



UNIVERSIDAD DE CUENCA

UNIVERSIDAD DE CUENCA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**TESIS: “Análisis del Contenido de ADN y Cinética Proliferativa en Productos de Aborto por Técnicas de Citometría de Flujo”**

Tesis previa a la obtención del título de  
Doctor en Bioquímica y Farmacia.

**Autor:** Pablo Farfán Patiño

**Directora:** Dra. Graciela Chérrez

**Asesora:** Dra. Paola Cabrera

**Cuenca-Ecuador  
2011**



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

## **AGRADECIMIENTO.**

A la Dra. Paola Cabrera por su constante estímulo y confianza en mí lo que ha supuesto un soporte fundamental para la realización de esta tesis.

A la Dra. Graciela Chérrez directora de la tesis y ayuda imprescindible para el diseño y elaboración de la tesis.

Al Instituto del Cáncer “SOLCA CUENCA” que me ha facilitado la infraestructura y la ayuda necesaria para completar este proyecto de investigación.



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

## DEDICATORIA

A mis padres, mi esposa Angélica y mi hija Alejandra por su constante apoyo.



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

## RESUMEN.

El aborto se define como la interrupción del embarazo menor a 22 semanas o la pérdida del embrión o feto con un peso menor a 500g. Se calcula que de un 20-30% de las gestaciones terminan en aborto espontáneo.

La mayoría de los abortos espontáneos se producen por anomalías en los cromosomas, que hacen, que estos embarazos sean incompatibles con la vida. Entre un 60-70% de los abortos espontáneos son consecuencia de defectos genéticos.

Se estudió 69 casos de productos de aborto espontáneo. Los criterios de inclusión fueron productos de abortos espontáneos hasta de 22 semanas de gestación procedentes del laboratorio de patología del Hospital Vicente Corral Moscoso y muestras privadas procesadas en el laboratorio de Citometría de Flujo del Instituto del Cáncer "SOLCA CUENCA".

Las muestras fueron procesadas por disgregación mecánica para obtener una suspensión celular, En el marcaje se empleó yoduro de propidio y se adquirió en el citómetro de flujo FacsCalibur, los resultados obtenidos se analizaron mediante el software Modfit LT 3.0.

Los resultados obtenidos en las muestras analizadas, se determinó que 52 productos de aborto son Diploides y 17 productos de aborto espontáneo presentan alteración en el contenido de ADN "aneuploides".

Además de esta población estudiada, 52 productos de aborto corresponden a abortos tempranos, mientras que 17 son abortos tardíos.

Del estudio de la población aneuploide se concluye que 9 son hiperdiploides; 2 son hipodiploides y 5 son polidiploides.



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

Finalmente se encontró, que de 69 casos analizados, 17 casos corresponden a gestantes con una edad igual o mayor a 35 años.

En la serie de 69 casos de aborto espontáneo, el estudio de ploidía de ADN es importante como factor predictor de alteración en el contenido de ADN y como posible causa de abortos recurrentes.

## **PALABRAS CLAVES:**

**CITOMETRIA DE FLUJO, ABORTO, PLOIDÍA, CONTENIDO DE DNA, ANEUPLOIDE, DIPLOIDE, TRIPLOIDE, INDICE DE DNA**



## JUSTIFICACION

Ha sido ampliamente demostrado que las anomalías cromosómicas son una de las principales causas de aborto recurrente. Alrededor del 60 % de los abortos espontáneos del primer trimestre son cromosómicos anormales.

En el presente estudio se determinará la incidencia de abortos espontáneos que estén relacionados con alteración del contenido de ADN y cinética proliferativa, del además dicho estudio proporcionará información sobre el riesgo de recurrencia y la posibilidad que la pareja acuda por consejería genética.

A su vez este trabajo permite establecer si el estudio de ploidía en nuestro medio, interviene como factor de pronóstico de abortos espontáneos por alteraciones genéticas.



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

## ÍNDICE

### CAPITULO I

Introducción.....	10
1. El ciclo celular.....	11
1.1 El Ciclo vital de las células.....	11
1.2 Fases del ciclo celular.....	12
1.2.1 Interfase .....	12
1.2.2 Fase M.....	13
1.2.3 Citocinesis.....	13
1.3 Regulación del ciclo celular.....	14
1.3.1 Regulación intracelular.....	14
1.3.1.1 Punto de Restricción.....	17
1.3.1.2 Puntos de Control.....	18
1.3.2 Regulación extracelular del ciclo celular.....	22
1.3.3 Apoptosis.....	24
1.4 Reproducción sexual.....	26
1.4.1 La meiosis.....	27
1.4.2 Las ocho fases de la meiosis.....	27
1.5 Aborto.....	29
1.5.1 Aspectos Generales.....	29
1.5.2 Definiciones.....	32
1.5.3 Síntomas.....	34



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

1.5.4 Causas de Aborto espontáneo.....	34
1.5.5 Factores genéticos.....	36
1.5.6 Consejo genético.....	40
1.6 Citometría de Flujo.....	41
1.6.1 Aspectos generales.....	41
1.6.2 El citómetro de flujo.....	43
1.6.3 Fluorocromos para citometría de flujo.....	46
1.6.4 Estudio del contenido de ADN y fases del ciclo celular por Citometría de flujo.....	49

## CAPITULO II

2. Metodología.....	53
2.1 tipo de estudio.....	53
2.2 Universo de la muestra.....	53
2.3 Área de estudio.....	53
2.4 Método, técnica e instrumentos.....	53
2.5 Variables de estudio.....	54
2.6 Operacionalización de variables.....	54
2.7 Plan de tabulación y análisis.....	54
2.8 Procedimiento.....	54

## CAPITULO III

3. Resultados y discusión de resultados.....	56
3.1 Glosario de tabla de resultados.....	56
3.2 Validación de resultados.....	56





# UNIVERSIDAD DE CUENCA

3.3 Tabla de resultados.....	57
3.4 Estudio estadístico y discusión de resultados.....	58

## CAPITULO IV

4. Conclusiones y recomendaciones.....	63
4.1 Conclusiones.....	63
4.2 Recomendaciones.....	64
Glosario.....	65
Referencia Bibliográfica.....	66
Anexos.....	71



## CAPITULO I

### INTRODUCCIÓN.

Aproximadamente del 20 al 30% de las gestaciones humanas reconocidas clínicamente terminan en aborto espontáneo cuya etiología es difícil determinar, sin embargo, estas cifras son bajas puesto que no incluyen pérdidas tempranas de cigotos pre o post implantación, que ocurre sin que la gestante las detecte o se manifieste clínicamente en cuyo caso los valores se incrementan.

Entre los múltiples factores que intervienen en un aborto puede mencionarse las mal formaciones uterinas, los trastornos endocrinos e inmunológicos, las infecciones sistémicas, los factores ambientales y problemas genéticos, entre los cuales se debe considerar alteraciones cromosómicas (ploidía) y falla del ciclo celular.

La cuantificación del contenido ADN permite determinar la distribución de una población celular a lo largo de las distintas fases del ciclo celular. Los estudios de ciclo celular tienen gran relevancia en varias áreas de la biología celular y la biomedicina.

Este tipo de estudios se realizan de manera rutinaria para detectar la presencia de anomalías en el contenido genético de poblaciones celulares (aneuploidias), para determinar agentes que promueven o retardan la proliferación celular y para cuantificar la proporción de muerte por apoptosis.



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

La distribución celular de una población se analiza por citometría de flujo utilizando colorantes de ADN que incrementan su fluorescencia tras su unión al ácido nucleico. La cantidad de colorante unido es proporcional a la cantidad de ADN, y por tanto la luz recogida en el citómetro es proporcional a la cantidad de ADN de cada célula.

## 1. CICLO CELULAR

### 1.1 EL CICLO VITAL DE LAS CELULAS.

En un organismo adulto una célula puede considerarse un sistema de estado de equilibrio. El ADN es leído (transcrito) constantemente para formar un conjunto particular de proteínas. A medida que estas proteínas ejercen su función van siendo degradadas y reemplazadas por otras nuevas, el sistema esta tan bien equilibrado que las células no crecen ni se encojen, ni cambian su función. Esta visión estática de la célula, no obstante, pasa por alto muy importantes aspectos dinámicos de la vida celular.

La dinámica de la célula se comprende mejor si se examina el curso de su vida. Surge una nueva célula cuando una se divide o cuando dos de ellas, como el espermatozoide y el ovocito se fusionan. Cualquiera de los dos fenómenos inicia un programa de replicación celular que está codificado en el ADN y es ejecutado por proteínas. Este programa suele incluir un período de crecimiento celular, durante el cual se elaboran proteínas y se replica el ADN, seguido por la división celular, cuyo resultado es la aparición de dos células hijas. Que una célula crezca y se divida es una decisión muy bien regulada por el organismo, lo que asegura que un individuo adulto reemplace las células desgastadas o produzca más células en respuesta a una nueva necesidad. Ejemplos de esto último son el crecimiento del músculo en respuesta al ejercicio y la proliferación de eritrocitos ante la escasez de oxígeno de las grandes alturas. <sup>(23)</sup>

El ciclo celular esta cronometrado de manera muy precisa. De acuerdo a la teoría celular establecida por el biólogo alemán Rudolf Virchoff en el siglo XIX, “*las células sólo provienen de células*”. Las células existentes se dividen a través de una serie ordenada de pasos denominados ciclo celular; en la que la célula aumenta su tamaño, el número de componentes intracelulares (proteínas y organelos), duplica su material genético y finalmente se divide (Fig. 1).<sup>(1)</sup>

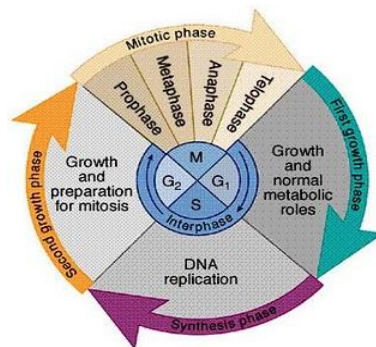


Fig. 1. EL CICLO CELULAR EUCARIOTA. (eluniversobajoelmicroscopio.blogspot.com)

## 1.2 FASES DEL CICLO CELULAR.

### 1.2.1 Interfase, que consta de:

- a) *Fase de síntesis (S)*: En esta etapa la célula duplica su material genético para pasarle una copia completa del genoma a cada una de sus células hijas.
- b) *Fase G1 y G2 (intervalo)*: Entre la fase S y M de cada ciclo hay dos fases denominadas intervalo en las cuales la célula está muy activa metabólicamente, lo cual le permite incrementar su tamaño (aumentando el número de proteínas y organelos), de lo contrario las células se harían más pequeñas con cada división.



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

## 1.2.2 Fase M

*Mitosis (M)*: En esta fase se reparte a las células hijas el material genético duplicado, a través de la segregación de los cromosomas. La fase M, para su estudio se divide en:

- a) *Profase*: En esta etapa los cromosomas (constituidos de dos cromátidas hermanas) se condensan en el núcleo, mientras en el citoplasma se comienza a ensamblar el huso mitótico entre los centrosomas.
- b) *Metafase*: Comienza con la disgregación de la membrana nuclear de esta manera los cromosomas se pueden unir al huso mitótico (mediante los cinetocoros). Una vez unidos los cromosomas se alinean en el ecuador de la célula.
- c) *Anafase*: Se produce la separación de las cromátidas hermanas, las cuales dan lugar a dos cromosomas hijos, los cuales migran hacia polos opuestos de la célula.
- d) *Telofase*: Aquí ambos juegos de cromosomas llegan a los polos de la célula y adoptan una estructura menos densa, posteriormente se forma nuevamente la envoltura nuclear. Al finalizar esta fase, la división del citoplasma y sus contenidos comienza con la formación de un anillo contráctil.

