

Estudio cromosómico de 303 pérdidas gestacionales en México

Luz M. Garduño-Zarazúa,^{1,2,3} Dora G. Mayén,¹ Ricardo Meléndez-Hernández,¹ Antonio J. Paz-Martínez,¹ Eva Ramírez-Arroyo,¹ David Sosa,¹ Mónica Aguinaga,⁴ Javier Pérez-Durán,⁵ Osiris Ríos,⁶ Jaime López-Valdez,^{7,8} Leda Torres⁶ y Sara Frías^{6,9*}

¹Unidad de Genética Aplicada, Hospital Ángeles Lomas, Huixquilucan, Estado de México; ²Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México; ³Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México; ⁴Departamento de Genética, Instituto Nacional de Perinatología, Ciudad de México; ⁵Departamento de Investigación en Salud Reproductiva y Perinatal, Instituto Nacional de Perinatología, Ciudad de México; ⁶Laboratorio de Citogenética, Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México; ⁷Departamento de Genética, Hospital Centenario "Miguel Hidalgo", Aguascalientes, Aguascalientes; ⁸Hospital de la Mujer, Instituto de Salud del Estado de Aguascalientes, Aguascalientes; ⁹Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México. México

Resumen

Antecedentes: Las alteraciones cromosómicas están presentes en 50 a 60 % de los abortos espontáneos y en 6 a 19 % de los mortinatos. Aunque se prefieren los microarreglos para estudiarlos, numerosos hospitales no pueden ofrecerlos. **Objetivo:** Presentar los resultados del estudio citogenético de 303 productos de la concepción (POC), 184 se obtuvieron de abortos espontáneos, 49 fueron mortinatos y en 17 no se identificó la de edad gestacional. **Material y métodos:** Se empleó cariotipo, hibridación in situ con fluorescencia, secuencias cortas repetidas en tándem y microarreglos, según el tipo de pérdida y la muestra disponible. **Resultados:** En 29 POC se encontró tejido materno, por lo que fueron eliminados de los análisis. En 250 (91.2 %)/274 casos se obtuvieron resultados informativos; la tasa de éxito del cariotipo fue de 80.7 %; la de los microarreglos de SNP, de 94.5 %; y la de la hibridación fluorescente in situ y la repetición corta en tándem, de 100 %. Se observaron anomalías citogenéticas en 57.6 % de los abortos espontáneos y en 24.5 % de los mortinatos; 94 % de las anomalías fueron numéricas y 6 %, submicroscópicas. **Conclusiones:** El cariotipo en conjunto con el estudio de secuencias cortas repetidas en tándem para descartar contaminación de células maternas es efectivo para estudiar abortos espontáneos; los microarreglos se recomiendan en los mortinatos.

PALABRAS CLAVE: Aborto espontáneo. Cariotipo. Hibridación in situ con fluorescencia. Microarreglo. Mortinato. Secuencias cortas repetidas en tándem.

Chromosome analysis of 303 pregnancy losses in Mexico

Abstract

Background: Chromosomal abnormalities are present in 50 to 60 % of miscarriages and in 6 to 19 % of stillbirths. Although microarrays are preferred for studying chromosomal abnormalities, many hospitals cannot offer this methodology. **Objective:** To present the results of the cytogenetic analysis of 303 products of conception (POC), which included 184 miscarriages, 49 stillbirths and 17 cases of undefined age. **Material and methods:** Karyotyping, fluorescence in situ hybridization, short tandem repeats and microarrays were used, depending on the type of loss and available sample. **Results:** In 29 POCs we found maternal tissue and were eliminated from the analyses. Informative results were obtained in 250 (91.2 %)/274 cases;

*Correspondencia:

Sara Frías

E-mail: sarafrias@iibiomedicas.unam.mx

0016-3813/© 2024 Academia Nacional de Medicina de México, A.C. Publicado por Permanyer. Este es un artículo open access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Fecha de recepción: 27-09-2023

Fecha de aceptación: 05-01-2024

DOI: 10.24875/GMM.23000396

Gac Med Mex. 2024;160:81-91

Disponible en PubMed

www.gacetamedicademexico.com

the karyotyping success rate was 80.7 %; that of single nucleotide polymorphism microarrays, 94.5 %; and that of fluorescence in situ hybridization and short tandem repeat, 100 %. Cytogenetic abnormalities were observed in 57.6 % of miscarriages and in 24.5 % of stillbirths; 94 % of total anomalies were numerical and 6 % were submicroscopic. Conclusions: Karyotyping with simultaneous short tandem repeat study to rule out contamination of maternal cells is effective for studying miscarriages; in stillbirths, microarrays are recommended.

KEYWORDS: Miscarriage. Karyotype. Fluorescence in situ hybridization. Microarray. Stillbirth. Short tandem repeats.

Antecedentes

De todos los embarazos clínicamente reconocidos, entre 15 y 20 % termina en pérdida del producto de la concepción (POC). Las causas son complejas e incluyen anomalías inmunes, endocrinológicas, anatómicas y genéticas.¹⁻⁵ Aproximadamente de 50 a 60 % de los abortos espontáneos (< 20 semanas de gestación) conllevan una anomalía cromosómica, cuya frecuencia disminuye a medida que evoluciona el embarazo, alcanzando de 6 a 19 % en los mortinatos (> 20 semanas de gestación).¹⁻⁵ Actualmente, 25 % de los mortinatos y 50 % de los abortos espontáneos se clasifican como de causa desconocida.^{3,6}

La identificación de una anomalía cromosómica como causa de pérdida del embarazo proporciona información importante sobre los riesgos de recurrencia, ayuda a identificar portadores de reordenamientos cromosómicos que predisponen a pérdida recurrente del embarazo, predice futuros nacimientos con defectos congénitos o discapacidad intelectual y brinda opciones para el diagnóstico prenatal o, previo a la implantación, para futuros embarazos.^{1,4,6}

