez Zaragoza, por nuestra amistad de tantos años que no olvida los buenos momentos y que la distancia no separa.

A Jesús Álvarez, porque contigo encontré a un amigo muy valioso que me ha dado su apoyo en momentos difíciles, que me ha enseñado que los cambios son necesarios para madurar y para ser mejor persona. Amigo, gracias por impulsarme a trabajar en esta tesis.

A Iván Alejandro Medina, Juan David Falcón y Diego Muciño, mis grandes amigos, me siento afortunada de conocer a personas tan increíbles con quienes he compartido muchos momentos felices y cuya compañía me ha hecho fuerte en condiciones difíciles. Espero que sepan lo importantes que son para mí, cuanto los amo y que me siento orgullosa de ser testigo de sus logros.

A Alma León Olivera y Lilia García, mis amigas y hermanas, este trabajo lo dedico a nuestra amistad que ha perdurado y espero que siga.

A Rafael Cerón por tu cariño y apoyo, porque siempre me has alegrado la vida, por confiar en mí y motivarme para realizar este trabajo.

A Ernesto Zepeda, por tu apoyo, amor y confianza, por ayudarme a dibujar mundos felices.

# ÍNDICE GENERAL

---

	Página
ÍNDICE GENERAL .....	1
ÍNDICE DE IMÁGENES .....	3
ÍNDICE DE TABLAS .....	5
ÍNDICE DE GRÁFICAS .....	6
ABREVIATURAS .....	6
RESUMEN .....	7
I. INTRODUCCIÓN .....	<b>8</b>
II. MARCO TEÓRICO .....	<b>9</b>
1. Falla Ovárica Prematura. ....	9
1.1 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario .....	10
1.2 Características Clínicas .....	14
1.3 Epidemiología .....	16
1.4 Factores Etiológicos .....	16
1.5 Causas de FOP .....	19
a) Causas Genéticas .....	19
b) Alteraciones enzimáticas .....	24
c) Enfermedades Autoinmunes .....	25
d) Causas Infecciosas .....	26
e) Causas Iatrogénicas .....	26
1.6 Diagnóstico y Tratamiento .....	26
2. Desarrollo Embrionario Humano .....	28
2.1 Origen embrionario del Sistema Urinario .....	30
2.2 Origen embrionario del Ovario .....	32
3. Cariotipo Humano .....	33
4. Hibridación in situ con Fluorescencia (FISH) .....	36
4.1 Fundamento de la técnica .....	37
4.2 Tipos de sondas .....	43
4.3 Criterios de diagnóstico de mosaicismo de baja proporción con FISH .....	45
5. Alteraciones cromosómicas .....	46
5.1 Alteraciones numéricas .....	46



5.2 Mosaicismo .....	48
III. JUSTIFICACIÓN .....	51
IV. HIPÓTESIS .....	52
V. OBJETIVOS .....	52
VI. MATERIALES Y MÉTODOS .....	53
6.1 Definición del estudio .....	53
6.2 Variables a estudiar .....	53
6.3 Obtención y Siembra de Linfocitos de sangre periférica para Cariotipo .....	53
6.3.1 Cosecha .....	54
6.3.2 Bando GTG .....	55
6.3.3 Análisis citogenético .....	55
6.4 Obtención de Células Sanguíneas y Células de descamación del Epitelio Urinario para FISH .....	56
6.4.1 Cosecha directa .....	56
6.4.2 Pretratamiento .....	58
6.4.3 Hibridación .....	59
6.4.4 Lavados .....	59
6.4.5 Análisis de FISH .....	59
6.5 Análisis Estadístico .....	60
VII. RESULTADOS .....	61
VIII. DISCUSIÓN .....	79
IX. CONCLUSIONES .....	83
X. REFERENCIAS .....	84

## ÍNDICE DE IMÁGENES

---

<b>Imagen 1.</b> Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario .....	10
<b>Imagen 2.</b> Desarrollo folicular temprano .....	11
<b>Imagen 3.</b> Modelo de las dos células para la esteroidogénesis .....	12
<b>Imagen 4.</b> Cambios hormonales durante el ciclo menstrual .....	14
<b>Imagen 5.</b> Número de Folículos primordiales durante la vida pre y postnatal .....	17
<b>Imagen 6.</b> Reserva ovárica normal y disminuida con cambios en las concentraciones hormonales .....	18
<b>Imagen 7.</b> Mecanismos involucrados en la Falla Ovárica Prematura. ....	18
<b>Imagen 8.</b> Diagrama esquemático del cromosoma X que muestra el comportamiento de la función ovárica en función de la presencia de deleciones terminales sin mosaicismo. ....	21
<b>Imagen 9.</b> Variación en el número de repetidos del gen <i>FMR1</i> .....	22
<b>Imagen 10.</b> Enfermedades autoinmunes asociadas a la Falla Ovárica Prematura .....	25
<b>Imagen 11.</b> Riesgo estimado de disfunción gonadal con fármacos citotóxicos .....	26
<b>Imagen 12.</b> Pruebas de laboratorio que apoyan al diagnóstico de FOP .....	27
<b>Imagen 13.</b> Representación de la fertilización, desarrollo del cigoto e implantación en el endometrio. ....	29
<b>Imagen 14.</b> Desarrollo de la notocorda y diferenciación del Endodermo, Ectodermo y Mesodermo. Delaminación del mesodermo .....	30
<b>Imagen 15.</b> Desarrollo de las formas tempranas del riñón. Vista lateral .....	31
<b>Imagen 16.</b> Desarrollo de la vejiga. Vista dorsal .....	32
<b>Imagen 17.</b> Disminución del número de células germinales y atresia folicular .....	33
<b>Imagen 18.</b> Clasificación de los cromosomas de acuerdo a la posición del centrómero... ..	34
<b>Imagen 19.</b> Cariotipo masculino con bandas GTG (46, XY) .....	35
<b>Imagen 20.</b> Principio de la técnica de FISH. ....	40
<b>Imagen 21.</b> Representación esquemática de los criterios de evaluación de FISH .....	43
<b>Imagen 22.</b> Las diferentes clases de sondas en FISH. ....	45
<b>Imagen 23.</b> Representación esquemática del rezago anafásico en meiosis I .....	47
<b>Imagen 24.</b> Representación esquemática de las consecuencias de la no disyunción en meiosis I y meiosis II .....	48

<b>Imagen 25.</b> Desarrollo humano a partir del cigoto. El mosaicismo da lugar a poblaciones celulares con diferente genotipo confinadas a un tejido específico .....	49
<b>Imagen 26.</b> Representación gráfica de los mecanismos por los cuales se produce mosaicismo cromosómico .....	50
<b>Imagen 27.</b> Cariotipo Control FOP 010 con bandas GTG, 46, XX .....	64
<b>Imagen 28.</b> Cariotipo paciente FOP 013 con bandas GTG (46, XX) .....	64
<b>Imagen 29.</b> Cariotipo Control FOP 014 con bandas GTG, 46, XX .....	65
<b>Imagen 30.</b> Cariotipo paciente FOP 015 con bandas GTG (46, XX) .....	65
<b>Imagen 31.</b> Imágenes de FISH en núcleos interfásicos de leucocitos de sangre periférica .....	66
<b>Imagen 32.</b> Imágenes de FISH en núcleos interfásicos de células de descamación del epitelio urinario .....	67
<b>Imagen 33.</b> Imágenes de FISH en núcleos interfásicos de células de descamación del epitelio urinario .....	68

## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1.</b> Hallazgos clínicos en mujeres con Falla Ovárica Prematura .....	15
<b>Tabla 2.</b> Datos Clínicos de las Pacientes con Falla Ovárica Prematura. ....	61
<b>Tabla 3.</b> Datos Clínicos Grupo Control.....	62
<b>Tabla 4.</b> Resultado del estudio de cariotipo en Linfocitos de Sangre Periférica de las pacientes con FOP y del grupo Control.....	63
<b>Tabla 5.</b> Resultados de FISH en núcleos interfásicos de Leucocitos de Sangre Periférica en Pacientes con Falla Ovárica Prematura .....	69
<b>Tabla 6.</b> Resultados de FISH en núcleos interfásicos de Leucocitos de Sangre Periférica en el grupo Control.....	69
<b>Tabla 7.</b> Resultados de FISH en núcleos interfásicos de Células de descamación del epitelio urinario en Pacientes con Falla Ovárica Prematura.....	70
<b>Tabla 8.</b> Resultados de FISH en núcleos interfásicos de Células de descamación del epitelio urinario en el grupo Control. ....	70
<b>Tabla 9.</b> Porcentaje de Células 45, X/ 46, XX/ 47, XXX en Leucocitos de Sangre Periférica en Pacientes con FOP y el Grupo Control. ....	71
<b>Tabla 10.</b> Porcentaje de Células 45, X/ 46, XX/ 47, XXX en Células de descamación del epitelio urinario en Pacientes con FOP y el Grupo Control. ....	72
<b>Tabla 11.</b> Porcentaje de células con monosomía y trisomía del cromosoma X de Pacientes y Grupo Control en Sangre Periférica ordenadas de acuerdo a la edad.....	72
<b>Tabla 12.</b> Porcentaje de células con monosomía y trisomía del cromosoma X de Pacientes y Grupo Control en Células de descamación del epitelio urinario ordenadas de acuerdo a la edad.....	73

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

---

<b>Gráfica 1.</b> Porcentaje de células con aneuploidía del Cromosoma X en función de la edad en Leucocitos de Sangre Periférica de Pacientes con FOP. ....	74
<b>Gráfica 2.</b> Porcentaje de células con aneuploidía del Cromosoma X en función de la edad en Leucocitos de Sangre Periférica del Grupo Control. ....	74
<b>Gráfica 3.</b> Porcentaje de células con aneuploidía del Cromosoma X en función de la edad en Células de descamación del epitelio urinario en Pacientes con FOP. ....	75
<b>Gráfica 4.</b> Porcentaje de células con aneuploidía del Cromosoma X en función de la edad en Células de descamación del epitelio urinario en el Grupo Control. ....	75
<b>Gráfica 5.</b> Intervalos del porcentaje de Mosaicismo del Grupo Control y Pacientes con FOP en Leucocitos de Sangre Periférica. ....	76
<b>Gráfica 6.</b> Intervalos del porcentaje de Mosaicismo del cromosoma X del Grupo Control y Pacientes con FOP en Células de descamación del epitelio urinario. ....	76
<b>Gráfica 7.</b> Comparación Caso vs. Control del porcentaje de Mosaicismo del Cromosoma X en Leucocitos de Sangre Periférica. ....	77
<b>Gráfica 8.</b> Comparación Caso vs. Control del porcentaje de Mosaicismo del Cromosoma X en Células de descamación del epitelio urinario. ....	77
<b>Gráfica 9.</b> Comparación del porcentaje de mosaicismo Caso vs. Control en Leucocitos de Sangre Periférica y Células de descamación del epitelio urinario. ....	78

## ABREVIATURAS

---

**FOP/ POF:** Falla ovárica prematura/ Premature Ovarian Failure.

**FSH:** Hormona folículoestimulante.

**LH:** Hormona luteinizante.

**GnRH:** Hormona liberadora de gonadotrofinas.

**MEM:** Medio esencial mínimo.

**PBS:** Solución buffer de fosfatos.

**SSC:** Solución salina de citratos.

**SFB:** Suero fetal bovino.

**ISCN:** International system for human cytogenetic nomenclature.

**GTG:** Bando G por tripsina con la técnica de Giemsa.

## RESUMEN

---

La Falla Ovárica Prematura es una enfermedad que afecta al 1-3% de las mujeres menores de 40 años. La FOP se caracteriza por la presencia de amenorrea primaria o secundaria, hipoestrogenismo y concentraciones elevadas de las gonadotropinas: FSH y LH. Esta patología es un grave problema de infertilidad y disminuye la calidad de vida de las mujeres que la padecen haciéndolas más propensas a desarrollar enfermedad cardiovascular, osteoporosis y trastornos neurocognitivos. Las causas que originan esta patología son diversas e incluyen causas genéticas, autoinmunes, infecciosas, etc. Entre las causas genéticas asociadas con FOP se encuentra el mosaicismo del cromosoma X.

La relación entre la aparición de la Falla Ovárica Prematura con la presencia de mosaicismo del cromosoma X ha sido analizada en otros países pero en México no se tiene información acerca del tema, por esta razón se decidió llevar a cabo la presente investigación en el departamento de Genética y Genómica Humana del INPer. La población de estudio consta de 10 pacientes diagnosticadas con FOP con cariotipo normal, pareadas por edad con 10 controles, el rango de edad es de 24-38 años.

Se realizó la técnica de FISH para detectar mosaicismo del cromosoma X (empleando sondas centroméricas para los cromosomas X, Y y 18) en núcleos interfásicos de leucocitos de sangre periférica y de células de descamación del epitelio urinario analizando un total de 1000 núcleos para cada tejido. Debido a que el desarrollo de los sistemas urinario y sistema reproductor femenino guardan relación estrecha, el análisis de células provenientes del urotelio es particularmente interesante puesto que los hallazgos de mosaicismo del cromosoma X en este tejido pueden reflejar la situación del tejido ovárico.

Los resultados de este trabajo demuestran que la cantidad de células con monosomía del X es mayor en pacientes con FOP que en mujeres sanas y esta diferencia es más notoria en el caso de las células de descamación del urotelio. Por otra parte, se obtuvo que el intervalo de mosaicismo del cromosoma X en Pacientes con FOP es de 0.4-2.6% en Sangre periférica y de 1.09-2.5% en Células de descamación del urotelio, mientras que, en el grupo control el intervalo es de 0-3.6% en Sangre periférica y 0.2-3% en células de descamación del urotelio. Con lo anterior se encontró que el 80% de las pacientes con FOP en la población supera el intervalo de mosaicismo impuesto por el grupo control.

## I. INTRODUCCIÓN

---

La Falla Ovárica Prematura (FOP) es una patología que afecta de 1-3% de las mujeres menores de 40 años, está definida por la presencia de amenorrea primaria o secundaria, hipoestrogenismo y concentraciones elevadas de gonadotrofinas; esta enfermedad es resultado de la disfunción o del agotamiento prematuro de los folículos ováricos. La falla ovárica prematura representa uno de los mayores problemas de infertilidad, sin embargo, se estima que aproximadamente del 5-10% de las pacientes puede concebir de manera natural (Kovanci y Schutt et al., 2015) (Cox y Liu, 2014).

Las mujeres con Falla Ovárica Prematura pueden experimentar las consecuencias del hipoestrogenismo como enfermedad cardiovascular, osteoporosis y trastornos neurocognitivos, disminuyendo su calidad de vida (Pacheco, 2010).

La etiología de este padecimiento es heterogénea, incluye causas genéticas, autoinmunes, infecciosas, disfunciones metabólicas o iatrogénicas; pero desafortunadamente en la mayoría de las pacientes se desconoce su origen (Vujovic, 2009). Entre las causas genéticas asociadas con FOP se encuentra el mosaicismo del cromosoma X que ha sido investigada en otros países pero en el ámbito nacional no se tiene información precisa en relación al tema.

El propósito de este estudio es analizar la relación de FOP con el mosaicismo del sexocromosoma X en tejidos diferentes, utilizando técnicas de citogenética tradicional y molecular.

## II. MARCO TEÓRICO

---

### 1. FALLA OVÁRICA PREMATURA

La menopausia, definida como la interrupción definitiva de los ciclos menstruales, asociada al declive de la secreción de estrógenos por pérdida de la función folicular, marca el final de la etapa reproductiva en la vida femenina. La edad de la menopausia varía ampliamente, en México se presenta en una edad promedio de 47.6 años con un rango entre 41 a 55 años, antes de este rango se considera como falla ovárica prematura (Vázquez et al., 2010; Rojas et al., 2014).

El término de Falla Ovárica Prematura (POF; OMIM311360) o Insuficiencia Ovárica Primaria fue propuesto en 1942 por Fuller Albright, se trata de un defecto temprano en la función ovárica caracterizado por ausencia de menarca (Amenorrea primaria) o agotamiento prematuro de los folículos ováricos antes de los 40 años (Amenorrea secundaria), hipoestrogenismo y concentraciones elevadas de gonadotropinas FSH y LH. Esta condición afecta a 1-3% de las mujeres y representa uno de los mayores problemas de esterilidad femenina, difiere de la menopausia ya que en este padecimiento puede recobrase la función ovárica de manera impredecible e intermitentemente (Lakhal et al., 2010). El riesgo de recurrencia familiar es del 4-33% pero en general es esporádica (Vujovic, 2009).

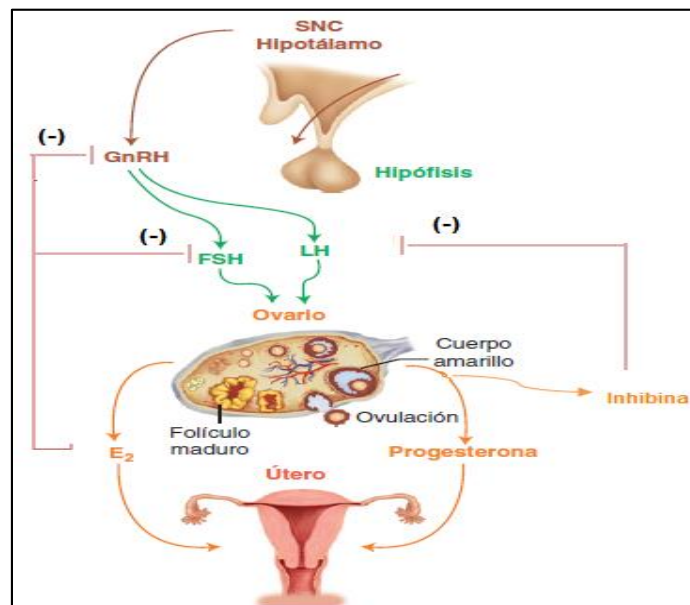
Las pacientes con FOP experimentan los síntomas y las consecuencias a largo plazo de la deficiencia de estrógenos como osteoporosis, enfermedad cardiovascular y alteraciones neurocognitivas (García et al., 2012). La infertilidad es otra consecuencia de la Falla Ovárica Prematura, sin embargo, un alto porcentaje de pacientes puede presentar diferentes grados de función ovárica por lo que aproximadamente 5-10% de ellas puede concebir de manera natural (Cox y Liu, 2014).

La etiología de FOP es diversa, la disfunción ovárica puede ser secundaria a enfermedades autoinmunes, infecciones, deficiencias metabólicas, tratamiento con radiación o quimioterapia, pero en el 90% de los casos es idiopática y probablemente genética (Cordts et al., 2011).



## 1.1 EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO

La fertilidad en la mujer es resultado de eventos moleculares complejos que comienzan en la vida fetal con la diferenciación ovárica y la formación de los folículos ováricos y continúan después del nacimiento con la interacción coordinada del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Simpson y Rajkovic, 1999), la actividad de este eje controla el desarrollo sexual y la capacidad reproductiva en mamíferos. La disfunción de este eje puede resultar en un amplio espectro de anomalías tanto en hombres como en mujeres incluyendo la Falla Ovárica prematura que se encuentra entre los trastornos de hipogonadismo hipergonadotrófico (Layman, 2012).

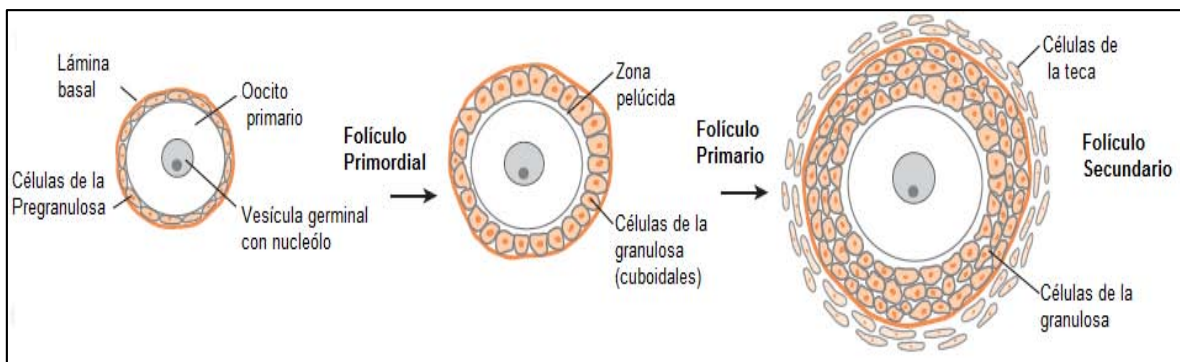


**Imagen 1.** Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario. (Modificada de Bretault y Christin-Maitre, 2015)

El ciclo menstrual, con una duración promedio de 28 días, se puede dividir en tres fases: la fase proliferativa o folicular (del día 1 al 14), ovulación (alrededor del día 14) y la fase lútea (del día 15 al 28) (Arteaga y García, 2014).

El folículo ovárico es la unidad funcional del ovario, tiene funciones gametogénicas y endócrinas. El folículo primordial está constituido por células foliculares y un oocito detenido en la profase de meiosis I, entre ellos se establecen interacciones mediadas por uniones gap. Los folículos primordiales se encuentran en un estado de quiescencia relativa hasta el inicio de la menstruación en la pubertad. En cada ciclo 20-30 ovocitos reanudan su desarrollo, al principio de manera independiente de gonadotrofinas, debido a factores parácrinos, de esta manera las células foliculares que rodean al ovocito se vuelven cúbicas

formando al folículo primario, las células foliculares, conocidas como células de la granulosa proliferan y crean capas alrededor del ovocito dando lugar al folículo secundario; en esta etapa el ovocito crece y secreta una matriz extracelular de glicoproteínas denominada zona pelúcida. Por fuera de las células de la granulosa se observa una membrana basal que las separa del estroma circundante denominada teca folicular; a medida que maduran los folículos primarios, la teca folicular se divide en una capa interna vascularizada de células secretoras, la teca interna y una capa externa de tejido fibroso, la teca externa (Arteaga y García, 2014). Entre las células de la granulosa comienzan a formarse espacios o antros que se llenan de líquido, al principio separados unos de otros y posteriormente se unen formando un único y amplio espacio antral convirtiéndose en folículos antrales que pueden ser reclutados para su maduración (White y Porterfield, 2012).



**Imagen 2.** Desarrollo folicular temprano. (Modificado de White y Porterfield, 2012)

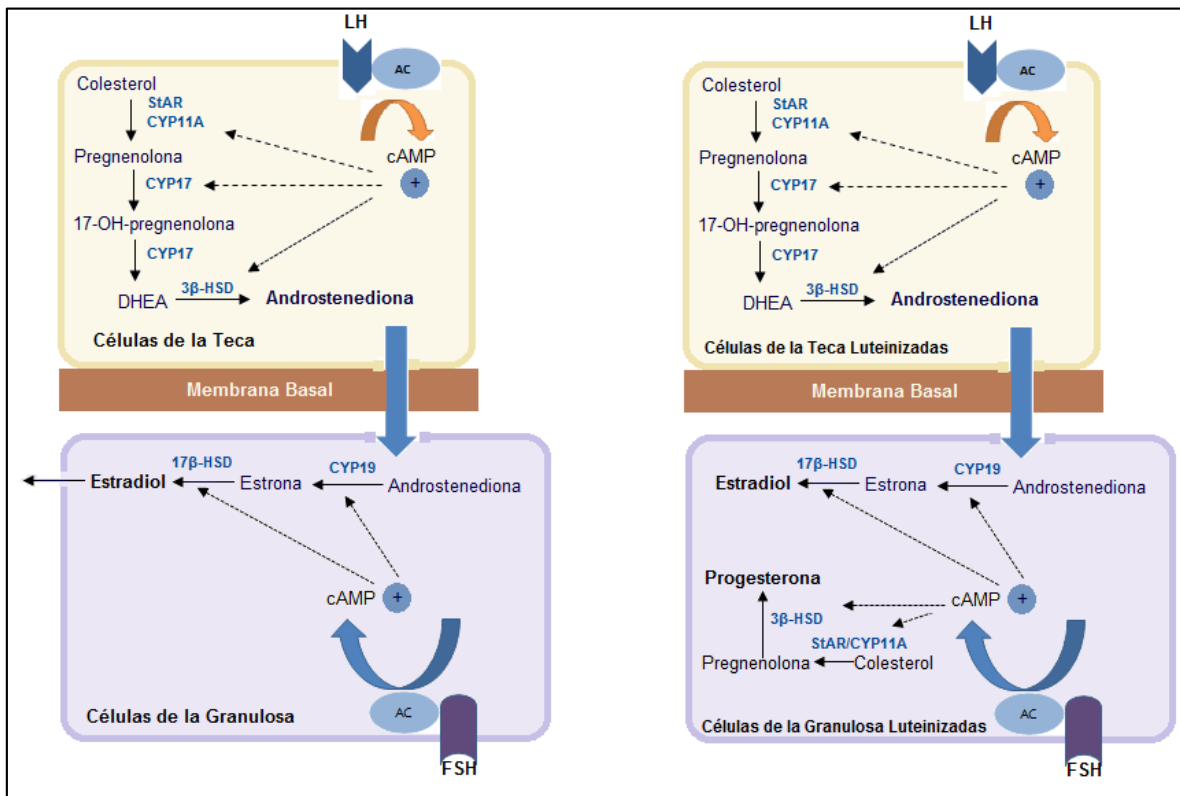
En el núcleo arcuato del hipotálamo se produce la GnRH (Hormona Liberadora de Gonadotrofinas). La GnRH es producida y secretada al sistema porta hipotálamo-hipofisiario en forma pulsátil (Beshay y Carr, 2013)

La GnRH actúa sobre la hipófisis anterior promoviendo la producción de las gonadotrofinas FSH y LH, la intensidad y frecuencia de los pulsos de GnRH promueve la producción selectiva de gonadotrofinas. Las gonadotrofinas son glicoproteínas diméricas con dos subunidades  $\alpha$  (común para ambas) y  $\beta$  (específica) (Beshay y Carr, 2013)

La hormona FSH tiene receptores en las células de la granulosa, es responsable del reclutamiento de folículos ováricos induciendo en ellos un desarrollo rápido, estos folículos producen bajos niveles de estrógenos e Inhibina B; la hipófisis responde a los estrógenos y la Inhibina disminuyendo la secreción de FSH. Así mismo aumenta la frecuencia de los pulsos de GnRH incrementando la síntesis de LH (White y Porterfield, 2012).

Al disminuir los niveles de FSH, la mayoría de los folículos estimulados se vuelven atrésicos y sólo uno de ellos, aquél con mayor número de receptores para FSH y mejor aporte vascular, se convierte en el folículo dominante o de De Graaf. (White y Porterfield, 2012)

Por medio del estímulo de la FSH las células de la teca interna expresan receptores para LH. El incremento de los niveles de LH estimulan la expresión de enzimas esteroidogénicas como CYP11A1, 3 $\beta$ -HSD y CYP17 para producir andrógenos (Androstenediona y Testosterona), los andrógenos difunden a las células de la granulosa mural. En respuesta a FSH, las células de la granulosa mural producen la enzima clave para la producción de estrógenos CYP19 (Aromatasa) que se encarga de la conversión de la Androstenediona en Estrona y de convertir la testosterona en el estrógeno más importante Estradiol 17 $\beta$ . Esta interacción entre las células de la teca y de la granulosa se conoce como “Modelo de las dos células para la Esteroidogénesis” (White y Porterfield, 2012).



**Imagen 3.** Modelo de las dos células para la esteroidogénesis. La unión de LH con su receptor en las células de la teca estimula la conversión de colesterol a androstenediona. La unión de FSH con su receptor en las células de la granulosa estimula la aromatización de los andrógenos a estrógenos. (izquierda) Rutas esteroidogénicas en las células de la teca y granulosa luteinizadas (derecha).

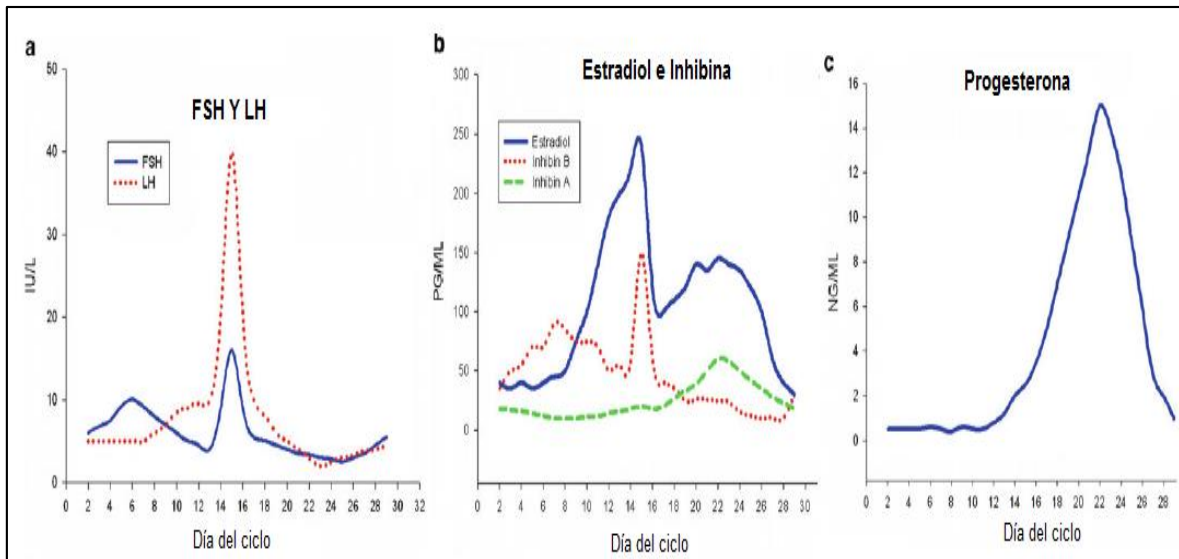
Durante el período periovulatorio la secreción de Estradiol e Inhibina B actúan para impedir la secreción de FSH. Las concentraciones de LH aumentan para producir cambios estructurales en el folículo dominante, estos cambios son:

- Ruptura del folículo maduro, el cual se caracteriza por tener un amplio antro folicular, el cúmulo oóforo y estar rodeado por la zona pelúcida la corona radiada.
- Reanudación de la división meiótica en el ovocito y progreso hasta la metafase de meiosis II.
- Liberación de colagenasa, prostaglandinas y activador del plasminógeno que coadyuvan en el rompimiento de la pared del folículo.