**1.2.3 Citocinesis**: Finalmente se divide la célula mediante el anillo contráctil de actina y miosina, produciendo dos células hijas cada una con un juego completo de cromosomas.

Cuando ya no se requieren más células, estas entran en un estado denominado G<sub>0</sub>, en el cual abandonan el ciclo celular y entran en un periodo de latencia, lo cual no significa que entren en reposo ya que

éstas células presentan un metabolismo activo, pues si estas células reciben el estímulo adecuado abandonan el estado G<sub>0</sub> y entran al G<sub>1</sub>. Algunas poblaciones celulares altamente especializadas como las fibras musculares o neuronas al entrar en estado G<sub>0</sub> abandonan indefinidamente el ciclo celular. <sup>(23)</sup>

## 1.3 REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR

El conjunto de procesos que ocurren durante el ciclo celular llevan un orden y supervisión estrictos, señales provenientes del medio y algunos controladores dentro de la célula se encargan de dirigir el progreso de ésta a través de las distintas fases del ciclo celular. Entonces hablamos de que hay una regulación extracelular y una regulación intracelular.

### 1.3.1 Regulación intracelular

El control interno del ciclo celular está a cargo de proteínas, cuyas acciones podrían resumirse en unas series de activaciones e inhibiciones de otras proteínas que son indispensables durante las fases del ciclo. Los principales efectores de esta regulación son dos: a) Las proteínas que permiten el progreso del ciclo formado por los complejos cdk's-ciclinas y b) Las proteínas que las inhiben como constituidas por dos pequeñas familias de proteínas, las CIP y las INK4. <sup>(1)</sup>

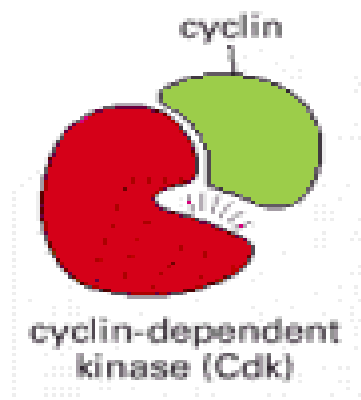


Fig.2 Cinasa dependiente de ciclina (Cdk). ( Alberts. et al.)

- a) Los complejos cdk's-ciclinas, están compuestos por 2 tipos de proteínas: Las cdk's (cinasa dependiente de ciclina) y las ciclinas, que pasan por un ciclo de síntesis y degradación (Fig. 2). Se conocen seis cdk's pero sólo se ha caracterizado la función de cuatro de ellas (cdk 1, 2, 4 y 6). Mientras que de las ciclinas sólo se conocen 4 tipos (ciclinas A, B, D y E). Las cdk's fosforila aminoácidos específicos de algunas proteínas, pero sólo si esta unida a una ciclina. Se conocen 6 distintas combinaciones de cdk's-ciclinas que actúan en tiempos específicos durante el ciclo (Fig. 3).<sup>(24)</sup>

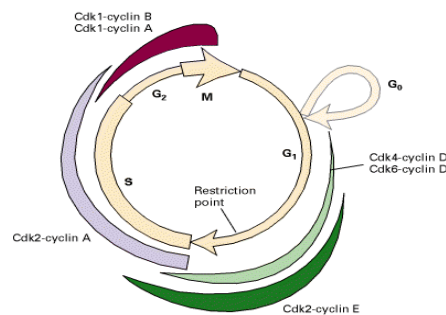


Fig.3 Complejos cdk-ciclina (Lodish et al.)

- b) Se sabe que las células sintetizan proteínas inhibidoras de los complejos cdk-ciclinas que colaboran al control del ciclo celular. Estas proteínas se han agrupado en dos: Las proteínas INK4 (inhibidoras de cinasa 4); y las CIP (proteínas inhibidoras de cdk's). Las INK4 se unen e inhiben sólo los complejos cdk4-ciclina D y cdk6-ciclina D, la única caracterizada es la p16 (p= fosfoproteína y el número es su peso en kDa). Las CIP se unen e inhiben a todos los complejos que contengan cdk's 1, 2, 4 y 6, actualmente se conocen las: p21, p27 y p53 (Fig. 4).<sup>(1)</sup>

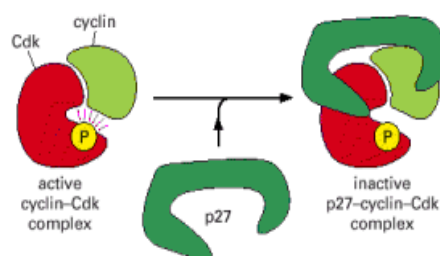


Fig.4 Inhibición de de complejo cdk-ciclina (Alberts, et.al.)

Las proteínas INK4 y CIP, llamadas en conjuntos inhibidores de cdk's y algunos factores de la transcripción como el p53, tienen la función de impedir la proliferación celular. La mutación de los genes que las codifican y/o la pérdida de función de estas proteínas, resulta en la falla del control sobre el ciclo celular y la incapacidad para detenerlo (proliferación celular con errores). Por su mecanismo de acción a los genes que codifican estas proteínas se les denominaron “*genes supresores de tumores*”.

Estas proteínas actúan en diferentes espacios de tiempo permitiendo o inhibiendo el progreso adecuado del ciclo celular. Esta capacidad de orden, se debe principalmente a que las proteínas (las ciclinas), que no se utilizan son eliminadas por un complejo de degradación llamado ubiquitinaproteasoma (Fig. 5).<sup>(1) (3)</sup>

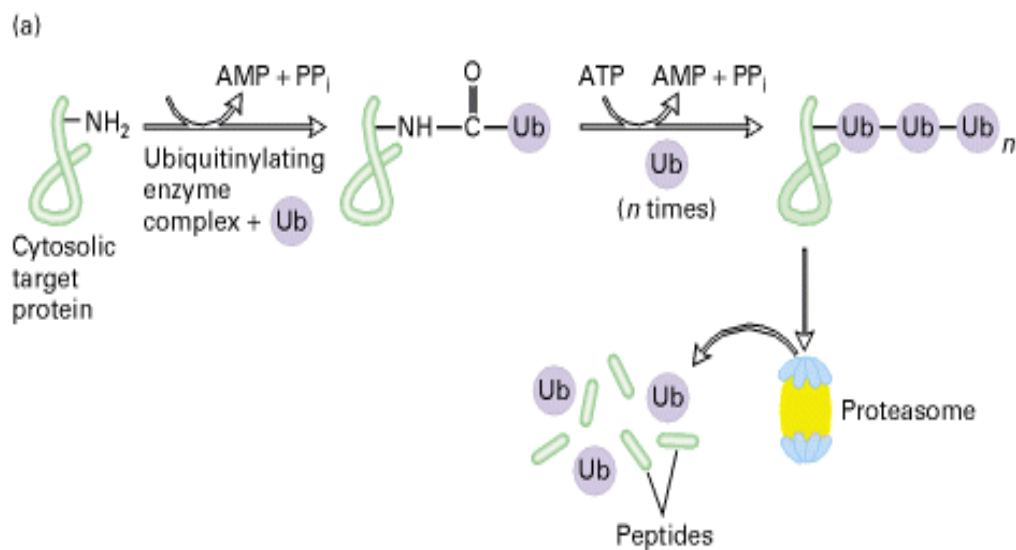


Fig.5 Complejo Ubiquitinaproteasoma (Alberts et al.)

Resumiendo, el paso ordenado por cada una de las fases del ciclo celular, está altamente regulado por los complejos cdk's-ciclinas y sus inhibidores, entre otras proteínas. Además, para el control del ciclo celular se postularon cuatro puntos en los que se controla a la célula, y al medio extracelular para dar lugar o restringir las acciones propias de cada una de las fases del ciclo. Estos cuatro puntos son: un punto de restricción y tres puntos de control.<sup>(1)</sup>



## 1.3.1.1 Punto de restricción

El punto de restricción se encuentra casi al final de G1 y se lo conoce así puesto que si la célula lo atraviesa se encuentra comprometida irreversiblemente a entrar al ciclo celular independientemente de lo que suceda en el exterior. Es muy importante entender que este punto está principalmente controlado por el medio y depende de su capacidad de inducción para que la célula se comprometa a completar el ciclo celular (Fig.6). Los responsables intracelulares del paso a través de este punto, son los complejos cdk4 y cdk6 –ciclina D, que liberan al factor de transcripción E2F de la proteína Rb (proteína del Retinoblastoma), las cdk's tienen que fosforilar a la proteína Rb para que libere a E2F. La fosforilación de la proteína Rb por las cdk's-ciclina, permite la liberación del factor de transcripción E2F del complejo Rb-E2F. El factor de transcripción (E2F) estimula la síntesis de: cdk2 y ciclina E necesarios para el progreso de G1 a S; de proteínas necesarias para la síntesis de ADN; y de él mismo, inactivando aún más Rb's y disminuyendo la concentración de p27. La inactivación de Rb es mantenida a lo largo del ciclo por la concentración de distintos complejos cdk's-ciclina pero, una vez que las ciclinas se degradan el Rb es de nuevo activo y une al E2F. <sup>(24)</sup>

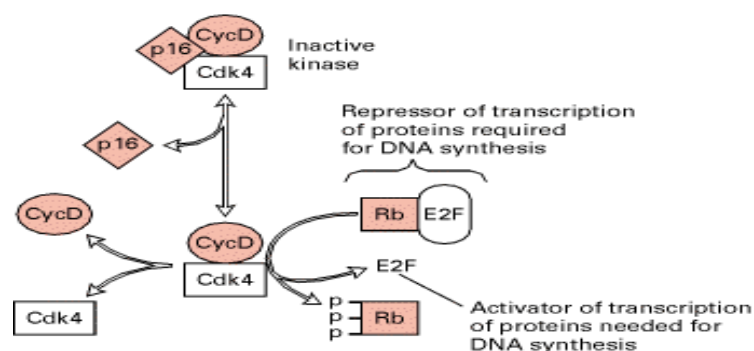


Fig.6 punto de restricción (Lodish, et al.)

El paso por este punto es también vigilado por la p16 (INK4), que como se describió antes, se encarga de inhibir a los complejos cdk4, 6 –ciclina D. La p16 inhibe la unión de la cdk y la ciclina, se interpone entre ellos, por lo que

son inactivos, esto es, el E2F no se puede liberar y en consecuencia no se pasa el punto de restricción. La acción de la p16 tiene que ver con el medio extracelular pues se sabe que si no existen suficientes señales del exterior (mitógenos, factores de crecimiento, nutrientes, etc.), la p16 y p27 tienden a acumularse por lo que se hacen muy activos. La fosfoproteína p27 es una CIP y su importancia radica en que no sólo se encarga de suprimir la actividad de los complejos cdk's-ciclinas activos en los primeros dos puntos de control sino que además ayuda a retirar a la célula del ciclo celular llevándola a G<sub>0</sub>.<sup>(24)</sup>

### 1.3.1.2 Puntos de control

Los puntos de control son por así decirlo pequeños retenes donde se revisan distintas características del medio y de la célula misma, la célula debe estar sana y el medio debe ser lo suficientemente bueno para que se continúe el ciclo celular. Pero además de ello los controladores implicados en estos puntos tienen la capacidad de llamar a otros a reparar cuando por ejemplo el material genético está dañado, o a terminar distintos procesos.<sup>(1) (3)</sup>

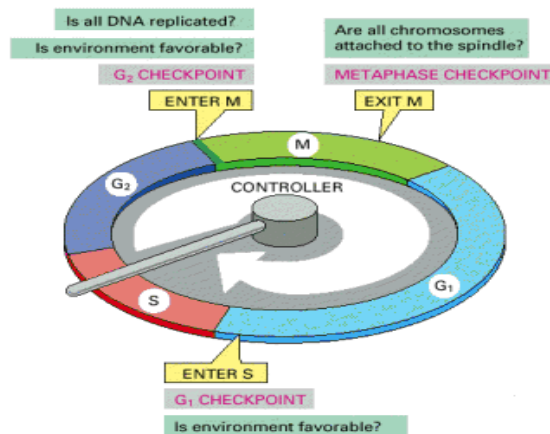


Fig.7 Puntos de control del ciclo celular (Modificado deAlberts, et al.)