Una alta proporción de anomalías cromosómicas se detecta mediante cariotipo en cultivo de tejido embrionario, fetal o de vellosidades coriónicas, y aunque puede implicar problemas como fallas en el cultivo celular en 20 a 40 %, contaminación de células maternas y un largo tiempo desde el procesamiento hasta el análisis (de cuatro a seis semanas), la prueba cromosómica proporciona información valiosa sobre la causa de la pérdida del embarazo y es el método más utilizado en los países en desarrollo, principalmente debido al alto costo de los análisis moleculares.^{1,2,7-11} Sin embargo, cuando es posible, se utilizan otras estrategias citogenómicas a manera de procedimientos de rescate, como la hibridación in situ con fluorescencia (FISH) y la PCR fluorescente cuantitativa (QF-PCR), ambas ofrecen una detección rápida de aneuploidías de cromosomas específicos y en paralelo con el ADN materno, con la QF-PCR es posible identificar embarazos molares, el origen

de la aneuploidía y confirmar que el tejido analizado es embrionario y no materno. Desafortunadamente, estas técnicas no pueden detectar anomalías de *loci* no estudiados y no pueden considerarse pruebas definitivas.⁶ Por otro lado, los costosos métodos moleculares del genoma completo, como la hibridación genómica comparada y los microarreglos de sondas de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP arrays),^{2,12} son capaces de detectar pequeños desequilibrios genómicos, no requieren células vivas ya que el ADN se extrae directamente del tejido y tienen una alta tasa de éxito.^{1,2,4,8} Por lo tanto, cuando sea posible, se debe utilizar una combinación de dos o más métodos citogenéticos convencionales y moleculares para incrementar la eficiencia diagnóstica.¹³

En este trabajo presentamos los resultados de los estudios citogenéticos y citogenómicos de 303 pérdidas gestacionales. Destacamos que la mayoría de las alteraciones encontradas en los abortos fueron cromosómicas, pero un porcentaje mucho menor de estas (compatibles con nacer vivo) se identificó mediante cariotipo en los mortinatos. En este tipo de POC, los microarreglos de SNP pueden proporcionar más y nueva información sobre la pérdida del embarazo.

Material y métodos

Población de estudio

En un período de cinco años (de 2014 a 2018), se recolectaron 310 tejidos de POC en tres centros médicos de México. Las muestras fueron codificadas y procesadas de forma anónima. El proyecto fue autorizado por los comités de ética de los hospitales participantes y se obtuvieron cartas de consentimiento informado. Siete de 310 casos fueron eliminados por falta de datos o por decisión de los participantes, por lo que la muestra de estudio se redujo a 303 POC; 226 correspondieron a abortos, 53 a mortinatos y en 24 no se indicó la edad gestacional. Las edades materna y paterna de los 303 casos estudiados se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Población de estudio agrupada por tipo de pérdida del embarazo

Tipo de pérdida	Edad del padre (años)*		Edad de la madre (años)*		Edad gestacional (semanas)		Total
	Media ± DE	Rango	Media ± DE	Rango	Media ± DE	Rango	
Aborto espontáneo**	35.84 ± 5.3	21-51	33 ± 5.6	14-47	10.61 ± 3.7	4-20	226
Mortinato†	37.28 ± 6.2	20-44	31.30 ± 6.4	14-45	27.8 ± 4.9	21-39	53
Indefinido	37 ± 2.82	35-39	31.75 ± 5.7	25-41	-	-	24
Total			-	-	-	-	303

*Las edades paterna y materna no son estadísticamente diferentes entre abortos espontáneos y mortinatos, $p = 0.344$ y $p = 0.169$, respectivamente (U de Mann-Whitney).

**Antes de la semana 20 de gestación. †Después de la semana 20 de gestación.

DE: desviación estándar.

Para detectar alteraciones en el genoma se realizaron una o más de las siguientes técnicas: cariotipo con tinción de bandas GTG, FISH, secuencias cortas repetidas en tándem (STR) y microarreglos de SNP.

Cultivo celular para cariotipo y bandas GTG

El tejido de los POC fue seleccionado y cortado con un bisturí. Se mantuvieron de dos a cinco cultivos primarios de cada caso con medio de cultivo Amniomax suplementado (medio basal Gibco™ AmnioMAX™ C-100) a 37 °C y 5 % de CO₂; los cultivos se revisaron cada 24 horas en un microscopio invertido hasta que se observaron figuras mitóticas. Para la cosecha se utilizaron 10 µg/mL de colcemida (HBSS Gibco™ KaryoMAX™ Colcemid™) durante 15 a 20 minutos y solución hipotónica de citrato de sodio a 0.8 % durante 30 minutos a 37 °C. Se llevó a cabo lavado con fijador metanol:ácido acético (grado HPLC de Merck) en una proporción de 5:2. Los cubreobjetos con las células se colocaron en una placa a 37 °C con humedad constante y se maduraron a 90 °C durante 30 minutos. Las bandas GTG se obtuvieron con tripsina (Gibco™ Trypsin [1:250]) y tinción de Wright-Giemsa a 4 % vol/vol (Sigma-Aldrich). Se leyeron 25 metafases por caso en al menos dos cultivos primarios (cinco en promedio). Se consideró la presencia de mosaicismo cuando se encontraron dos células con el mismo complemento cromosómico en dos cultivos primarios diferentes.

Hibridación in situ con fluorescencia

Se utilizó FISH para la detección de alteraciones en los cromosomas 13, 18, 21, X y Y en células de tejidos

sin crecimiento celular para cariotipo; la muestra se trató previamente con el kit AneuVysion (Vysis/Abbott, Downers Grove, Illinois, Estados Unidos), según las instrucciones del fabricante. Los portaobjetos se tiñeron con 3.5 µL de DAPI (medio de montaje Vectashield® con DAPI). Se examinaron 50 células de cada cóctel con un microscopio de epifluorescencia.