Finalmente en el interior del folículo se desprende la pared del cúmulo oóforo, se rompe el estigma y se expulsa al ovocito y la corona radiada. Este momento de la ruptura y la salida del ovocito secundario es denominado ovulación. (White y Porterfield, 2012)

Posterior a la ovulación inicia la fase lútea. El folículo roto se llena de sangre transformándose en *folículo hemorrágico* que finalmente da lugar a un *cuerpo lúteo* o cuerpo amarillo. El cuerpo lúteo secreta progesterona y estrógenos, hormonas que actúan sobre el endometrio del útero preparándolo para la implantación del blastocisto, adicionalmente produce Inhibina A que actúa en la hipófisis para bloquear la producción de FSH y LH; las gonadotrofinas vuelven a su nivel basal (Arteaga y García, 2014).

Si el ovocito no es fecundado, el cuerpo lúteo se transforma en un cuerpo lúteo de la menstruación o en degeneración, el cual mantiene su secreción hormonal aproximadamente 12 días después de la ovulación (día 26 del ciclo menstrual), momento en el que comienza a disminuir la producción de progesterona, estradiol e Inhibina. Al final de este período de 12 días, la disminución de la Inhibina favorece la secreción de la FSH por la adenohipófisis para iniciar un nuevo ciclo de maduración de los folículos en el ovario. Un par de días después el descenso de la progesterona y el estradiol provoca la menstruación y el ciclo inicia de nuevo (Arteaga y García, 2014).



**Imagen 4.** Cambios hormonales durante el ciclo menstrual. (a) Concentraciones séricas de las hormonas FSH y LH a lo largo del ciclo. (b) Concentraciones séricas de Estradiol e Inhibina A y B. (c) Concentración sérica de progesterona durante el ciclo menstrual (Modificado de Beshay y Carr, 2013)

## 1.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

La Falla Ovárica Prematura es un trastorno crónico que tiene efectos a largo plazo en la capacidad reproductiva y en la salud general de las mujeres por lo que, el diagnóstico de FOP provoca ansiedad, depresión y problemas de autoestima en las pacientes (De Vos et al., 2010). Actualmente, se propone el cambio del término a Insuficiencia Ovárica Prematura puesto que aproximadamente el 50% de las mujeres diagnosticadas puede tener función ovárica intermitente y por tanto tener ciclos menstruales (Nelson, 2009). Según el Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos del 5 al 10% de las mujeres con FOP pueden gestar de manera natural (Pacheco, 2010).

La edad de presentación de FOP es variable y depende de la cantidad de folículos ováricos funcionales o de la rapidez de la atresia de éstos (Kalantaridou y Davis, 1998). El trastorno comienza con subfertilidad que progresa a insuficiencia bioquímica (elevación de FSH) y eventualmente conduce a la presentación clínica común con períodos menstruales irregulares o ausentes y síntomas vasomotores (Welt, 2008).

**Tabla 1.** Hallazgos clínicos en mujeres con Falla Ovárica Prematura

<b>Estadios Clínicos de FOP</b>	<b>Niveles de FSH</b>	<b>Fertilidad</b>	<b>Ciclos Menstruales</b>
<b>Normal</b>	Normal	Normal	Regular
<b>Subfertilidad</b>	Normal	Reducida	Regular
<b>Insuficiencia Bioquímica</b>	Elevada	Reducida	Regular
<b>FOP evidente</b>	Elevada	Reducida	Irregular o ausente

(Modificada de Welt, 2008)

La amenorrea primaria es el síntoma inicial en el 10% de los casos, sin embargo, la mayoría de las pacientes refiere haber tenido ciclos menstruales normales que se volvieron irregulares en la forma de oligo/amenorrea, polimenorrea o sangrado uterino disfuncional (Rafique et al., 2012).

La amenorrea primaria es más frecuente en mujeres con cariotipo anormal; las mujeres con amenorrea secundaria comúnmente tienen cariotipo normal. En los casos de mosaicismo de igual forma, es más común la amenorrea secundaria debido a que en estas pacientes hay función gonadal que permite el desarrollo sexual y la presentación de ciclos menstruales normales (De Vos et al., 2010).

Como consecuencia de la disfunción ovárica en FOP existe un déficit en la producción de estrógenos, esta característica de la enfermedad provoca afectaciones importantes no sólo para el funcionamiento del aparato reproductivo femenino sino también en otros tejidos como el hueso, hígado, sistema cardiovascular, SNC y tejido adiposo (De Vos et al., 2010).

Los síntomas de la deficiencia de estrógenos pueden presentarse en la mayoría de las pacientes diagnosticadas con FOP. El hipoestrogenismo se asocia con la aparición de síntomas vasomotores (palpitaciones, bochornos, sudoración nocturna) y otros como: irritabilidad, ansiedad, depresión, fatiga, trastornos del sueño, disminución de la libido y dispareunia como consecuencia de resequedad vaginal (Pacheco, 2010). Sumado a estos síntomas, el hipoestrogenismo prematuro aumenta el riesgo de padecer osteoporosis y la susceptibilidad a fracturas siendo la más frecuente la fractura de cadera en un 15% (De Vos et al., 2010), esto se debe a que el estradiol tiene una importante función biológica en el hueso al ser un regulador de la función de osteoblastos y osteoclastos favoreciendo la formación de hueso además estimula la absorción intestinal de calcio así como su reabsorción tubular (White y Porterfield, 2012).

La probabilidad de padecer trastornos cardiovasculares se incrementa puesto que de manera normal los estrógenos promueven la vasodilatación a partir del incremento de la producción de Óxido Nítrico que relaja el músculo liso vascular y disminuyen la actividad de los sistemas vasoconstrictores como Prostaglandinas y el Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (White y Porterfield, 2012). El hipoestrogenismo ocasiona la acumulación de tejido adiposo predominantemente en el área abdominal lo cual es un marcador de riesgo en hipercolesterolemia y coadyuva en el desarrollo de enfermedad cardiovascular (Michalakis y Coppack, 2012).

Además de los trastornos mencionados, el déficit de hormonas sexuales puede ocasionar trastornos neurológicos como Alzheimer, esto se atribuye a la ausencia del efecto neuroprotector que ejercen las hormonas esteroideas (Michalakis y Coppack, 2012).

### 1.3 EPIDEMIOLOGÍA

La incidencia de la Falla Ovárica Prematura es altamente variable de acuerdo al contexto familiar y a la sintomatología clínica que conduce al diagnóstico. Se estima que esta condición afecta a:

- 1:10,000 mujeres  $\leq$  20 años (0.01%).
- 1:1000 mujeres  $\leq$  30 años (0.1%).
- 1.100 mujeres menores de 40 años (1%).

Sin embargo, existen evidencias que revelan la existencia de diferencias étnicas y raciales en la reserva ovárica (Cox y Liu, 2014). De esta manera los índices de ocurrencia de FOP pueden cambiar: 1.4% para mujeres afroamericanas e hispanas, 1.0% para mujeres caucásicas, 0.5% para mujeres chinas y 0.1% para mujeres japonesas (García et al., 2012).

Por otra parte, se estima que la prevalencia es de 10-28% en mujeres con Amenorrea primaria y de 4-18% para mujeres con Amenorrea Secundaria (García et al., 2012).

### 1.4 FACTORES ETIOLÓGICOS

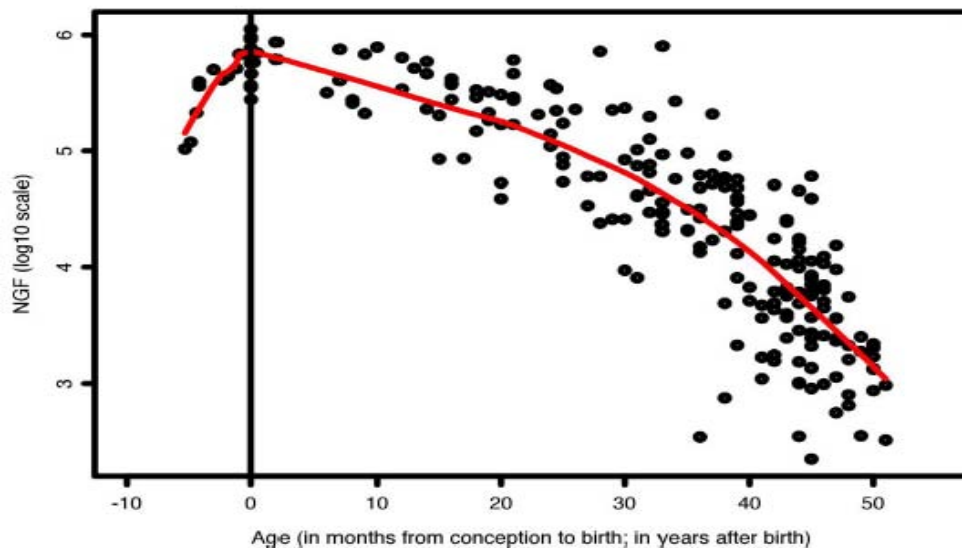
Existen dos mecanismos que explican la fisiopatología de la Falla Ovárica Prematura:

- Agotamiento de los folículos ováricos.
- Disfunción folicular.

La disfunción folicular indica que en el ovario están presentes los folículos pero que algún proceso patológico impide su funcionamiento o proceso de maduración. La causa de la disfunción puede ser defectos en los receptores de las gonadotrofinas, mutaciones en la proteína G, deficiencia de enzimas o enfermedades autoinmunes (Rafique et al., 2012).

El agotamiento folicular indica que no existen folículos primordiales en el ovario. Esta condición se debe a la existencia de una dotación insuficiente de folículos o a una destrucción acelerada de éstos (Nelson, 2009). La disminución de la reserva ovárica se debe al proceso de atresia folicular en el cual los folículos y su contenido ovular degeneran y la apoptosis, proceso controlado por proteínas intracelulares, es la ruta predominante de atresia folicular. Se estima que más del 90% de la reserva ovárica se pierde debido a la atresia durante la infancia y la adultez temprana. La sobrevivencia o apoptosis folicular depende de factores de crecimiento, citocinas, hormonas y el balance entre la expresión de factores antiapoptóticos y pro-apoptóticos (Gougeon, 2010).

Como resultado del proceso de atresia folicular se ha construido una gráfica que representa la disminución de la reserva ovárica, la cual está regulada por factores genéticos y epidemiológicos (Pelosi et al., 2015).

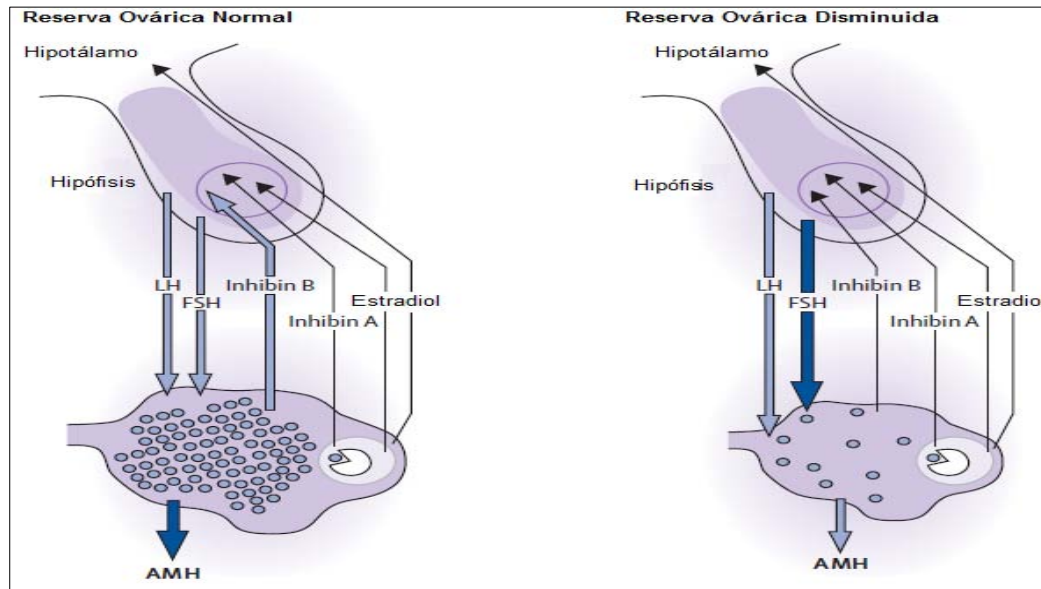


**Imagen 5.** Número de Folículos primordiales durante la vida pre y postnatal (Pelosi et al., 2015)

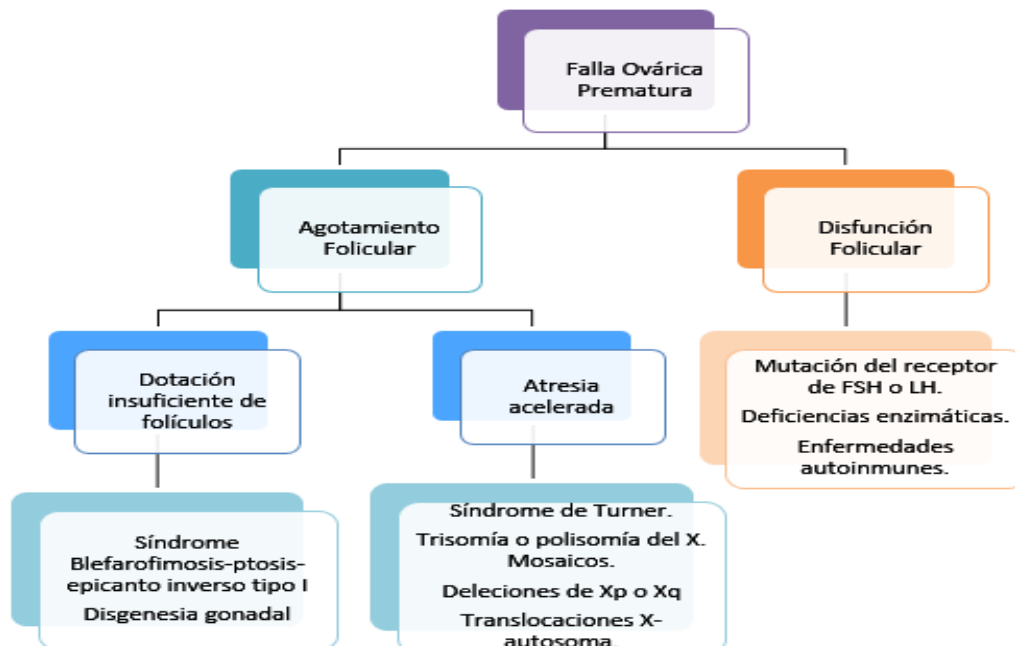
La cantidad de la reserva ovárica determina las concentraciones de factores endócrinos, así que el sistema hormonal del eje hipotálamo-hipófisis-ovario se altera, aumentando la concentración de FSH y disminuyendo la secreción de Inhibina B y Estradiol en el ovario. Existen diversas causas de Falla Ovárica Prematura asociadas al mecanismo de



agotamiento folicular como ocurre en las alteraciones cromosómicas estructurales o numéricas, involucrando principalmente al cromosoma X, o a la exposición de toxinas y tratamientos de quimio y radioterapia (Rafique et al, 2012).



**Imagen 6.** Reserva ovárica normal y disminuida con cambios en las concentraciones hormonales. El grosor de las flechas indica la concentración de la hormona (Modificada de De Vos et al., 2010).



**Imagen 7.** Mecanismos involucrados en la Falla Ovárica Prematura.

## 1.5 CAUSAS DE FALLA OVÁRICA PREMATURA

### a) CAUSAS GENÉTICAS

La reducción de la dosis génica y fallas en la división meiótica son los mecanismos genéticos asociados al desarrollo de Falla Ovárica Prematura. Estos elementos explican la disminución de la reserva de folículos primordiales y el incremento en la atresia por apoptosis (Vujovic, 2009). Las anomalías genéticas que pueden causar Falla Ovárica Prematura pueden ser cromosómicas (numéricas o estructurales) o génicas.

En la etiología de la Falla Ovárica Prematura destacan las anomalías cromosómicas que involucran al cromosoma X ya que el sexocromosoma contiene secuencias críticas para la función ovárica, esta región se encuentra entre Xq13.3-Xq27 (Kovanci y Schutt, 2015). Por esta razón existe la hipótesis de que aunque es suficiente un X para la diferenciación ovárica se necesita que los dos cromosomas X estén intactos y activos en la oogénesis y para garantizar una dotación de folículos normal (Dixit et al., 2010). A continuación se explicarán algunas anomalías del cromosoma X y su relación con la aparición de FOP.

#### SÍNDROME DE TURNER

El síndrome de Turner tiene una incidencia de 1 en 2,500 mujeres, se caracteriza por disgenesia gonadal, amenorrea primaria, infantilismo sexual, talla baja y fenotipo femenino con múltiples anomalías congénitas. La mayoría de las pacientes tiene cariotipo 45,X (50-60%) otros casos muestran anomalías cromosómicas que involucran al X como deleciones, isocromosomas, cromosomas en anillo y cerca del 20% de los casos son mosaicos y entre el 6% y 8% de las pacientes con síndrome de Turner se encuentra una línea celular con cromosoma Y (Cordts et al, 2011).

En las mujeres con Síndrome de Turner la ovogénesis procede de manera normal hasta el diploteno en la meiosis I, momento en el que los oocitos comienzan a incorporarse a los folículos; se cree que la monosomía del X provoca errores en el apareamiento durante la meiosis. Subsecuentemente se obstaculiza la formación de los folículos primordiales provocando atresia folicular (Vujovic, 2009).

## TRISOMÍA DEL X

La trisomía del cromosoma X (47,XXX) es una aneuploidía con incidencia de 1 en 1,000 nacimientos. En la mayoría de las pacientes el cariotipo es 47,XXX puro y sólo en el 10% son mosaicos como: 46,XX/ 47,XXX; 47,XXX/48,XXXX; 45X/47,XXX;45,X/46,XX/47,XXX. Las características clínicas incluyen pliegues epicánticos, hipertelorismo, clinodactilia e hipotonía. Existen reportes de mujeres con trisomía del X con POF, con los hallazgos endócrinos propios de la patología (Cordts et al., 2011).

## MOSAICISMO DEL CROMOSOMA X

Entre las causas genéticas asociadas con la falla ovárica prematura se encuentra el mosaicismo del cromosoma X, el impacto de esta anomalía cromosómica en la función ovárica y en el desarrollo patológico la FOP es aún controversial, particularmente en los casos de mosaicismo de baja proporción. Se estima que la frecuencia de mosaicismo del cromosoma X en mujeres con FOP esporádica es de 3-11% (Gersak y Veble, 2011).

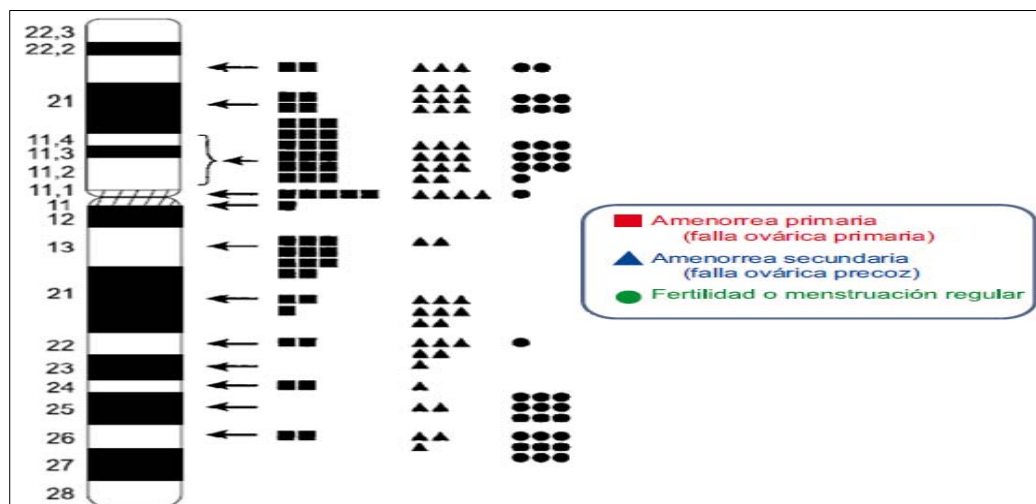
El mosaicismo se define como la presencia de dos o más líneas celulares que difieren en su complemento cromosómico en un individuo o tejido. Cuando el mosaicismo se limita a un número reducido de células se considera como mosaicismo de bajo nivel o de baja proporción, el significado biológico de este fenómeno es incierto. En cuanto a la Falla Ovárica Prematura, para algunos autores el mosaicismo de baja proporción con implicaciones clínicas es aquel que contiene de 5-10% de células de células aneuploides. Esta percepción se fundamenta en la relación existente entre la pérdida del cromosoma X y la edad, se estima que la población de células monosómicas para el sexocromosoma aumenta en una proporción de  $700 \times 10^6$  por año, de tal manera que, se han hallado proporciones menores al 5% de células con monosomía del cromosoma X en mujeres con desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y con fertilidad probada. Otros autores consideran mosaicismo de baja proporción a la presencia de 6% de células aneuploides; sin embargo, aún no existe un acuerdo formal que establezca los parámetros para considerar la presencia de mosaicismo de baja proporción (López et al., 2012; Homer et al., 2010; Devi et al., 1998).

El impacto de la presencia de líneas celulares con complemento cromosómico 45,X en el desarrollo gonadal está documentado en pacientes con síndrome de Turner, se sabe que durante el desarrollo gonadal intrauterino en las mujeres con Turner ocurre atresia folicular después del tercer mes de gestación. En cuanto a la Falla Ovárica Prematura, la asociación

de aneuploidías del cromosoma X con la existencia de daños gonadales se explica por medio de diferentes hipótesis. La primera de ellas propuesta por Burgoyne y Baker quienes propusieron que el apareamiento cromosómico aberrante durante la meiosis en células con complemento cromosómico 45,X y 47,XXX pueden causar muerte celular prematura. La segunda hipótesis postula que la calidad de los oocitos está influenciada por la deficiencia o la sobreexpresión de algunos genes contenidos en el cromosoma X. La tercera hipótesis se basa en la suposición de que el mosaicismo del cromosoma X puede ser una manifestación de fallas en los mecanismos de control celular que evitan la no disyunción (Kuo y Guo, 2004).

### DELECCIONES Y TRANSLOCACIONES DEL CROMOSOMA X

Además del Síndrome de Turner, las deleciones y translocaciones que involucran al cromosoma X están relacionadas con la Falla Ovárica Prematura siendo la deleción el fenómeno más común. Las deleciones en Xp se relacionan a Amenorrea Primaria y disgenesia gonadal, particularmente en Xp11 y Xp21, mientras que en Xq los puntos de ruptura más comunes se originan en Xq13 y Xq21 se asocian con amenorrea primaria, falta de desarrollo mamario y falla ovárica completa. Con base en estos hallazgos se establece que la función ovárica se preserva si las deleciones son distales a pesar de que esta región contiene genes de importancia para tal fin mientras que, las deleciones proximales inducen falla ovárica. En la figura se observan las variaciones fenotípicas en función al punto de ruptura (Vujovic, 2009; Pacheco, 2010).



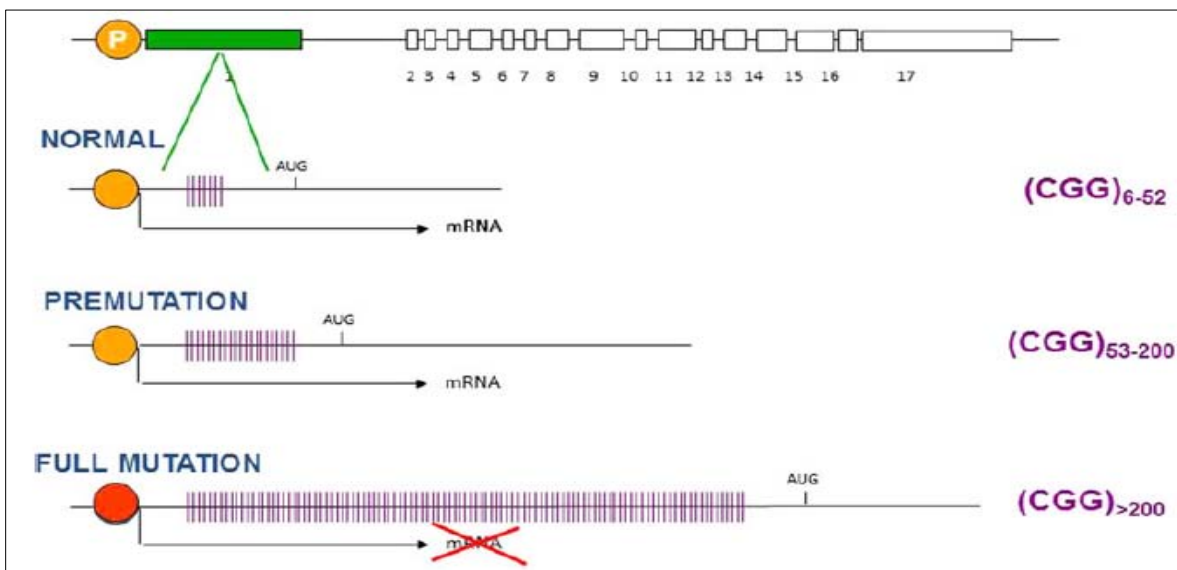
**Imagen 8.** Diagrama esquemático del cromosoma X que muestra el comportamiento de la función ovárica en función de la presencia de deleciones terminales sin mosaicismo. Cada viñeta en el esquema representa a los datos obtenidos en estudios acerca de la relación entre las anomalías estructurales del cromosoma X con la fisiología ovárica. (Tomada de Simpson y Rajkovic, 1999).

## SÍNDROME DEL X FRÁGIL

La expansión del trinucleótido CGG en el extremo 5' del gen *FMR1* produce el Síndrome del X frágil. Una cantidad inferior de 50 repetidos del trinucleótido se considera normal, de 50-200 repetidos premutación y más de 200 repetidos mutación completa. Se estima que el 21% de los casos familiares de FOP se deben a la premutación de *FMR1* localizado en Xq27.3. La premutación puede sufrir una expansión a mutación completa, este fenómeno ocurre durante la división meiótica (Dixit et al, 2010).

El producto de la expresión del gen *FMR1* es expresado en las células de la granulosa, la disfunción ovárica en el Síndrome del X frágil es debido a la atresia acelerada y a una dotación insuficiente de folículos (Cordts et al., 2011).

El gen *FMR2*, localizado a 600kb del gen *FMR1* en Xq28, es un sitio frágil que muestra un comportamiento similar a *FMR1* y está relacionado igualmente con FOP (Dixit et al, 2010).



**Imagen 9.** Variación en el número de repetidos del gen *FMR1* (Tomado de Cordts et al., 2011)

## BMP15

Es un gen localizado en Xp11.22, es miembro de la superfamilia del Factor de crecimiento transformante beta (TGFb), un grupo de proteínas que actúan en diversos procesos celulares durante el desarrollo embrionario y la formación de tejidos. Se relaciona con GDF9 y ambos son expresados por el oocito para estimular la proliferación de las células de la granulosa y favorecer la esteroidogénesis. La expresión de ambos genes inicia en el folículo primordial y permanece a lo largo de la maduración folicular. Se han encontrado diferentes

mutaciones en el gen BMP15, incluyendo mutaciones sin sentido e inserciones, en pacientes con POF (Cordts et al., 2011).

#### POF1B

Localizado en Xq21.1-q21.2, la expresión de *POF1B* se limita al período embrionario y es de vital importancia para el desarrollo ovárico y el establecimiento de la reserva ovárica (Dixit et al, 2010).

#### GENES AUTOSÓMICOS ASOCIADOS A FOP

Los genes de significación en la Falla Ovárica Prematura son aquellos que regulan procesos de importancia en la función ovárica como la foliculogénesis, la maduración folicular y la esteroidogénesis, igualmente los genes que regulan al eje hipotálamo-hipófisis-ovario.

GEN	LOCALIZACIÓN	FUNCIÓN
<b>Receptor de FSH (FSHR)</b>	2p21-p16	El receptor de FSH pertenece a la familia 1 de receptores acoplados a proteína G. Se han descrito diversas mutaciones y polimorfismos en este gen, lo cual impide la función del receptor y la transducción de señales que activaría la unión con FSH (Sundblad et al., 2004).
<b>Receptor de LH (LHR)</b>	2p21	<i>LHR</i> codifica para el receptor de LH y de la hCG. Mutaciones en <i>LHR</i> resultan en desórdenes del desarrollo de caracteres sexuales secundarios (Welt, 2008)
<b>AIRE</b>	21q22	<i>AIRE</i> codifica un factor de transcripción, mutaciones en este gen causan el Síndrome poliglandular autoinmune tipo 1 (Dixit et al., 2010)
<b>ATM</b>	11q22-q23	Este gen codifica una serina/treonina cinasa, la proteína participa en la reparación de DNA y en el desarrollo del sistema nervioso y autoinmune. Mutaciones en <i>ATM</i> se asocian a Ataxia telangiectasia (Dixit et al., 2010).