- a) **Primer punto de control:** El primer punto de control se encuentra justo después del punto de restricción aún en G<sub>1</sub> (Fig. 8). En general podríamos decir que el primer control se encarga de: Revisar las condiciones del medio buscando factores externos que induzcan el

progreso del ciclo celular; revisar que la célula haya crecido lo suficiente; y que el material genético esté intacto. La búsqueda de factores externos es muy importante pues éstos estimulan la síntesis de proteínas como algunas cdk's y ciclinas, y sin estas la continuación y el control del ciclo celular serían imposibles.<sup>(27)</sup>

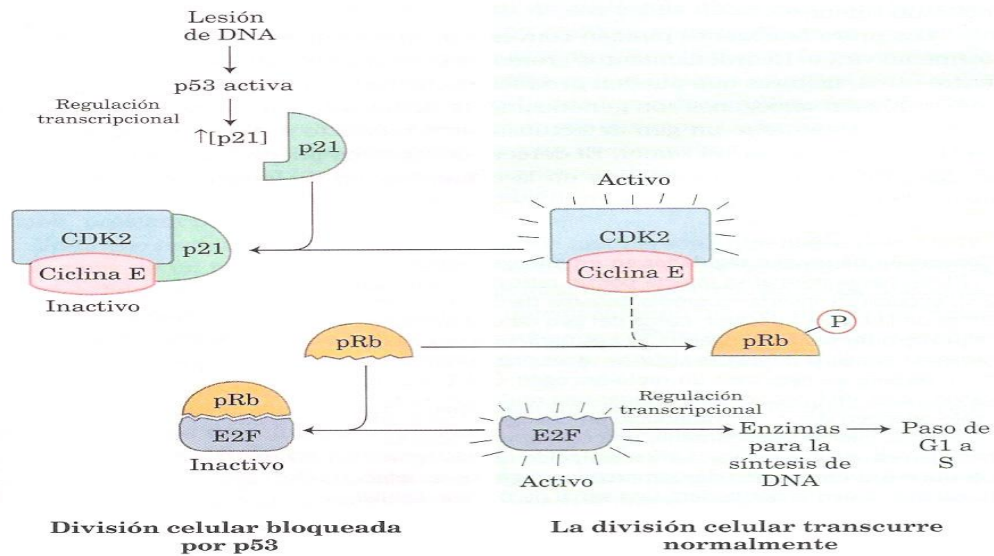


Fig.8 puntos de control del ciclo celular (Nelson & Cox).

Participan en este punto el complejo cdk2-ciclina E, que como los implicados en el punto de restricción también se encarga de inactivar a la proteína Rb y de favorecer el trabajo de E2F para que estén listas las enzimas necesarias para iniciar la síntesis de ADN en la fase S. Los encargados de la inhibición en este punto de control son un factor de transcripción (p53) y una CIP (p21). La p53 usualmente se encuentra en la célula pero es muy inestable en condiciones normales ya que se encuentra unido a otra proteína llamada Mdm2 que funciona como un marcador para que la p53 se degrade. Pero si existe una lesión en el ADN distintas enzimas se activan éstas ayudan a separar la p53 de su marcador, una mayor concentración de p53 estimula la síntesis de p21 (CIP) que se une a cdk2 y ciclina E, inhibiendo la acción del complejo. La célula entonces no puede entrar a S.<sup>(27)</sup>

- b) **Fase sin punto de control:** La fase S no tiene como tal un punto de control aun cuando algunos autores los consideran, sin embargo es indispensable la presencia del complejo cdk2-ciclina A para que la síntesis de ADN se lleve a cabo (Fig. 9). Como se explicó antes, durante la fase S el ADN se replica para ello es necesario que se arme la maquinaria específica. Dentro de ellas hay un conjunto de proteínas conocido como complejo de reconocimiento del origen u ORC que reconocen secuencias bien definidas de bases en el ADN llamadas orígenes de replicación. Durante la fase G1 se forma el ORC, tras el cual otras proteínas (como cdc6 y mcm) se unen para formar el complejo de prereplicación (pre-RC). El complejo cdk2-ciclina A, se encarga de deshacerse de las proteínas del pre-RC y de unir las enzimas necesarias para la replicación como la ADN polimerasa. Así se asegura que la maquinaria de replicación no vuelva a armarse hasta que se haya terminado el ciclo, y la replicación sólo ocurra una sola vez. <sup>(1) (3)</sup>

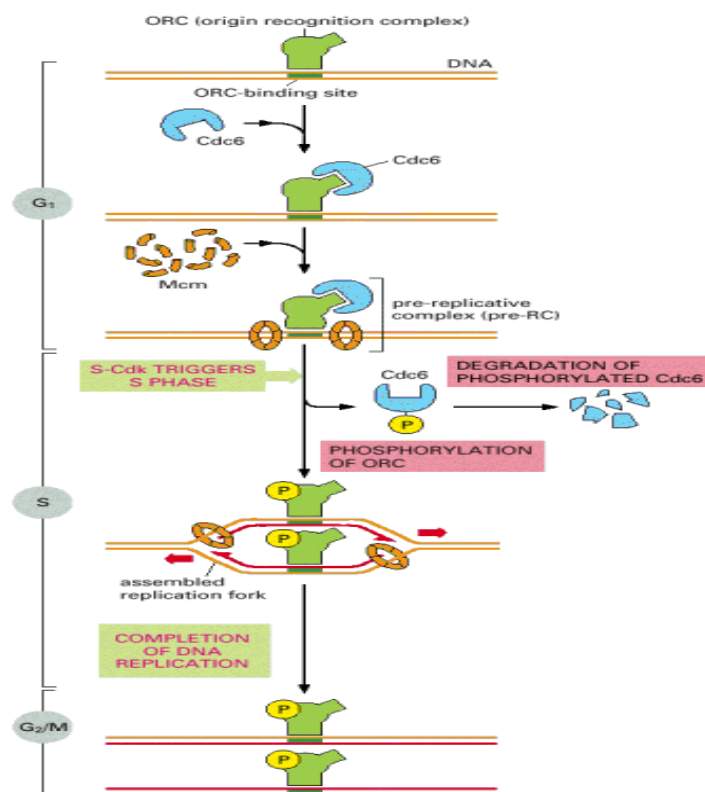


Fig.9 complejo cdk2-ciclina A del ciclo celular (Alberts, et al.)



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

- c) **Segundo punto de control:** El segundo punto de control se encuentra al final de G<sub>2</sub>. Los complejos cdk1- ciclina A y ciclina B permiten el paso a través de este punto. En conjunto la actividad de estos dos complejos se denominó Factor Promotor de la Mitosis (MPF). A grandes rasgos el segundo punto de control se encarga de revisar: que el material genético se haya duplicado completamente; que el material genético no tenga errores; y que el medio extracelular sea el adecuado. Se sabe que una vez activado el complejo cdk-ciclina, éste se encarga de llevar a cabo tareas indispensables durante las primeras subfases de la mitosis. En resumen, los complejos cdk1-ciclina A y cdk1-ciclina B, se encargan de inducir el ensamble del huso mitótico y en parte de asegurarse de que los cromosomas se unan a éste. Se encarga además: de iniciar la condensación del material genético activando un grupo de proteínas conocidas como condensinas; de desensamblar la envoltura nuclear fosforilando las láminas nucleares; de armar nuevamente el citoesqueleto celular y de la reorganización del aparato de Golgi y el retículo endoplasmático. En este punto actúa también la p53 que como ya vimos detecta alteraciones en el ADN y desencadena a la activación de la CIP p21 encargada de la inhibición de cualquier complejo cdk 1,2, 4 y 6-ciclina. <sup>(1) (3)</sup>
- d) **Separación de las cromátides hermanas:** Las cohesinas son proteínas requeridas para mantener unidas a las cromátides hermanas, es durante la anafase cuando las cromátides se separan. Para que esto suceda es necesaria la actividad de varios complejos proteicos el principal de éstos es el complejo promotor del anafase (APC) este complejo es activado por la unión de una proteína semejante a una cdk, llamada cdc20 (cdc= ciclo de división celular). Una vez activado el APC se encarga de marcar a diversas proteínas para que se degraden una de ellas es la *securina*, que inactiva a la *separasa* a su vez esta separasa es la proteína encargada de

inactivar a las cohesinas eliminando las uniones entre las cromátides hermanas (Fig. 10).<sup>(1)</sup>

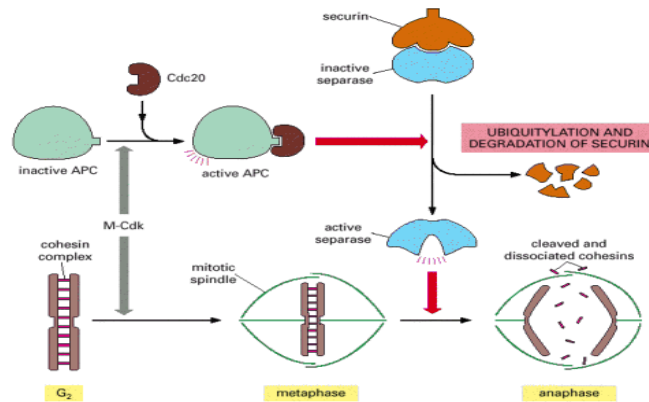


Fig.10 separación de las cromátides hermanas. (Alberts, et al.)

- e) **Tercer punto de control:** Este último punto de control se encuentra en la fase M, entre la metafase y anafase se encarga de revisar que todos los cromosomas se hayan unido al huso mitótico, si detecta que uno de los cinetocoros no se encuentra unido manda una señal negativa al sistema de control bloqueando la activación de proteínas implicadas en la separación de las cromátides hermanas, específicamente inactiva al conjunto APC-cdc20, lo que inhibe la liberación de la separasa, impidiendo que las cromátides hermanas se separen hasta que la señal desaparezca.<sup>(1)</sup>

### 1.3.2 Control extracelular del ciclo celular

La forma y el tamaño de un organismo están definidos por los tres procesos fundamentales que dan forma y tamaño al individuo: el crecimiento celular; la muerte celular; y la proliferación celular, esta última es el resultado del ciclo celular que como se vio en secciones anteriores está regulado por mediadores intracelulares (ciclinas-Cdk), cabe señalar que la entrada al ciclo celular no es un proceso autónomo de la célula se requiere de la activación de estas vías (ciclinas-Cdk), a través de la señalización mediante factores solubles de naturaleza proteica denominados mitógenos. De esta manera las



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

células en organismos multicelulares proliferan solo cuando se requieren más células.

La mayoría de los mitógenos controlan la tasa de división celular actuando en la fase G1 liberando el control negativo del ciclo celular y permitiendo la entrada a la fase S. Actúan uniéndose a receptores de membrana con actividad de tirosina-quinasas los cuales activan a la proteína G monomérica Ras cambiándola de su estado unido a GDP por GTP; esta activación desencadena una cascada de fosforilaciones a través de las proteínas MAPK (quinasas activadas por mitógenos). A su vez estas proteínas MAPK transmiten el estímulo a diversas moléculas efectoras (quinasas de proteínas o factores de transcripción). Esta cascada de fosforilaciones ocasiona la transcripción de genes tempranos entre los que destacan los que codifican a las ciclinas de G1, algunos de estos genes a su vez activan la transcripción de otros genes denominados genes tardíos. De esta manera la vía de señalización Ras-MAPK transmite señales extracelulares al núcleo activando la maquinaria del ciclo celular.