Extracción de ADN genómico

El ADN se extrajo con Qiagen Gentra Puregene® (Qiagen, Venlo, Países Bajos) y kits de purificación de ADN Promega Maxwell® 16 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. La calidad y cantidad del ADN se evaluaron mediante absorbancia a 280, 260 y 230 nm (Nanodrop Technologies Inc., Estados Unidos) y la integridad del ADN genómico se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa a 1 % teñido con bromuro de etidio.

Secuencias cortas repetidas en tándem

Para POC con cariotipo 46,XX se solicitó muestra de sangre materna; solo en 44 casos fue posible obtenerla. Todos los casos fueron analizados por STR (AmpFISTR™ Identifier™) para confirmar o descartar la presencia de tejido materno o la detección de alteraciones en los cromosomas 2, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 13, 16, 18, 19, 21, X y Y correspondientes a las secuencias contenidas en el kit utilizado. Los resultados de la electroforesis se interpretaron en el programa GeneMapper® ID v3.2.1 (Applied Biosystems). Los alelos del POC se compararon con los alelos del ADN materno cuando se dispuso de una muestra materna.

Microarreglos de SNP

Se procesaron 54 muestras para el estudio de microarreglos de SNP (Cytoscan HD o 750 k, Affymetrix Thermo Fisher Scientific, Santa Clara, California, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente: se digirieron, ligaron, amplificaron por PCR, purificaron, fragmentaron, marcaron e hibridaron 250 ng de ADN genómico en una matriz de 750 k que incluía 550 000 marcadores de variantes en el número de copias y 200 436 sondas de SNP.

Después de lavar, teñir y escanear el microarreglo de SNP, los resultados se interpretaron en el programa Chromosome Analysis Suite versión 4.3.0.71 con los siguientes criterios: ganancias y pérdidas mayores a 100 kb (50 sondas). En 51 muestras, los resultados fueron informativos. Las regiones se analizaron con base en Genome Reference Consortium Human 37 (GRCh37), Genescout OMIM (<https://genescout.omim.org>), Database Ensembl Resources (<https://www.deciphergenomics.org/browser>), Franklin (<https://franklin.genoox.com>), Varsome (<https://varsome.com>), ClinGen (<https://clinicalgenome.org>) y UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu>). Todas las variantes en el número de copias fueron evaluadas sistemáticamente siguiendo las recomendaciones del Colegio Americano de Genética Médica y Genómica;¹⁴ las mayores a 10 Mb fueron consideradas patógenas.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa SPSS v24.0 (IBM Corp., Armonk, Nueva York, Estados Unidos). Para determinar la distribución normal de la muestra se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov, posteriormente se empleó la U de Mann-Whitney para comparar variables continuas. Los datos se presentan como medias y desviaciones estándar. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

Resultados

En 44 POC no se obtuvieron células, por lo que se procedió directamente a la extracción del ADN genómico, quedando en total 259 POC para cultivo celular.

Los casos estudiados fueron POC de parejas no consanguíneas que experimentaron pérdida del

embarazo durante el período considerado en este estudio. Las principales causas fueron el aborto diferido o la muerte fetal detectada mediante ecografía; 44 parejas tenían antecedentes de pérdida recurrente del embarazo (de dos a cuatro pérdidas) y ninguna tenía antecedentes de nacimientos vivos con anomalías cromosómicas.

Análisis de cariotipo

En 50/259 casos (19 %), los cultivos celulares fallaron y no se obtuvo material cromosómico, por lo que quedaron 209 casos con resultados informativos del cariotipo convencional, 94 de ellos anormales y 115 con resultado normal: cariotipo 46,XX en 80 casos y cariotipo 46,XY en 35, con una relación XX: XY de 2,2:1.

Análisis FISH y de secuencias cortas repetidas en tándem

Debido a la alta proporción de cariotipos 46,XX se solicitó ADN materno, obteniéndose 44 casos para realizar STR e investigar contaminación materna. En 29 de las 44 muestras solo se encontraron células maternas, por lo que fueron eliminadas de los resultados, quedando 274 POC con resultados, 180 de los cuales se obtuvieron mediante análisis de cariotipo. De los 50 casos con cariotipo fallido, 10 fueron procesados mediante microarreglos de SNP, en cinco no fue posible realizar microarreglos de SNP ni obtener resultados mediante FISH o STR. Mediante STR o FISH fueron procesados 35 POC, 19 de ellos (54.3 %) presentaron alteración cromosómica: 6/11 con FISH (54.5 %) y 13/24 con STR (54.2 %); en 16 sin alteraciones en los cromosomas analizados se registraron resultados no definitivos conforme al criterio de que al no estudiarse todos los cromosomas, los casos no anormales no pueden considerarse normales (Tabla 2). En algunos POC con cariotipo exitoso, el estudio por STR fue útil para conocer el origen de las poliploidías, y en los casos de mosaicismo sirvió para discernir entre mosaicos verdaderos y aquellos con contaminación de células maternas (ejemplos de casos se muestran en la Figura 1).