<b><i>FSH <math>\beta</math></i></b>	11p13	Codifica para la subunidad $\beta$ de la gonadotropina FSH (Dixit et al., 2010).
<b><i>INHA</i></b>	2q33-q36	Las Inhibinas son glicoproteínas diméricas compuestas por dos subunidades $\alpha$ y $\beta$ . La Inhibina aparece a la mitad del ciclo ovulatorio e incrementa en la fase lútea (Cordts et al., 2011)
<b><i>FOXL2</i></b>	3q23	Es un factor de transcripción, mutaciones en <i>FOXL2</i> provocan el Síndrome Blefarofimosis-ptosis-epicanto inverso tipo I. La expresión de este gen es importante en la diferenciación ovárica y el desarrollo folicular (Cordts et al., 2011).
<b><i>GDF9</i></b>	5q31.1	Factor de crecimiento expresado en los oocitos, necesario en la foliculogénesis (Dixit et al, 2010).

#### **b) ALTERACIONES ENZIMÁTICAS**

Entre las alteraciones enzimáticas causante de FOP se encuentran los déficits de 17 $\alpha$ -hidroxilasa, aromatasa y GALT.

GALT es una enzima que cataliza la conversión de galactosa a glucosa. La ausencia de esta enzima causa Galactosemia, patología en la que se acumulan metabolitos como galactosa 1-fosfato y galactitol causando daño celular. La Galactosemia es causa de retraso mental y de crecimiento, hepatomegalia, disfunción tubular renal y FOP por atresia folicular postnatal (Cordts et al., 2011; Welt, 2008).

La enzima 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20 desmolasa es una enzima que cataliza la conversión de Pregnenolona a 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona, la ausencia de esta enzima bloquea la producción de cortisol, Androstenediona, Testosterona y Andrógenos. Su deficiencia se relaciona con hiperplasia suprarrenal asociada a amenorrea, aumento de las gonadotropinas y pérdida de los caracteres sexuales secundarios. La enzima es codificada por el gen *CYP17* y se localiza en 10q24-q25 (Cox y Liu, 2014).

La deficiencia de la enzima Aromatasa impide la conversión de los Andrógenos a Estrógenos, impide la maduración folicular. La ausencia de Aromatasa causa amenorrea primaria. El gen *CYP19* se localiza en el cromosoma 15q21.1 (Cox y Liu, 2014).

### c) ENFERMEDADES AUTOINMUNES

La acción de la autoinmunidad en FOP puede determinar la reducción en el número de folículos así como la destrucción acelerada de los folículos. Es conocida la presencia de anticuerpos antiováricos, contra receptores de gonadotrofinas, contra los esteroides y la zona pelúcida. El proceso central de la atresia folicular en la autoinmunidad es la activación de la cascada de citocinas iniciada por el interferón gamma. Los datos que soportan esta hipótesis incluyen: la infiltración ovárica por linfocitos y células plasmáticas, alteraciones en subclases de células T y circulación de anticuerpos anti ovario (Scucces, 2008)

El 2-10% de FOP está asociado a falla adrenal lo cual ocurre en el Síndrome de Insuficiencia Poliglandular tipo I y II. El tipo I se presenta en la niñez con candidiasis Mucocutánea, hipoparatiroidismo e insuficiencia adrenal, se acompaña de POF en 60% de los casos. Este síndrome es resultado de mutaciones en el gen *AIRE* que es un regulador de los linfocitos T. El síndrome de insuficiencia poliglandular de tipo II está caracterizado por insuficiencia adrenal, hipotiroidismo y se asocia con POF en solo el 10% de los casos (Welt, 2008).

Cuando se descarta autoinmunidad adrenal se puede sospechar de otras enfermedades autoinmunes como Lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Addison, hipertiroidismo-hipotiroidismo autoinmune, etc. (Pacheco, 2010)

- 
- Disfunción tiroidea.
  - Insuficiencia poliglandular tipo I y II <sup>(21)</sup>.
    - Síndrome pluriglandular autoinmune tipo 1.
      - Insuficiencia suprarrenal.
      - Candidiasis mucocutánea.
      - Hiporatiroidismo crónico.
      - Insuficiencia gonadal.
    - Síndrome pluriglandular autoinmune tipo 2.
      - Enfermedad de Addison.
      - Hipertiroidismo - hipotiroidismo primario autoinmune.
      - Diabetes mellitus tipo 1.
      - Hipogonadismo primario.
      - Miastenia grave.
      - Enfermedad celiaca.
  - Artritis reumatoide.
  - Púrpura trombocitopénica idiopática (ITP).
  - Diabetes.
  - Anemia perniciosa.
  - Insuficiencia suprarrenal.
  - Vitiligo.
  - Lupus eritematoso sistémico.
- 

**Imagen 10.** Enfermedades autoinmunes asociadas a la Falla Ovárica Prematura (Tomada de Pacheco, 2010)



#### d) CAUSAS INFECCIOSAS

Las pacientes afectadas por el virus de la parotiditis pueden presentar ooforitis en 5% de los casos, lo cual puede ser responsable de la Falla Ovárica. Se señala también las infecciones por Shigella, rubéola, Coxsackie como causas raras de FOP (Leal, 2014).

#### e) CAUSAS IATROGÉNICAS

Las causas iatrogénicas de FOP incluyen la cirugía de endometriomas, ooforectomía, exposición a agentes tóxicos como el cigarro y el tratamiento para condiciones neoplásicas con quimio y radioterapia.

La quimioterapia y la radioterapia inhiben la proliferación de las células de la teca y de la granulosa por lo que tienen efectos perjudiciales en la maduración de los folículos ováricos, el tratamiento con agentes alquilantes promueve alteraciones en el DNA. Ambas terapias reducen la función ovárica, los efectos son directamente proporcionales a la dosis, la edad y genética de la paciente (Leal, 2014).

Riesgo Alto
<ul style="list-style-type: none"><li>• Ciclofosfamida</li><li>• Ifosfamida</li><li>• Busulfán</li><li>• Melfalan</li><li>• Clorambucil</li></ul>
Riesgo Medio
<ul style="list-style-type: none"><li>• Cisplatino</li><li>• Carboplatino</li><li>• Doxorubicina</li></ul>
Bajo Riesgo
<ul style="list-style-type: none"><li>• Vincristina</li><li>• Metrotexato</li><li>• Vinblastina</li><li>• Dactinomicina</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Radioterapia: 6gy sobre el ovario (FOP irreversible)</li></ul>

**Imagen 11.** Riesgo estimado de disfunción gonadal con fármacos citotóxicos (Modificado de Sonmezer y Oktay, 2004)

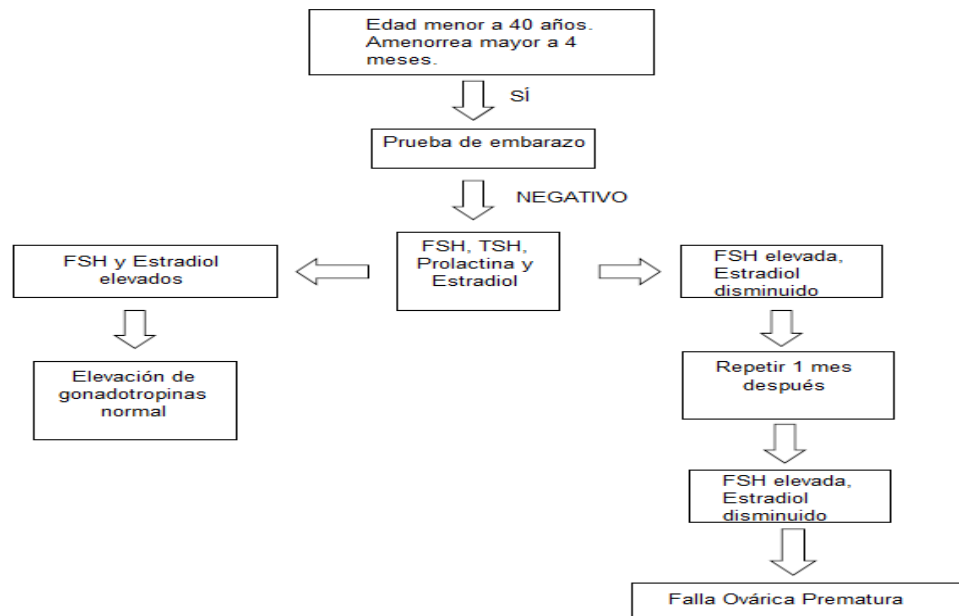
### 1.6 DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

El criterio más utilizado para diagnosticar FOP es la ausencia de menarca o amenorrea de más de 4 meses de duración y su asociación con niveles plasmáticos de FSH mayores o iguales a 40mUI/ml, la determinación de FSH se realiza dos veces a distancia de un mes, en una mujer con edad inferior a los 40 años. Una atenta historia clínica con anamnesis detallada y un minucioso examen físico pueden orientar acerca de patologías específicas o no asociadas a FOP (Cox y Liu, 2014).

Las pruebas de laboratorio recomendadas para el diagnóstico de FOP incluyen: hGC, FSH, TSH, prolactina, Inhibina B, Estradiol y la Hormona Anti Mulleriana (AMH). La AMH ha sido propuesta como una prueba temprana en el diagnóstico de FOP ya que refleja la situación de la reserva ovárica; concentraciones menores de 1ng/mL de AMH indican disminución de la reserva (Cox y Liu, 2014).

El análisis de cariotipo se impone para identificar anomalías cromosómicas como deleciones en el cromosoma X, mosaicismo del X y translocaciones autosómicas. De sospecharse alguna anomalía cromosómica se indican pruebas genéticas de mutaciones en genes como FMR1, GALT, AIRE, BMP15, etc. En las pacientes con cariotipo normal y FOP espontánea se debe realizar una evaluación inmunológica de anticuerpos adrenales, antitiroideos y antiovario (Scucces, 2008).

La ecografía pélvica y la biopsia ovárica no dan indicaciones pronósticas, pues la presencia o no de folículos no indican fertilidad en la paciente, aunque evalúen la actividad folicular ovárica. La biopsia ovárica no representa la condición anatómica real de toda la gónada y es un procedimiento no exento de riesgo (Scucces, 2008).



**Imagen 12.** Pruebas de laboratorio que apoyan al diagnóstico de FOP (Tomado de Cox y Liu, 2014)

Considerando que el diagnóstico de la patología puede afectar tanto la salud física como emocional, el tratamiento debe ser multidisciplinario. Como primer paso se establece terapia de reemplazo hormonal (TRH) para disminuir el riesgo de padecer enfermedades

cardiovasculares o neurológicas, osteoporosis así como el mantenimiento de la función sexual (Cox y Liu, 2014). Las mujeres con hipoestrogenismo requieren tomar medidas contra la osteoporosis por lo que deben incluir en su dieta vitamina D y Calcio (1200mg/día) (Nelson, 2009).

La infertilidad es el efecto colateral más devastador en las pacientes con FOP. Es importante informar a las pacientes que existen posibilidades de concebir de manera natural, sin embargo, actualmente existen tratamientos disponibles para preservar la fertilidad como la donación de ovocitos o embriones, la maduración *in vitro* de ovocitos y el reemplazo mitocondrial (Cox y Liu, 2014).

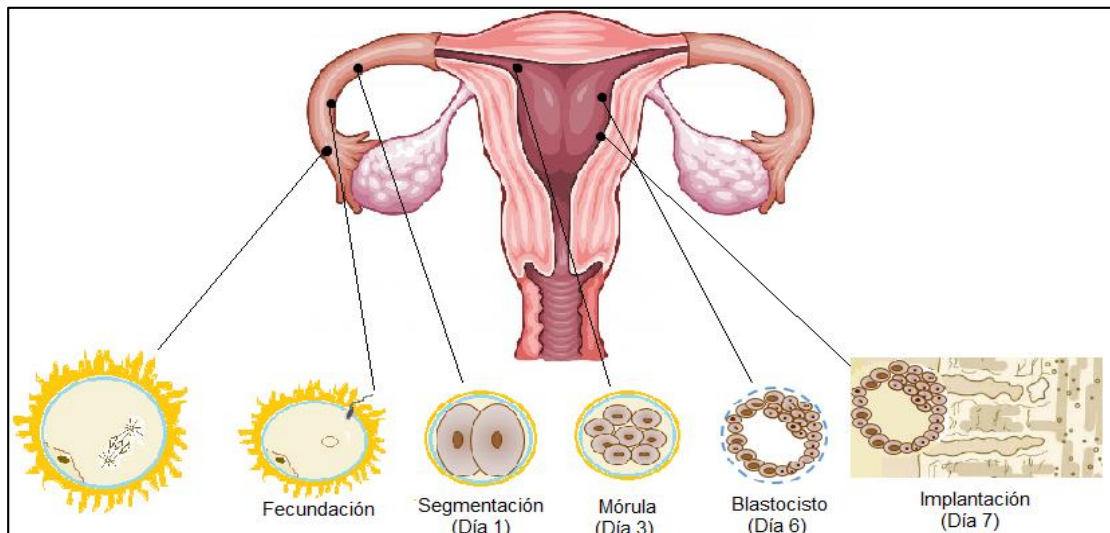
## 2. DESARROLLO EMBRIONARIO HUMANO

Durante el desarrollo prenatal a partir del cigoto se va a formar un organismo multicelular complejo, con una anatomía particular que incluye un conjunto de órganos y estructuras formados por células especializadas que cumplen diferentes funciones.

Tras la fecundación del óvulo por el espermatozoide se inicia la etapa de segmentación, en la que el cigoto sufre divisiones mitóticas sucesivas originando células denominadas blastómeros. Entre el tercer y cuarto día existe un conglomerado de unos 16 blastómeros dentro de la zona pelúcida, denominada mórula. Cuando el embrión tiene aproximadamente 8 células ocurre el fenómeno de compactación en la que los blastómeros más externos establecen uniones en hendidura entre sí, perdiendo su identidad individual. En esta etapa el embrión en conjunto se denomina blastocisto (Arteaga y García, 2014).

En la etapa de blastocisto, el embrión está conformado por dos tipos de células: una capa epitelial externa, el trofoblasto que rodea al embrioblasto o masa celular interna. Entre éstos se forma una cavidad llamada blastocelo. Las células de la masa interna darán origen al cuerpo del embrión y de varias estructuras extraembrionarias, mientras que, las células del trofoblasto dan origen a estructuras extraembrionarias como la placenta (Arteaga y García, 2014). En el día  $5\pm 1$  después de la fertilización, el blastocisto incluido en la zona pelúcida llegará a la cavidad uterina, donde se desprende de la zona pelúcida, y a partir del día  $7\pm 1$ , iniciará el proceso de implantación donde el embrión comienza a adherirse al revestimiento epitelial del endometrio. Las células del trofoblasto que están en contacto con el embrioblasto entran en contacto con el epitelio endometrial y comienzan a proliferar formando el citotrofoblasto y el sincitiotrofoblasto multinucleado. El sincitiotrofoblasto rompe el epitelio endometrial y se introduce en el estroma del endometrio, así entre el día 10 a 12

el embrión está incluido por completo en el endometrio (Arteaga y García, 2014; Carlson, 2014).



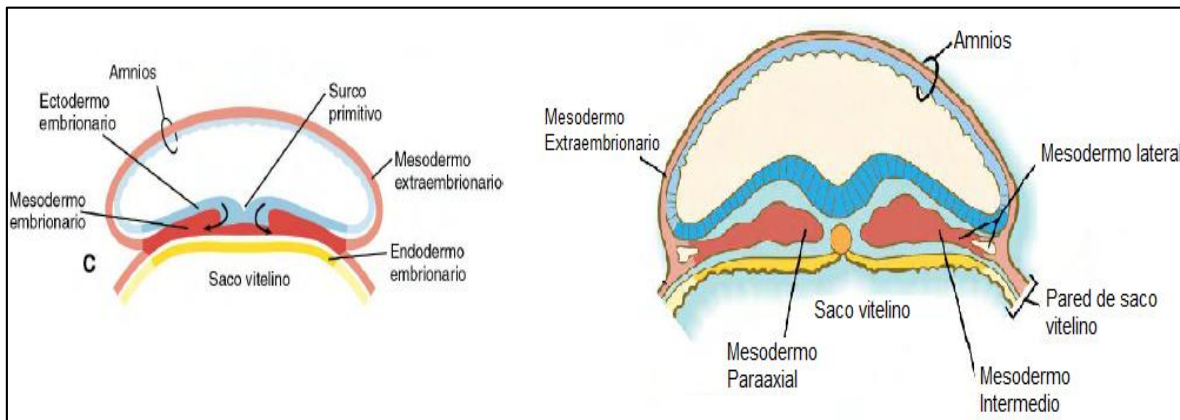
**Imagen 13.** Representación de la fertilización, desarrollo del cigoto e implantación en el endometrio. En la tercera semana inicia la gastrulación, proceso por el cual, en el disco embrionario bilaminar, las células del epiblasto migran a través de la línea primitiva y se forma el disco embrionario trilaminar conformado por las tres capas germinales embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo. Una vez constituidas las tres capas germinales, de ellas se derivan los diferentes tejidos y órganos (Arteaga y García, 2014).

De la capa ectodérmica surgen el sistema nervioso central y periférico, la hipófisis anterior y posterior, la retina y el cristalino, el oído interno, las glándulas sudoríparas y mamarias, la epidermis, incluso el cabello, las uñas y el esmalte dental (Carlson, 2014).

El mesodermo se segmenta dando lugar a la formación del mesodermo paraaxial, intermedio y lateral. Del mesodermo paraaxial se derivan los somites que dan origen a la mayor parte del esqueleto, músculos de la cabeza, cuello y tronco, además de la dermis y tejido conjuntivo. Del mesodermo lateral se originan las membranas serosas, el tejido conjuntivo y el músculo de las vísceras, el corazón, el esqueleto de los miembros, la pared de los sistemas digestivo y respiratorio y las células sanguíneas junto con el endotelio de los vasos sanguíneos. Del mesodermo intermedio surge la mayor parte del sistema urogenital (Carlson, 2014).

Del endodermo se originan las células secretoras de la tiroides y paratiroides, el parénquima del hígado y del páncreas, el epitelio y glándulas del tubo digestivo, de la faringe, de las

amígdalas, de la cavidad timpánica y del epitelio de revestimiento de la vejiga (Carlson, 2014).



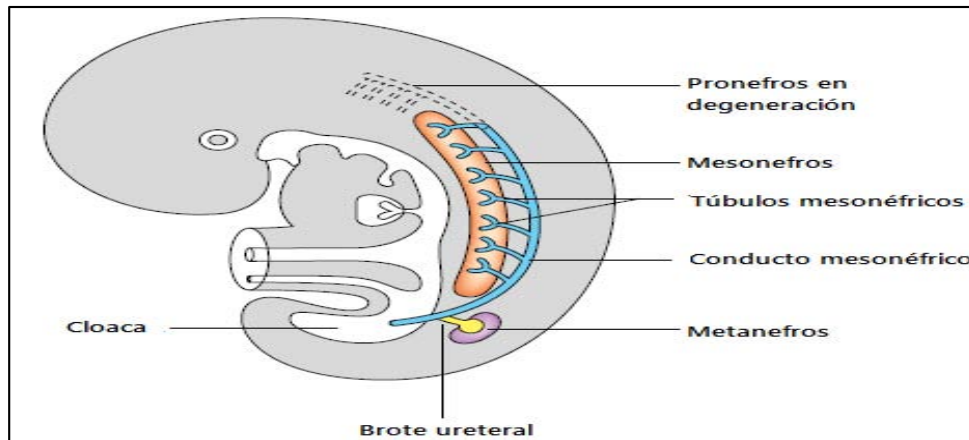
**Imagen 14.** Desarrollo de la notocorda y diferenciación del Endodermo, Ectodermo y Mesodermo. Delaminación del mesodermo (*der.*) (Tomado de Carlson, 2014).

## 2.1 ORIGEN EMBRIONARIO DEL SISTEMA URINARIO

En el individuo adulto los sistemas urinario y genital son funcionalmente independientes. Sin embargo, embriológicamente los dos sistemas guardan una estrecha relación ya que ambos provienen del mesodermo intermedio.

El desarrollo del sistema urinario pasa por tres etapas: pronefros y mesonefros que son formas tempranas del riñón que son reemplazadas, y metanefros responsable de la formación del riñón definitivo (Carlson, 204).

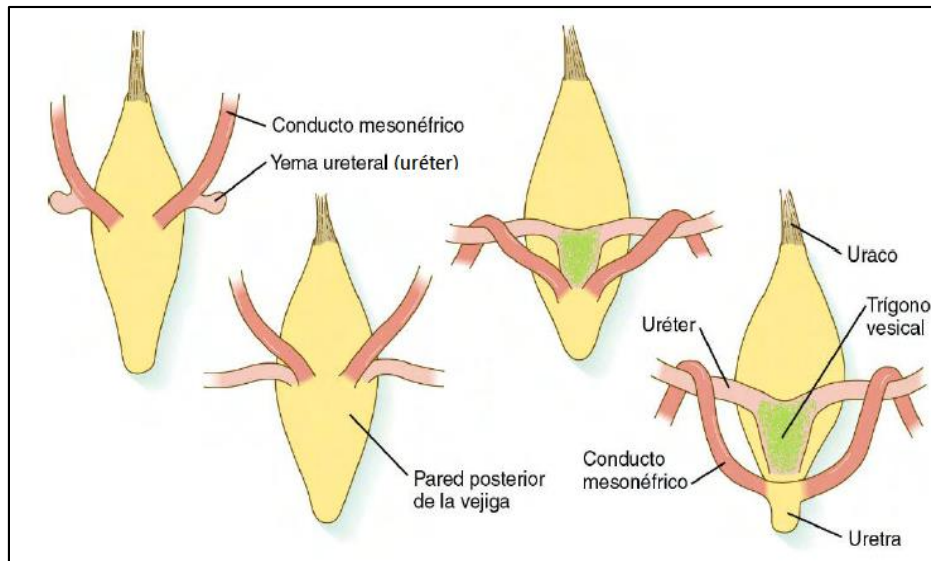
El pronefros aparece alrededor del día 22, está constituido por un grupo de cordones epiteliales llamados nefrotomos que se conectan originando los túbulos pronéfricos que se extienden hacia la cloaca. Conforme los túbulos pronéfricos se extienden, estimulan al mesodermo intermedio para formar al mesonefros, constituido de un glomérulo y un túbulo mesonéfrico contorneado. Los túbulos, que se extienden en sentido craneocaudal, conectan los glomérulos hacia el conducto mesonéfrico que recorre el mesonefros y se une con la cloaca. Alrededor del día 32 se desarrolla el metanefros a partir del blastema metanefrogénico que da lugar a la formación de las nefronas y de la yema o brote ureteral, que se desarrolla como una evaginación del conducto mesonéfrico, y que dará lugar a las vías urinarias (Carlson, 2014; Arteaga y García, 2014).



**Imagen 15.** Desarrollo de las formas tempranas del riñón. Vista lateral. (Tomado de Singh, 2012).

En la quinta semana de desarrollo comienza la división de la cloaca, terminación del extremo caudal del intestino posterior. El crecimiento del tabique urorectal produce la división de la cloaca en una porción anterior, el seno urogenital, y una porción posterior, el recto (Arteaga y García, 2014).

El seno urogenital se continúa con la alantoides cuya base dilatada se expande para formar la vejiga urinaria y su extremo distal se vuelve fibroso y da origen al uraco que en el individuo adulto corresponde al ligamento umbilical medio que une la vejiga con la región umbilical. Conforme crece la vejiga, su pared posterior incorpora los conductos mesonéfricos y a los uréteres, éstos últimos desembocan en la vejiga y quedan situados por arriba de los conductos mesonéfricos. De la región caudal de los conductos mesonéfricos surge el trígono vesical (Arteaga y García, 2014). El urotelio de la vejiga proviene del endodermo del seno urogenital, mientras que el resto de la pared surge del mesodermo esplácnico. La mucosa del trígono vesical es de origen mesodérmico y su epitelio es de origen endodérmico. El epitelio de la uretra deriva del endodermo del seno urogenital (Arteaga y García, 2014).



**Imagen 16.** Desarrollo de la vejiga. Vista dorsal. La ilustración muestra la incorporación de los conductos mesonéricos y los uréteres a la vejiga (Tomado de Carlson, 2014).

## 2.2 ORIGEN EMBRIONARIO DEL OVARIO

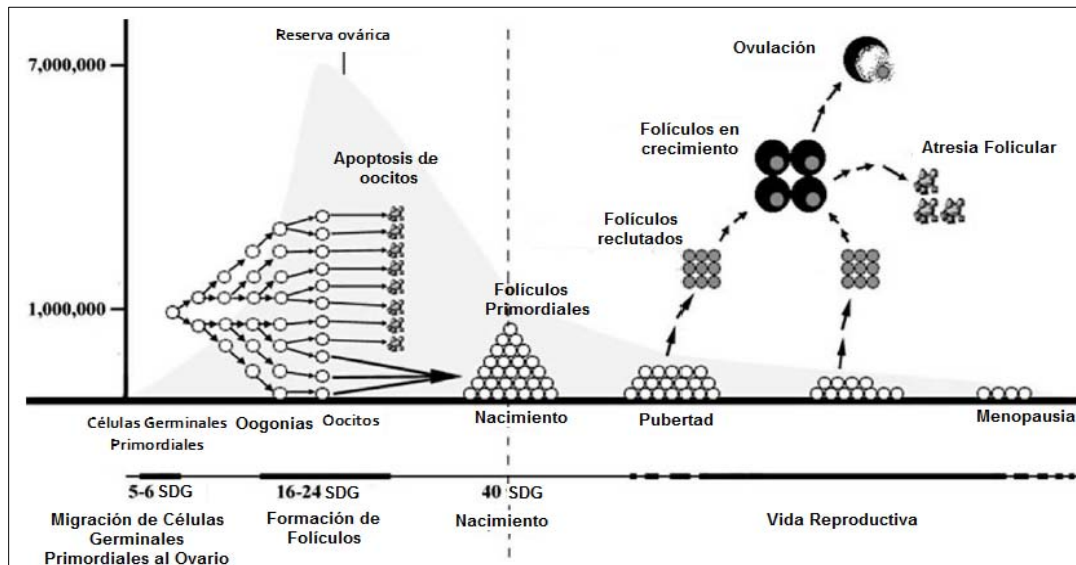
Las Células Germinales Primordiales (PGCs) son los primeros precursores de los gametos, se originan en el revestimiento del saco vitelino e inicialmente migran hacia el epitelio del intestino primitivo posterior para después desplazarse a través del mesenterio dorsal hasta alcanzar los primordios gonadales mediante movimientos ameboides (Carlson, 2014).

En la quinta semana de gestación las células germinales primordiales llegan a las gónadas y se transforman en ovogonias, en esta etapa, experimentan una fase de proliferación mitótica rápida. La presencia de las células germinales es esencial para la diferenciación ovárica ya que si éstas no migran a las cresta genitales la gónada no se diferencia (Carlson, 2014).

Poco después, las ovogonias proliferan brevemente por mitosis al tiempo que son rodeadas parcialmente por las células del tejido conjuntivo del ovario que le forman una monocapa de células epiteliales foliculares aplanadas y adoptan la forma de nidos de células. En la etapa fetal tardía las ovogonias entran a la primera división meiótica que se detiene en el diploteno de la profase I. Las ovogonias, que ahora se denominan ovocitos, se separan de los nidos de células y se asocian de manera individual a las células foliculares formando los folículos primordiales (Arteaga y García, 2014).

El bloqueo de la meiosis en los ovocitos se elimina hasta la pubertad. El establecimiento de las células germinales primordiales en la gónada en desarrollo y su diferenciación en

ovocitos incluidos en los folículos primordiales conforman la reserva ovárica, que se refiere al número total de folículos contenidos en cada ovario, este número se establece en la etapa fetal. Alrededor del 5° mes intrauterino el feto femenino tiene una reserva de 6-7 millones de ovocitos, muchos de ellos degeneran y al momento del nacimiento existen 1-2 millones de células germinales, al inicio de la menarca, el número es de aproximadamente 500,000 y sólo 400 folículos alcanzan su etapa de madurez a lo largo de la vida reproductiva; la disminución de la reserva decrece de manera drástica con la edad (Dixit et al., 2010).



**Imagen 17.** Disminución del número de células germinales y atresia folicular. Las células germinales primordiales migran al ovario durante el desarrollo embrionario. Su número incrementa por medio de la división mitótica pero la mayoría de los oocitos no sobrevive hasta el nacimiento (Modificada de Dixit et al., 2010).

### 3. CARIOTIPO HUMANO

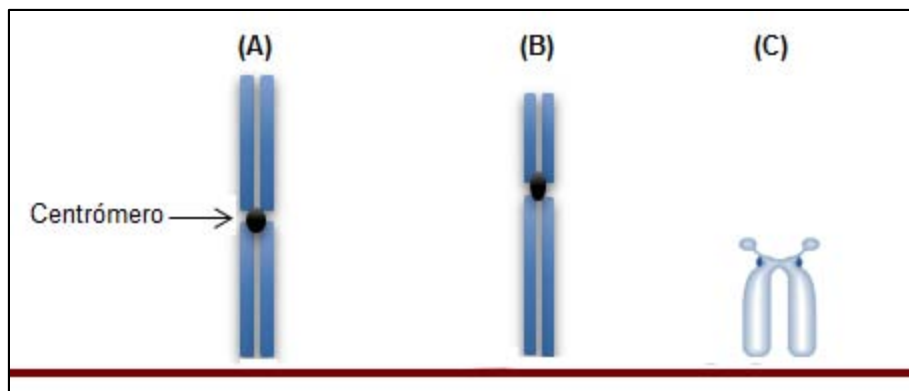
En 1956, Tjio y Levan descubrieron que en la especie humana el número normal de cromosomas en el núcleo de las células somáticas es de 46, 22 pares autosómicos (del 1 al 22) y un par de cromosomas sexuales o gonosomas (X-Y). La fórmula cromosómica normal en la mujer es 46, XX y 46, XY en el hombre. Los cromosomas están formados por DNA unido a proteínas, histonas y no histonas, que durante la interfase se encuentran en forma de cromatina y durante la división celular el DNA se replica y se condensa dando lugar al cromosoma metafásico (Lacadena, 1996; Oliva y Vidal-Taboada, 2006).