Muchos tipos celulares como los fibroblastos o las células epiteliales, requieren de adhesión a sustratos de la matriz extracelular (fibronectina o laminina), para crecer y proliferar en adición de las señales y medio adecuados. Este requerimiento se debe a que la unión de moléculas de matriz extracelular a integrinas (moléculas receptoras de matriz en la membrana celular, las cuales están unidas al citoesqueleto) activa otras vías de señalización requeridas para entrar al ciclo celular, mediadas por la activación de otras cinasas (FAK, cinasa de adhesión focal).

Es necesario señalar que las células de mamífero no se dividen infinitamente muchas células se dividen un número limitado de veces antes de diferenciarse en células altamente especializadas. Por ejemplo fibroblastos humanos en medio de cultivo estándar se dividen entre 25 y 50 veces, hacia el final la proliferación se disminuye su velocidad y finalmente se detiene a este fenómeno se le ha denominado senescencia replicativa.<sup>(24)</sup>

## 1.3.3 Apoptosis

Las células en un organismo forman una comunidad organizada donde el número de células en esta comunidad está estrictamente regulado, si una célula ya no es requerida esta muere o se suicida por apoptosis. Este fenómeno es bastante común tanto en organismos en desarrollo como en adultos lo cual podría parecer como un desperdicio, ya que por lo general las células que mueren por apoptosis son células sanas a diferencia de las células que mueren por necrosis, pero en realidad es un proceso necesario para la homeostasis y la morfogénesis por ejemplo los dedos se separan por apoptosis del tejido que hay entre ellos en el primordio de la mano.

La apoptosis a diferencia de la necrosis es un proceso ordenado las células muere limpiamente sin dañar a sus células vecinas con el contenido de su citoplasma, la célula se condensa y reduce su tamaño, colapsa el citoesqueleto, la membrana nuclear se destruye, el ADN se fragmenta y finalmente la superficie de la célula cambia de manera que puede ser reconocida por células vecinas o macrófagos para ser fagocitada.

El proceso intracelular de la apoptosis depende de una familia de proteasas llamadas *caspasas* que cortan a la proteína blanco en residuos de aspartato. Las caspasas se encuentran en las células en forma inactiva (procaspasas) las cuales son activadas por un corte proteolítico estas a su vez activan otras procaspasas en una cascada de amplificación (Fig. 11). <sup>(1) (10)</sup>

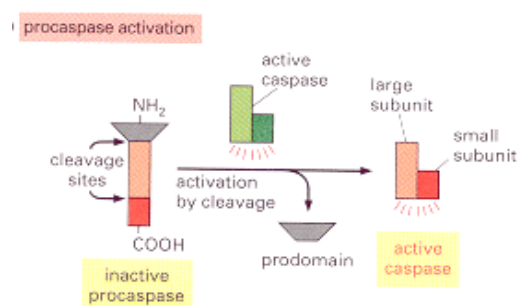


Fig.11 Activación de las caspatas (Alberts, et al.)



Las caspasas cortan proteínas clave en la célula como la laminina que al romperse desintegra la membrana nuclear y degradan a la enzima que inactiva a la DNAsa ocasionando la degradación del material genético. La entrada a la apoptosis al igual que la entrada a un nuevo ciclo celular es un “todo o nada”, donde una célula que ha iniciado este proceso no puede detenerse. El mecanismo propuesto de la activación de estas procaspasas gira alrededor de proteínas adaptadoras que juntan múltiples caspasas en un agregado en este agregado las caspasas se activan entre sí, mediante un pequeña actividad de proteasa basal en unos momentos estas caspasas activas desencadenan la cascada de activación amplificando la señal de muerte. Las señales de muerte pueden originarse a dos niveles, en algunas células se puede inducir apoptosis presentando el ligando de Fas en su membrana el cual se une a un receptor de muerte (Fas) en la superficie celular de la célula blanco, el agregado de Fas y su ligando recluta a los adaptadores que unen y activan a la procaspasa 8. La célula también en respuesta a daño o estrés puede activar la apoptosis, por ejemplo un daño severo al ADN puede inducirla mediante la p53 la cual activa la transcripción de genes que codifican para proteínas que promueven la liberación del citocromo C de la mitocondria en el citoplasma se une al factor promotor de la apoptosis 1 (Apaf1) el cual agrega y activa a la procaspasa 9 (Fig. 12).<sup>(1)</sup>  
(3)

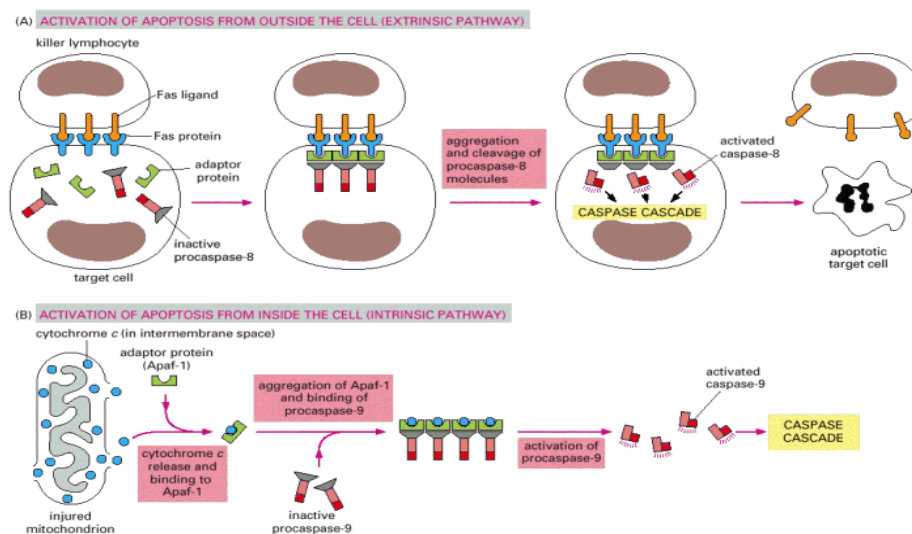


Fig.12 Activación de la apoptosis celular (Alberts, et al.)



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

## 1.4 REPRODUCCIÓN SEXUAL

Los seres humanos se reproducen sexualmente, es decir, producen descendencia que tiene características genéticas de los dos progenitores. La reproducción sexual requiere, en general, dos progenitores y siempre involucra dos procesos: La meiosis y la fecundación. Por medio de la fecundación, las dotaciones genéticas de ambos progenitores se reúnen y forman una nueva identidad genética, la de la progeñie.

Para comprender la meiosis, debemos centrar nuevamente nuestra atención en los cromosomas. Cada organismo tiene un número de cromosomas característico de su especie, un ser humano tiene 46. Sin embargo, en estos organismos, y en la mayoría de las otras plantas y animales conocidos, las células sexuales o gametos tienen exactamente la mitad del número de cromosomas que las células somáticas del organismo. El número de cromosomas de los gametos se conoce como número haploide (“dotación simple”) de cromosomas y el de las células somáticas, como número diploide (“dotación doble”). Las células que tienen más dotaciones cromosómicas se denominan células poliploide (“muchas dotaciones”).

El número haploide se designa  $n$  y el número diploide,  $2n$ . Así en los seres humanos,  $n=23$  y  $2n=46$ . Cuando un gameto masculino fecunda a un gameto femenino, los dos núcleos haploides se fusionan,  $n + n = 2n$ , y el número diploide se restablece. La célula diploide producida por la fusión de dos gametos se conoce como célula huevo o cigoto.

En toda célula diploide, cada cromosoma tiene su par. Los pares de cromosomas se conocen como pares de homólogos y los miembros de cada par se asemejan en tamaño, forma y también; como veremos, en el tipo de información hereditaria que contiene. Uno de los cromosomas homólogos proviene del gameto de uno de los progenitores y su par, el gameto del otro progenitor. Después de la fecundación, ambos homólogos se reúnen en el cigoto.



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

En la meiosis, la dotación cromosómica diploide, que contiene los dos homólogos de cada par, se reduce a una dotación haploide, que contiene solo un homólogo de cada par. Así la meiosis compensa el efecto multiplicador de la fecundación.

## **1.4.1 La meiosis: una reducción en el número de cromosomas.**

La meiosis consiste en dos divisiones nucleares sucesivas que dan como resultado final un total de 4 células hijas. Cada núcleo hijo contiene la mitad del número de cromosomas presentes en el núcleo progenitor y además recibe sólo un miembro de cada par de cromosomas homólogos.

Durante la interfase anterior a la meiosis, los cromosomas se replican de la misma manera que en la interfase que precede a la mitosis, y cada cromosoma pasa a tener dos cromátidas hermanas idénticas unidas por el centrómero. Al comienzo de la profase de la primera división meiótica ocurre un hecho clave para la meiosis: los cromosomas homólogos se acercan y se aparean en el proceso de sinapsis, mientras que los cromosomas homólogos están apareados, se produce el entrecruzamiento o crossing over. En los puntos donde hay entrecruzamiento, un fragmento de cromátida de un homólogo se rompe y se intercambia por un fragmento de cromátida del otro homólogo. Las zonas de ruptura se reparan y, como resultado, las cromátidas hermanas de cada cromosoma homólogo dejan de ser genéticamente idénticas. El cromosoma materno contiene ahora partes del homólogo paterno y viceversa. El entrecruzamiento es un mecanismo crucial que permite la recombinación del material genético de los dos progenitores, un hecho de enormes consecuencias para el proceso evolutivo.

## **1.4.2 Las ocho fases de la meiosis.**

De la misma manera que la mitosis, la meiosis es un proceso continuo en el que se puede reconocer una serie de etapas características. La meiosis consiste en dos divisiones nucleares sucesivas, la meiosis I y la meiosis II.



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

En la meiosis I se aparean y luego se separan los cromosomas homólogos, en la meiosis II, se separan las cromátidas de cada homólogo.

Durante la interfase los cromosomas se duplican de manera que, al comienzo de la meiosis, cada cromosoma consiste en cromátidas hermanas idénticas. La primera de las dos divisiones nucleares se desarrolla a través de la profase I, la metafase I, anafase I, y la telofase I. La meiosis II es muy similar a la mitosis, excepto en que no está precedida por la duplicación del material cromosómico. Luego de recorrida esta secuencia de fases puede producirse una interfase de corta duración, durante la cual los cromosomas se desarrollan parcialmente pero, en muchas especies, la meiosis pasa de telofase I directamente a la profase II. Luego, continúa la metafase II, anafase II y la telofase II. Si al comienzo de la segunda división meiótica los cromosomas están dispersos, se condensan nuevamente.

De ésta manera, a partir de una única célula se obtiene cuatro células, cada una con un miembro del par de homólogos presentes en la célula progenitora y, en consecuencia, con la mitad del número cromosomas que tenía la progenitora. En este proceso, el número de cromosomas se reduce de diploide a haploide.

Además del entrecruzamiento, durante la meiosis se produce otro hecho que también deriva en la recombinación del material genético de los progenitores: los cromosomas homólogos se distribuyen al azar entre las cuatro células hijas haploides. Como cada miembro de cada par de homólogos derivó de uno de los dos progenitores de ese organismo, el hecho de que uno de los gametos contenga un cromosoma procedente de su madre o el cromosoma homólogo, que derivó de su padre, depende exclusivamente del azar. Este proceso azaroso hace que los núcleos haploides producidos por la meiosis contengan nuevas combinaciones de cromosomas.