Análisis de microarreglos de SNP

El estudio se realizó en 54 muestras, tres de las cuales fueron eliminadas por no cumplir con los

Tabla 2. Resultados obtenidos en 274 POC y el método por el que se obtuvieron*

Resultados	Cariotipo (n = 180)	FISH (n = 11)	STR (n = 24)	Arreglo de SNP (n = 54)	Total (n = 269)
46,XX	51	0	0	14	65
46,XY	35	0	0	25	60
Monosomía X	13	1	3	1	18
Triploidía	12	2	1	0	15
Trisomía 21	12	1	3	0	16
Trisomía 16	11	0	0	0	11
Trisomía 18	7	2	1	1	11
Trisomía 13**	6	0	2	0	8
Trisomía 15	6	0	0	0	6
Trisomía 22	6	0	0	0	6
Tetraploidía	3	0	0	0	3
Trisomía 20	2	0	0	0	2
Trisomía 2	2	0	0	0	2
Monosomía 22	1	0	0	0	1
Trisomía 9	1	0	0	0	1
Trisomía 10	1	0	0	0	1
Trisomía 8	1	0	0	0	1
Trisomía 7	1	0	0	0	1
Trisomía 14	1	0	0	0	1
48, XX,+13,+18	1	0	0	0	1
48, XXY,+18	1	0	0	0	1
48, XXY,+21	1	0	0	0	1
mos 47, XX,+12[19]/46, XX[6]***	1	0	0	0	1
mos 47, XY,+16[14]/46, XY[11]***	1	0	0	0	1
mos 88-94 < 4n>XXXX,-4,+12,+22,+22[8]/46, XX[17]***	1	0	0	0	1
mos 48, XX,+15,+18[5]/46, XX[32]***	1	0	0	0	1
mos 46, X,+20[17]/48, XXX,+20[1]/47, XX,+20[17]***	1	0	0	0	1
48, N,+18,+21	0	0	1	0	1
XXY***(47, XXY)	0	0	1	0	1
46, XX***(Mole)	0	0	1	0	1
48, XY,+4,+20	0	0	0	1	1
Xp22.33q28 (542709_154486746) x2-3****	0	0	0	1	1
2q22.3 (145204107_145288341) x1	0	0	0	1	1
4q25 (111531211_111567074) x1	0	0	0	1	1
5p15.33p14.2 (113577_23682169) x1, 5p14.2p13.1 (23686757_40713251) x3	0	0	0	1	1

(Continúa)

Tabla 2. Resultados obtenidos en 274 POC y el método por el que se obtuvieron* (continuación)

Resultados	Cariotipo (n = 180)	FISH (n = 11)	STR (n = 24)	Arreglo de SNP (n = 54)	Total (n = 269)
7p22.3p21.2 (43377_14131658) x3, 13q34 (114016267_115107733) x1, 16p13.3q24.3 (85881_90155062) x3	0	0	0	1	1
10q11.22q11.23 (48301644_51861565) x1	0	0	0	1	1
13q21.31q32.1 (63901217_96673460) x1	0	0	0	1	1
16p11.2 (29580021_30320002) x3	0	0	0	1	1
17p13.3 (2416839_2522562) x1	0	0	0	1	1
Subtotal anormal	94	6	13	12	125
Subtotal normal	86	ND	ND	39	125
Total resultados	180	6	13	51	250

*29/303 muestras no fueron incluidas porque STR solo encontró células maternas, quedando 274 muestras POC para continuar con el estudio citogenómico. En 5/303 POC no se obtuvieron resultados mediante ningún método. En 19 POC estudiados por FISH, STR y microarreglos de SNP se obtuvieron resultados no definitivos (ND), por lo que estos POC no están representados en estos 250 resultados informativos.

**Un caso con translocación robertsoniana.

***Verificado/encontrado como verdadero mosaicismo mediante STR.

****Mosaico identificado mediante microarreglo de SNP.

El asesoramiento genético fue posible en 250 de los 274 POC estudiados mediante análisis del genoma completo (91.2 %).

critérios de calidad para el análisis genómico (SNP QC > 10, MAPD < 0.2 y WAVINESS SD < 0.12), por lo que quedaron 51 POC con resultados informativos, 34 correspondientes a mortinatos, 10 a abortos espontáneos y siete a edad gestacional indefinida. En 12 de esos 51 POC (23.5 %) se encontraron variantes patogénicas en el número de copias; 39 POC, representados principalmente por mortinatos, presentaron resultados normales (Tabla 3 y Figura 2).

Edad gestacional y frecuencia de alteraciones citogenéticas

En nuestra población, 49 POC correspondieron a mortinatos y 184 a abortos: 16 mortinatos ocurrieron entre las semanas 21 y 24 de gestación (segundo trimestre) y 33 en la semana 25 de gestación o después (tercer trimestre); 138 abortos espontáneos en la semana 12 o antes (primer trimestre) y 46 abortos espontáneos entre las semanas 13 y 20 de gestación (segundo trimestre). En 17 POC no se registró la etapa gestacional.

Se ha observado que las mujeres con edad materna avanzada tienen mayor probabilidad de tener fetos aneuploides.^{2,15} En nuestro estudio, las edades maternas de los casos con resultados normales y anormales fueron similares, sin diferencias significativas: 32.46 ± 4.53 años en el grupo de abortos espontáneos con

resultados normales y 33.23 ± 6.1 años en el grupo con resultados anormales; 32.06 ± 5.2 años en el grupo de mortinatos con resultados normales y 32.77 ± 6.80 en los mortinatos con resultados anormales (Tabla 3). Se observaron anomalías citogenéticas en 57.6 % de los abortos espontáneos, en 24.5 % de los mortinatos y en 41.2 % del grupo sin edad gestacional definida (Figura 2).

Frecuencia y tipo de anomalías genómicas en 125 POC con resultados anormales

El grupo total con resultados obtenidos mediante los diferentes métodos estuvo conformado por 250 POC, 73.6 % fueron abortos espontáneos, 19.6 % mortinatos y 6.8 % sin edad gestacional definida. En estos POC con edad gestacional heterogénea, 50 % presentó alteraciones citogenéticas. Curiosamente, aunque no todos fueron abortos espontáneos, 94 % de los resultados anormales se trató de anomalías cromosómicas, tanto numéricas como estructurales, y solo 6 % correspondió a anomalías submicroscópicas (Tabla 3 y Figura 3). Como era de esperar, las aneuploidías correspondieron a 79.2 %, distribuidas de la siguiente manera: trisomía 53.6 %, monosomía 15.2 % (esencialmente monosomía X y solo un caso con monosomía 22) y otras anomalías numéricas 10.4 %, incluidas dos dobles trisomías y mosaicos genéticos.