Los cromosomas están formados por dos cromátides hermanas unidas por el centrómero que está constituido de DNA alfoide con unidades de 171 pares de bases en tándem que se repiten entre 1700 y 2900 veces. El centrómero es de vital importancia ya que contiene



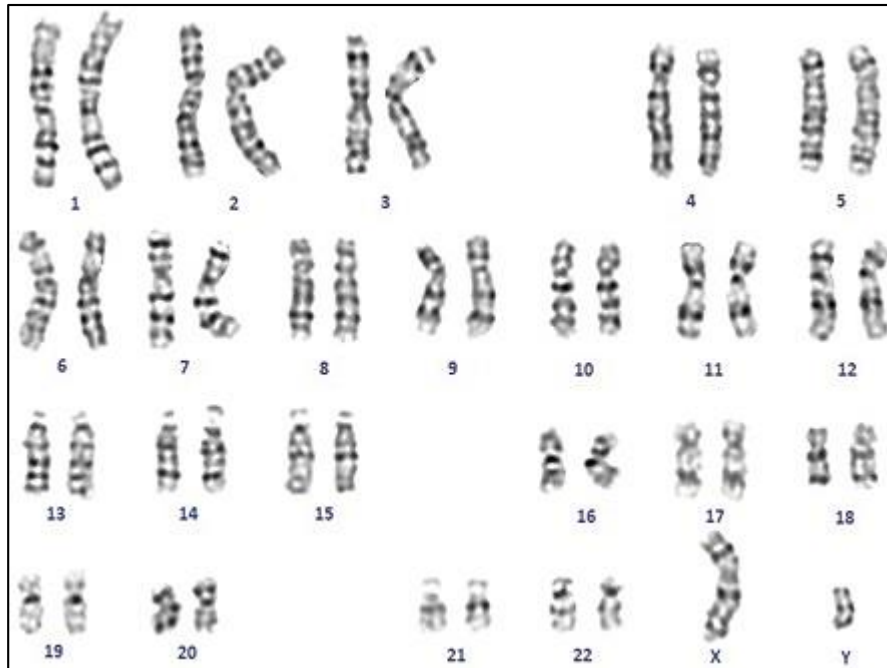
al cinetocoro que es el sitio exacto en donde se unen los microtúbulos del huso acromático en la división celular. Además, tiene dos telómeros, uno en cada extremo del cromosoma y consisten de una secuencia básica TTAGGG repetida varios miles de veces hasta formar un segmento de aproximadamente 10, 000 pares de bases. Estos segmentos terminales previenen la fusión entre los cromosomas y protegen a los cromosomas del ataque de nucleasas (Del Castillo et al., 2012).

El centrómero origina un estrechamiento o constricción primaria que divide al cromosoma en dos partes: brazos cortos (p) y brazos largos (q); según la posición del centrómero, los cromosomas se clasifican en metacéntricos, si el centrómero se ubica en el medio del cromosoma y la longitud de sus brazos es igual, submetacéntrico si el centrómero se encuentra más cerca de uno de los extremos y divide al cromosoma en dos porciones de diferente tamaño y acrocéntrico si el centrómero se encuentra cerca de un extremo del cromosoma, lo cual produce un brazo largo y el final del brazo corto muestra un botón o satélite (Pierce, 2010; Oliva y Vidal-Taboada, 2006).



**Imagen 18.** Clasificación de los cromosomas de acuerdo a la posición del centrómero: (A) Metacéntricos, (B) Submetacéntricos, (C) Acrocéntricos.

El cariotipo es la disposición ordenada de los cromosomas del núcleo de las células de un organismo según su tamaño, posición del centrómero y patrón de bandeo. Se distribuyen en 22 pares de autosomas homólogos numerados del 1 al 22 y por los cromosomas sexuales X y Y. Los cromosomas de tamaño semejante se reúnen en grupos que se designan por letras, de la A a la G; los cromosomas sexuales se asignan a los grupos C y G respectivamente de acuerdo a su tamaño (Oliva y Vidal-Taboada, 2006).



**Imagen 19.** Cariotipo masculino con bandas GTG (46, XY) (Tomado de Oliva y Vidal-Taboada, 2006).

El cariotipo se obtiene de cualquier tejido cuyas células estén en división o puedan ser estimuladas para dividirse mediante su cultivo, los linfocitos de sangre periférica son las células que más se utilizan para este fin aunque también se realiza con médula ósea, piel, células de líquido amniótico, fibroblastos, piel, vellosidades coriónicas, etc.

La metodología para obtener cromosomas metafásicos de linfocitos consiste en mezclar de 8-10 gotas de sangre venosa heparinizada con 10mL de medio de cultivo y adicionar fitohemaglutinina, lectina que estimula la actividad mitogénica en linfocitos T. Al transcurrir 48 horas de incubación los cultivos ya contienen células en división, el máximo índice mitótico ocurre a partir de las 64 a las 72 horas de cultivo (Lisker et al., 2014).

Tras el cultivo celular se procede al tratamiento de las células con colchicina o colcemid que inhibe la polimerización de los microtúbulos interrumpiendo la formación del huso mitótico, de esta manera detiene la división celular en la metafase. El siguiente paso consiste en aplicar una solución hipotónica que hace que las células se hinchen y logra evitar la superposición de los cromosomas. Después del tratamiento con solución hipotónica se procede a la fijación con solución de Carnoy (Metanol-ácido acético 3:1) para preservar la estructura de los cromosomas. Finalmente se gotea la suspensión celular sobre una portaobjetos con lo cual las células estallan y los cromosomas aparecen distribuidos en la superficie de la laminilla (Lisker et al., 2014; Oliva y Vidal-Taboada, 2006).

Para visualizar e identificar a los cromosomas se procede al bandeo cromosómico que se refiere a las regiones claras y oscuras a lo largo de los cromosomas producidas después de la tinción con colorantes específicos. La técnica de bandeo más utilizada en citogenética es el bandeo G en la que los cromosomas se someten al tratamiento con enzimas proteolíticas como la tripsina seguido por la tinción con colorante de Giemsa. Como resultado de esta técnica se producen bandas oscuras y bandas claras cuyo patrón es único para cada par cromosómico. Las diferencias en la estructura y composición del DNA son responsables de la respuesta a la tinción, así, las bandas oscuras o positivas corresponden a regiones de DNA ricas en A-T, cuyo DNA replica tardíamente en la fase S y con baja densidad de genes mientras que las bandas negativas o claras son ricas en G-C que replica al inicio de la fase S y contiene la mayoría de los genes codificantes (Brenner y Miller, 2013).

El número de bandas obtenidas tras la técnica de bandeo determina la resolución de los cromosomas, en metafase tardía se obtiene una resolución de 350-400 bandas. El bandeo permite la identificación y diagnóstico de alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales como deleciones, duplicaciones, translocaciones e inversiones con un límite de detección de 5-10Mb. (Brenner y Miller, 2013). La nomenclatura internacional, ISCN, determina el orden y el sistema de símbolos con los que se reporta un cariotipo; en primer lugar se escribe el número total de cromosomas seguido del complemento de cromosomas sexuales, en tercer lugar se describe la anomalía cromosómica, si existe. Aunado a este sistema se emplea un sistema de nomenclatura de bandas que actúan como puntos divisorios en cada brazo de los cromosomas, este sistema permite la descripción de los sitios en donde ha ocurrido algún rompimiento o rearrreglo cromosómico así como la localización de locus génicos. Para designar una banda se coloca primero el número del cromosoma, seguido del símbolo del brazo involucrado, el número de la región, el número de la banda seguido del número de la sub banda (Lisker et al., 2014).

#### 4. HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH)

Los primeros estudios de Hibridación in situ (ISH) fueron desarrollados independientemente por Pardue y Gall, y John y col. en 1969. Originalmente, se empleaban sondas marcadas con isótopos radioactivos para hibridar con la secuencia complementaria de DNA y la detección se realizaba con autorradiografía. Este método de marcación de sondas tuvo inconvenientes como: 1) la naturaleza inestable de los isótopos, 2) se necesitaban largos tiempos de exposición para la autorradiografía, 3) las sondas radioactivas proporcionan una

limitada resolución porque la emisión de la partícula radioactiva deja cometas, no señales discretas y 4) los isótopos radioactivos son un material costoso y peligroso que debe ser transportado, manejado y dispuesto de acuerdo a ciertas regulaciones (Levsky y Singer, 2003).

En los 80's se desarrollaron métodos de marcación no radioactivos, como los fluorocromos que pueden unirse de manera directa a las sondas, de esta manera nace la Hibridación in situ con Fluorescencia (FISH). La técnica de FISH permite detectar y localizar secuencias específicas de ácidos nucleicos (DNA o RNA) en preparaciones cromosómicas, extensiones celulares y cortes de tejido; el análisis de la hibridación se realiza directamente con microscopios de fluorescencia y por lo tanto se obtienen resultados en menor tiempo. Actualmente es posible el uso simultáneo de dos o más fluorocromos que permiten el análisis de múltiples secuencias de DNA en la misma hibridación y existen numerosos kits de sondas disponibles comercialmente (Tubbs y Stoler, 2009).

La técnica de FISH se realiza como complemento de la citogenética clásica pues identifica con mayor precisión la presencia de anomalías cromosómicas numéricas, aneuploidías o mosaicismo, y anomalías estructurales como es el caso de los rearrreglos cromosómicos complejos, microdeleciones o microduplicaciones que son difíciles de analizar en el cariotipo. Aplicando la técnica de FISH se puede conocer la frecuencia real de células con la alteración cromosómica frente a la población celular total, permite analizar un gran número de células de manera rápida y sencilla y no requiere que las células se encuentren en división. Por todo esto se considera a la técnica de citogenética molecular una herramienta valiosa en el ámbito clínico y de investigación.

#### 4.1 FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

La técnica de FISH se define como la alineación complementaria exacta entre una secuencia de DNA marcada con un fluorocromo (sonda) y la secuencia de DNA blanco que permite la visualización de la localización espacial de secuencias específicas dentro de una preparación celular. Esta metodología puede aplicarse tanto en cromosomas como en interfase y puede realizarse en diversos tipos celulares.

El protocolo estándar de FISH se basa en cinco pasos básicos:

1. Preparación del material biológico: el procedimiento para obtener las células que se deseen analizar bajo la técnica de FISH está determinado por la naturaleza de la muestra.

Las laminillas deben contar con un número adecuado de células (de acuerdo a la cantidad de núcleos o metafases que se requiera analizar) y que éstas se encuentren bien distribuidas, sin solapamientos, a lo largo de la laminilla. La calidad de la laminilla puede influenciar en los resultados de la técnica de FISH, cuando las preparaciones tienen características óptimas (número y dispersión adecuada) los pasos posteriores de la técnica se ven favorecidos, por ejemplo, el tratamiento con proteasas y el acceso de la sonda, además de reducir el background (Bayani y Squire, 2004).

Un paso importante es la fijación, este proceso previene la autólisis y la degradación del tejido con la finalidad de preservar la morfología del material biológico y obtener el máximo de retención de las secuencias de DNA de interés. Las soluciones fijadoras se clasifican en dos categorías de acuerdo a su mecanismo de acción: fijadores desnaturizantes y fijadores de entrecruzamiento (o adición). Los fijadores más utilizados son el formaldehído que actúa sobre las proteínas, su grupo aldehído se combina con el grupo amino de la lisina formando puentes de metileno, de igual manera produce entrecruzamientos con los grupos fenol, indol, aminometilol e imidazol de aminoácidos como arginina, tirosina, asparagina, histidina y glutamina a través de una reacción conocida como reacción de Mannich. Por otra parte la solución de Carnoy metanol/ácido acético (3:1) actúa como desnaturizante, se utiliza en preparaciones de células y cromosomas; el alcohol presente en la solución provoca la desnaturización de las proteínas ya que elimina el agua de los grupos carboxilo, hidroxilo, amino, amido e imino presentes en las proteínas, lo cual, produce su coagulación y la contracción de las células; el ácido acético funciona como coagulante, actúa sobre los ácidos nucleicos pero en general no fija proteínas. Se incorpora en fijadores compuestos puesto que ayuda a prevenir la pérdida de los ácidos nucleicos y a que contrarresta la contracción causada por el metanol ya que hace que el colágeno se hinche. El ácido acético tiene una tasa de penetración elevada, pero los fijadores que lo contienen lisan a los eritrocitos (Howat y Wilson, 2014; Kiernan, 2000).

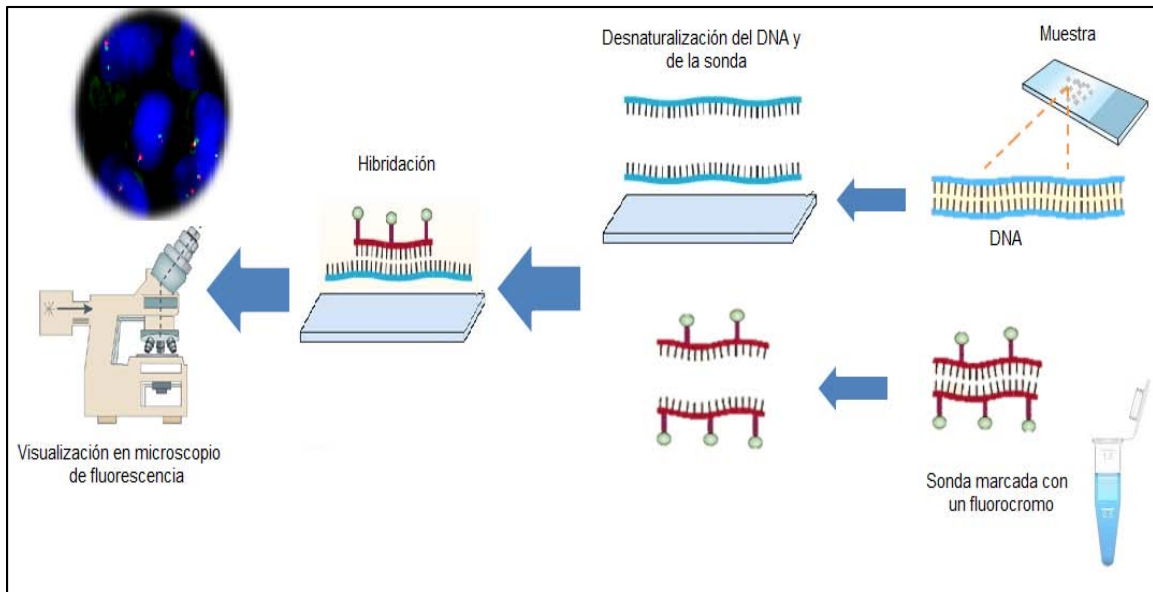
Es importante tener en cuenta el tiempo de fijación, el cual depende del tamaño de la muestra, para células aisladas, 20 minutos son suficiente, si se excede el tiempo de fijación los pasos subsecuentes de permeabilización y digestión enzimáticas tendrán que ser más agresivos, además puede disminuir la intensidad de la señal (Quintanilla, 2004).

2. Pretratamiento: La finalidad del pretratamiento es incrementar la eficiencia de la hibridación y reducir las uniones inespecíficas o el background, lo cual, se consigue a través de procedimientos cuyo objetivo es incrementar la permeabilidad de las células. Existen

diversos procedimientos de pretratamiento como por ejemplo, el procesamiento con solventes orgánicos (etanol o metanol) que actúan removiendo los lípidos de membrana, la hidrólisis con HCl diluido y la digestión proteolítica, que es considerado como un procedimiento clave para incrementar la accesibilidad al DNA blanco. La digestión proteolítica se realiza con enzimas como la pepsina o proteinasa K para remover componentes del citoplasma e incrementar el acceso de la sonda al DNA diana a través de la degradación de proteínas que interaccionan con el material genético. La concentración de la enzima y el tiempo de tratamiento dependen del tipo de tejido, si se somete a un tratamiento de corta duración, la permeabilización de las células sería deficiente y esto repercute en el acceso de la sonda y en la hibridación. En el caso contrario, la incubación con enzimas proteolíticas por períodos prolongados resulta en la digestión excesiva de las células, lo cual daña la integridad morfológica y afecta a la intensidad de la señal. Posterior a esta etapa se debe detener el proceso de digestión lavando en solución salina como PBS o Tris-buffer seguido de una breve fijación, generalmente con formalina, de lo contrario el tejido sufriría una desintegración. Adicionalmente a los procedimientos mencionados se somete a las células a períodos de incubación en buffer que preparan los ácidos nucleicos para la hibridación como la solución 20 XSSC diluida (Petersen et al., 2004; Pulido, 2010; Jin y Lloyd, 1997).

3. Desnaturalización de la sonda y la muestra: Para que la sonda pueda alinearse y unirse con su DNA blanco es necesario separar las cadenas de la doble hélice, lo anterior se logra mediante la desnaturalización por acción de reactivos suaves como álcalis, formamida o urea, o bien, al elevar la temperatura. La desnaturalización por calor es el método más común. Deben evaluarse las condiciones óptimas de desnaturalización en cuanto a factores como el tiempo de desnaturalización, la temperatura, que dependerá del contenido de G-C, la concentración de sales, y el pH (Petersen et al., 2004).

4. Hibridación: Al disminuir la temperatura a la cual se logró la separación de la doble hélice se dan las condiciones óptimas para que, por complementariedad de bases la sonda se una al DNA blanco a través de enlaces por puente de hidrógeno. La hibridación de la sonda depende de la capacidad de renaturalización del DNA justo por debajo de su  $T_m$ , que es la temperatura a la cual el 50% del DNA se encuentra como DNA de cadena simple (Jin y Lloyd, 1997).



**Imagen 20.** Principio de la técnica de FISH.

La renaturalización y por tanto la hibridación dependen de diversos parámetros como:

- La temperatura, la tasa máxima de renaturalización es de 25°C pero se puede llevar a cabo en un rango que va de 16 a 32°C por debajo del valor de la T<sub>m</sub>.
- pH, normalmente la renaturalización no se altera con el pH siempre y cuando su valor se encuentre entre 5 a 9.
- Concentración de cationes monovalentes: los cationes monovalentes establecen interacciones electrostáticas con los grupos fosfato, de tal manera que, a altas concentraciones de los cationes disminuye la repulsión electrostática entre las cadenas de DNA, incrementando la estabilidad del híbrido.
- La longitud de la sonda tienen influencia en los resultados de la hibridación, sondas largas forman híbridos más estables ya que la unión de la sonda con el DNA involucra un número considerable de bases.
- La composición de la sonda, las sondas con mayor contenido de G-C tienden a formar uniones más estables debido al triple puente de hidrógeno que se establece entre estos dos nucleótidos a diferencia de los dos puentes de hidrógeno que se forman entre A-T.
- Concentración de la sonda: A mayor concentración de la sonda, mayor índice de renaturalización, pero por otro lado incrementa el background (Pulido, 2010).

Los parámetros mencionados determinan la astringencia de la hibridación, definida como el grado de especificidad en el apareamiento de la sonda con su secuencia diana, supone una medida de la capacidad de reconocimiento entre las dos secuencias. Entre mayor sea el rigor o astringencia solamente serán estables los híbridos apareados por completo (Pulido, 2010).

5. Lavados post-hibridación: Después de la hibridación, debe eliminarse la sonda que no hibridó así como la hibridación no específica, que es inestable a comparación de los híbridos perfectamente homólogos. Las preparaciones son sometidas a una serie de lavados de astringencia creciente, la astringencia o rigor está influenciada por la temperatura, concentración de sales, concentración de detergente y la duración del proceso (Bayani y Squire, 2004).

Inicialmente, las preparaciones se someten a un lavado de alto rigor a elevada temperatura (60-73°C), con detergente y buffer de alta concentración de sales como SSC, a menor concentración de este buffer es mayor la astringencia, así la solución 0.1XSSC desestabiliza el DNA más rápidamente que la solución 2XSSC. Posteriormente se realiza un lavado de menor astringencia, suave con los híbridos estables pero efectivo en la remoción de la sonda no hibridada, a temperatura ambiente con buffer de concentración 2XSSC y una concentración menor de surfactante.

Existe una amplia variedad de detergentes como Tween 20 que tiene un efecto potente si se utiliza en las soluciones de lavado y por tanto impacta en la intensidad de la señal. Como alternativa se puede utilizar NP-40, detergente no iónico que se emplea tanto en FISH como en ELISA e inmunohistoquímica para reducir el background (Bayani y Squire, 2004).

6. Detección de la sonda marcada y Análisis al microscopio: El paso final de la hibridación in situ es la detección de la sonda marcada en las células o tejido. Para esto se realiza la contratinción de los núcleos o cromosomas con DAPI (4'6-diamino-2-fenilindol), colorante fluorescente que se une al zurco menor del DNA en regiones ricas en AT, y el montaje de la laminilla con agentes que preservan la fluorescencia. Finalmente, se observa la laminilla a través de un microscopio de fluorescencia, el cual utiliza iluminación de alta intensidad (lámpara de halógeno-cuarzo, arcos de mercurio o xenón) para excitar a los fluorocromos presentes en la sonda. Cada fluorocromo es excitado con una longitud de onda específica, la molécula absorbe fotones y al hacerlo sus electrones son excitados a un nivel de energía más alto, cuando vuelven a su estado fundamental la energía vibracional se pierde y como

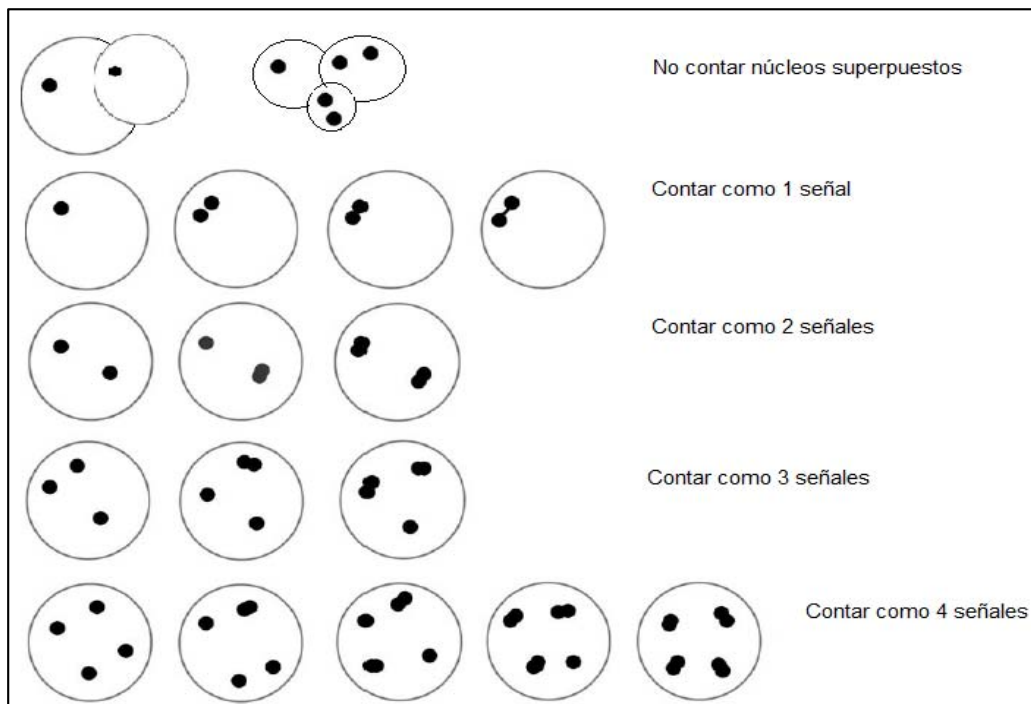


resultado emiten luz de longitud de onda más larga, dentro del espectro visible. Los microscopios de fluorescencia y el objetivo enfocan la luz de excitación y recolectan la luz que regresa al ocular o detector. La fluorescencia se separa de la luz de excitación por medio de un espejo dicróico y de los filtros apropiados que transmiten la fluorescencia excluyendo y/o transmitiendo las longitudes de onda de luz seleccionadas, optimizan la fluorescencia y reducen el ruido de fondo o background no deseado. Los microscopios de fluorescencia pueden estar acoplados a un detector que se encarga del registro, procesamiento y almacenamiento de imágenes (Nikon, 2015; Spring, 2003; Haaf, 2006).

Los criterios de evaluación de FISH definen cómo contabilizar las señales en base a la integridad de la señal, su tamaño, superposición, etc. De igual manera dictan criterios de exclusión de células para el análisis. La objetividad del análisis de FISH depende del conocimiento y correcta aplicación de estos lineamientos. El análisis de células en interfase usualmente se realiza para la enumeración de cromosomas utilizando sondas centroméricas; a continuación se dan algunas recomendaciones para el análisis:

- Seleccionar las áreas de análisis a lo largo de la laminillas. Si la región tiene mucho ruido de fondo o la intensidad de la señal es deficiente o no hay señal, se excluye esa área para el análisis.
- Seleccionar núcleos que no se encuentren rodeados de restos de citoplasma, que estén intactos y cuyos bordes estén bien definidos.
- Elegir núcleos libres, que no se superpongan con otros, cuyas señales tengan la misma intensidad.
- Enfocar de arriba a abajo en el eje z para revisar si existen señales en esa configuración espacial.
- Seleccionar núcleos con señales de la misma intensidad.
- No se contabilizan señales débiles e inespecíficas. Estas señales se reconocen por su baja intensidad y forma que difieren de la señal normal.
- Cuando se encuentran dos señales unidas por una hebra fluorescente se cuenta como una señal, lo mismo ocurre si se encuentran señales separadas pero continuas o cuya separación no exceda al tamaño de una de ellas. En ocasiones las sondas centroméricas generan señales que no son totalmente esféricas y que pueden presentarse difusas o dispersas en la cromatina de los núcleos en interfase.
- Se cuentan como dos señales si el espacio de separación entre éstas equivale al tamaño de una de ellas.

- Incluir en el conteo únicamente a los núcleos en los que se pueda interpretar la señal y excluir aquellos que sean poco concluyentes (Bayani y Squire, 2004).



**Imagen 21.** Representación esquemática de los criterios de evaluación de FISH. Las imágenes corresponden a la hibridación con sondas centroméricas o de locus específicos en núcleos interfásicos. (Tomada de Bayani y Squire, 2004)

## 4.2 TIPOS DE SONDAS

La disponibilidad comercial de numerosas sondas para FISH ha logrado que la técnica tenga una amplia aceptación y aplicación en el campo clínico y de investigación. Existen tres clases de sondas para FISH: sondas centroméricas, sondas de locus específico, y las sondas de pintado cromosómico; conocer sus características ventajas y limitaciones ayuda a elegir la sonda adecuada para el estudio que se desee realizar.

### a) Sondas Centroméricas

Las sondas centroméricas (CEP) hibridan con secuencias altamente repetitivas de DNA  $\alpha$  satélite presentes en la región centromérica o pericentromérica de los cromosomas humanos. La secuencia de estas sondas es seleccionada de tal manera que es específica para cada par cromosómico, por lo tanto, son útiles para la detección y enumeración de cromosomas específicos en metafases o núcleos interfásicos (Tubbs y Stoler, 2009).

Las características de las sondas centroméricas limitan su aplicación al estudio de aneuploidías en estudios prenatales, en la determinación del porcentaje de células con complemento cromosómico anormal en pacientes con mosaicismo o en neoplasias y tejidos donde el proceso de cultivo puede presentar un problema. Como desventaja de este tipo de sonda es que no puede detectar anomalías estructurales en el cromosoma, de tal manera que, si existe una deleción en el cromosoma blanco pero la región centromérica está intacta la sonda genera la misma señal (Tubbs y Stoler, 2009).

#### **b) Sondas de locus específico**

Las sondas de locus específico hibridan con una región de interés y por lo tanto están compuestas principalmente por secuencias únicas, su longitud va de 100 a 300 kilobases necesarias para producir una señal visible y se pueden emplear en cromosomas en metafase o en núcleos en interfase. Este tipo de sondas se utilizan para la detección de microduplicaciones o microdeleciones las cuales, son indetectables mediante la citogenética clásica. El desarrollo de FISH multicolor hizo posible aplicar más de una sonda de locus específico para detectar dos o más secuencias de ácidos nucleicos al mismo tiempo, lo que las hace útiles en la tipificación de translocaciones presentes en algunas leucemias (Tubbs y Stoler, 2009).

#### **c) Sondas de pintado cromosómico**

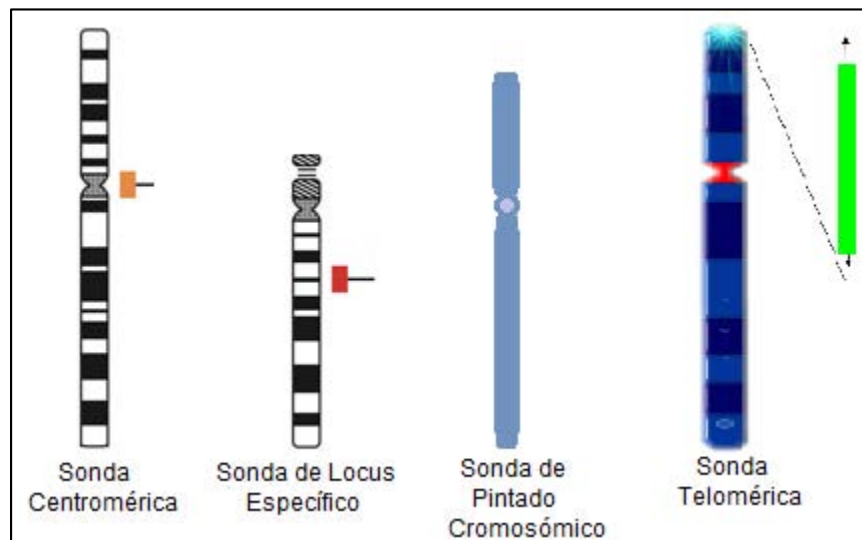
Se trata de una mezcla de sondas marcadas con un fluorocromo que hibridan con secuencias distribuidas a lo largo de un cromosoma, esta mezcla se aplica solamente en preparaciones cromosómicas en una reacción de hibridación, el resultado es el “pintado” del cromosoma de interés. Esta clase de sondas hace posible el análisis de aneuploidías y la identificación de anomalías estructurales como translocaciones. Las limitaciones de esta clase de sonda incluyen la incapacidad de detectar cambios estructurales dentro de un mismo cromosoma (ej. Inversiones), restringido poder de resolución en el análisis de rearrreglos cromosómicos complejos y que sólo es aplicable en cromosomas en metafase (Yung, 1996).