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

En los individuos producidos sexualmente, el potencial para la variabilidad genética es enorme. En las especies de reproducción sexual pueden reconocerse tres procesos fundamentales que ocurren durante la meiosis y la fecundación, que funcionan como fuentes de variabilidad genética al proveer nuevas variaciones que constituye la “materia prima” de la selección natural a lo largo del proceso evolutivo.

- El entrecruzamiento. Como, se vio en la profase I se intercambia información genética entre cromosomas homólogos.
- La segregación al azar de los cromosomas de los dos progenitores. Los cromosomas paterno y materno se distribuyen en forma independiente entre las células haploides en la meiosis y esa distribución depende de la orientación de los pares de homólogos en la metafase I. Como esta orientación es al azar, no hay ninguna “regla” sobre cuántos homólogos paternos o maternos se colocarán a cada lado del ecuador.
- La fecundación. Ésta es una fuente extra de variabilidad: salvo el caso de los gemelos monocigóticos, nunca dos individuos son idénticos, ya que proviene de la unión de cierta pareja de gametos (cierto espermatozoide y cierto óvulo) y no de otra. Debido a los mecanismos de recombinación y segregación de los cromosomas en la meiosis, no hay dos gametos idénticos. <sup>(4)</sup>

## 1.5 ABORTO

### 1.5.1 Aspectos Generales

La Organización Mundial de la Salud ha definido el aborto como: “la expulsión o extracción de su madre de un embrión o feto que pese 500 gramos o menos”. Este peso corresponde a una edad gestacional entre 20-22 semanas. Como en el aborto retenido no ha ocurrido la expulsión, se



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

podría definir mejor al aborto como la interrupción de un embarazo menor de 20-22 semanas o la pérdida de un embrión o de un feto que pesa menos de 500 gramos. Se denomina aborto temprano al que ocurre antes de la 12a semana de gestación y aborto tardío al que se presenta entre las 12 y las 20 semanas de gestación. El aborto puede ser espontáneo o inducido (provocado).

Se calcula que 20-30% de las gestaciones terminan en aborto espontáneo; sin embargo, hay estudios que indican una incidencia de aborto entre 40-50% y aun hasta 80% de todas las gestaciones cuando se incluyen embarazos muy tempranos.

Se denomina pérdida recurrente del embarazo, a la ocurrencia de tres o más abortos espontáneos consecutivos este término ha reemplazado al de aborto habitual. La pérdida recurrente del embarazo se clasifica como: primaria si la paciente nunca ha tenido un fruto viable; o secundaria si la madre ha tenido un bebé antes de las pérdidas consecutivas del embarazo. En la actualidad cuando una paciente ha presentado dos abortos consecutivos espontáneos, se inicia la investigación como pérdida recurrente del embarazo debido a que la frecuencia de hallazgos anormales es similar a la que se encuentra cuando se investigan las pacientes después de haber presentado tres o más abortos. Las parejas con una historia de tres abortos consecutivos sin el antecedente de un hijo vivo tienen un riesgo de aborto espontáneo subsecuente de 50%.<sup>(26)</sup>

El hecho de que exista fertilización del óvulo por el espermatozoide no implica que siempre se desarrolle un feto vivo, de hecho muchas concepciones ni siquiera llegan a ser reconocidas clínicamente. De los embarazos confirmados 10% a 15% terminan en abortos del primer trimestre y 2% a 3% lo hacen en el segundo trimestre, sin embargo en la actualidad la posibilidad de diagnosticar un embarazo dentro de los días que siguen a la implantación podría llevar a aumentar el número de casos de pérdidas espontáneas.



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

A pesar de que los embarazos pueden ser reconocidos por ecosonografía desde la semana 5-6 después del último período menstrual hay razones para creer que las pérdidas ocurren más tempranamente y es lo que se ha denominado “pérdidas preclínicas” o “embarazo bioquímico”, esto es, presencia de una prueba de embarazo positiva en ausencia de estructuras embrionarias visibles a la ecosonografía. <sup>(41)</sup>

El indicio de estas pérdidas preclínicas ha sido obtenido de estudios prospectivos en mujeres ovulatorias, mediante determinación seriada, en días alternos, de gonadotropina coriónica humana (HCG), desde el día 21 del ciclo hasta la aparición de la menstruación o el embarazo. Se considera diagnóstico de embarazo cuando se encuentran valores de  $\beta$ HCG  $\geq$  4mUI/mL.

En muchos casos los niveles de HCG son lo suficientemente elevados como para hacer el diagnóstico de embarazo; sin embargo, sólo en el 60% de los casos se observa embarazo clínico, por lo que las pérdidas preclínicas son superiores al 30% y las pérdidas clínicas superiores al 10%. Cerca de una quinta parte ocurren en la primera mitad del embarazo, la mayoría alrededor de la semana 8 y, generalmente, son huevos sin presencia de embrión y saco vitelino. <sup>(26)</sup>

Estudios prospectivos han demostrado que aproximadamente del 80% al 90% de las mujeres que han tenido un aborto espontáneo precoz tienen un nuevo embarazo de evolución normal. Las pacientes con antecedentes de embarazos a término sin complicaciones son las que tienen mayor probabilidad de presentar un nuevo embarazo con evolución normal. El factor edad es determinante en el resultado del embarazo porque del 85% al 90% de los embarazos en mujeres entre 20 a 30 años evolucionan en forma normal. La frecuencia de nacidos vivos disminuye en forma progresiva después de los 33 a 35 años, para llegar a 70% después de los 40 años de edad.



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

Entre las causas de pérdida fetal recurrente (PFR) se encuentran: anomalías en el crecimiento y desarrollo del embrión; trastornos inmunitarios; infecciones; uso de drogas; alteraciones anatómicas del útero y alteraciones metabólicas, por lo que la evaluación clínica de una paciente con historia de PFR debe incluir lo siguiente.

- a) Historia obstétrica de los embarazos anteriores, con patrón y características de las pérdidas previas.
- b) Antecedente de exposición a drogas y tóxicos ambientales.
- c) Infecciones ginecológicas.
- d) Hallazgos asociados con el síndrome antifosfolípido primario.
- e) Consanguinidad entre parejas con antecedentes de enfermedades o alteraciones genéticas.
- f) Historia familiar de PFR.
- g) Examen físico general, incluyendo examen ginecológico. <sup>(37)</sup>

## 1.5.2 Definiciones:

Se llama aborto a la separación del producto de la concepción antes de un nivel de maduración, sin la cual no puede ser viable. Este tiempo se corresponde con las 20-22 semanas completas (140-154 días completos), o cuando el feto no supera los 500 gramos de peso. Puede ser espontáneo o provocado.

- a) *Aborto inducido o provocado*: se llama así al resultado de maniobras practicadas deliberadamente con ánimo de interrumpir el embarazo. La técnica más empleada sigue siendo la dilatación cervical con bujías de Hegar y la evacuación mediante legrado instrumental o vacuoextracción con aspiración por vacío, manual o mecánica.





# UNIVERSIDAD DE CUENCA

b) *Aborto espontáneo*: expulsión de feto de menos de 500 gramos de peso, en ausencia de maniobras facilitadoras. Cuando se dice que la mujer tuvo un aborto espontáneo se expresa que el embarazo se interrumpió antes de la semana 20 de gestación, que el feto se expulsó antes de los 120 días de evolución o que en el momento de ser expulsado pesa menos de 500gramos. En este período del embarazo el feto no puede vivir fuera del útero materno. El aborto espontáneo se produce en la mayoría de los casos durante las primeras 12 semanas de embarazo, por eso se la considera una complicación del primer trimestre.

En el 20% de los embarazos puede presentarse una metrorragia durante los tres primeros meses, pero la frecuencia de aborto espontáneo es del 20 - 30%.

A más de estos conceptos, podemos encontrar los siguientes términos dentro del concepto de aborto:

- *aborto habitual o recidivante*: se denomina así al trastorno consistente en la pérdida de tres embarazos sucesivos en el período correspondiente al de aborto (hasta las 20-22 semanas).
- *amenaza de aborto*: existe amenaza de aborto, cuando hay un incremento de la contractilidad uterina inusual para esa edad gestacional y modificaciones cervicales que incluyen, centralización, ablandamiento, borramiento y dilatación del orificio cervical externo.
- *aborto en curso*, es el cuadro anterior más dilatación del orificio cervical interno.
- *aborto inminente*, es cuando mediante el tacto se puede tocar membranas o partes fetales, a través del orificio cervical interno dilatado.



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

- *aborto completo e incompleto*: está relacionado con la evacuación total (en block) o parcial de restos ovulares y membranas. Cuando ocurre la segunda opción, aborto incompleto, debe completarse la evacuación total, mediante técnicas instrumentales similares a las del aborto provocado.
- *aborto diferido* se denomina así a la retención del producto de la gestación sin vida, por un período prolongado, que se fija en dos meses o más. <sup>(32)</sup>

## 1.5.3 Síntomas

- a) *Pérdida de sangre* (se la llama metrorragia) por genitales externos, de características variables en cuanto a la cantidad y el color.
- b) *Dolores tipo cólico en la zona del pubis*, aunque a veces pueden irradiarse hacia la zona sacrolumbar, producidos por las contracciones uterinas que tiene la mujer, ya que es una forma de expulsar el feto en forma natural, como sucedería en un parto espontáneo.
- c) *Expulsión de restos ovulares*, aunque a veces esto no ocurre.

Estos síntomas no siempre se presentan, porque hay abortos espontáneos que transcurren sin manifestaciones clínicas, siendo identificados por un aumento de la subunidad beta de la Gonadotropina Coriónica humana (hormona que se produce sólo durante el embarazo). A estos embarazos se los llama “embarazos químicos”. <sup>(32)</sup>

## 1.5.4 Causas de aborto espontáneo

- a) *Hormonales*
  - Alteración del funcionamiento del ovario: déficit de progesterona.



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

- Alteración del funcionamiento de la glándula tiroides: hipotiroidismo.
- Alteración del funcionamiento de las glándulas suprarrenales: síndrome adrenogenital.

## b) *Infecciosas*

- Toxoplasmosis
- Micoplasmosis
- Listeriosis

Las infecciones pueden presentarse sin dar ningún síntoma, y muchas veces se diagnostican por estudios específicos que indica el médico.

## c) *Uterinas*

- Malformaciones uterinas.
- Hipoplasia uterina (útero infantil: falta de desarrollo del útero).
- Incompetencia Ístmico – cervical: alteración del cuello uterino que produce la dilatación espontánea del mismo, provocando el nacimiento del bebé.
- Miomas uterinos.
- Endometriosis.

d) *Anomalías genéticas*: La mayoría de los abortos espontáneos se producen por anomalías en los cromosomas (éstos son filamentos que están en el núcleo de las células donde se encuentra la información genética), que hacen que estos embarazos sean incompatibles con la vida. Cada persona tiene en sus células germinales (óvulos o espermatozoides) 23 pares de cromosomas. Cada par de cromosomas se forma por un cromosoma del padre y



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

otro de la madre. Entre un 60% a un 70% de los abortos espontáneos producidos durante el primer trimestre del embarazo, son consecuencia de defectos genéticos o deficiencias cromosómicas que interfieren en la vitalidad fetal.

- e) *Factores inmunológicos*: Los anticuerpos son proteínas que produce el organismo para protegernos de las infecciones, pero a veces se pueden fabricar anticuerpos que en vez de darnos protección, atacan nuestros propios tejidos y dañan nuestro organismo. Esto ocurre en el “Síndrome antifosfolípídico”, enfermedad materna en la que se producen anticuerpos que interfieren en los mecanismos de coagulación y afectan la circulación de la sangre materna; estas fallas del organismo materno repercute en la circulación placentaria, lo que puede provocar el aborto espontáneo.