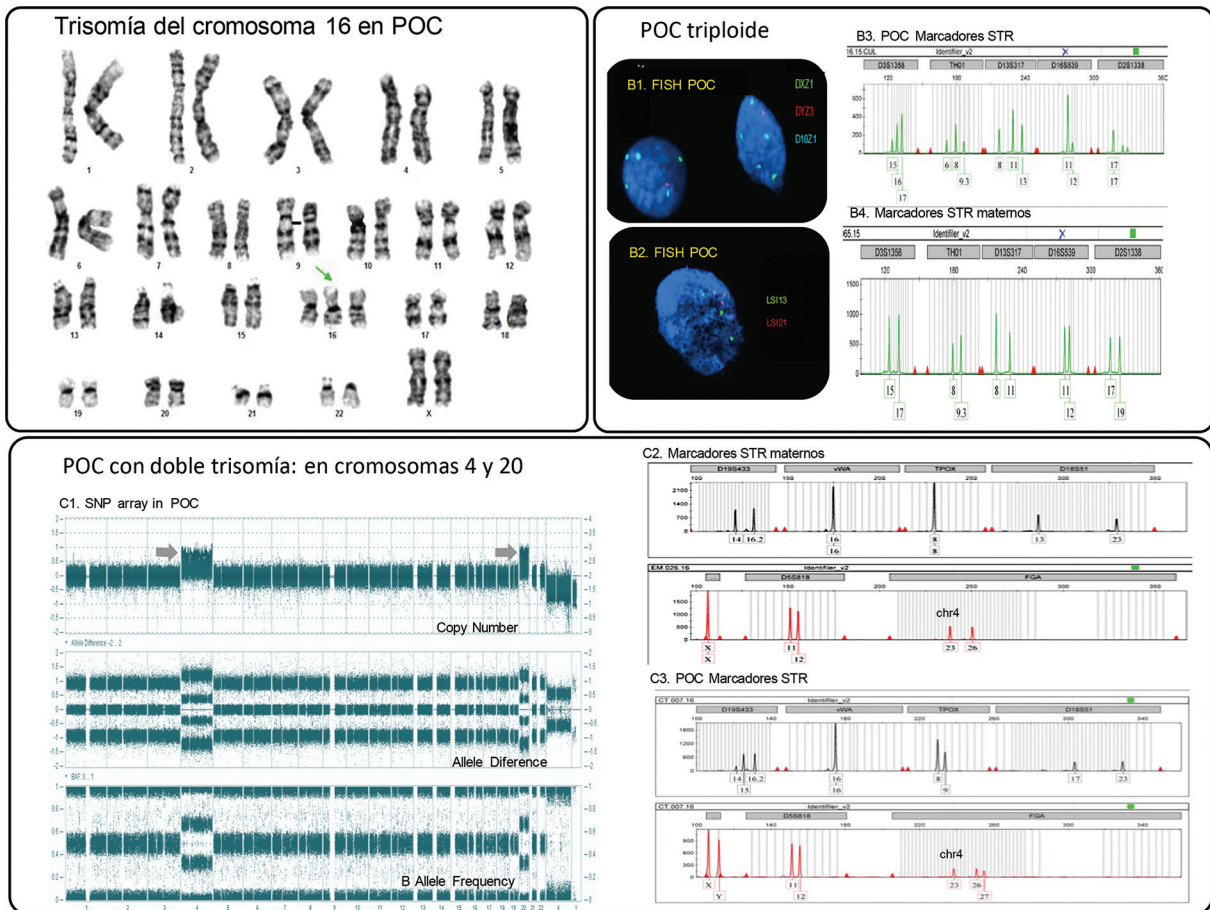


Figura 1. Utilidad de las diversas técnicas citogenéticas. **A:** POC con trisomía 16. El cariotipo identificó anomalías cromosómicas numéricas y estructurales (limitadas a una resolución baja de 8 a 10 Mb). **B:** POC triploide observado por marcadores STR y FISH. **B1** y **B2:** FISH detectó tres copias de cada cromosoma examinado (13, 18, 21, X,Y). **B3** y **B4:** STR reveló tres alelos para cada marcador, dos de los cuales eran de origen materno, lo que sugiere una triploidía digénica. **C:** el microarreglo de SNP detectó un POC con doble trisomía, en cromosomas 4 y 20. **C1:** vista del genoma completo; las flechas muestran las trisomías. **C2** y **C3:** marcadores STR del tejido materno y embrionario. En el POC se aprecia una copia de ambos alelos maternos y una del alelo paterno. El estado alélico definido por STR determinó el origen materno de la aneuploidía con no-disyunción en la meiosis I.

Las euploidías correspondieron a 14.4 %: triploidía a 12 % y tetraploidía a 2.4 %.

El 6.4 % de las anomalías estructurales se identificó mediante microarreglos de SNP, una de ellas fue un cariotipo complejo que consistía en una trisomía 16 más una duplicación de 7p y otra fue una duplicación-delección del cromosoma 5p (posiblemente un cromosoma derivativo); cinco de ocho anomalías estructurales fueron eliminaciones y tres, duplicaciones; todas ellas tenían una longitud de hasta 10 Mb (Tabla 2 y Figura 3).