#### **d) Sondas teloméricas**

Actualmente existen sondas específicas de cada telómero, los telómeros son los segmentos terminales de cada cromosoma y están constituidos por cientos de nucleótidos repetidos (TTAGGG), son importantes en el proceso de replicación del DNA y para la estabilidad de

los cromosomas. Varios estudios sugieren que los teloméros están involucrados en eventos como deleciones terminales, amplificación génica y translocaciones crípticas (Yung, 1996).

Las sondas teloméricas se utilizan en la evaluación el análisis y detección de translocaciones crípticas y deleciones así como la verificación de la integridad terminal de los cromosomas en neoplasias (Yung, 1996).



**Imagen 22.** Las diferentes clases de sondas en FISH.

#### 4.3 CRITERIOS DE DIAGNÓSTICO DE MOSAICISMO DE BAJA PROPORCIÓN

El mosaicismo de baja proporción es una causa conocida de diferentes síndromes y está implicado en diversas enfermedades multifactoriales. Sin embargo, a pesar de su relevancia, la mayoría de los casos de mosaicismo de baja proporción permanecen sin diagnóstico debido a que la proporción de células con la anomalía cromosómica es casi imperceptible mediante el análisis citogenético de rutina. La introducción de la hibridación in situ con fluorescencia (FISH) que permite el análisis de un gran número de células hace posible la detección del mosaicismo de baja proporción.

La presencia de mosaicismo de baja proporción relacionado con aneuploidías en cromosomas sexuales, se ha asociado con el desarrollo sexual anormal, falla ovárica prematura e infertilidad, sin embargo, el significado biológico no es totalmente claro. Para algunos autores, el mosaicismo de baja proporción está definido por la presencia de <6% de células anormales (Homer et al., 2010), otros consideran un rango de 5-10% (López et al., 2012) de células aneuploides y existe un rango más amplio de 7-30% (Robberecht et al., 2010); hasta ahora, no existe un acuerdo que uniformice este parámetro.

## 5. ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

Las anomalías cromosómicas pueden ser numéricas o estructurales y pueden afectar a los autosomas, a los cromosomas sexuales o a ambos simultáneamente. Las anomalías cromosómicas ocurren en aproximadamente 0.7% de nacidos vivos, este número no incluye a los casos de pérdida gestacional, defectos al nacimiento y retraso mental. El impacto clínico y social de las anomalías cromosómicas es enorme. El tipo de anomalía cromosómica más frecuente con repercusión clínica es la aneuploidía que se asocia con deficiencia en el desarrollo físico, mental o ambos. Las translocaciones, intercambio de segmentos entre cromosomas no homólogos, son también relativamente frecuentes pero su significado clínico varía dependiendo de su localización y si la translocación es balanceada o no (Nussbaum, 2008).

Las consecuencias fenotípicas de una alteración cromosómica dependen de su naturaleza específica, de los genes afectados por la alteración y de la probabilidad de su transmisión a la siguiente generación (Nussbaum, 2008).

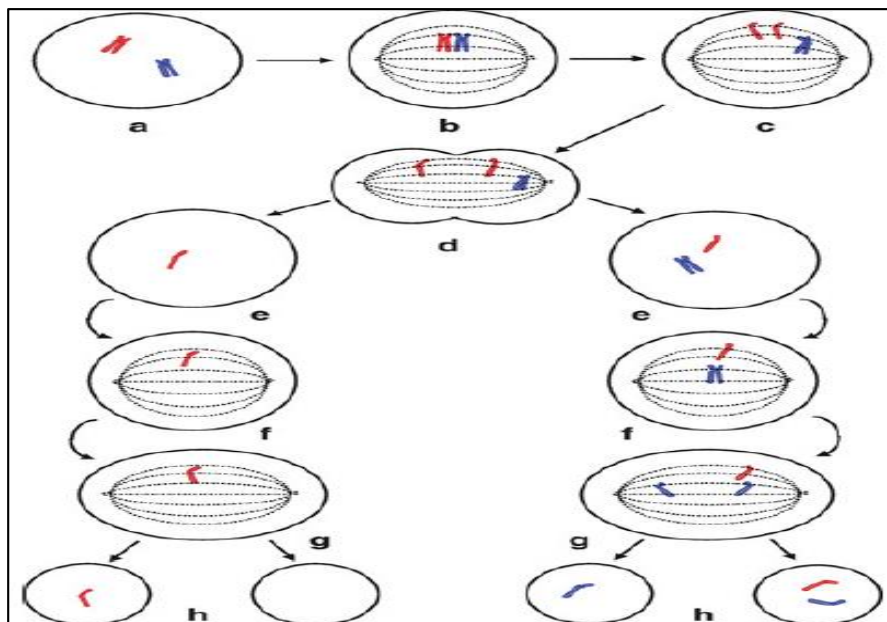
### 5.1 ALTERACIONES CROMOSÓMICAS NUMÉRICAS

Se denomina euploidía al múltiplo exacto del número haploide ( $n$ ) de cromosomas. Las células somáticas del ser humano tienen un número diploide de cromosomas ( $2n$ ). Además del número diploide característico de las células somáticas normales, en ocasiones se observan complementos cromosómicos euploides anormales: la triploidía ( $3n$ ) y la tetraploidía ( $4n$ ). Aunque ambas poliploidías no son compatibles con la vida, la triploidía ocurre en el 1-3% de las fecundaciones y entre los embriones que sobreviven hasta el final del primer trimestre de la gestación. La dispermia y la no disyunción meiótica son los mecanismos por los cuales se producen este tipo de anomalías. (Rosenberg y Rosenberg, 2012; Nussbaum, 2008).

La aneuploidía se refiere a la pérdida o ganancia de cromosomas completos, es el trastorno cromosómico humano más común y tiene lugar en al menos 5% de las gestaciones reconocidas. La mayoría de los pacientes aneuploides presentan trisomías (tres copias de un cromosoma) y con menor frecuencia monosomías (sólo una copia de un cromosoma). Sólo las trisomías de los autosomas 13, 18 y 21 y de los sexocromosomas X y Y son compatibles con la vida, esto puede explicarse por la baja densidad génica de los cromosomas 13, 18, 21 y Y además de la inactivación de las dos copias extra del

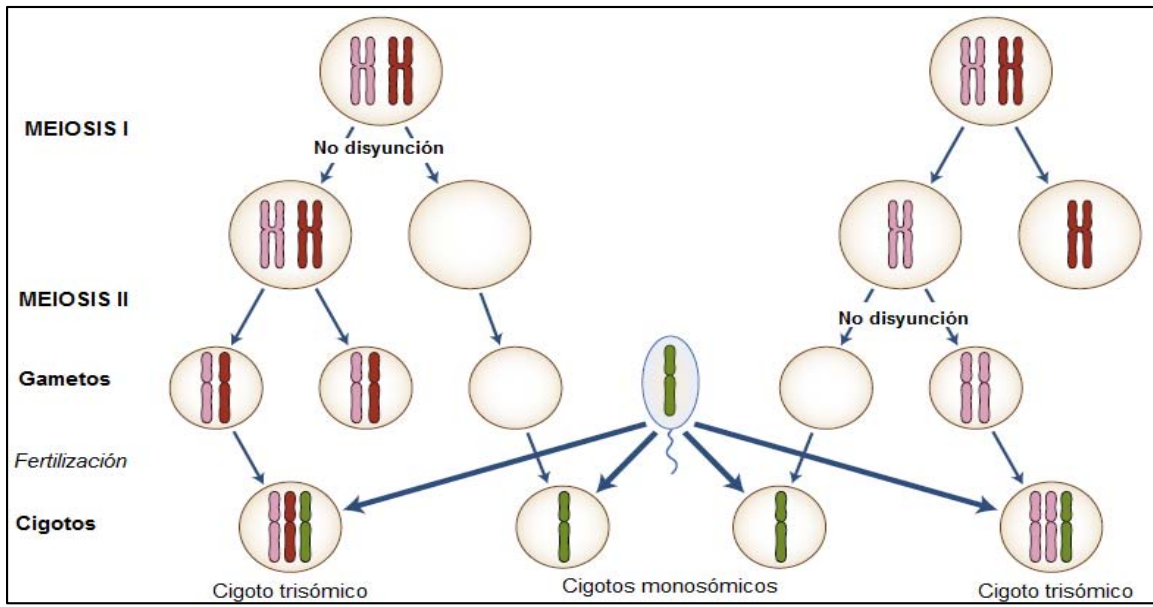
cromosoma X. La monosomía casi siempre es letal a excepción de la monosomía del X (Rosenberg y Rosenberg, 2012).

El rezago anafásico es uno de los mecanismos que ocasionan aneuploidías, esto ocurre durante la meiosis I cuando uno de los cromosomas retrasa su desplazamiento hacia uno de los polos de la célula en la anafase debido a que sus cromátides hermanas se separan prematuramente. Como resultado del rezago anafásico una de las cromátides se desplaza hacia un polo celular y la otra se segrega junto con el cromosoma homólogo en el polo opuesto. Esto da lugar a la existencia de gametos nulisómicos y con dos copias de un cromosoma (Jin-Chen, 2013).



**Imagen 23.** Representación esquemática del rezago anafásico en meiosis I. (a) Profase I. (b) Metafase I. (c) Anafase I, separación prematura de las cromátides de uno de los homólogos. (d) Telofase I, una de las cromátides se segrega con el cromosoma homólogo. (e) Resultado de la meiosis I. (f) Metafase II. (g) Anafase II. (h) Gametos resultantes: dos gametos con complemento cromosómico normal, un gameto nulisómico y un gameto con dos copias del cromosoma (Tomada de (Jin-Chen, 2013).

La no disyunción es el principal mecanismo por el cual se originan las aneuploidías, involucra un error en la separación de un par de cromosomas durante alguna de las dos divisiones meióticas, comúnmente en meiosis I. Las consecuencias de la no disyunción en meiosis I o en meiosis II son diferentes; cuando ocurre en meiosis I, el gameto con 24 cromosomas contiene los miembros materno y paterno del par cromosómico, mientras que, si ocurre en meiosis II el gameto con el cromosoma extra contiene ambas copias del cromosoma paterno o ambas del materno (Rosenberg y Rosenberg, 2012).



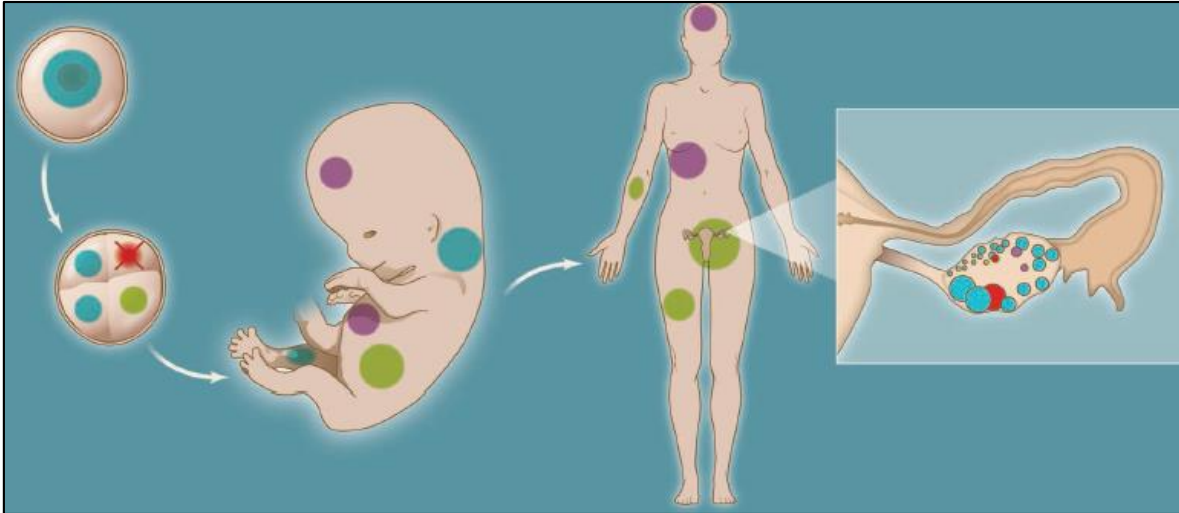
**Imagen 24.** Representación esquemática de las consecuencias de la no disyunción en meiosis I y meiosis II. Si la no disyunción ocurre en meiosis I los gametos contienen los miembros materno y paterno de un par cromosómico o carecen por completo del cromosoma y al ser fecundados originan cigotos trisómicos o monosómicos, respectivamente. Si la no disyunción ocurre en meiosis II, los gametos anormales contienen ambas copias parentales o son nulisómicos dando lugar a cigotos trisómicos y monosómicos respectivamente. (Modificada de Rosenberg y Rosenberg, 2012).

La aneuploidía puede ocurrir en la división meiótica como se ha descrito pero también ocurre en la división mitótica tras la formación del cigoto. Si este fenómeno ocurre en una etapa temprana, puede dar lugar a un mosaicismo clínicamente significativo (Nussbaum, 2008).

## 5.2 MOSAICISMO

El mosaicismo genético se define como la presencia de dos o más líneas celulares que difieren en su genotipo derivadas de un mismo cigoto. El mosaicismo puede ser numérico (el tipo más común) o estructural y puede afectar a células somáticas o a células germinales (Machiela y Chanock, 2013).

El desarrollo de un ser humano a partir de un cigoto involucra un sin número de divisiones celulares lo cual hace que el proceso de desarrollo sea susceptible a eventos mutacionales; el mosaicismo es resultado de mutaciones postzigóticas que en la mayoría de los casos ocurren antes de la formación del blastocisto aunque también pueden producirse en etapas posteriores, las células afectadas por la mutación transmiten esta característica a las subsecuentes células en su linaje (Frank, 2014).



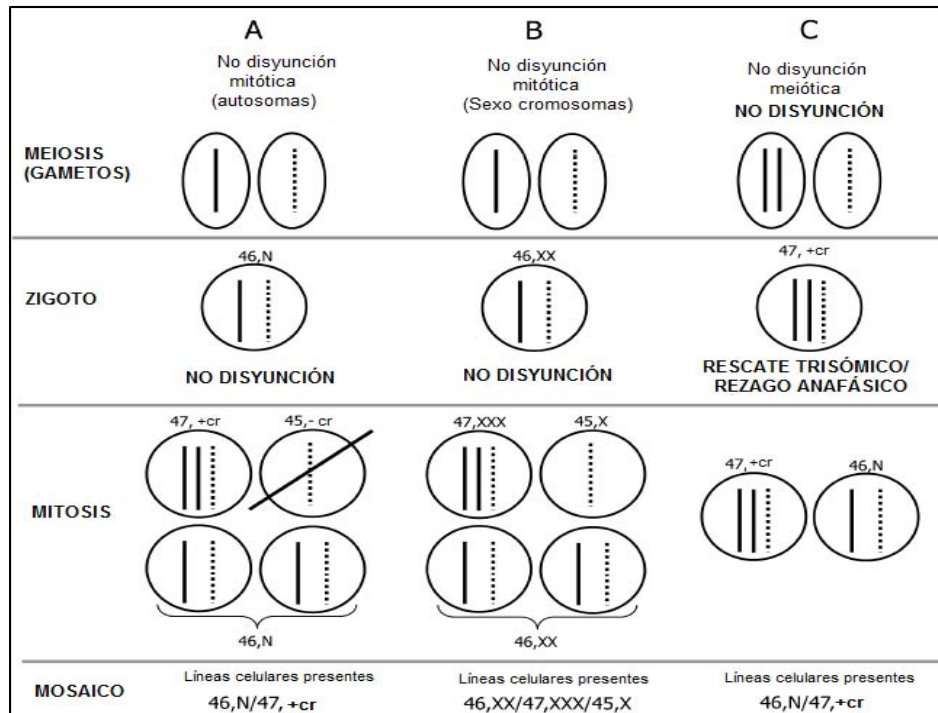
**Imagen 25.** Desarrollo humano a partir del cigoto. El mosaicismo da lugar a poblaciones celulares con diferente genotipo confinadas a un tejido específico (azul, verde, morado) (Tomada de Lupski, 2013).

El mosaicismo cromosómico se origina por medio de dos mecanismos, el primero y más común involucra la no disyunción en las divisiones mitóticas posteriores a la fertilización, el segundo mecanismo implica la corrección postzigótica de errores en las divisiones meióticas ocurridos durante la gametogénesis (Grati, 2014).

En el primer caso, inicialmente se tiene un cigoto con un complemento cromosómico normal (46 cromosomas) que por un error en la segregación en la división mitótica genera un mosaico generando tres líneas celulares: la trisómica (ej. 47, XY,+18), la monosómica (ej. 45, XY,-18) y la línea celular normal (46, XY). Las células con monosomías que involucran a cromosomas autosómicos generalmente son eliminadas mientras que la línea trisómica y la línea normal sobreviven. Las monosomías de los autosomas 13, 18, 21 y de los cromosomas sexuales X y Y son la excepción a esta regla ya que en el análisis citogenético se pueden encontrar las tres líneas celulares (Grati, 2014).

El segundo mecanismo implica la formación de un cigoto anormal (ej. 47, XX, +21), debido a que uno de los gametos era disómico, en donde se restaura la línea celular normal (ej. 46, XX) en las divisiones mitóticas subsecuentes a la fertilización con la pérdida del cromosoma extra mediante dos vías: rescate trisómico o retraso anafásico (Grati, 2014).





**Imagen 26.** Representación gráfica de los mecanismos por los cuales se produce mosaicismo cromosómico. **(A)** No disyunción mitótica de un autosoma, en donde la línea celular monosómica desaparece preferencialmente; **(B)** No disyunción mitótica que involucra a un sexocromosoma donde sobreviven tres líneas celulares; **(C)** No disyunción meiótica seguido de una corrección por rescate trisómico o rezago anafásico, se detectan dos líneas celulares, la normal y la trisómica. (Modificada de Grati, 2014)

Las consecuencias fenotípicas del mosaicismo dependen de factores como la etapa de desarrollo en el que ocurrió la mutación, el tamaño y la región genómica involucrada, las proporciones de los diferentes complementos cromosómicos, las partes del cuerpo afectadas y el efecto fisiopatológico de la mutación. De esta manera, se sabe que el mosaicismo contribuye a la diversidad humana, al desarrollo de enfermedades, al desarrollo prenatal del cerebro y al envejecimiento (Iourov et al., 2008).

El mosaicismo se detecta mediante la realización de cariotipo pero también se puede diagnosticar con el análisis de FISH en interfase y según los datos ofrecidos por aCGH. Con frecuencia, es difícil evaluar la importancia del hallazgo de un mosaicismo puesto que la proporción de células afectadas puede ser muy inferior a la proporción de células normales. Un problema adicional es que las proporciones de los diferentes complementos cromosómicos pueden no reflejar las proporciones presentes en otros tejidos (Brenner, 2013).

### III. JUSTIFICACIÓN

---

La Falla Ovárica Prematura es una patología que afecta al 1% de las mujeres menores de 40 años, son diversas las causas que provocan esta enfermedad, entre ellas se encuentran las causas genéticas que representan el 20-25% de los casos de FOP y dentro de este porcentaje el 13% se debe a anormalidades del cromosoma X como el mosaicismo.

El mosaicismo de baja proporción en relación con aneuploidías de los cromosomas sexuales se ha asociado con falla ovárica prematura, anormalidades en el desarrollo de los caracteres sexuales e infertilidad. Actualmente no existe un consenso que establezca los límites de lo que se considera mosaicismo de baja proporción, sin embargo su relevancia en relación con la FOP es innegable, aunado a esta hecho, el análisis de cariotipo resulta insuficiente para diagnosticar mosaicismo de baja proporción debido a que solamente se analizan de 20-30 metafases obtenidas a partir de linfocitos T lo cual excluye la presencia de mosaicismo de 14 y 10% (Hook, 1977) respectivamente. Por lo anterior, surge la necesidad de realizar estudios citogenéticos más extensivos como la técnica de Hibridación in situ con fluorescencia (FISH) que permite analizar un gran número de células e incluye a todos los leucocitos en interfase, de esta manera evalúa de manera más amplia la presencia de mosaicismo de baja proporción.

A través de la técnica de FISH se analizan 1000 núcleos de leucocitos no cultivados de sangre periférica y células de descamación del epitelio urinario con la intención de aumentar la capacidad de detección de mosaicismo del cromosoma X, además, ambos tejidos provienen de distinto origen embriológico, esta adición posibilita la verificación y/o comparación de la proporción de células anormales en cada tejido y permite inferir el momento en el que se originó el mosaicismo. Los resultados de este proyecto pueden ayudar a entender el impacto del mosaicismo del cromosoma X en la evolución de la FOP, además contribuye a mejorar el diagnóstico de esta enfermedad.

## IV. HIPÓTESIS

---

Es posible que pacientes con FOP y cariotipo normal presenten mosaicismo de monosomía del cromosoma X en células de descamación del epitelio urinario con mayor frecuencia que en mujeres de la misma edad que no padecen FOP.

## V. OBJETIVOS

---

Evaluar la contribución del mosaicismo del cromosoma X con el desarrollo de Falla Ovárica Prematura en pacientes con signos y síntomas de la enfermedad y cariotipo normal que acuden al INPer mediante la realización de la técnica de citogenética molecular Hibridación in situ Fluorescente (FISH) en leucocitos no cultivados de sangre periférica y células de descamación del epitelio urinario.

Establecer un punto de corte para determinar o excluir la presencia de mosaicismo de baja proporción a partir de los resultados recabados con este estudio.

Identificar si existe diferencia entre el mosaicismo de monosomía del X en leucocitos de sangre periférica y las células de descamación del epitelio urinario de pacientes con FOP.

Identificar si el mosaicismo de monosomía del X tiene relación con la edad.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 6.1 DEFINICIÓN DEL ESTUDIO

De acuerdo al Diseño de Investigación este proyecto se caracteriza por ser prospectivo, transversal y de análisis descriptivo.

Las pacientes que forman parte de este estudio fueron diagnosticadas con Falla Ovárica Prematura en el Instituto Nacional de Perinatología y posteriormente canalizadas al Departamento de Genética Humana para participar en el protocolo. A cada paciente se le explicó el propósito del estudio y mostrando su acuerdo firmó el debido Consentimiento informado, se recabaron los datos de la paciente así como de sus antecedentes gineco-obstétricos, patológicos y clínicos.

El grupo Control está conformado por mujeres con ciclos menstruales regulares y cuya edad sea igual a la de las pacientes o que difiera en no más de dos años.

### 6.2 VARIABLES A ESTUDIAR

En este proyecto se analizan principalmente dos variables de tipo cuantitativa discreta que son:

- a) Edad
- b) Porcentaje de mosaicismo de monosomía y trisomía del cromosoma X
- c) Tejido estudiado
  - Leucocitos no cultivados de sangre periférica
  - Células de descamación del epitelio urinario

### 6.3 OBTENCIÓN Y SIEMBRA DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA PARA CARIOTIPO

1. Se obtuvo sangre periférica por venopunción con el sistema Vacutainer en tubo heparinizado.

La muestra se procesó en el interior del cuarto de cultivo en condiciones asépticas:

2. Homogeneizar el contenido del tubo Vacutainer tapón verde y con ayuda de una pipeta de plástico estéril de 1mL tomar la sangre y depositar 10 gotas en cada uno de dos tubos de punta cónica de 15mL con medio MEM suplementado con antibiótico, SFB y Fitohemaglutinina.
3. Cerrar los tubos de punta cónica y homogeneizar su contenido. Identificar con los datos de la paciente.
4. Colocar los tubos de punta cónica en posición horizontal sobre una charola estéril e incubar a 37°C por 72 horas.
5. Extraer los tubos de la incubadora y homogeneizar suavemente. Agregar a uno de los tubos de punta cónica 200uL de Bromuro de etidio [0.5mg/ml] e identificar como tubo B, posteriormente adicionar a ambos tubos 200uL de colchicina [1mg/ml] y cronometrar 2hr.
6. Cerrar los tubos de punta cónica, homogeneizar suavemente y colocarlos en posición horizontal sobre la charola estéril. Incubar a 37°C hasta agotarse el tiempo cronometrado.

### 6.3.1 COSECHA

1. Extraer los tubos de la incubadora y centrifugar a 1500rpm por 10 minutos. Al término de la centrifugación se retira el sobrenadante con una pipeta Pasteur estéril.
2. Con una pipeta de 10ml añadir lentamente 8ml de KCl 0.075M, incubada anteriormente a 37°C, a cada uno de los tubos; homogeneizar suavemente e incubar por 15 minutos en una estufa a 37°C.
3. Sacar los tubos de punta cónica de la estufa a 37°C y centrifugar a 1500 rpm por 10 minutos. Al término de la centrifugación se desecha el sobrenadante con una pipeta Pasteur estéril.
4. Agregar lentamente y con agitación constante en vórtex 8ml de solución de Carnoy (metanol/ácido acético en proporción 3:1) fría y de reciente preparación a cada tubo.
5. Cerrar los tubos de punta cónica y centrifugar a 1500rpm por 10 minutos desechando el sobrenadante al final de la centrifugación.
6. Repetir el proceso de fijación descrito en el paso anterior por 3 veces más o hasta que el sobrenadante sea completamente claro. Después de la fijación, dejar un poco de solución fijadora, suficiente para el goteo.
7. Con ayuda de una pipeta Pasteur resuspender el paquete celular y gotear en un portaobjetos limpio y desengrasado. Colocar la laminilla sobre una toalla de papel,

previamente humedecida con agua corriente, y dejar secar sobre una plancha de calentamiento.

8. Al secarse la laminilla se observa al microscopio de contraste de fases para evaluar si la laminilla tiene un número y la dispersión adecuada de metafases.
9. Identificar las laminillas seleccionadas con una etiqueta. Colocar las laminillas en un Coplin y llevar a una estufa a 60°C para su maduración por 24 horas.

### 6.3.2 BANDEO GTG

Retirar las laminillas de la estufa a 60°C y colocarlas por separado en una gradilla para que se enfríen antes de realizar la técnica de bandeo GTG.

1. Sumergir de 1-2 laminillas en una solución de Tripsina al 1% en buffer de Sörensen durante 38 segundos aproximadamente.
2. Extraer las laminillas de la solución de Tripsina y lavar en solución amortiguadora de fosfato pH 7.4 por 30 segundos.
3. Transferir las laminillas a una solución amortiguadora de fosfato pH 7.4 por un minuto.
4. Sumergir las laminillas en una solución de colorante de Wright al 5% diluida en solución amortiguadora de fosfatos a pH 6.8 por tres minutos.
5. Sumergir las laminillas en solución de colorante de Giemsa al 5% diluida en solución amortiguadora de fosfatos a pH 6.8 por tres minutos.
6. Lavar las laminillas con agua corriente y dejar secar.
7. Observar al microscopio algunas metafases con el objetivo de inmersión 100X, analizar la calidad de la técnica de bandeo.

### 6.3.3 ANÁLISIS CITOGENÉTICO

Las preparaciones cromosómicas se examinaron al microscopio óptico con el objetivo 100X, se analizaron 30 metafases por cada caso. De encontrarse metafases con aneuploidía del cromosoma X, el número de metafases a estudiar se eleva a 50.

## 6.4 OBTENCIÓN DE CÉLULAS SANGUÍNEAS Y CÉLULAS DE DESCAMACIÓN DEL EPITELIO URINARIO PARA FISH

### 6.4.1 COSECHA DIRECTA

Obtener sangre periférica por venopunción con el sistema Vacutainer en tubo heparinizado (Tapón verde).

	Mezclar la sangre con el anticoagulante por inversión.
	Con ayuda de una pipeta de plástico de 1ml estéril tomar 1ml de sangre y transferir a dos tubos de punta cónica de 15ml. Identificar cada tubo con los datos del paciente
COSECHA DIRECTA DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA	Con una pipeta de 10ml estéril, añadir lentamente 10ml de KCl 0.075M a 37°C a cada tubo e incubar por 20 minutos en estufa a 37°C.
	Extraer los tubos de punta cónica de la estufa a 37°C.
	Con una pipeta estéril de 10ml añadir a cada tubo 2ml de solución de Carnoy fría y recientemente preparada para fijar.
	Centrifugar los tubos a 1500rpm por 10min. Después de la centrifugación, desechar sobrenadante.
	Fijar con 8ml de solución de Carnoy, fría y de preparación reciente, en agitación constante con vórtex.
	Centrifugar a 1500rpm por 10minutos y eliminar sobrenadante.
	Repetir el proceso de fijación dos veces más o hasta que el sobrenadante sea completamente claro.
	Después de la última fijación dejar un poco de solución de Carnoy para hacer una suspensión celular adecuada.

Pedir a la paciente que recolecte la primera orina de la mañana en recipientes estériles y entregue al Laboratorio de Genética del INPer.

COSECHA DIRECTA EN MUESTRA DE ORINA	Transferir la muestra de orina a cuatro tubos de punta cónica de 50ml. Identificar cada tubo con los datos de la paciente.
	Centrifugar los tubos a 2.200rpm por 10 minutos, al término, decantar el sobrenadante.
	Transferir el pellet de los tubos de punta cónica de 50ml a dos tubos de punta cónica de 15ml. Identificar ambos tubos con los datos de la paciente.
	Lavar con 10ml de PBS y centrifugar a 2200rpm por 10 minutos. Eliminar el sobrenadante.
	Con una pipeta de 10ml, adicionar lentamente 5ml de KCl a 37°C, homogeneizar suavemente. Incubar por 20 minutos en estufa a 37°C.
	Extraer de la estufa los tubos de 15ml y añadir 1ml de solución de Carnoy fría y recién preparada.
	Centrifugar a 2200rpm por 10 minutos. Eliminar sobrenadante.
	Añadir a cada tubo 5mL de solución de Carnoy en constante agitación con vórtex,dejar reposar por 30 minutos a -20°C .
	Centrifugar a 2200rpm por 10 minutos. Eliminar el sobrenadante.
	Adicionar 5mL de solución de Carnoy en agitación constante con vórtex y centrifugar a 2200rpm por 10min y posteriormente desechar sobrenadante.
Agregar 0.5mL de solución fijadora fría. Resuspender el paquete celular.	