En los casos que las parejas hayan tenido dos o más abortos espontáneos, debe someterse a estudios, ya que se trata de abortos recurrentes, para intentar saber la causa de los abortos y de esa forma valorar la posibilidad de algún tratamiento médico para corregirla. El 50% de las parejas logra conocer la causa del aborto espontáneo.<sup>(32)</sup>

## 1.5.5 Factores Genéticos

Las células somáticas de la especie humana se mantienen con su número diploide de 46 cromosomas gracias al proceso de mitosis constante que sucede en estas células. Sin embargo, en las gónadas los gametos realizan dos divisiones celulares por medio de meiosis, las cuales permiten la reducción del número de cromosomas que llevan a los gametos de un estadio primario diploide a un número haploide de 23 cromosomas. Cuando ocurren alteraciones en los procesos de mitosis y meiosis se producen anomalías del número de cromosomas y cuando ocurren trastornos sobre la morfología se producen las alteraciones cromosómicas de tipo estructural.<sup>(9)</sup>



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

a) **Anormalidades numéricas:** Las anomalías numéricas embrionarias pueden ser de tres tipos.

- **Euploidías:** Que es cuando las variaciones en el número de los cromosomas son múltiplos del número haploide (23 cromosomas).
- **Aneuploidías:** Que es cuando sólo uno o algunos cromosomas están involucrados y no son múltiplos del número haploide.
- **Poliploidía:** Es la presencia de más de 2 complejos cromosómicos haploides, y dependiendo del número de cromosomas pueden ser triploidías ( $3n = 69$ ), tetraploidías ( $4n = 92$ ), etc.

Las aneuploidías son las más comunes y resultan de una falta de separación cromosómica durante la meiosis (ausencia de disyunción meiótica), de éstas las trisomías de los cromosomas 13, 16, 18, 21 y 22 son las más frecuentes y se relacionan con la edad materna; mientras que las monosomías (45 x) se encuentran en el 97% de las muestras de abortos espontáneos y no se relacionan con la edad materna.

No existe mayor probabilidad de una trisomía en los casos de un segundo aborto sin embargo, las parejas con 2 ó más abortos espontáneos tienen un incremento en el riesgo de embarazos con alteraciones cromosómicas, a pesar de que los padres tengan un cariotipo normal. La frecuencia de anomalías citogenéticas en abortos clínicamente reconocidos es aproximadamente de un 50%.

Las poliploidías se producen generalmente por la fecundación de un óvulo con un cromosoma haploide normal por dos espermatozoides también normales (dispermia) y se observan frecuentemente en el material de aborto de 7 semanas de gestación. Entre las características patológicas de los embarazos triploides se encuentran: saco gestacional grande; degeneración quística de las vellosidades coriales; y trofoblasto hipotrófico o hidrópico



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

(degeneración pseudomolar). En relación con el riesgo de sufrir alteraciones del cariotipo en las pacientes con antecedentes de aborto, se ha señalado lo siguiente.

- No hay incremento del riesgo de trisomía a pesar de haber el antecedente de trisomía u otra alteración del cariotipo en un aborto anterior.
- Hay un incremento significativo en el riesgo de cariotipo anormal no trisómico cuando existe el antecedente de aborto con cariotipo similar.
- Hay incremento significativo del riesgo de aborto sin alteración del cariotipo cuando hay el antecedente de aborto con cariotipo normal.

Como la pérdida del embarazo se observa en forma recurrente, igualmente se observa predisposición para las aneuploidías con riesgo aumentado de recién nacidos con alteraciones cromosómicas. <sup>(19)</sup>

**b) *Anormalidades estructurales:*** Los cromosomas están expuestos a la acción de numerosos agentes ambientales mutágenos que los dañan y ocasionan fracturas o rompimientos; sin embargo, existen mecanismos a nivel celular que tratan de reparar esta lesión. La falla de estos mecanismos de reparación por defecto intrínseco o exposición severa al agente mutágeno ocasiona las alteraciones estructurales.

Las anomalías estructurales que se encuentran con mayor frecuencia en las parejas con PFR son las traslocaciones que se producen debido al intercambio de segmentos entre 2 cromosomas y pueden ser las siguientes.

- *Simples:* Cuando ocurre la adición de una parte de un cromosoma a otro cromosoma no homólogo.



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

- *Recíprocas*: Cuando ocurre el cambio de cromatina entre 2 cromosomas no homólogos
- *Robertsonianas*: Cuando ocurre la fusión de cromosomas acrocéntricos, o sea, cuando la parte central del cromosoma (centrómero) está situado cerca de los brazos cortos, y ocurre en los cromosomas 13, 14, 15, 21, 22. <sup>(26)</sup>

## c) **Tipos de Traslocaciones.**

- *Balancedas*: Ocurren cuando hay intercambio entre dos cromosomas sin pérdida del material genético y por tanto el individuo puede ser fenotípicamente normal.
- *Desbalanceadas*: Ocurren cuando pasa una parte de un cromosoma a otro, sin intercambio de material genético. En éstas el producto siempre es anormal. Las inversiones también ocurren en las parejas con PFR y se producen cuando un segmento cromosómico rota 180° sobre sí mismo y se coloca en forma invertida, lo que produce una alteración en la secuencia de genes. Esta puede ser paracéntrica si el segmento invertido no incluye el centrómero o pericéntrica si el centrómero queda incluido.

La normalidad del producto depende de muchas variables, entre las que se encuentran el tipo específico de anormalidad y si el padre o la madre es el portador. Los padres pueden ser individuos fenotípicamente normales pero portadores de una traslocación balanceada que se transmite de forma no esporádica a la descendencia y explica los abortos a repetición. Durante la gametogénesis estas traslocaciones pueden producir gametos normales o anormales y los resultados de la concepción pueden ser: niños con cariotipo normal, niños con traslocación balanceada, niños con fenotipo anormal y abortos con cromosomas desbalanceados.



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

Otras alteraciones estructurales que se han encontrado en muestras de abortos o en recién nacidos anormales son las duplicaciones, que se presenta, cuando una misma secuencia de genes aparece en forma doble en el mismo cromosoma y las deficiencias cromosómicas, que son el resultado de la segregación que consiste en la separación de genes alélicos durante la meiosis.

El riesgo de pérdida fetal o de tener un producto anormal se puede calcular cuando se conoce la historia familiar de casos anormales anteriores. El pronóstico del producto depende del tipo de alteración estructural y de las características de los padres, por ejemplo la traslocación recíproca  $t(11;22)$ , predispone frecuentemente a una mala segregación meiótica con el subsecuente alto riesgo de anormalidad cromosómica en la concepción, mientras que cuando la traslocación en la pareja es de tipo robertsoniana  $t(14;21)$ , teóricamente la mitad de las concepciones deberían ser incompatibles con viabilidad fetal, un tercio debería ser fenotípicamente normal y un sexto debería presentar una trisomía 21.

En toda muestra de tejido embrionario o fetal se debe realizar estudio morfológico y citogenético para predecir la presencia de malformaciones y determinar el riesgo de recurrencia. Los estudios cromosómicos del material ovular son costosos y requieren de personal experimentado en la preparación del material citogenético, medios de transporte sin preservativos y evitar contaminación de la muestra para obtener en forma satisfactoria el crecimiento celular. <sup>(26)</sup>

## 1.5.6 Consejo genético

La presencia de anomalías cromosómicas estructurales balanceadas en la pareja es causa importante de abortos a repetición y provee las bases para el consejo genético. Si el cariotipo de la pareja es normal y en un próximo embarazo presentan un aborto, se debe realizar el estudio citogenético del material ovular para obtener información acerca del





# UNIVERSIDAD DE CUENCA

pronóstico en un próximo embarazo. Si en el cariotipo hay alteraciones numéricas o cariotipos desbalanceados está indicado el diagnóstico prenatal, que se puede realizar antes de la implantación por procedimientos de micromanipulación, y en etapas más avanzadas por medio de la biopsia de vellosidades coriónicas, amniocentesis o cordocentesis.

También se debe realizar la evaluación citogenética de todo el núcleo familiar en etapa reproductiva. Si la pareja tiene aumento de riesgo de alteraciones cromosómicas en embarazos subsecuentes se pueden dar las siguientes recomendaciones, dependiendo de cada caso: desistir de la idea de un embarazo, adopción, inseminación artificial con semen de donante cuando el hombre es el portador de la alteración cromosómica y fertilización in vitro con donación de óvulos cuando la mujer es la portadora. <sup>(31)</sup>

## 1.6 CITOMETRÍA DE FLUJO.

### 1.6.1 Aspectos Generales:

**Historia:** El primer contador celular automático fue desarrollado por Moldavan (1934), consistía en un tubo capilar por el que se hacía pasar células teñidas, el capilar estaba montado sobre un microscopio óptico con un objetivo sobre el cual había un detector fotoeléctrico que registraba el paso de las células como un cambio en la luz que recibía. Tuvo muchos problemas con el grosor del capilar y obstrucción del mismo, dificultad en el mantenimiento de presiones, etc. Unos años más tarde Kielland (1941), patenta un modelo que parece ser igual al de Modalvan <sup>(2)</sup>.

Un importante avance para el desarrollo de la citometría de flujo se consiguió en 1953 al inventar Crosland y Taylor una cámara de flujo basada en la inyección de la muestra en el seno de un fluido de arrastre a través de un capilar que se estrecha y centra el flujo de la misma. Con este sistema se evitaban dos grandes problemas:



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

- a) El capilar tiene mayor diámetro, con lo que su obstrucción es mucho más difícil permitiendo el mejor enfoque de la muestra con la fuente de luz.
- b) Es la base de las cámaras que se usan en la actualidad.

W. Coulter había descrito poco antes (1949) el principio que lleva su nombre. Desarrolló un contador celular basado en el cambio que produce una partícula al pasar por un agujero en el que hay una diferencia de potencial conocida. En 1966 también usó cambios en ondas de radiofrecuencia <sup>(2)</sup>.

En 1953 Parker y Horst describen el primer contador diferencial hematológico usando células teñidas en rojo (hematíes) y azul (leucocitos), luz visible y detectores para luz roja o azul.

Fulwyler describe el proceso de sorter electrostático en 1965 basándose en la tecnología de las impresoras por chorro de tinta. Es el sistema mayoritariamente empleado en la actualidad. Durante los años 60 y 70 se producen avances en la tecnología y su aplicación a la citometría de flujo pero hasta final de los años 70 y principio de los 80 existían pocas aplicaciones de la citometría de flujo de interés biológico. Los esfuerzos se dirigían principalmente en mejorar las prestaciones de los instrumentos que se estaban desarrollando <sup>(2)</sup>.

Desde entonces se han producido avances en las aplicaciones de la Citometría de Flujo en la investigación médico-biológica

Muchos otros autores han contribuido con sus experimentos a desarrollar técnicas aplicables a la citometría de flujo que ahora están dando sus frutos y se emplean tanto en el laboratorio de rutina, como en la investigación básica y/o clínica <sup>(2)</sup>.

## 1.6.2 El citómetro de flujo

A diferencia de otras técnicas, el citómetro de flujo mide características celulares individuales de un gran número de células (no una media de los resultados), y además permite medir características intrínsecas y fenotípicas de poblaciones en muestras heterogéneas.