Discusión

El estudio de las causas genéticas de la pérdida del embarazo es importante no solo para brindar

información para el asesoramiento reproductivo (en nuestro grupo de estudio, todas las parejas, independientemente del resultado, recibieron el asesoramiento genético adecuado), sino también para generar conocimiento sobre la reproducción humana, acerca de la cual se ha estimado 45 % de fracaso posconcepcional, 80 % en etapa preclínica.¹³

Los errores en la meiosis materna contribuyen a la formación de trisomías autosómicas, principal causa de pérdida gestacional, y se conoce que la edad materna es un factor importante para la trisomía.¹⁶ En nuestro grupo de estudio, la edad materna fue de 32.63 años, significativamente mayor a la reportada en la población general mexicana (25 años) durante el mismo período de estudio ($p < 0.0001$ prueba de Wilcoxon); sin embargo, no se

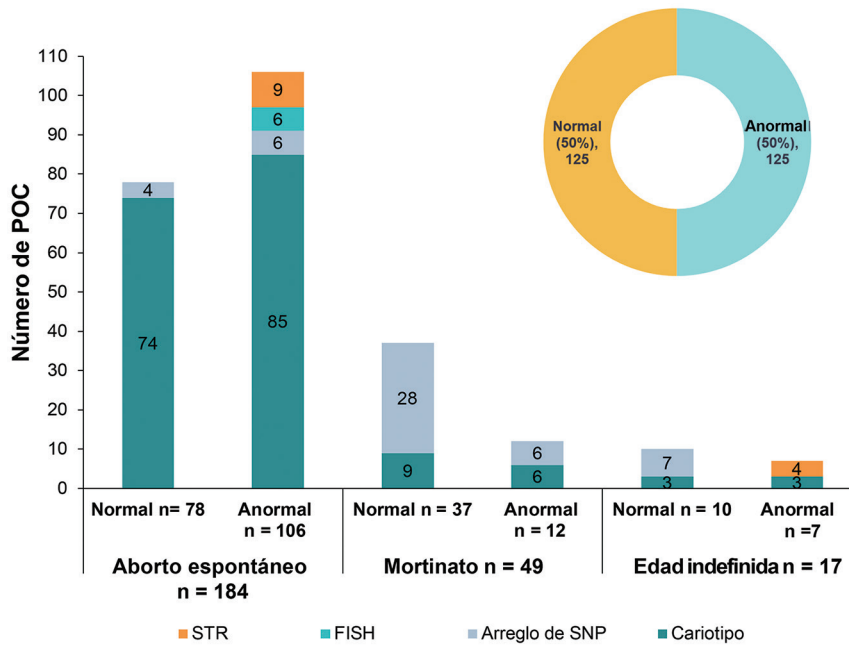


Figura 2. Distribución de resultados en 250 abortos espontáneos y mortinatos. Los métodos de abordaje del genoma completo, cariotipo y microarreglos de SNP generaron la mayoría de los resultados (normales y anormales) obtenidos en este estudio. El cariotipo detectó porcentajes más altos de anomalías en muestras de abortos espontáneos, en comparación con los mortinatos y los POC con edad gestacional indefinida. Cuando el cariotipo fallaba o solo se disponía de ADN, se utilizaban metodologías específicas como STR y FISH para complementar la búsqueda de anomalías en POC, cuando era posible.

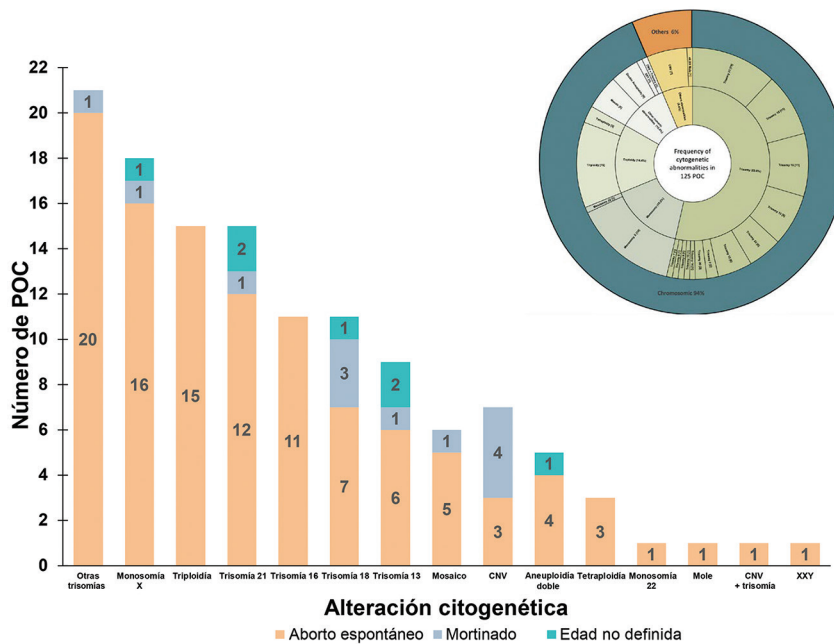


Figura 3. Frecuencia y tipo de alteraciones citogenéticas en 125 POC. Los datos se distribuyeron según el tipo de anomalía. La edad gestacional (aborto espontáneo antes de la semana 20 de gestación y muerte fetal después de las 20 semanas de gestación) se muestra con diferentes colores en la misma barra. El gráfico circular ilustra los porcentajes según el tipo de alteración; 94 % correspondió a alteraciones cromosómicas numéricas. CNV: variantes en el número de copias.

Tabla 3. Resultados totales en abortos espontáneos y mortinatos

Tipo de producto de la concepción	Resultado normal						Resultado anormal						Total					
	Edad paterna (años)		Edad materna (años)		Edad gestacional (semanas)		Edad paterna (años)		Edad materna (años)		Edad gestacional (semanas)		n	%				
	Media ± DE	Rango	Media ± DE	Rango	Media ± DE	Rango	Media ± DE	Rango	Media ± DE	Rango	Media ± DE	Rango						
Abortos espontáneos (< 20 semanas)	35.67 ± 5.18*	23-52	32.46 ± 4.53**	19-41	11.9 ± 4.34	4-20	78	42.4†	36.03* ± 5.18	21-47	33.23 ± 6.1**	19-47	10.53 ± 3.35	5-20	106†	57.6	184	73.6
Mortinatos (> 20 semanas)	35 ± 6.16*	20-39	32.06 ± 5.2**	14-42	27 ± 4.7	21-39	37	75.5†	40.33* ± 5.85	35-44	32.77 ± 6.80**	23-45	29.85 ± 5.42	21-37	12†	24.5	49	19.6
Indefinidos	35		35.33 ± 5.5	30-41	-		10	58.8	39		35 ± 4.24	25-36	-		7	41.2	17	6.8
Total								125								125		250

Las edades paterna y materna no fueron significativamente diferentes cuando se comparó el producto de la concepción normal versus el anormal.