## PREPARACIÓN DE LAMINILLAS

1. Depositar en el centro de un portaobjetos limpio y desengrasado 2 gotas de la suspensión celular. (Para las células de descamación del urotelio se utilizaron laminillas silanizadas)
2. Dejar secar la laminilla al aire. Observar al microscopio usando el objetivo 10X.
3. Seleccionar el área de hibridación con una densidad celular de 100 a 200 células por campo y marcar la zona con un lápiz de punta diamante.
4. Etiquetar la laminilla con los datos de la paciente con un lápiz punta diamante.
5. Si se va a hibridar el mismo día dejar laminillas a 63°C por 20-30minutos previos al pretratamiento, de no ser así, resguardar las laminillas en refrigeración a -20°C.



## 6.4.2 PRETRATAMIENTO

---

	Colocar las laminillas en un Coplin con una solución 2XSSC a 37°C por 1 hora.
LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA	Deshidratar en soluciones de etanol al 70, 85 y 100% por 1 minuto en cada una.
	Dejar secar la laminilla al aire.

---

	Colocar la laminilla en un Coplin con una solución 2XSSC a 73°C por 30 minutos.
	Sumergir la laminilla en una solución de pepsina (600ug/mL) en HCL 0.01N por 15 minutos a 37°C.
CÉLULAS DE DESCAMACIÓN DEL EPITELIO URINARIO	Transferir la laminilla a un Coplin con PBS por 5 minutos.
	Fijar en una solución de formol al 3.6% por 5 minutos a 0°C.
	Lavar en PBS 5 minutos.
	Introducir laminillas en solución 2XSSC a 37°C por 5 minutos.
	Deshidratar en soluciones de etanol al 70, 85 y 100% por 2 minutos en cada una.

---

### 6.4.3 HIBRIDACIÓN

1. Atemperar la sonda y el buffer de hibridación en la oscuridad, mezclar en vórtex para homogeneizar y centrifugar en microcentrifuga por 1-3 segundos.
2. Con una micropipeta tomar 1ul de la sonda y 9ul de buffer de hibridación y colocar en un tubo Eppendorf.
3. Con una micropipeta, tomar 10ul de la preparación de la sonda y colocar en el centro de la zona de hibridación marcada en la laminilla a hibridar.
4. Colocar un cubreobjetos sobre la preparación, dejar que la sonda se expanda evitando la formación de burbujas.
5. Sellar con cemento iris los bordes del cubreobjetos. Dejar secar.
6. Programar Hybrite como sigue:

Células Sanguíneas	Células de descamación del Urotelio
MELT: 72°C por 1 minuto	MELT: 75°C por 1 minuto
Hibridación: 37°C	Hibridación: 37°C
7. Colocar en cámara húmeda e incubar a 37°C por 20 horas.

### 6.4.4 LAVADOS

1. En la oscuridad, retirar laminillas de la cámara húmeda y retirar cemento iris. Despegar el cubreobjetos y desecharlo.
2. Colocar las laminillas en un Coplin con solución 0.4XSSC y 135µL de NP-40 a 73°C. Sacudir la laminilla por 10 segundos y dejar en el Coplin cerrado por 2 minutos.
3. Sumergir laminillas en una solución 2XSSC y 45µL de NP-40 a temperatura ambiente. Sacudir vigorosamente durante 1 minuto y dejar secar al aire.
4. Con una micropipeta, adicionar 10uL de DAPI (17:1 Vectashield/DAPI) en la zona de hibridación marcada en la laminilla y cubrir con cubreobjetos.
5. Sellar con cemento iris los bordes del cubreobjetos y guardar a -20°C hasta que se analice.

### 6.4.5 ANÁLISIS DE FISH

Se examinaron las laminillas en el microscopio de fluorescencia con el objetivo de 100X, se analizaron 1000 células de cada tejido. En cada célula se observó el número de señales emitidas por el fluorocromo de la sonda específica para los cromosomas 18, X y Y y se registraron los resultados.

## 6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron ordenados y resumidos en tablas, se calcularon medidas de tendencia central para la variable de edad de los grupos de estudio así como los porcentajes de mosaicismo del cromosoma X en cada tejido estudiado con lo cual se diseñaron gráficos a partir de los cuales se realizó el análisis.

## VII. RESULTADOS

El presente estudio cuenta con un grupo de 10 pacientes referidas al Servicio de Genética y Genómica Humana del INPer con el diagnóstico de Falla Ovárica Prematura pareadas por edad con 10 mujeres que conforman el grupo control, la media de la edad en las pacientes es de 33 años $\pm$ 4.6 y de 32.4 $\pm$ 4.9 años en el grupo control, la media de edad de la menarca en las pacientes es de 11.8 $\pm$ 1.31 mientras que, en el grupo control es de 13.2 $\pm$ 1.4, la totalidad de las pacientes presenta Amenorrea Secundaria y las mujeres que integran el grupo control presentan ciclos menstruales normales.

**Tabla 2.** Datos Clínicos de las Pacientes con Falla Ovárica Prematura.

ID. FOP	EDAD (a)	MENARCA (a)	CICLOS (días/duración)	GESTACIONES	ABORTOS	ULTRASONIDO	FSH (mUI/ml)	LH (mUI/ml)
FOP 001	26	12	30 / 5 días	2	2	Quiste simple de ovario derecho. Mioma uterino.	39.5	39.6
FOP 003	35	14	30 / 8 días	0	0	Ovarios disminuidos. Endometrio delgado.	34	6.29
FOP 005	38	10	28 / 3 días	0	0	Ovarios y útero normales.	31.1	12.2
FOP 007	30	12	60 / 5 días	0	0	Ovario derecho disminuido, ovario izquierdo quístico, endometrio delgado.	52.9	8.29
FOP 009	33	11	Irregular	0	0	Quiste simple en ovario izquierdo. Miomas en endometrio.	40.4	10.9
FOP 011	35	11	60 / 4 días	0	0	Ovarios disminuidos, útero normal.	49.5	30.6
FOP 0013	25	14	3 meses	1	1	Ovarios y útero normales	37.1	14.7
FOP 015	36	12	30 / 4-6 días	2	1	Ovarios disminuidos	73.3	22.3
FOP 017	34	11	28 / 3-5 días	0	0	Ovarios y útero normales.	-	-
FOP 019	38	11	28-30 / 3 días	0	0	Ovarios y útero normales.	113	-

La disminución en el tamaño de los ovarios, adelgazamiento del grosor del endometrio y la aparición de quistes o miomas forman parte de los hallazgos en el ultrasonido de algunas pacientes. La disminución de las dimensiones ováricas en mujeres con FOP se debe a la atrofia del órgano debido a la reducción del número de folículos antrales; por otro lado, el adelgazamiento del grosor endometrial puede ser causado por el déficit de estrógenos, lo

cual, no permite que el tejido endometrial prolifere (Cabero, 2007) (Kurjak, 2008) (Bonilla, et al, 2009).

Los resultados del análisis de FSH en suero de las pacientes se encuentran en un rango de 31-113mUI/mL mientras que el rango de los niveles de LH es de 6.29-39.6mUI/mL. Si bien es cierto que la mayoría de los autores señala que la Falla Ovárica Prematura se manifiesta con un nivel de FSH mayor o igual a 40mUI/mL y mayor o igual a 30mUI/mL en el caso de la LH, en general, se considera que valores a partir de 30mUI/mL o superiores de las gonadotrofinas son suficientes para dictaminar un estado postmenopaúsico y, en algunos casos los niveles de FSH de mujeres con FOP pueden llegar a ser normales sin que por esta razón se invalide el diagnóstico (Dorantes, 2012 )(Ángel, 2006). La variabilidad en la concentración sérica de las hormonas FSH y LH en pacientes con FOP se relaciona con la edad de inicio y la etapa de desarrollo de la enfermedad, así como del grado de función ovárica.

**Tabla 3.** Datos Clínicos Grupo Control.

ID. FOP	EDAD (a)	MENARCA (a)	CICLOS (días/duración)	GESTACIONES	ABORTOS
<b>FOP 002</b>	24	14	28 / 7 días	0	0
<b>FOP 004</b>	33	15	31 / 5 días	1	0
<b>FOP 006</b>	38	15	30 / 5 días	0	0
<b>FOP 008</b>	29	12	29 / 3 días	0	0
<b>FOP 010</b>	33	11	28-35 / 6 días	0	0
<b>FOP 012</b>	35	14	30 / 5 días	0	0
<b>FOP 014</b>	25	12	30/ 5 días	1	0
<b>FOP 016</b>	36	13	28 / 4 días	3	0
<b>FOP 018</b>	33	12	21 / 4 días	0	0
<b>FOP 020</b>	38	14	30 / 4 días	0	0

## RESULTADOS CARIOTIPO

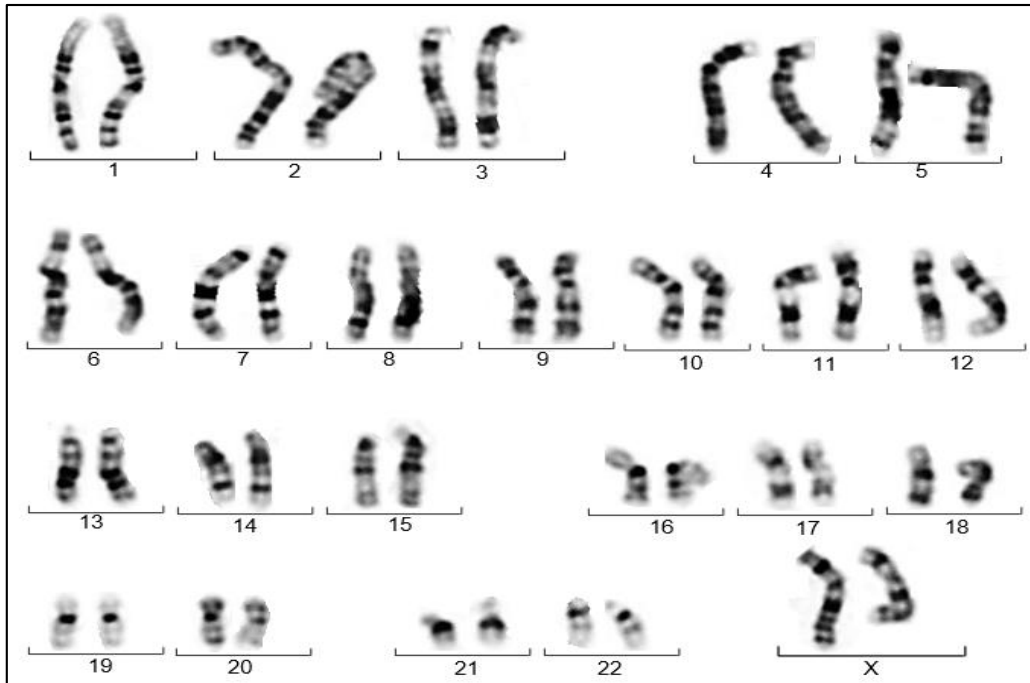
Se realizó el estudio de cariotipo con bandas G en linfocitos de sangre periférica para las pacientes que no contaban con cariotipo previo así como para las mujeres del grupo control, en cada caso se analizaron 30 metafases.

**Tabla 4.** Resultado del estudio de cariotipo en Linfocitos de Sangre Periférica de las pacientes con FOP y del grupo Control.

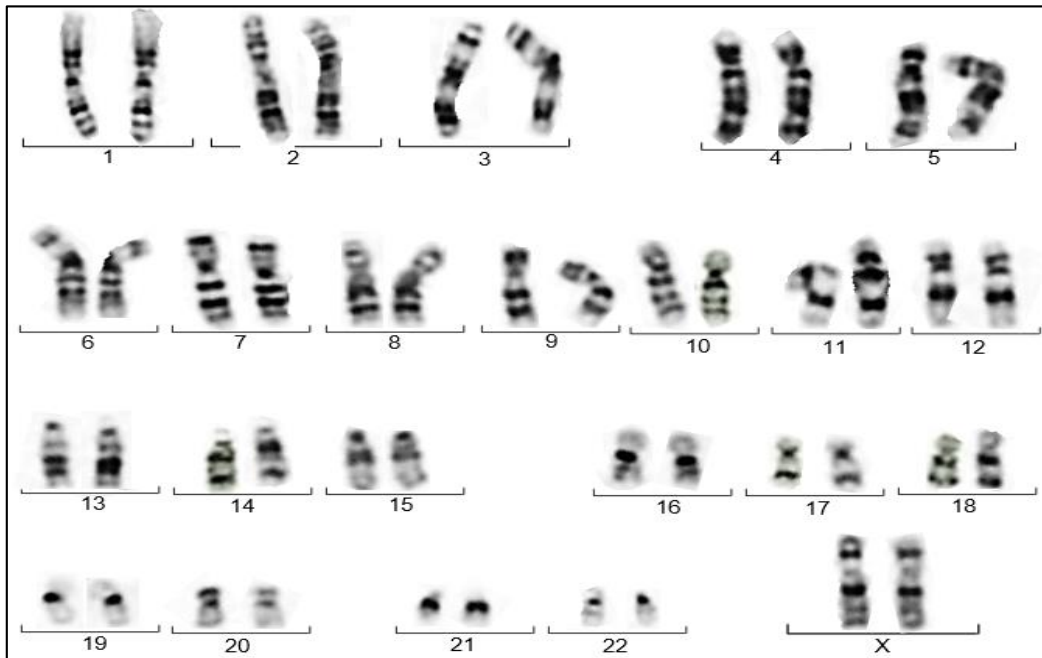
Pacientes	Resultados de Cariotipo	Grupo Control	Resultados de Cariotipo
<b>FOP 001</b>	46,XX*	<b>FOP 002</b>	46,XX
<b>FOP 003</b>	46,XX*	<b>FOP 004</b>	46,XX*
<b>FOP 005</b>	46,XX*	<b>FOP 006</b>	46,XX
<b>FOP 007</b>	46,XX*	<b>FOP 008</b>	46,XX*
<b>FOP 009</b>	46,XX*	<b>FOP 010</b>	46,XX
<b>FOP 011</b>	46,XX*	<b>FOP 012</b>	46,XX
<b>FOP 013</b>	46,XX	<b>FOP 014</b>	46,XX
<b>FOP 015</b>	46,XX	<b>FOP 016</b>	46, XX
<b>FOP 017</b>	46,XX*	<b>FOP 018</b>	46,XX
<b>FOP 019</b>	46, XX	<b>FOP 020</b>	46, XX

\*: Estudio de cariotipo realizado previamente.

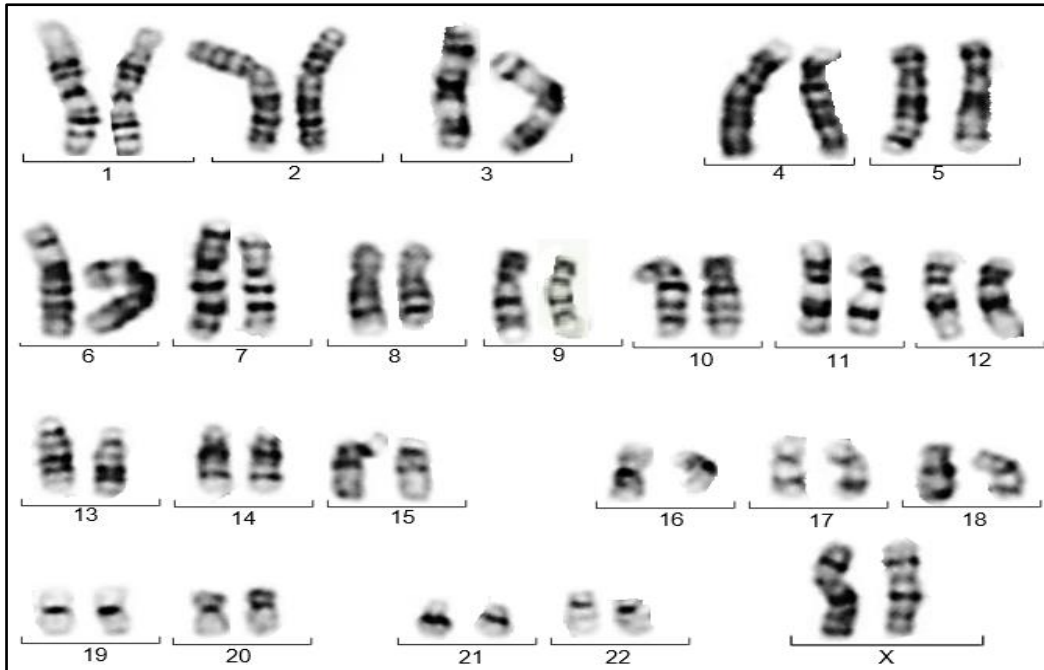
El análisis cromosómico de linfocitos estimulados de sangre periférica mediante bandeado GTG en las pacientes no reveló anomalías cromosómicas numéricas o estructurales de autosomas ni de sexocromosomas (Ver Figs. 28 y 30), el complemento cromosómico de las pacientes fue 46, XX. De igual forma el análisis de cariotipo del grupo control resultó ser normal y el complemento cromosómico de 46, XX (Ver Figs. 27 y 29). Al analizar un total de 30 metafases para cada caso se descarta la existencia de mosaicismo del cromosoma X del 15% con un nivel de confianza del 99%(Hook, 1977).



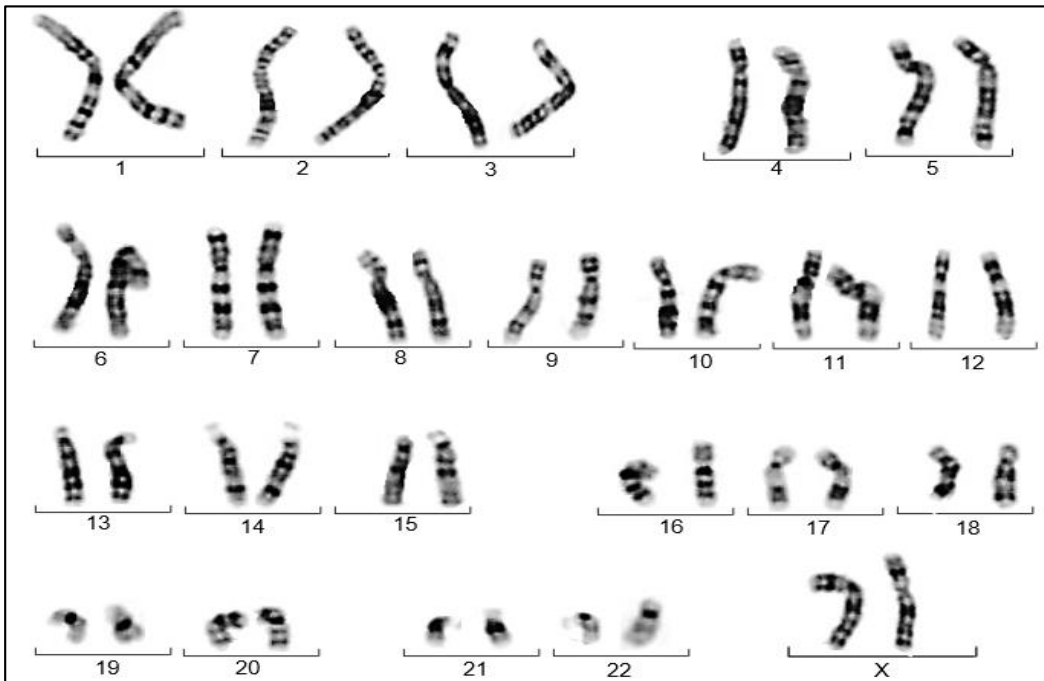
**Imagen 27.** Cariotipo Control FOP 010 con bandas GTG, 46, XX.



**Imagen 28.** Cariotipo paciente FOP 013 con bandas GTG (46, XX).



**Imagen 29.** Cariotipo Control FOP 014 con bandas GTG, 46, XX.

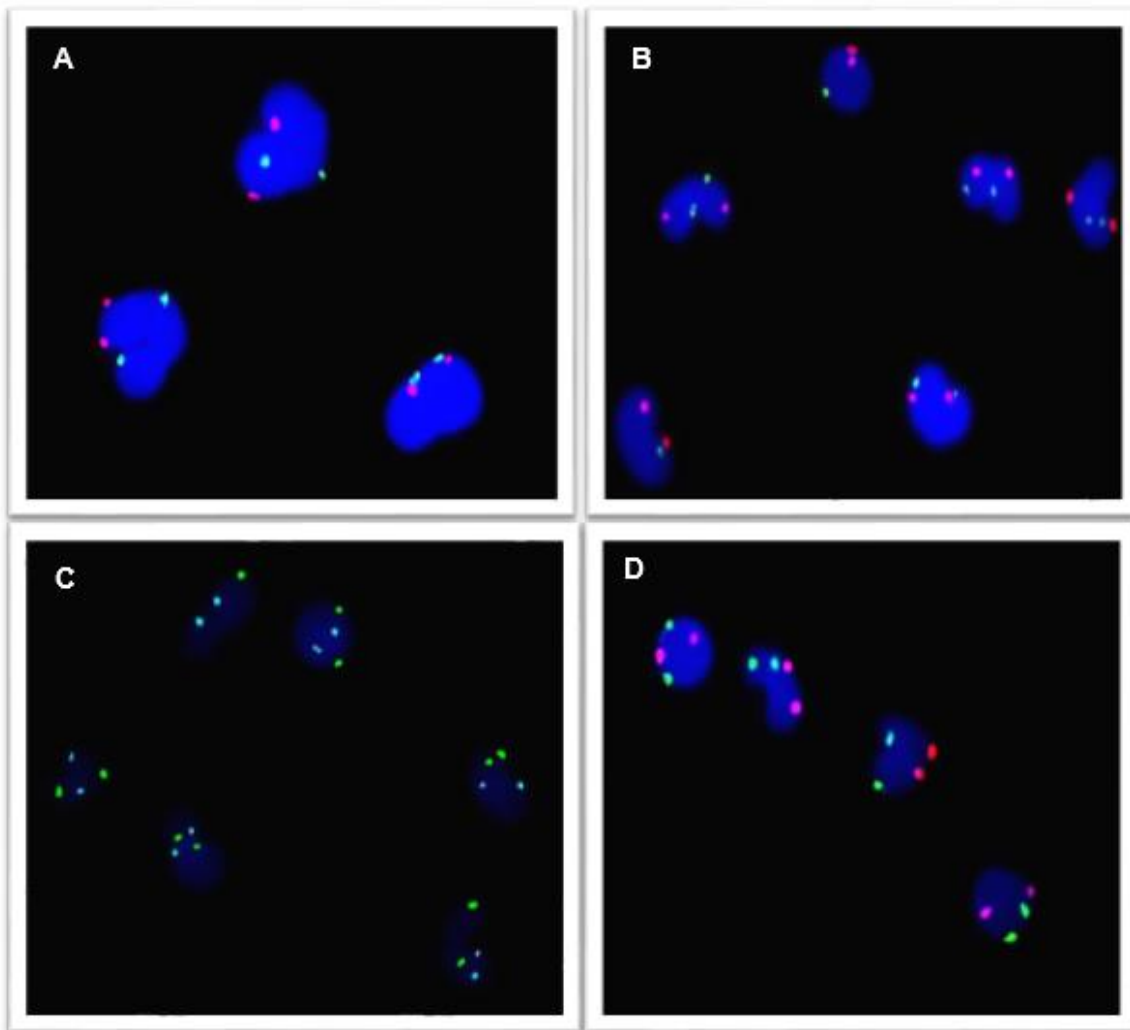


**Imagen 30.** Cariotipo paciente FOP 015 con bandas GTG (46, XX).

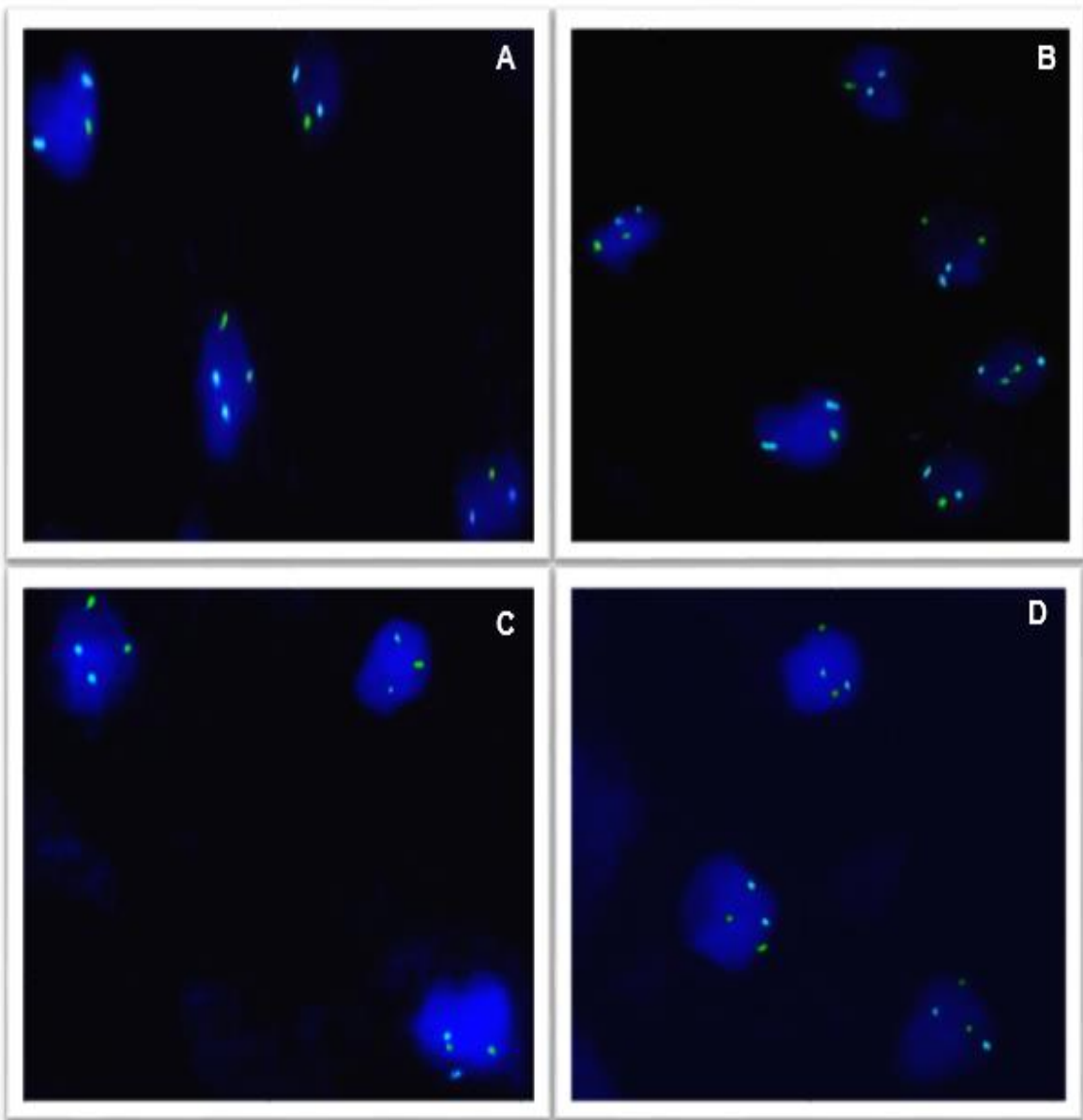


## RESULTADOS FISH

La técnica de Hibridación in situ con Fluorescencia (FISH) se realizó en núcleos en interfase de leucocitos de sangre periférica y de células de descamación del epitelio urinario en ambos grupos para detectar mosaicismos de baja proporción del cromosoma X. Se utilizaron sondas del kit AneuVysion Multicolor empleando para el ensayo tres tipos de sondas: la sonda centromérica para el cromosoma X marcada con SpectrumGreen (señal fluorescente verde), sonda centromérica para el cromosoma Y marcada con SpectrumOrange (señal fluorescente naranja) y como control una sonda centromérica para el cromosoma 18 marcada con SpectrumAqua (señal azul), posterior a la hibridación se realizó una contratinción con DAPI. En todos los casos se analizaron 1000 núcleos de cada tejido.