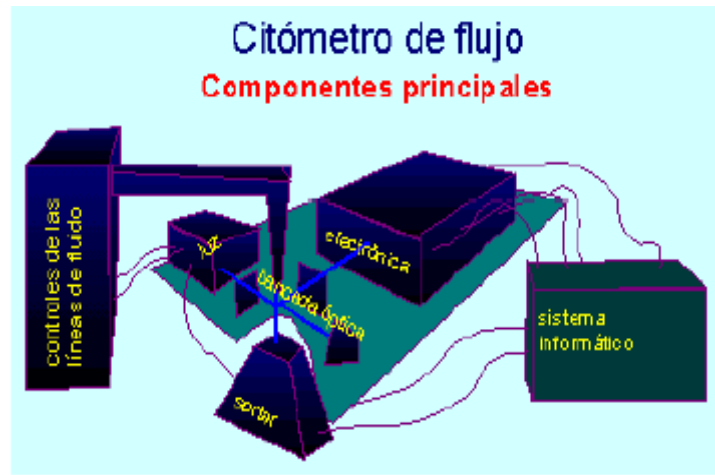


Fig.13 Componentes principales del Citómetro de Flujo

- a) **El sistema óptico:** Se debe considerar la fuente de iluminación (que puede ser un láser o una lámpara de arco voltaico), la señal de ruido, y los filtros necesarios para discriminar la señal lumínica y llevarla al detector adecuado. <sup>(36)</sup>
- Instrumentos basados en una fuente de iluminación láser: Tienen una configuración ortogonal, es decir que son perpendiculares los ejes de iluminación, detección y paso de muestra. El láser por acción de lentes tiene una sección elíptica y la intensidad de la luz decrece hacia la periferia de forma gaussiana. Su grosor se considera hasta que su intensidad ha disminuido del centro del haz al valor  $1/e^2$ , el cual es aproximadamente  $100 \mu\text{m}$  de ancho. Algunos citómetros poseen dos o más láseres como fuentes de iluminación. <sup>(36)</sup>

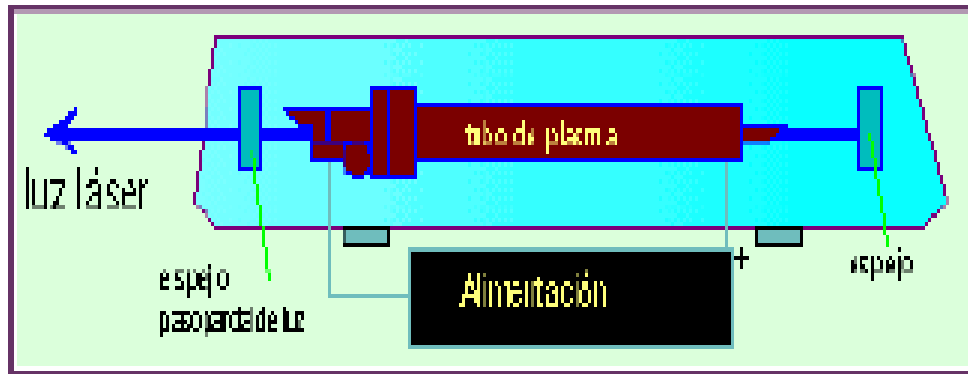


Fig.14 Fuentes de iluminación.

La fluorescencia se recoge a 90 grados por lentes de alta apertura numérica. Recogen del 5 al 10 % de la fluorescencia emitida, pero con un espejo de diseño especial se puede llegar a recoger hasta el 90 %. Se debe situar una placa con un agujero (pinhole) para aumentar la razón señal/ruido. Por la lente que recoge la señal fluorescente también se recoge la señal de la luz dispersada a 90 grados (right angle scatter), que se lleva mediante espejos a su detector específico y es función de la refractariedad y estructura celular. Existe un detector para la luz dispersada hacia adelante o dispersión frontal de la luz (low angle scatter), que es función del tamaño celular.

- *Instrumentos basados en lámparas de arco como fuente de iluminación:* Emplean una lámpara de mercurio o xenón con objetivos de alta apertura numérica y epiluminación. En algunos casos pueden detectar la dispersión de luz frontal <sup>(39)</sup>.
  - *Ruido de fondo (background):* Se debe eliminar la luz que no sea la emitida o dispersada por las células. Hay que tener en cuenta la llamada luz dispersada de Raman (inelástica) por el agua que pasa de ser de 488 a 529/584 nm y no se puede eliminar por filtros. Para suprimir la luminiscencia de ruido se utilizan un pinhole <sup>(39)</sup>.
- b) Filtros:** Se usan para eliminar y separar la luz recogida. Debe tener: alta transmitancia dentro de su banda de paso; banda de paso



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

limitada y estrecha; baja autofluorescencia; y buena estabilidad y resistencia a la luz.

Los filtros pueden ser de dos tipos:

- **Coloreados o de absorción:** se usan como filtros de paso largo o "long pass", absorben la luz, y
- **De interferencia o dióicos:** reflejan la luz que tiene una longitud de onda superior o inferior a la que dejan pasar. No absorben la luz, sólo la reflejan <sup>(33)</sup>.

c) **Detectores:** Existen dos tipos de detectores de la luz: los fotomultiplicadores y los fotodetectores diodos o de estado-sólido.

- **Fotomultiplicadores (PMT):** se usan para la detección de la señal de fluorescencia y luz dispersada a 90 grados. Tienen una buena relación señal/ruido, aunque su eficiencia cuántica es baja. Hay dos tipos diferentes que se llaman end-on y side-window, la diferencia radica que el side-window tiene mayor rendimiento cuántico para las longitudes de onda que se usan en citometría pero el alineamiento es crítico.
- **Fotodetectores diodos:** se usan para detectar la dispersión frontal de la luz. Son muy resistentes y eficientes (señales fuertes), pero tiene una baja relación señal/ruido lo que los hace poco útiles para señales débiles <sup>(33)</sup>.

d) **Cámaras de flujo:** Son muy diferentes según sea la fuente de iluminación de aparato.

- **Citómetros con fuente de iluminación láser:** Se basan en la cámara de flujo descrita por Crosland-Taylor (enfoque hidrodinámico). Hay dos tipos: las cerradas y las abiertas (detección en "chorro en aire").



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

Las cámaras cerradas consiguen flujos laminares con velocidades de flujo inferiores y producen menos ruido lumínico, en cambio no permiten una fácil eliminación de los coágulos o suciedad.

- *Citómetros con fuente de iluminación de arco*: hay varios sistemas, ya sean abiertos o cerrados. Generalmente los sistemas son más complejos que los de los citómetros basados en la iluminación tipo láser. <sup>(22) (36)</sup>

e) **Sistemas de inyección de la muestra**: Es muy importante que la velocidad sea constante y a su vez la velocidad óptima depende de la aplicación. Existen dos sistemas:

- Por presión, y
- Por inyección isovolumétrica por jeringa (permite velocidades inferiores de flujo y contar las células). <sup>(17)</sup>

f) **Componente electrónico**: Los pulsos detectados por los fotodetectores pasan a un amplificador y después son convertidos de señal analógica a digital (ADC). Se pueden efectuar amplificaciones lineales a 256 canales (8 bits), 1024 canales (10 bits) o bien logarítmicas (3 ó 4 décadas). Existe la posibilidad de seleccionar un umbral de señal (las señales inferiores al umbral son deshechadas). Después del procesamiento informático de la señal se obtienen histogramas mono o biparamétricos <sup>(15)</sup>.

## 1.6.3 Fluorocromos empleados para Citometría de flujo:

Los fluorocromos ofrecen un método sensible para obtener información acerca de la estructura, función y vitalidad de las células. Hay dos procedimientos para la obtención de marcadores fluorescentes empleados en citometría: uno es mediante la unión covalente del fluorocromo a moléculas que se unen específicamente a componentes celulares y,



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

segundo, con fluorocromos que varían sus características en función del microambiente que les rodea. <sup>(39)</sup>

Fluorocromo	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Láser (nm)
Fluoresceína	495	520	488 Argón
Ficoeritrina (R)	564,495	576	488 Argón
Rojo Texas	596	620	568 Kriptón
Alofococianina	650	660	630 Helio-Neón
Tetrametilrodamina	543	570	568 Kriptón
Cumarina	357	460	U.V.
Ioduro de propidio	495,342	639	488 Argón
Bromuro de etidio	493,320	637	488 Argón
Naranja de acridina	503	530 (ADN) 640	488 Argón
Mitramicina	445	569	458 Argón
Cromomicina	430	580	457 Argón
Hoeschst 33342	395	450	U.V.
DAPI	372	456	U.V.
Rodamina 123	485	564	488 Argón
Fura-2	362	515	U.V.
Indo-1	349	480	U.V.

Tabla 1-16.- Longitud de onda de excitación y emisión máxima de algunos fluorocromos usados en citometría de flujo.

El fluorocromo ideal debería tener un alto coeficiente de extinción a la longitud de onda de excitación (probabilidad de absorber la luz), un alto rendimiento cuántico (emisión de luz), una elevada fotoestabilidad y un corto estado de excitación <sup>(39)(20)</sup>.

## a) **Técnicas inmunofluorescentes:**

- *Marcadores fluorescentes de unión covalente:* Son fluorocromos que reaccionan y se usan para marcar proteínas, lípidos, o bien otras moléculas biológicas. Deben ser suficientemente selectivos y reactivos. Se emplean cromóforos con grupos isotiocianato, clorotrizinil y ésteres de succinimida por su elevada capacidad de unión.

El fluorocromo más empleado es isotiocianato de fluoresceína (FITC). Otros que se han descrito y empleado son: rodamina, rojo texas, cianinas (láseres diodos), etc., pero el más famoso es la ficoeritrina



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

(de la familia de las ficobiliproteínas) por su gran absorción, rendimiento y fotoestabilidad; además, puede ser excitado a 488 nm, pero emite más allá del espectro de la fluoresceína, permitiendo el doble análisis con un solo láser.<sup>(39)(14)</sup>

Algunos avances recientes en el campo de los fluorocromos son el uso, en citometría de flujo, de sondas de ADN unidas a fluoresceína, los anticuerpos anti-bromodeoxiuridina para el estudio del ciclo celular, los anticuerpos contra antígenos que aparecen en células en ciclo celular y la unión de anticuerpos a varios fluorocromos (ficoeritrina-rojo texas, ficoeritrina-Cy-3 o Cy-5, ficoeritrina-aloficocianina) de modo que con una láser de 488 nm se excita a la ficoeritrina, la cual emite luz que es captada por el segundo cromóforo, que a su vez emite en una longitud de onda superior y diferente a la de la ficoeritrina (por un fenómeno de transferencia de energía). Ello permite con un solo láser el estudio simultáneo de tres o más antígenos celulares. Recientemente, se ha descrito la posibilidad de investigar, por citometría de flujo, la expresión de antígenos de superficie con anticuerpos marcados con oro coloidal en lugar de fluorocromos.<sup>(8)(11)</sup>

- *Fluorocromos que se unen no covalentemente a estructuras celulares:* Son fluorocromos que debido a su especial composición molecular se unen a determinados componentes celulares, pero no de forma covalente.
  - *Marcadores del contenido en ADN y ARN* según el tipo son más o menos específicos para el ADN, ARN o determinadas bases. Se emplean el Hoescht, DAPI, DIPI, cromomicina A3, olivomicina, mitramicina y otros. El naranja de acridina se une al ADN y ARN, pero tiene la particularidad de emitir en diferente longitud según el tipo de ácido nucleico al que está unido. De uso común es el





# UNIVERSIDAD DE CUENCA

ioduro de propidio que se excita con un láser de 488 nm y que se une al ADN por intercalación entre la doble cadena de bases.