*p = 0.200; **p = 0.095 U de Mann-Whitney.

†El porcentaje de abortos espontáneos anormales versus mortinatos anormales es significativamente diferente, p < 0.001 U de Mann-Whitney.

identificaron diferencias respecto a la pérdida recurrente del embarazo (25/44 parejas con pérdida gestacional recurrente [56 %] tuvieron un POC anormal), la edad gestacional del POC o los resultados citogenéticos (Tabla 3), lo que sugiere que la edad materna avanzada es un factor que contribuye a la pérdida del embarazo.

Edad gestacional y anomalías cromosómicas

Históricamente se ha encontrado que las alteraciones cromosómicas están presentes en 50 a 70 % de los abortos espontáneos.¹⁷⁻²³ En nuestro estudio encontramos una prevalencia de 57.6 %, significativamente superior a 24.5 % en mortinatos anormales, la cual es una proporción alta en comparación con 6 a 17 % informado con anterioridad.^{15,24} Se ha observado que a medida que transcurre el tiempo de gestación, el aporte de las alteraciones cromosómicas disminuye para dar paso a alteraciones más compatibles con la vida y a cambios estructurales que impactan en pequeños segmentos del genoma y que generalmente no se detectan por cariotipo sino por microarreglos.^{18,22} De esta forma, las pocas aneuploidías que aún pueden identificarse a partir de las 20 semanas de gestación son las observadas en nacidos vivos, junto con variaciones patogénicas submicroscópicas (Figura 3).

Frecuencia y tipo de anomalías genómicas en 125 POC con resultados anormales

En 250 de 274 POC (91.2 %) obtuvimos resultados informativos con una tasa de éxito de 80.7 % con el cariotipo, de 94.5 % con los microarreglos de SNP y de 100 % con FISH y STR; sin embargo, solo los resultados anormales se consideraron definitivos en las dos últimas técnicas. De los 250 POC, 50 % tuvo resultados cromosómicos anormales, frecuencia que podría considerarse baja, pero nuestra población incluyó 19 % de mortinatos, en los cuales, como era de esperar, se encontró un alto porcentaje de resultados normales.

Entre los POC anormales, 68.8 % fue aneuploide y la trisomía autosómica única constituyó la anomalía más común en 53.6 %, seguida de la monosomía, de la cual la X fue la más frecuente. Llama la atención que la distribución de las trisomías en nuestro grupo no siguió el patrón habitualmente observado.^{18,19,22,23,25}

La trisomía 21 fue la trisomía más representada, seguida de la 16. Esta última y la trisomía 22 constituyen las dos trisomías más frecuentes en otros estudios; en nuestra investigación las identificamos en 8.8 y 4.8 %, respectivamente. La presentación de euploidía en 14.4 %, principalmente triploide, fue similar a la reportada con anterioridad (Figura 3).

Es importante destacar que 94 % de las anomalías totales fueron anomalías cromosómicas numéricas, detectadas mediante cualquiera de las cuatro técnicas utilizadas, y solo 6 % fueron submicroscópicas; siete variantes en el número de copias > 10 Mb, detectadas mediante microarreglos de SNP, y una translocación robertsoniana, detectada por cariotipo. Los resultados indican que en los abortos el cariotipo es el método que proporciona un mayor número de resultados anormales, mientras que en los mortinatos se identificó una mayor proporción de resultados normales, independientemente de la técnica utilizada (Figura 2).

En forma global podemos concluir que si bien el método de microarreglos tiene un mayor porcentaje de detección de POC anormales y un menor fallo que las técnicas citogenéticas, y que en las POC menores a 20 semanas de gestación (en las cuales es posible obtener tejido fetal) se recomienda el estudio directo de microarreglos, el cariotipo con STR simultáneo para descartar contaminación de células maternas sigue siendo eficaz para las pruebas cromosómicas en abortos espontáneos; además, es una prueba más económica, está disponible en la mayoría de los hospitales y utiliza un equipo común en numerosos laboratorios, lo cual hace posible que la población de países en desarrollo tenga acceso a los resultados del POC y se brinde un adecuado asesoramiento genético a las parejas.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Laboratorio Genos Médica, por su apoyo para el transporte de las muestras; así como a la doctora Haydée Rosas y a todas las familias estudiadas, por su invaluable colaboración.

Financiamiento

Se recibió financiamiento del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT), proyecto FOSISS-142040. Luz María Garduño Zarazúa, estudiante de doctorado del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad

Nacional Autónoma de México, recibió la beca CONAHCYT 587332/306157. También se recibió apoyo del Hospital Ángeles Lomas, Instituto Nacional de Perinatología, Hospital de la Mujer de Aguascalientes e Instituto Nacional de Pediatría para los proyectos 197/2013, 212250-3140-1108-05-15, 21SSEA-29/15 y 038/2015, respectivamente.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen intereses financieros en competencia ni relaciones personales que influyeran en el trabajo presentado en este artículo.

Responsabilidades éticas

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran haber seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de los sujetos involucrados.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores obtuvieron el consentimiento informado por escrito de los sujetos mencionados en el artículo. La autora correspondiente está en posesión de esos documentos.

Uso de inteligencia artificial para la generación de texto. Los autores declaran que no utilizaron ningún tipo de inteligencia artificial generativa para la redacción de este manuscrito, ni para la creación de imágenes, gráficos, tablas o sus correspondientes pies de foto.