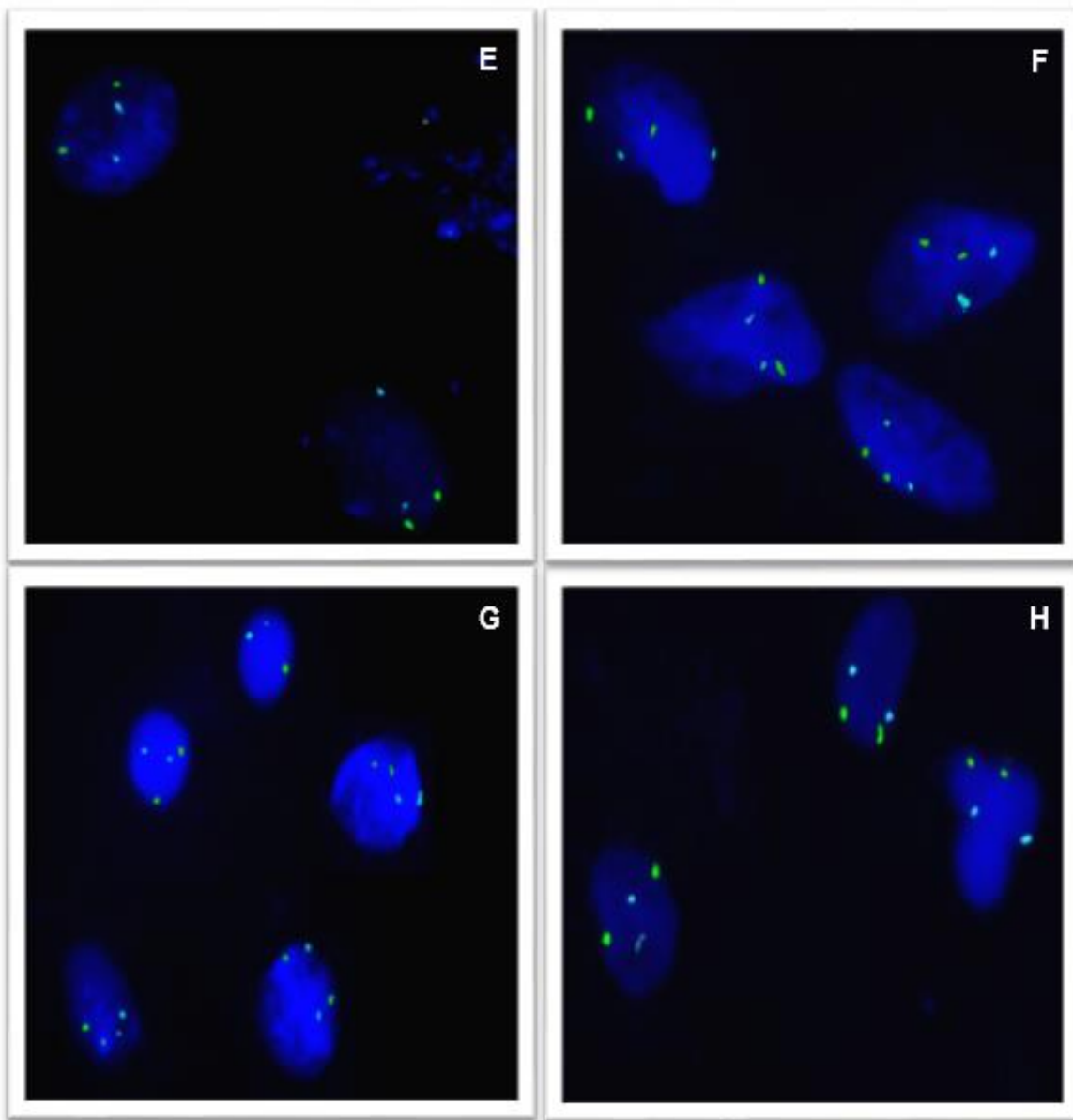


**Imagen 31.** Imágenes de FISH en núcleos interfásicos de leucocitos de sangre periférica. (A)Paciente FOP 003. (B)Paciente FOP 019. (C)Paciente FOP 014. (D)Control FOP 016.  
**NOTA.** Verde: CEPX, Azul aqua: CEP18, Naranja: CEP18. Contratinción con DAPI.



**Imagen 32.** Imágenes de FISH en núcleos interfásicos de células de descamación del epitelio urinario. **(A)** Paciente FOP 009. **(B)** Paciente FOP 013. **(C)** Paciente FOP 015. **(D)** Paciente FOP 019.

**NOTA.** Verde: CEPX, Azul aqua: CEP18. Contraintinción con DAPI.



**Imagen 33.** Imágenes de FISH en núcleos interfásicos de células de descamación del epitelio urinario. **(A)** Control FOP 0010. **(B)** Control FOP 014. **(C)** Control FOP 016. **(D)** Control FOP 020. **NOTA.** Verde: CEPX, Azul aqua: CEP18. Contratinción con DAPI.

**Tabla 5.** Resultados de FISH en núcleos interfásicos de Leucocitos de Sangre Periférica en Pacientes con Falla Ovárica Prematura.

Sonda	CEP 18		CEP X			CEP Y
	1	2	1	2	3	1
FOP 001	0	1000	7	992	1	0
FOP 003	0	1000	4	995	1	0
FOP 005	0	1000	7	991	2	0
FOP 007	0	1000	3	996	1	0
FOP 009	0	1000	9	991	0	0
FOP 011	0	1000	9	990	1	0
FOP 013	0	1000	3	981	16	0
FOP 015	0	1010	22	984	4	0
FOP 017	0	1000	13	985	2	0
FOP 019	0	1000	13	984	3	0

**Tabla 6.** Resultados de FISH en núcleos interfásicos de Leucocitos de Sangre Periférica en el grupo Control.

Sonda	CEP 18		CEP X			CEP Y
	1	2	1	2	3	1
FOP 002	0	1000	3	996	1	0
FOP 004	0	1000	7	992	1	0
FOP 006	0	1000	7	990	3	0
FOP 008	0	1000	2	998	0	0
FOP 010	0	1000	0	1000	0	0
FOP 012	0	1000	3	997	0	0
FOP 014	0	1000	35	964	1	0
FOP 016	0	1010	7	995	3	0
FOP 018	0	1037	4	1032	1	0
FOP 020	0	1000	8	992	0	0

**Tabla 7.** Resultados de FISH en núcleos interfásicos de Células de descamación del epitelio urinario en Pacientes con Falla Ovárica Prematura.

Sonda	CEP 18		CEP X			CEP Y
	1	2	1	2	3	1
FOP 001	0	1000	12	975	13	0
FOP 003	0	1000	9	998	3	0
FOP 005	0	1000	12	988	0	0
FOP 007	0	1000	11	989	0	0
FOP 009	0	1000	20	980	0	0
FOP 011	0	1000	9	987	4	0
FOP 013	0	1000	14	980	6	0
FOP 015	0	1010	16	981	3	0
FOP 017	0	1000	9	989	2	0
FOP 019	0	1000	15	984	2	0

**Tabla 8.** Resultados de FISH en núcleos interfásicos de Células de descamación del epitelio urinario en el grupo Control.

Sonda	CEP 18		CEP X			CEP Y
	1	2	1	2	3	1
FOP 002	0	1000	3	997	0	0
FOP 004	0	1000	3	994	3	0
FOP 006	0	1000	6	970	24	0
FOP 008	0	1000	3	997	0	0
FOP 010	0	1000	5	995	0	0
FOP 012	0	1000	1	998	1	0
FOP 014	0	1000	3	997	0	0
FOP 016	0	1010	6	994	2	0
FOP 018	0	1000	5	995	0	0
FOP 020	0	1000	14	982	5	0

A partir de los resultados obtenidos del análisis de FISH se obtuvieron los porcentajes de células con monosomía, disomía o trisomía del cromosoma X en las pacientes y en el Grupo Control.

En las Pacientes se encontró que en sangre periférica el porcentaje promedio de células con monosomía del X es de 0.89%, de células con trisomía del X es de 0.31% y de células disómicas el 98.8% mientras que en células de descamación del urotelio el porcentaje promedio de células con monosomía del X es de 1.26%, de 0.32% en células con trisomía del X y de 98.5% en el caso de las células disómicas.

En el grupo control, en leucocitos de sangre periférica se halló que el porcentaje promedio de células con monosomía del cromosoma X es de 0.76%, 0.1% en el caso de células con trisomía del X y de 99.14% de células con disomía del X, en cuanto a las células de descamación del epitelio urinario se tiene que el 0.48% de las células tienen monosomía del X, 0.35% tiene trisomía del X y el 99.16% de las células son disómicas para el sexocromosoma.

**Tabla 9.** Porcentaje de Células 45, X/ 46, XX/ 47, XXX en Leucocitos de Sangre Periférica en Pacientes con FOP y el Grupo Control.

ID. FOP Pacientes	% Células 46, XX	% Células 45, X	% Células 47, XXX	%Células Aneuploides	ID. FOP Control	% Células 46, XX	% Células 45, X	% Células 47, XXX	%Células Aneuploides
FOP 001	99.2	0.7	0.1	0.8	FOP 002	99.6	0.3	0.1	0.4
FOP 003	99.5	0.4	0.1	0.5	FOP 004	99.2	0.7	0.1	0.8
FOP 005	99.1	0.7	0.2	0.9	FOP 006	99	0.7	0.3	1
FOP 007	99.6	0.3	0.1	0.4	FOP 008	99.8	0.2	0	0.2
FOP 009	99.1	0.9	0	0.9	FOP 010	100	0	0	0
FOP 011	99.0	0.9	0.1	1.0	FOP 012	99.7	0.3	0	0.3
FOP 013	98.1	0.3	1.6	1.9	FOP 014	96.4	3.5	0.1	3.6
FOP 015	97.4	2.2	0.4	2.6	FOP 016	99.0	0.7	0.3	1
FOP 017	98.5	1.3	0.2	1.5	FOP 018	99.5	0.4	0.1	0.5
FOP 019	98.4	1.3	0.3	1.6	FOP 020	99.2	0.8	0	0.8

**Tabla 10.** Porcentaje de Células 45, X/ 46, XX/ 47, XXX en Células de descamación del epitelio urinario en Pacientes con FOP y el Grupo Control.

ID. FOP Pacientes	% Células 46, XX	% Células 45, X	% Células 47, XXX	% Células Aneuploides	ID. FOP Control	% Células 46, XX	% Células 45, X	% Células 47, XXX	% Células Aneuploides
FOP 001	97.5	1.2	1.3	2.5	FOP 002	99.7	0.3	0	0.3
FOP 003	99.8	0.9	0.3	1.2	FOP 004	99.4	0.3	0.3	0.6
FOP 005	98.8	1.2	0	1.2	FOP 006	97.0	0.6	2.4	3.0
FOP 007	98.9	1.1	0	1.1	FOP 008	99.7	0.3	0	0.3
FOP 009	98	2	0	2	FOP 010	99.5	0.5	0	0.5
FOP 011	98.7	0.9	0.4	1.3	FOP 012	99.8	0.1	0.1	0.2
FOP 013	98	1.4	0.6	2	FOP 014	99.7	0.3	0	0.3
FOP 015	98.1	1.6	0.3	1.9	FOP 016	99.2	0.6	0.2	0.8
FOP 017	98.8	0.9	0.2	1.1	FOP 018	99.5	0.5	0	0.5
FOP 019	98.4	1.5	0.2	1.7	FOP 020	98.1	1.4	0.5	1.9

Se ordenó por edad a las pacientes y al grupo control para observar la relación entre el porcentaje de Mosaicismo del cromosoma X y la edad, de igual forma se buscó conocer el comportamiento de estas variables en los diferentes tejidos.

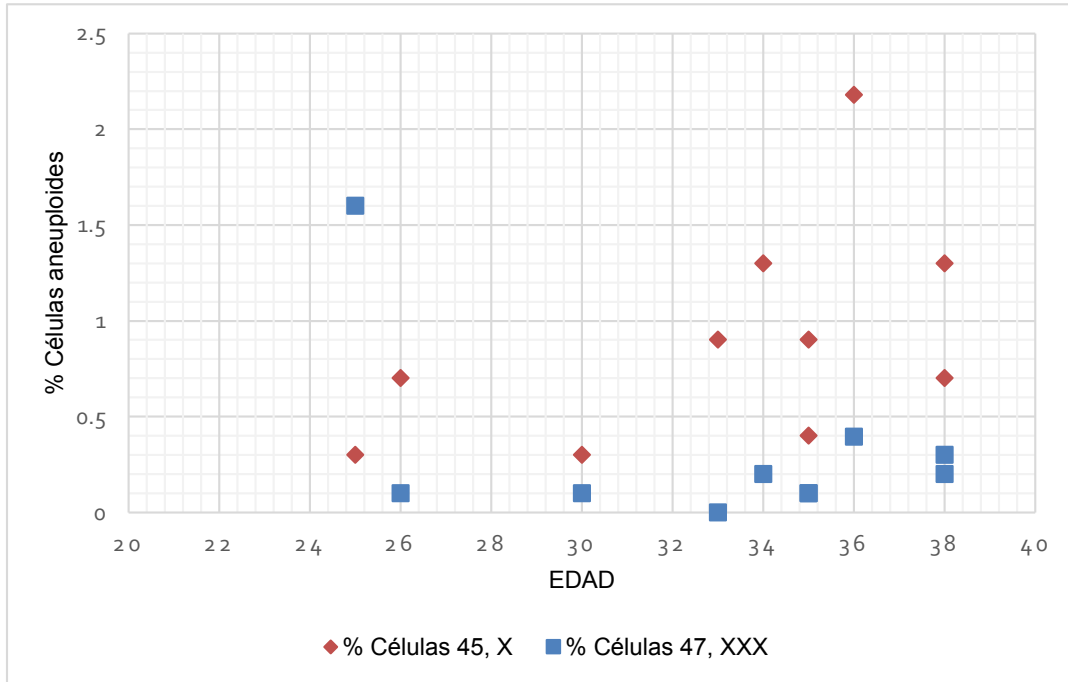
**Tabla 11.** Porcentaje de células con monosomía y trisomía del cromosoma X de Pacientes y Grupo Control en Sangre Periférica ordenadas de acuerdo a la edad.

ID. FOP Pacientes	EDAD (a)	% Células 45, X	% Células 47, XXX	ID. FOP Control	EDAD (a)	% Células 45, X	% Células 47, XXX
<b>FOP 013</b>	25	0.3	1.6	<b>FOP 002</b>	24	0.3	0.1
<b>FOP 001</b>	26	0.7	0.1	<b>FOP 014</b>	25	3.5	0.1
<b>FOP 007</b>	30	0.3	0.1	<b>FOP 008</b>	29	0.2	0
<b>FOP 009</b>	33	0.9	0	<b>FOP 004</b>	33	0.7	0.1
<b>FOP 017</b>	34	1.3	0.2	<b>FOP 010</b>	33	0	0
<b>FOP 003</b>	35	0.4	0.1	<b>FOP 018</b>	33	0.4	0.1
<b>FOP 011</b>	35	0.9	0.1	<b>FOP 012</b>	35	0.3	0
<b>FOP 015</b>	36	2.2	0.4	<b>FOP 016</b>	36	0.7	0.3
<b>FOP 005</b>	38	0.7	0.2	<b>FOP 006</b>	38	0.7	0.3
<b>FOP 019</b>	38	1.3	0.3	<b>FOP 020</b>	38	0.8	0

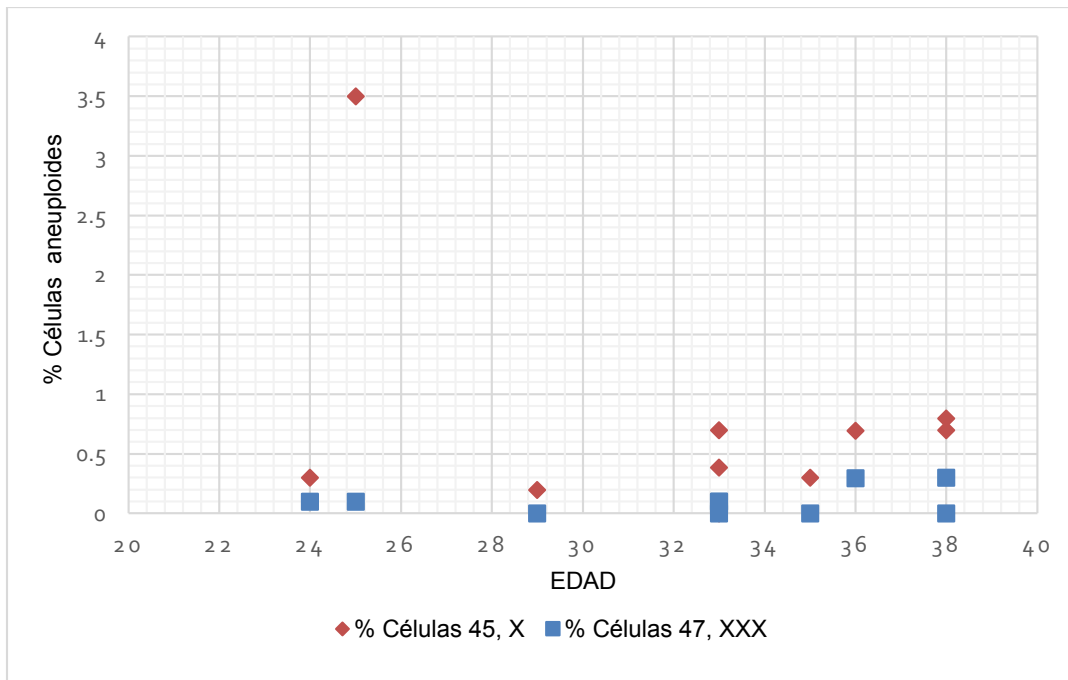
**Tabla 12.** Porcentaje de células con monosomía y trisomía del cromosoma X de Pacientes y Grupo Control en Células de descamación del epitelio urinario ordenadas de acuerdo a la edad.

ID. FOP Pacientes	Edad	% Células 45, X	% Células 47, XXX	ID. FOP Control	EDAD (a)	% Células 45, X	% Células 47, XXX
FOP 013	25	1.4	0.6	FOP 002	24	0.3	0
FOP 001	26	1.2	1.3	FOP 014	25	0.3	0
FOP 007	30	1.1	0	FOP 008	29	0.3	0
FOP 009	33	2	0	FOP 004	33	0.3	0.3
FOP 017	34	0.9	0.2	FOP 010	33	0.5	0
FOP 003	35	0.9	0.3	FOP 018	33	0.5	0
FOP 011	35	0.9	0.4	FOP 012	35	0.1	0.1
FOP 015	36	1.6	0.3	FOP 016	36	0.6	0.2
FOP 005	38	1.2	0	FOP 006	38	0.6	2.4
FOP 019	38	1.5	0.2	FOP 020	38	1.4	0.5

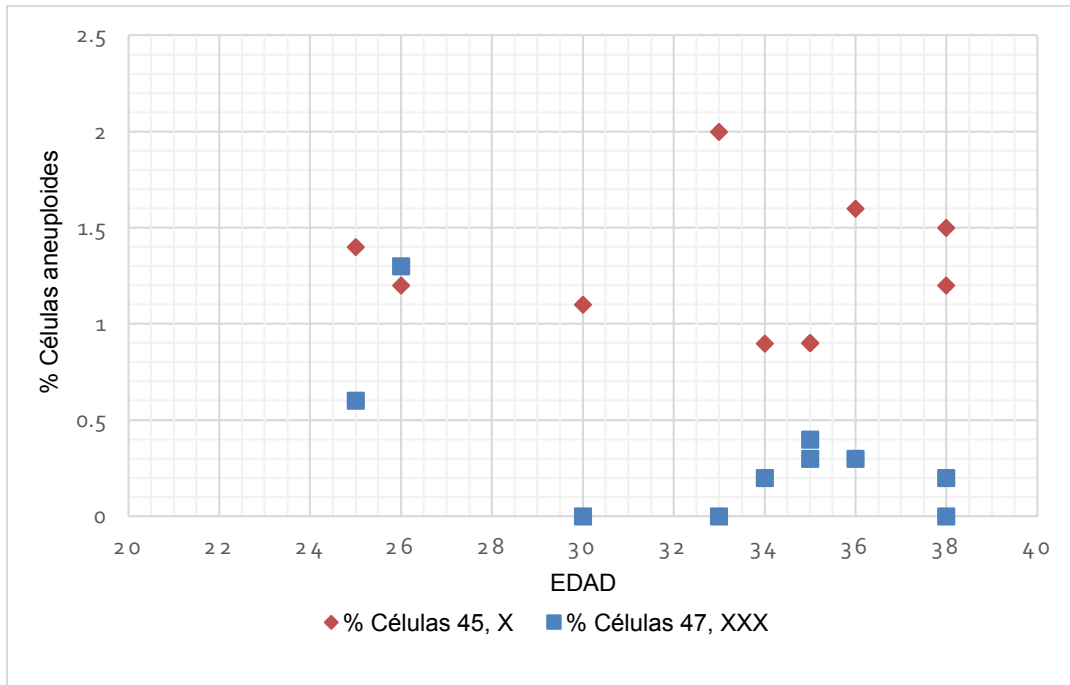




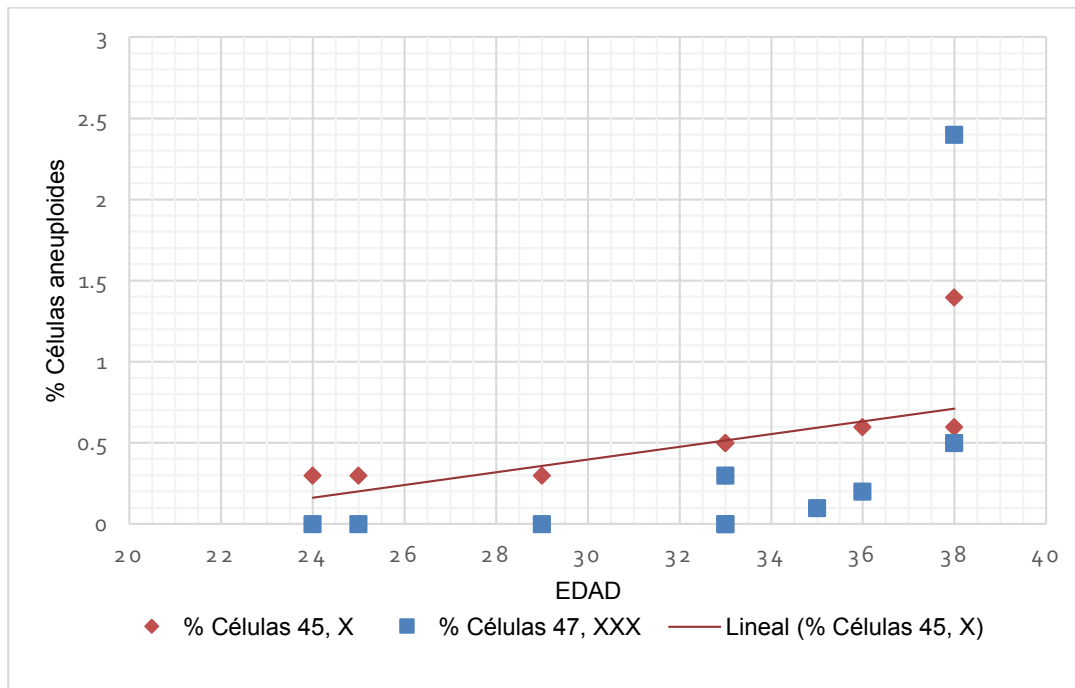
**Gráfica 1.** Porcentaje de células con aneuploidía del Cromosoma X en función de la edad en Leucocitos de Sangre Periférica de Pacientes con FOP.



**Gráfica 2.** Porcentaje de células con aneuploidía del Cromosoma X en función de la edad en Leucocitos de Sangre Periférica del Grupo Control.

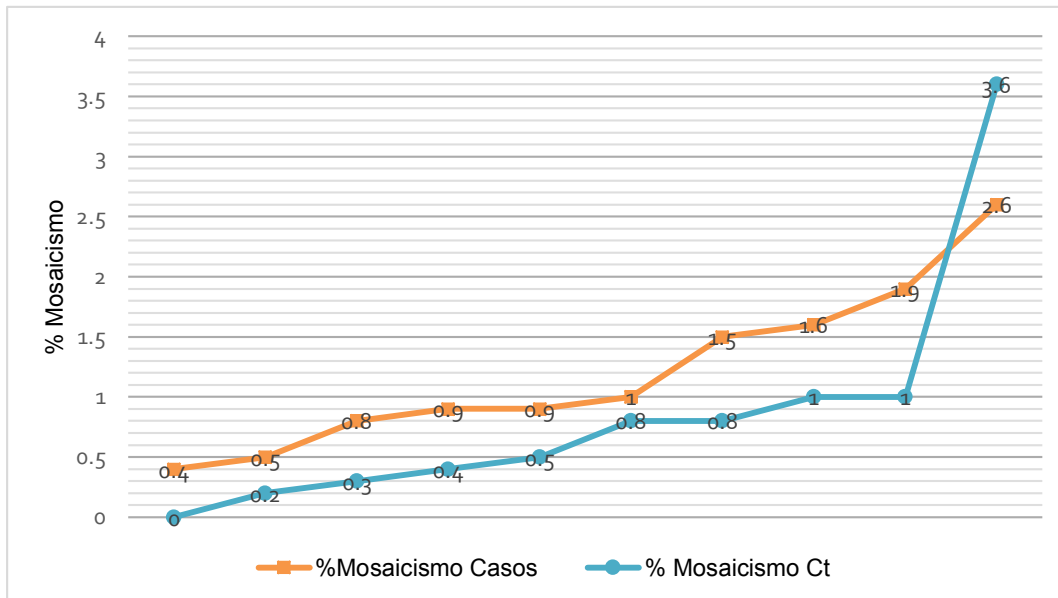


**Gráfica 3.** Porcentaje de células con aneuploidía del Cromosoma X en función de la edad en Células de descamación del epitelio urinario en Pacientes con FOP.

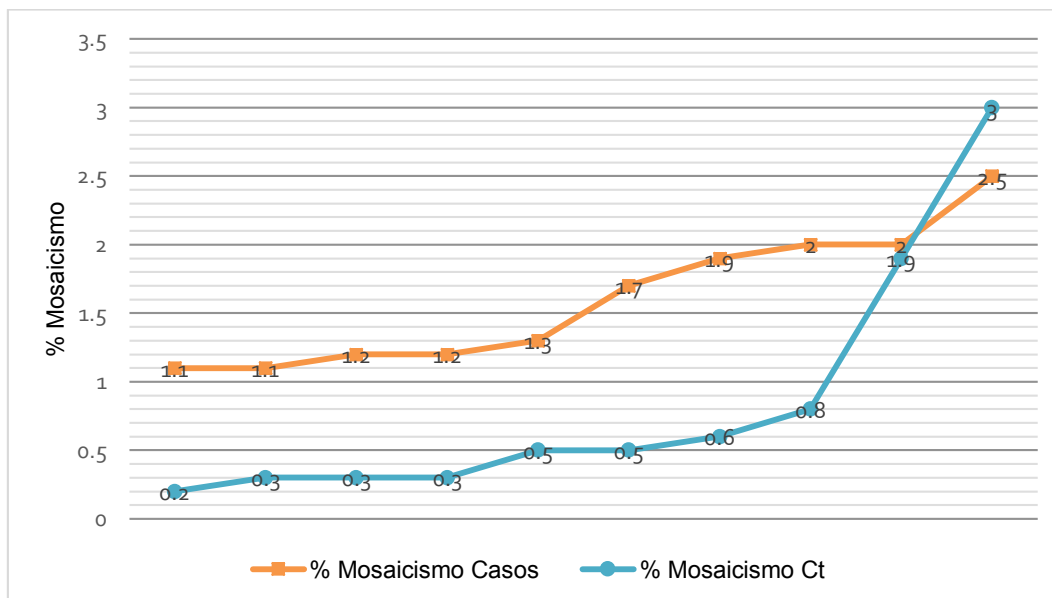


**Gráfica 4.** Porcentaje de células con aneuploidía del Cromosoma X en función de la edad en Células de descamación del epitelio urinario en el Grupo Control.

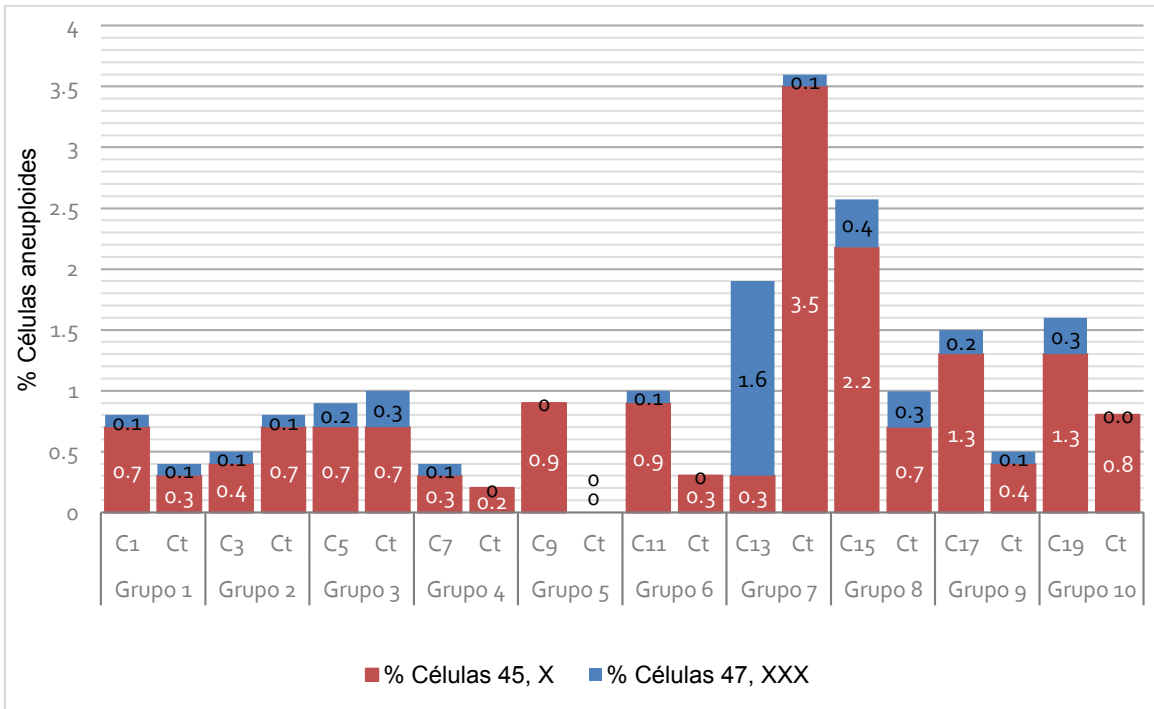
Entre las pacientes se halló un intervalo de mosaicismos del cromosoma X de 0.4-2.6% con una mediana de 0.95 en Sangre periférica y de 1.09-2.5%, con una mediana de 1.5 en Células de descamación del urotelio, mientras que, en el Grupo Control se encontró un intervalo de 0-3.6% con una mediana de 0.65 en Sangre periférica y de 0.2-3% con una mediana de 0.5 en Células de descamación del urotelio.



**Gráfica 5.** Intervalos del porcentaje de Mosaicismo del Grupo Control y Pacientes con FOP en Leucocitos de Sangre Periférica.

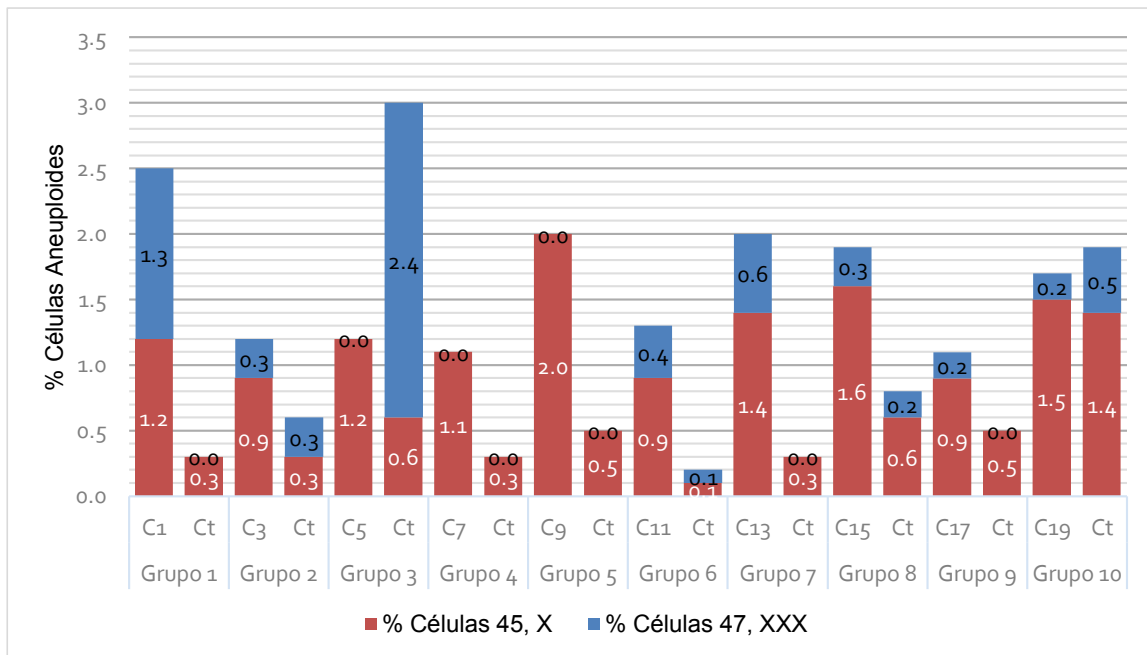


**Gráfica 6.** Intervalos del porcentaje de Mosaicismo del cromosoma X del Grupo Control y Pacientes con FOP en Células de descamación del epitelio urinario.



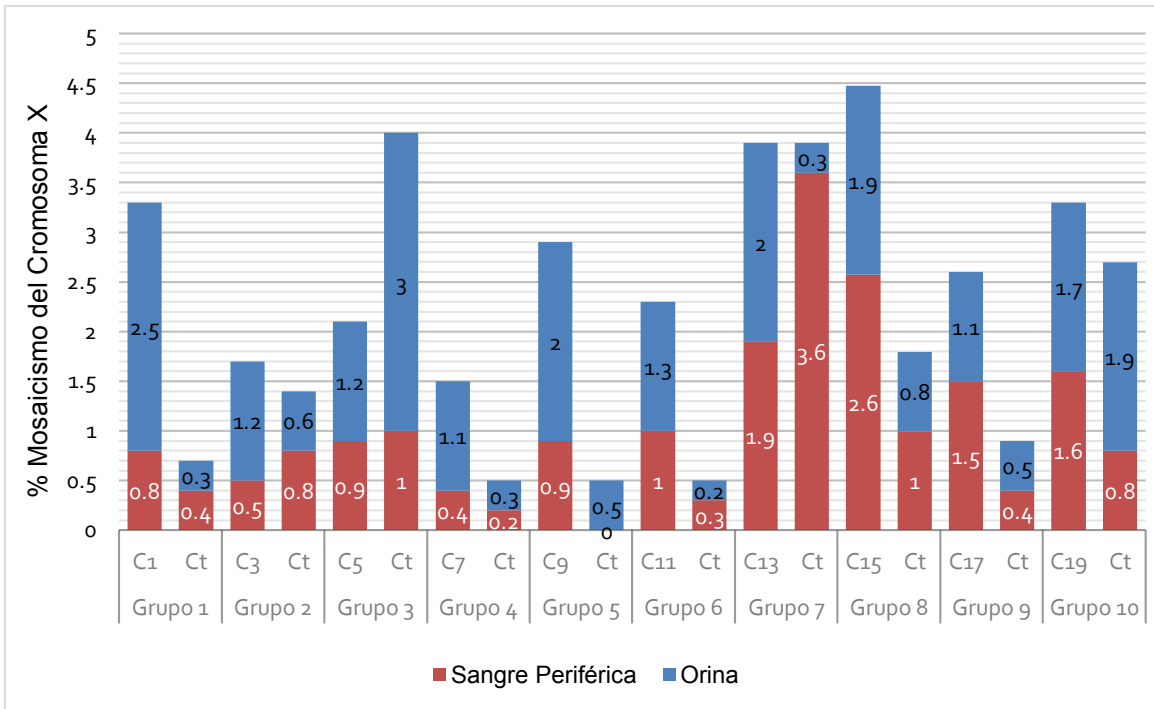
**Cn:** Número de Caso. **Ct:** Control.

**Gráfica 7.** Comparación Caso vs. Control del porcentaje de Mosaicismo del Cromosoma X en Leucocitos de Sangre Periférica.



**Cn:** Número de Caso. **Ct:** Control.

**Gráfica 8.** Comparación Caso vs. Control del porcentaje de Mosaicismo del Cromosoma X en Células de descamación del epitelio urinario.



**Cn:** Número de Caso. **Ct:** Control.

**Gráfica 9.** Comparación del porcentaje de mosaicismo Caso vs. Control en Leucocitos de Sangre Periférica y Células de descamación del epitelio urinario.

## VIII. DISCUSIÓN

---

Para evaluar la presencia de células con aneuploidía del cromosoma X se realizó la técnica de FISH analizando 1000 núcleos tanto de leucocitos de sangre periférica como de células de descamación del epitelio urinario, tal población de células permite descartar la presencia de mosaicismo del cromosoma X de 1% con un nivel de confianza del 99% (Hook, 1977). En las pacientes como en el grupo control se encontraron células con aneuploidía del cromosoma X (Ver Imagen 31 a 33) siendo más frecuente la monosomía con un porcentaje de 0.89% y de 0.76% en leucocitos de sangre periférica de pacientes con FOP y en el grupo control respectivamente, mientras que en células de descamación del urotelio se encontró que el porcentaje de células 45,X en pacientes con FOP es de 1.26% mientras que en el grupo control es de 0.48%. Las células con trisomía del cromosoma X presentan menor frecuencia con un porcentaje de 0.31% y 0.1% en sangre periférica de pacientes con FOP y el grupo control, respectivamente; en células de descamación del urotelio las células trisómicas representan el 0.32% en pacientes y el 0.35% en el grupo control. Guttenbach et al., 1995, Devi et al., 1998, y Baronchelli et al., 2011 sugieren que al parecer existe una selección que favorece la viabilidad de células 45,X sobre las células 47,XXX.

La asociación entre el incremento de células con aneuploidía del cromosoma X y la edad en mujeres fenotípicamente normales se conoce desde 1961, este proceso de “aneuploidización” se atribuye a errores en la disyunción de los cromosomas durante la mitosis, se genera desde la infancia con prevalencia a partir de los 40 años y se considera normal (Baronchelli et al., 2011; Iourov et al., 2008). Los estudios acerca de la pérdida preferencial del cromosoma X se habían realizado con anterioridad exclusivamente en células sanguíneas (Abruzzo et al., 1985; Guttenbach et al., 1995; Russell et al., 2007), en este proyecto se analizaron células sanguíneas y células de descamación del urotelio pues ambas provienen de distinto origen embrionario, sumado a esta consideración es particularmente interesante estudiar las células provenientes del urotelio puesto que la formación del sistema urinario y del sistema reproductor femenino, particularmente el ovario, guardan una relación estrecha. Al analizar en leucocitos de sangre periférica del grupo control el porcentaje de células aneuploides del cromosoma X en relación a la edad (Ver Tabla 11, Gráfica 2) no se encontró relación lineal tal como reportaron Guttenbach et al., 1995, Devi et al., 1998 y Lakhal et al., 2010, tampoco se ajusta a la regresión cuadrática reportada por Russell et al., 2007; sin embargo, si observamos una tendencia al incremento

de células aneuploides, en particular de células 45,X conforme avanza la edad, en contraste, las células con trisomía 47,XXX no parecen tener el mismo comportamiento que las células monosómicas. En el caso de células de descamación del epitelio urinario sí se estableció una relación lineal entre el porcentaje de células 45,X y la edad en el grupo control (Ver Tabla 12 y Gráfica 4), este hallazgo plantea que al igual que en células sanguíneas en otros tejidos ocurre la pérdida del sexocromosoma. Por otro lado, al igual que en sangre, en células provenientes del urotelio el porcentaje de células 47,XXX no muestra relación con la edad.

Al observar la relación entre el porcentaje de células con aneuploidía del cromosoma X y la edad en pacientes con FOP (Ver Tabla 11 y 12) se encontró que la población de células aneuploides 45,X o 47,XXX no se incrementa a lo largo de los años de manera constante como sucede en el grupo control sino que varía de paciente a paciente, y se presenta tanto en leucocitos como en células de descamación del urotelio (Ver Gráfica 1 y 3), lo cual sugiere que en las pacientes con FOP el mosaicismo del cromosoma X ya se encontraba presente desde edades tempranas y la pérdida cromosómica relacionada con la edad quedó encubierta por el mosaicismo preexistente. Este resultado es consistente con los resultados de Devi et al., 1998 y Lakhal et al., 2010 en donde tampoco se encontró correlación entre el porcentaje de monosomías del X con la edad de las pacientes con FOP.

Con respecto a los intervalos de mosaicismo en pacientes y controles en leucocitos y células de descamación de epitelio urinario con el objetivo de encontrar los puntos de corte para considerar o rechazar la existencia de mosaicismo de baja proporción del cromosoma X en las pacientes, se observó lo siguiente: el intervalo de mosaicismo en sangre para pacientes con FOP es de 0.4-2.57% y en el grupo control es de 0-3.6% (Ver Gráfica 5), mientras que, en células de orina el intervalo de mosaicismo en pacientes con FOP es de 1.09-2.5% y de 0.2-3% en el grupo control (Ver Gráfica 6). Estos intervalos tienen semejanza con intervalos de mosaicismo del cromosoma X reportados anteriormente por otros autores en linfocitos de sangre periférica utilizando la técnica de FISH, Devi et al., 1998, analizando 1000 núcleos, encontró que el porcentaje de mosaicismo del cromosoma X en 20 mujeres con salud reproductiva demostrada fue de 0.9-5.1% mientras que en 15 pacientes con FOP el intervalo de mosaicismo va de 3.40 a 8.47%, Lakhal et al., 2010 estableció un intervalo de 0.80-3.85% de mosaicismo del cromosoma X en 100 mujeres sanas de 17 a 37 años de edad y en 200 pacientes con FOP el intervalo de mosaicismo fue de 0.64-10.23%, este resultado se basa en el análisis de 500 núcleos interfásicos;

Baronchelli et al., 2011 analizó de 40-210 núcleos interfásicos y diferenció las poblaciones celulares con monosomía (45,X) y con trisomía encontrando que el grupo control tenía un porcentaje de células monosómicas de 2.7% y de 0.6% de células trisómicas mientras que, en pacientes con FOP el porcentaje de células monosómicas fue de 7.5% y de 3.3% en el caso de células con trisomía del X.

Es notable que los intervalos de mosaicismo establecidos mediante este proyecto son menores a los reportados por Devi et al., 1998, Lakhal, 2010 y Baronchelli et al., 2011 que realizan sus estudios en núcleos interfásicos de linfocitos y en núcleos de linfocitos T cultivados, esto puede deberse a que en el presente proyecto no se seleccionó únicamente a la población de linfocitos en sangre periférica sino que se decidió incluir y estudiar la totalidad de leucocitos, sumado a esto, se analizan células de descamación del epitelio urinario, población celular que hasta este proyecto no se había analizado; por otro lado el número total de células analizadas en este proyecto es superior al número de células que se analizaron en estudios anteriores. Así mismo cabe resaltar que en la mayoría de los casos el porcentaje de mosaicismo en los pacientes es mayor que en el grupo control tanto en leucocitos como en células de descamación del urotelio y que el límite inferior de los intervalos de mosaicismo del cromosoma X siempre es mayor en pacientes con FOP en los dos tejidos a pesar de que los límites superiores del intervalo sean mayores en el grupo control.

Para observar la variación en los porcentajes de células 45,X y 47,XXX entre los pares Paciente-Control se formaron 10 grupos, en la Gráfica 7 se aprecia que en los grupos 1,4,5,6,8,9 y 10 la paciente con FOP correspondiente al grupo posee una proporción mayor de células aneuploides y donde las células 45,X representan la mayor población en comparación a las mujeres que integran el grupo control en que la cantidad de células aneuploides es menor y de igual forma, las células 45,X son más frecuentes.

En la Gráfica 8, para los grupos 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 en Células de descamación del epitelio urinario ocurre lo mismo, las pacientes que integran cada grupo tienen mayor porcentaje de células aneuploides que sus respectivos controles, cabe mencionar que en estas células aunque siguen imperando las células 45,X, la población de células 47,XXX tiene mayor porcentaje que en sangre periférica. Así mismo, las diferencias en cuanto al porcentaje de mosaicismo entre pacientes y controles son más evidentes en células provenientes del urotelio que en Sangre periférica. En discordancia con lo observado en la mayoría de los grupos se encuentran los controles del Grupo 2, 3 y 7 en Sangre periférica y del Grupo 3 y



10 de Células de descamación del urotelio que presentan una cantidad superior de células aneuploides que la Paciente respectiva, sólo el Control del Grupo 3 muestra el mismo comportamiento en los dos tejidos de estudio, mientras que los otros solo tienen discrepancia en uno de los tejidos. Existen dos potenciales explicaciones para esto, una de ellas es el hecho de que el mosaicismo es tejido específico, por lo tanto el resultado del análisis cromosómico en un tejido no refleja la situación de otros tejidos y la segunda es la posibilidad de que estas mujeres tengan mosaicismo de baja proporción del cromosoma X pero que hasta el momento esta condición no ha manifestado su impacto biológico.

Por último, se realizó la comparación grupal del porcentaje de mosaicismo del cromosoma X para los dos tejidos de estudio (Ver Gráfica 9) encontrando que en pacientes con FOP el grado de mosaicismo del sexocromosoma en células de descamación del epitelio urinario es mayor que el grado de mosaicismo encontrado en leucocitos de sangre periférica. Lo anterior apoya nuestra hipótesis, en la que se plantea que la morfogénesis de la vejiga urinaria y el ovario se relacionan, por lo que el hallazgo de mosaicismo de baja proporción en células del urotelio puede reflejar también la situación del ovario. Aunque no se conoce plenamente el impacto del mosaicismo de baja proporción en la patogénesis de la Falla Ovárica Prematura sí se conoce la importancia de la presencia de los dos cromosomas X para la formación de los folículos ováricos, de tal manera que la ausencia de uno de ellos o la presencia de una copia extra puede causar la muerte de las células germinales o acelerar la atresia provocando la aparición de la FOP (Dixit et al., 2010; Baronchelli et al., 2011).

## IX. CONCLUSIONES

---

- Los hallazgos obtenidos apoyan el hecho de que las pacientes con FOP presentan monosomía del X en células de descamación del urotelio y en leucocitos de sangre periférica con mayor frecuencia que las mujeres control. La presencia de células con monosomía del X en las pacientes con FOP es mayor en células de descamación del urotelio que en leucocitos.
- Este estudio muestra la relación existente entre la edad y el incremento en el porcentaje de células aneuploides del cromosoma X en las mujeres que integraron el Grupo Control, mientras que en las pacientes con Falla Ovárica Prematura tal correlación no se observó posiblemente debido a la presencia de un mosaico de base asociado a la Falla Ovárica Prematura.
- En esta población se observó que el intervalo de mosaicismo del cromosoma X en Pacientes con FOP es de 0.4-2.6% en Sangre periférica y de 1.09-2.5% en Células de descamación del urotelio, en el grupo control el intervalo es de 0-3.6% en Sangre periférica y 0.2-3% en células de descamación del urotelio. El 80% de las pacientes con FOP supera el intervalo de mosaicismo impuesto por el grupo control.

## X.REFERENCIAS

---

1. Abruzzo, MA., Mayer, M., Jacobs, PA. (1985). Aging and aneuploidy: evidence for the preferential involvement of the inactive X chromosome. *Cytogenet Cell Genet.* 39: 275–278.
2. Ángel, G., Mejía, M. (2006). Interpretación clínica del laboratorio. 7a. ed. Colombia. Médica Panamericana. Págs.284, 285,310, 387.
3. Arteaga, Manuel, García, María Isabel. (2014). Embriología Humana y Biología del desarrollo, México, Médica Panamericana.
4. Baronchelli, S., Conconi, D., Panzeri, E., Bentivegna, A., Redaelli, S., Lissoni, S., Saccheri, F., Villa, N., Crosti, F., Sala, E., Martinoli, E., Volontè, M., Marozzi, A., Dalprà, L. (2011). Cytogenetics of premature ovarian failure: an investigation on 269 affected women. *J Biomed Biotechnol.* 2011:370195. doi: 10.1155/2011/370195. 1-9.
5. Bayani, J., Squire, JA. (2004). Cap. 22 Fluorescence in situ Hybridization (FISH). En: *Curr Protoc Cell Biol.* EUA. John Wiley and Sons, pág. 22.4.1-22.4.52.
6. Beshay, V., Carr, B., (2013), Cap. 2. Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis and Control of the Menstrual Cycle. En *Clinical Reproductive Medicine and Surgery: A Practical Guide.* EUA. Springer, pág.: 31-40.
7. Bonilla, F., et al. (2009). Reproducción asistida. España. *Médica Panamericana.* Págs.: 4-5.
8. Brenner, S., Miller, Jeffrey. (2013). Brenner's Encyclopedia of Genetics. 2a ed. Polonia. *Academic Press.* Pág.: 546-548.
9. Bretault, M., Christin-Maitre, S., (2015), Amenorrea, *EMC-Tratado de Medicina.* 19(1):1-9.
10. Cabero, L., Saldívar, E., Cabrillo, E. (2007). Obstetricia y medicina materno-fetal. España. *Médica Panamericana.* Págs.: 145-148.
11. Carlson, B. (2014). Embriología Humana y Biología del Desarrollo. 5ta. Ed. Saunders. España.
12. Cordts, EB., Christofolini, DM., Dos Santos, AA., Bianco, B., Barbosa, CP. (2011). Genetic aspects of premature ovarian failure: a literature review. *Arch Gynecol Obstet.* 283(3):635-43.
13. Cox, L., Liu, JH. (2014). Primary ovarian insufficiency: an update. *Int J Womens Health.* 6:235-243.
14. De Vos, M., Devroey, P., Fauser, BC. (2010). Primary ovarian insufficiency. *Lancet.* 376(9744):911-21.

15. Del Castillo, V., Uranga, R., Zafra, Gildardo. (2012). Genética clínica. México. *Ed. El Manual Moderno*. Pág. 215-228.
16. Devi, AS., Metzger, DA., Luciano, AA., Benn, PA. (1998). 45,X/46,XX mosaicism in patients with idiopathic premature ovarian failure. *Fertil Steril*.70 (1):89-93.
17. Dixit, H., Rao, L., Padmalatha, V., Raseswari, T., Kapu, AK., Panda, B., Murthy, K., Tosh, D., Nallari, P., Deenadayal, M., Gupta, N., Chakrabarthy, B., Singh, L. (2010). Genes governing premature ovarian failure. *Reprod Biomed Online*. 20(6):724-40.
18. Dorantes, A. Martínez, C. Guzmán, A. (2012). Endocrinología clínica. 4a. ed. México. Manual moderno. Págs.685.
19. Frank, S. (2014). Somatic mosaicism and disease. *Current Biology*. 24(12): R577-R581.
20. García, J., Lara, R., Juárez, K. (2012). Insuficiencia ovárica prematura: una revisión. *Rev Chil Obstet Ginecol*. 77(2): 148-153.
21. Gersak, K., Veble, A. (2011). Low-level X chromosome mosaicism in women with sporadic premature ovarian failure. *Reprod Biomed Online*. 22(4):399-403.
22. Gougeon, A. (2010). Human ovarian follicular development: from activation of resting follicles to preovulatory maturation. *Ann Endocrinol (Paris)*. 71(3):132-43.
23. Grati, FR. (2014). Chromosomal Mosaicism in Human Feto-Placental Development: Implications for Prenatal Diagnosis. *J Clin Med*. 24;3(3):809-837.
24. Guttenbach, M., Koschorz, B., Bernthaler, U., Grimm, T., Schmid, M. (1995). Sex chromosome loss and aging: in situ hybridization studies on human interphase nuclei. *Am J Hum Genet*. 57(5):1143-50.
25. Haaf, T. (2006). Fluorescence In Situ Hybridization. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. EUA. John Wiley and Sons, pág.1-21.
26. Havelock, J., Rainey, W., Carr, B. (2004). Ovarian granulosa cell lines. *Mol Cell Endocrinol*. 228(1-2):67-78.
27. Homer, L., Le Martelot, MT., Morel, F., Amice, V., Kerlan, V., Collet, M., De Braekeleer, M. (2010). 45,X/46,XX mosaicism below 30% of aneuploidy: clinical implications in adult women from a reproductive medicine unit. *Eur J Endocrinol*. 162(3):617-23.
28. Hook, EB. (1977). Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95% and 99% confidence limits and comments on use. *Am J Hum Genet*. 29(1):94-7.
29. Howat, WJ., Wilson, BA. (2014). Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods*. 70(1):12-9.

30. Iourov, IY., Vorsanova, SG., Yurov, YB. (2008). Chromosomal mosaicism goes global. *Mol Cytogenet.* 25;1:26.
31. Jin, L., Lloyd, RV. (1997). In situ hybridization: methods and applications. *J Clin Lab Anal.* 11(1):2-9.
32. Jin-Chen, C. (2013). Cap. 8 Autosomal aneuploidy. En: *The principles of clinical cytogenetics*. 3a ed. EUA. Humana Press. Pág. 133-164.
33. Kalantaridou, SN., Davis, SR., Nelson, LM. (1998). Premature ovarian failure. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 27(4):989-1006.
34. Kiernan, J. (2000). Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Microscopy today.* 1: 8-12.
35. Kovanci, E., Schutt, AK. (2015). Premature ovarian failure: clinical presentation and treatment. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 42(1):153-61.
36. Kuo, PL., Guo, HR. (2004). Mechanism of recurrent spontaneous abortions in women with mosaicism of X-chromosome aneuploidies. *Fertil Steril.* 82(6):1594-601.
37. Kurjak, A., Chervenak, F. (2008). Donald School: Ecografía en obstetricia y ginecología. 2a ed. Argentina. Médica Panamericana. Págs.: 923-925.
38. Lacadena, J. (1996). Citogenética. España. Ed. Complutense. Pág. 791-797.
39. Lakhal, B., Braham, R., Berguigua, R., Bouali, N., Zaouali, M., Chaieb, M., Veitia, RA., Saad, A., Elghezal, H. (2010). Cytogenetic analyses of premature ovarian failure using karyotyping and interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) in a group of 1000 patients. *Clin Genet.* 78(2):181-5.
40. Layman, C., (2012), Cap. 30. Disorders of the hypothalamic-Pituitary-Gonadal axis. En *Handbook of Neuroendocrinology*. EUA. Elsevier, pág: 659-669.
41. Leal de Assumpção, C. (2014). Falência ovariana precoce. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 58(2): 132-142.
42. Levsky, JM., Singer, RH. (2003). Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *J Cell Sci.*;116 (Pt 14):2833-2838.
43. Lisker, R., Zentella, A., Grether, P. (2014). Introducción a la genética humana. 4ta ed. México. *El Manual Moderno*. Pág.: 142-148, 150-154.
44. López, N., Mayorga, J., Cravioto, M. (2012). Mosaicismo de baja proporción del cromosoma X en pacientes con insuficiencia ovárica prematura idiopática. *Revista de endocrinología y nutrición.* 20(1): 19-24.
45. Lupski, JR. (2013). Genetics. Genome mosaicism--one human, multiple genomes. *Science.* 26;341(6144):358-359.

46. Machiela, MJ., Chanock, SJ. (2013). Detectable clonal mosaicism in the human genome. *Semin Hematol.* 50(4):348-59.
47. Michalakis, K., Coppack, SW. (2012). Primary ovarian insufficiency: relation to changes in body composition and adiposity. *Maturitas.* 71(4):320-325.
48. Nelson, LM. (2009). Clinical practice. Primary ovarian insufficiency. *N Engl J Med.* 360(6):606-14.
49. Nikon. (2015). Fluorescencia. 20 agosto 2015, de Nikon Instruments Inc. Sitio web: [http://www.nikoninstruments.com/es\\_AMS/Learn-Explore/Centro-de-Informacion/Fluorescencia](http://www.nikoninstruments.com/es_AMS/Learn-Explore/Centro-de-Informacion/Fluorescencia)
50. Nussbaum, R.L. (2008). Thompson & Thompson Genética en Medicina. 7a ed. España. *Masson.* Pág.: 59-83.
51. Oliva, R., Vidal-Taboada, J. (2006). Genoma humano: nuevos avances en investigación, diagnóstico y tratamiento. España. *Ed. De la Universitat de Barcelona.* Pág.:74-78.
52. Pacheco, José. (2010). Falla Ovárica Precoz. *Anales de la Facultad de Medicina.* 71(3): 191-200.
53. Pelosi, E., Simonsick, E., Forabosco, A., Garcia-Ortiz, JE., Schlessinger D. (2015). Dynamics of the ovarian reserve and impact of genetic and epidemiological factors on age of menopause. *Biol Reprod.* 92(5):130.
54. Petersen, BL., Sørensen, MC., Pedersen, S., Rasmussen, M. (2004). Fluorescence in situ hybridization on formalin-fixed and paraffin-embedded tissue: optimizing the method. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 12(3):259-65.
55. Pierce, B. (2010). Genética: un enfoque conceptual. España. Médica Panamericana. Pág.:238.
56. Pulido, E. (2010). *Estandarización de la técnica de hibridación in situ para la detección de Streptococcus agalactiae en tejidos de tilapia roja (Oreochromis sp.) y su uso potencial en estudios epidemiológicos y de patogénesis.* Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia.
57. Quintanilla, E. (2004). *Implementación de la técnica de FISH en el laboratorio de hematología clínica para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con leucemia granulocítica crónica.* Tesis de licenciatura. Universidad de Nuevo León.
58. Rafique, S., Sterling, EW., Nelson, LM. (2012). A new approach to primary ovarian insufficiency. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 39(4):567-586.

59. Robberecht, C., Fryns, JP., Vermeesch, JR. (2010). Piecing together the problems in diagnosing low-level chromosomal mosaicism. *Genome Med.* 29;2(7):47.
60. Rojas, S., Lopera, J., Cardona, J., Vargas, N. Hormaza, M. (2014). Síndrome metabólico en la menopausia. *Rev. chil. obstet. ginecol.* 79(2): 121-128.
61. Rosenberg, L., Rosenberg, D. (2012). Cap. 11 Chromosome abnormalities. En: *Human Genes and Genomes*. EUA. Academic Press. Pág.: 141-167.
62. Russell, L.M., Strike, P., Browne, C.E., Jacobs, P.A. (2007). X chromosome loss and ageing. *Cytogenet Genome Res.* 116:181-185.
63. Scucces, M. (2008). Insuficiencia ovárica prematura. *Rev Obstet Ginecol Venez.* 68(4): 263-276.
64. Simpson, JL., Rajkovic, A. (1999). Ovarian differentiation and gonadal failure. *Am J Med Genet.* 89(4):186-200.
65. Singh, V. (2012). Textbook of clinical embryology. India. Saunders. Pág. 234.
66. Sonmezer, M., Oktay, K. (2004). Fertility preservation in female patients. *Hum Reprod Update.* 10: 251–66.
67. Spring, K. (2003). Fluorescence microscopy. *Encyclopedia of optical engineering*. EUA. Marcel Dekker Inc., pág. 548-555.
68. Sundblad, V., Chiauzzi, VA., Escobar, ME., Dain, L., Charreau, EH. (2004). Screening of FSH receptor gene in Argentine women with premature ovarian failure (POF). *Mol Cell Endocrinol.* 222(1–2):53–59.
69. Tubbs, R., Stoler, M. (2009), Cap. 11. Fluorescence in situ hybridization. En *Cell and tissue based molecular pathology*. China. Elsevier, pág.: 104-113.
70. Vázquez, J., Morfin, J., Motta, E. (2010). Estudio del Climaterio y la Menopausia. *Colegio Mexicano de Especialistas en Ginecología y Obstetricia A.C.* 235-246.
71. Vujovic, S. (2009). Aetiology of premature ovarian failure. *Menopause Int.* 15(2):72-75.
72. Welt, CK. (2008). Primary ovarian insufficiency: a more accurate term for premature ovarian failure. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 68(4):499-509.
73. White, A., Porterfield, Susan. (2012). Cap. 10. The Female Reproductive System. En *Endocrine and Reproductive Physiology*. EUA. Elsevier, pág.: 216-238.
74. Yung JF. (1996). New FISH probes--the end in sight. *Nat Genet.* 14(1):10-2.