Bibliografía

1. Rosenfeld JA, Tucker ME, Escobar LF, Neill NJ, Torchia BS, McDaniel LD, et al. Diagnostic utility of microarray testing in pregnancy loss. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;46(4):478-486.
2. Chen S, Liu D, Zhang J, Li S, Zhang L, Fan J, et al. A copy number variation genotyping method for aneuploidy detection in spontaneous abortion specimens. *Prenat Diagn.* 2017;37(2):176-183.
3. Martínez-Portilla RJ, Pauta M, Hawkins-Villarreal A, Rial-Crestelo M, Paz YMF, Madrigal I, et al. Added value of chromosomal microarray analysis over conventional karyotyping in stillbirth work-up: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2019;53(5):590-597.
4. Gou L, Liu T, Wang Y, Wu Q, Hu S, Dong B, et al. Clinical utilization of chromosomal microarray analysis for the genetic analysis in subgroups of pregnancy loss. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2022;35(22):4404-4411.
5. Schilit SLP, Studwell C, Flatley P, Listewnik M, Mertens L, Ligon AH, et al. Chromosomal microarray analysis in pregnancy loss: Is it time for a consensus approach? *Prenat Diagn.* 2022;42(12):1545-1553.
6. Wou K, Hyun Y, Chitayat D, Vlasschaert M, Chong K, Wasim S, et al. Analysis of tissue from products of conception and perinatal losses using QF-PCR and microarray: a three-year retrospective study resulting in an efficient protocol. *Eur J Med Genet.* 2016;59(8):417-424.
7. Zhu X, Li J, Zhu Y, Wang W, Wu X, Yang Y, et al. Application of chromosomal microarray analysis in products of miscarriage. *Mol Cytogenet.* 2018;11:44.
8. Sahoo T, Dzidic N, Strecker MN, Commander S, Travis MK, Doherty C, et al. Comprehensive genetic analysis of pregnancy loss by chromosomal microarrays: outcomes, benefits, and challenges. *Genet Med.* 2017;19(1):83-89.

9. Shah MS, Cinnioğlu C, Maisenbacher M, Comstock I, Kort J, Lathi RB. Comparison of cytogenetics and molecular karyotyping for chromosome testing of miscarriage specimens. *Fertil Steril*. 2017;107(4):1028-1033.
10. Lathi RB, Massie JA, Loring M, Demko ZP, Johnson D, Sigurjonsson S, et al. Informatics enhanced SNP microarray analysis of 30 miscarriage samples compared to routine cytogenetics. *PLoS One*. 2012;7(3):e31282.
11. Lathi RB, Maisenbacher M, Sigurjonsson S, Keller J, Demko Z, Rabinowitz M. Informatics-based molecular karyotyping of products of conception (POC) preserved in paraffin with maternal cell contamination (MCC) detection: report on 46 consecutive analyses. *Fertil Steril*. 2012;98(3 Suppl):S33.
12. Ozawa N, Sago H, Matsuoka K, Maruyama T, Migita O, Aizu Y, et al. Cytogenetic analysis of spontaneously discharged products of conception by array-based comparative genomic hybridization. *Springerplus*. 2016;5(1):874.
13. Hardy K, Hardy PJ. 1(st) trimester miscarriage: four decades of study. *Transl Pediatr*. 2015;4(2):189-200.
14. Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, Kantarci S, Kearney H, Patel A, et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genet Med*. 2020;22(2):245-257.
15. Wapner RJ. Genetics of stillbirth. *Clin Obstet Gynecol*. 2010;53(3):628-634.
16. MacLennan M, Crichton JH, Playfoot CJ, Adams IR. Oocyte development, meiosis and aneuploidy. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;45:68-76.
17. Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuel B, Matsuura J, et al. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet*. 1980;44(2):151-178.
18. Mora-Alferez AP, Paredes D, Rodríguez O, Quispe E, Chavesta F, de Zigelboim EK, et al. Anomalías cromosómicas en abortos espontáneos. *Rev Peru Ginecol Obstet*. 2016;62(2):141-151.
19. Castillo-Taucher S, Fuentes-Soto AM, Paulos-Millanao A, de la Rosa-Rebaza E. Estudio cromosómico en abortos espontáneos. *Rev Chil Obstet Ginecol*. 2014;79(1):40-46.
20. Qi H, Xuan ZL, Du Y, Cai LR, Zhang H, Wen XH, et al. High resolution global chromosomal aberrations from spontaneous miscarriages revealed by low coverage whole genome sequencing. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2018;224:21-28.
21. Soriano-Torres M, Castelví-López A, Barrios-Martínez A, García-Gómez D, Méndez-Rosado LA. El estudio citogenético en el manejo de las parejas con aborto habitual en Cuba. *Rev. Cub Obstet Ginecol*. 2021;202146(3):e648. Disponible en: <https://revginecobstetricia.sld.cu/index.php/gin/article/view/648>
22. Liao N, Zhang Z, Liu X, Wang J, Hu R, Xiao L, et al. A chromosomal microarray analysis-based laboratory algorithm for the detection of genetic etiology of early pregnancy loss. *Front Genet*. 2023;14:1203891.
23. García-Alonso López A, Bermejo-Huerta S, Hernández-Galván R, Ayala-Posadas R, González-del Ángel A, Grether-González P. Diagnóstico citogenético en aborto espontáneo del primer trimestre. *Ginecol Obstet Mex*. 2011;79(12):779-784.
24. Marques B, Benítez L, Peguero A, Madrígala I, Gómez O, Figueras F, et al. Cytogenetic investigation in 136 consecutive stillbirths: Does the tissue type affect the success rate of chromosomal microarray analysis and karyotype? *Fetal Diagn Ther*. 2020;47(4):315-320.
25. Wang BT, Chong TP, Boyar FZ, Kopita KA, Ross LP, El-Naggar MM, et al. Abnormalities in spontaneous abortions detected by G-banding and chromosomal microarray analysis (CMA) at a national reference laboratory. *Mol Cytogenet*. 2014;7:33.