- *Marcadores del potencial de membrana* son las cianinas y la rodamina123. También son usados para marcar mitocondrias debido a la alta diferencia de potencial de su membrana.<sup>(16)(30)</sup>
- *Marcadores de membrana y lípidos y marcadores que diferencian compartimentos con distinto pH.* Son poco usados en citometría de flujo.
- *Marcadores fluorescentes que son sensibles al microambiente que les rodea:* Ciertos fluorocromos pueden ser empleados para estimar las propiedades del ambiente en el que se encuentran puesto que varían su espectro de absorción o emisión en función de las características del microambiente que les rodea. Se emplean para la determinación de diversos estados funcionales celulares: pH (6-carboxi-fluoresceína, 2,3-diciano-1,4-dihidroxi-benceno, hidroxipireno trisulfato), calcio (quin II, fura-2, indo-1), potencial redox (diclorofluoresceína, NADH, NADHP), actividad enzimática (substratos que por acción del enzima varían su fluorescencia o espectro), polaridad (anilino-naftalina-sulfato o ANS) y viscosidad/fluidez.<sup>(6)(13)(14)</sup>

## **1.6.4 Estudio del contenido en ADN y fases del ciclo celular por Citometría de Flujo.**

La medición del ADN ha sido una de las primeras y más empleadas aplicaciones de la citometría de flujo. Las células con alteraciones en el contenido de ADN frecuentemente pueden ser detectadas por citometría de flujo. El análisis del contenido en ADN y de las fases del ciclo celular es útil para el estudio de la biología celular y han demostrado tener una relación diagnóstica y pronóstica en determinadas patologías. Se dispone de muchos fluorocromos que se unen específicamente a las bases del ADN. La señal



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

fluorescente es proporcional a la unión del fluorocromo al ácido nucleico que es de tipo estequiométrico.

Los fluorocromos que se usan para la cuantificación de ADN por citometría de flujo se clasifican en función de su mecanismo de unión. Los intercalantes, como el bromuro de etidio, yoduro de propidio y naranja de acridina, se unen al material genético de doble cadena intercalándose entre las dos bases; los de unión preferente a las bases adenina-timina, como DAPI, DIPI y Hoescht y; por último, los de unión preferente a las bases citosina-guanina, como la mitramicina, olivomicina, y cromomicina A3.<sup>(20)</sup>

- a) **Estudio de la aneuploidía y del ciclo celular:** En el ciclo celular se distinguen varias fases: la fase de reposo (G<sub>0</sub>), fase de síntesis proteica (G<sub>1a</sub>), síntesis de ARN (G<sub>1b</sub>), síntesis de material genético o ADN (fase S), de nuevo síntesis de proteínas (G<sub>2</sub>) y, por último, división celular (M). Según el tipo y función de la célula, ésta tiene más o menos actividad proliferativa y el ciclo puede variar según diversas condiciones: fármacos, radiaciones, etc.
  
- b) **Técnicas para medir la síntesis de ADN:** Estudio del ciclo celular la intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de fluorocromo que es proporcional a la cantidad de ADN de la célula. Hay cierta variación entre el resultado teórico y el obtenido debido a la variación biológica en la tinción y en la lectura, por ello, se define el coeficiente de variación (CV) que nos da una idea de la semejanza de los resultados obtenidos a la realidad y que hace necesario el empleo de programas informáticos para discriminar correctamente el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular.<sup>(7)(38)</sup>
  
- c) **Detección de aneuploidía:** el término aneuploidía por citometría de flujo, significa la presencia de una población con un contenido en ADN diferente a un control de células semejantes y en igual fase del ciclo celular. El término de aneuploidía citométrica no es semejante al de



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

aneuploidía citogenética y la ausencia de aneuploidía por citometría de flujo no excluye la presencia de alteraciones citogenéticas que no conlleven a un aumento de la cantidad total de ADN (translocaciones balanceadas, etc.).<sup>(20)</sup>

Se define como Índice de ADN (ID) al cociente entre la moda del pico G0/G1 de la población problema y la moda del pico G0/G1 del control (en %). A partir de ahí, se define la siguiente terminología: diploide si ID igual 1, aneuploide si ID diferente de 1, hiperploide si ID superior a 1, hipoploide si ID inferior a 1, poliploide si ID es igual a 1.5, 2, 2.5, etc. Y haploide si ID es igual a 0.5.<sup>(12)</sup>

Un problema importante en la lectura de algunas muestras es la discriminación de dobletes que interfieren y aumentan, la fase de mitosis. La solución se debe buscar en el procedimiento técnico, en criterios de estandarización y en soluciones citométricas del análisis de la señal.

Se define como criterio de aneuploidía la presencia de dos picos en canales diferentes de fluorescencia con dos poblaciones en la muestra. Se acepta que el coeficiente de variación de la población aneuploide suele ser mayor que la diploide, de modo, que si se obtiene un histograma con dos picos y desconocemos cuál de ellos es el diploide se aceptará que se está ante la presencia de una población hiperploide o se escogerá como aneuploide el pico con un mayor coeficiente de variación. Ante un histograma dudoso se puede buscar la presencia de células en la región de G2M de la población problema dudosamente aneuploide, la existencia de proporcionalidad entre las fases de los ciclos celulares o comprobar la existencia de aneuploidía con diferentes técnicas.

Con una buena técnica y el citómetro en condiciones óptimas se pueden conseguir coeficientes de variación que permitan separar



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

grupos de células con índices de ADN de 0,95 a 1,05; en su defecto al menos de 0,9 a 1,1, aunque, generalmente, se obtienen mejores histogramas con muestras frescas que parafinadas. <sup>(28)(29)(40)</sup>

- d) **Estudio de la proliferación celular:** En el ciclo celular se distinguen varias fases: la fase de reposo (G0), fase de síntesis de proteínas y ARN (G1), fase de síntesis de material genético (fase S), nueva fase de síntesis de proteínas y preparación a la división (fase G2) y, por último, división celular (fase M).

Según el tipo y función de la célula, ésta tiene más o menos actividad y proliferación. Para el estudio de la proliferación celular se pueden emplear métodos morfológicos o inmunológicos.

No todos los anticuerpos miden el mismo componente del ciclo celular, sino que varía según el anticuerpo empleado y el antígeno contra el cual van dirigidos. Generalmente, las técnicas inmunocitoquímicas van a ofrecer información estática acerca del estado de proliferación de las células tumorales o no tumorales, pero no proporcionan información de la velocidad a que tiene lugar el ciclo celular y por lo tanto de la velocidad de proliferación. <sup>(29)</sup>



## CAPITULO II

### 2. METODOLOGÍA

#### 2.1 Tipo de estudio:

Descriptivo, transversal.

#### 2.2 Universo de la muestra:

El universo estuvo constituido por 69 productos de aborto, hasta de 20 semanas de gestación procedentes del Hospital Vicente Corral Moscoso y del Instituto del Cáncer "SOLCA CUENCA".

#### 2.3 Área de estudio:

El estudio se llevó a cabo en el Instituto del Cáncer "SOLCA-CUENCA". Servicio de Hematología en el Laboratorio de Citometría de Flujo.

#### 2.4 Método, Técnica e instrumentos:

El método de estudio fue científico, la técnica, la observación directa y como instrumentos se empleó la base de datos diseñada en Microsoft Excel versión 2007.

#### 2.5 Variables de estudio:



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

## a) Variable Dependiente:

- Ploidía

## b) Variable Independiente:

- Edad
- Semanas de gestación

## 2.6 Operacionalización de variables: (Anexo 1)

## 2.7 Plan de tabulación y análisis:

Los valores obtenidos del análisis en el software Modfit, fueron ingresados en una base datos elaborada y diseñada en Microsoft Excel versión 2007, para su revisión y clasificación. El análisis de datos se empleó el programa SPSS versión 15.0, para su estudio estadístico, se utilizó medidas de frecuencia absoluta y relativa (principalmente porcentaje).

Para la determinación de asociación se utilizó el Chi cuadrado con un nivel de confianza del 95%.

## 2.8 Procedimiento

- a) Autorización de la institución para la utilización de la información, materiales e infraestructura.
- b) Elaboración de ficha para la recolección de datos.
- c) Recolección de las muestras en solución buffer.
- d) *Disgregación de material fresco (células)*: cuando el tejido es sólido se emplean métodos mecánicos o enzimáticos basados en tripsina, proteasas, colagenasas, hialuronidasas, DNAasa o cocktails de ellas. Todos estos procedimientos tienen limitaciones (alteración de las



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

características celulares o antígenos de membrana) y varía su efectividad según el tipo de tejido. En el presente estudio se realizó una disgregación mecánica de la muestra. (Anexo 2).

- e) Con una pipeta Pasteur se recoge la suspensión celular y se coloca en un tubo falcon.
- f) *Como marcadores del contenido en ADN y RNA de uso común es el yoduro de propidio que se excita con un láser de 488 nm y que se une al ADN por intercalación entre la doble cadena de bases, con un tiempo de incubación de 4h a una temperatura de 4°C en ausencia de luz. (anexo 3).*
- g) Para la calibración del equipo y control de calidad se empleo el kit DNA QC BECTON DICKINSON (ref:349523).
- h) Se homogenizo y se adiciono el control diploide y se realiza la adquisición de la misma en el Citómetro de flujo FacsCalibur (Anexo 4).
- i) Interpretación de resultados obtenidos se analizó con el software Modfit LT. (Anexo 5).
- j) Se ingresó la información en la base de datos para elaboración y análisis de los mismos.



## CAPITULO III

### 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

#### 3.1

Glosario de la Tabla de Resultados:	
SG y Tipo de aborto:	Semanas gestación y aborto temprano o tardío
G <sub>0</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> , S, M:	Fases del ciclo celular diploidea y aneuploidea
CV:	Coefficiente de variación diploidea y aneuploidea

#### 3.2 Validación de Resultados:

##### a) Edad:

- 1: ≤ 18 años.
- 2: 19 a 34 años.
- 3: ≥ a 35 años.

##### b) Semanas de Gestación:

- 1: 0 a 11 semanas ABORTO TEMPRANO
- 2: 12 a 22 semanas ABORTO TARDIO

##### c) Contenido de ADN:

- 1: Diploide
- 2: Aneuploide

##### d) Índice de DNA aneuploide:

- 1: DI < 1,5 hiperdiploide
- 2: DI > 1,5 Triploide
- 3: DI > 2 tetraploide
- 4: DI < 1 Hipodiploide





# UNIVERSIDAD DE CUENCA

## 3.3 Tabla de Resultados

Tabla 1: Obtenida del estudio de 69 productos de abortos.

CODIGO	EDAD	SG y tipo de aborto	CONTENIDO DE ADN	DIPLOIDE %	G0-G1 (%)	G2 (%)	S (%)	C.V (%)	INDICE DE DNA DIPLOIDE	ANEUPLOIDE (%)	G0-G1 (%)	G2 (%)	S (%)	C.V (%)	Indice de DNA ANEUPLOIDE
PLO1	1	2	1	100	96	0	4	7	1	0	92	0	0	0	0,00
PLO2	3	1	2	22	71	0	29	3	1	78	92	0	8	5	1,366
PLO3	2	2	1	100	96	0	4	4	1	0	98	0	0	0	0,00
PLO4	2	1	1	100	100	0	0	5	1	0	52	0	0	0	0,00
PLO5	3	1	1	100	92	1	8	8	1	0	100	0	0	0	0,00
PLO6	2	1	1	100	93	0	7	8	1	0	94	0	0	0	0,00
PLO7	2	1	1	100	94	1	5	4	1	0	33	0	0	0	0,00
PLO8	2	2	1	100	92	1	7	4	1	0	80	0	0	0	0,00
PLO9	2	1	1	100	87	0	13	8	1	0	100	0	0	0	0,00
PLO10	2	2	1	100	21	0	79	2	1	0	75	0	0	0	0,00
PLO11	1	1	1	100	9	12	79	3	1	0	95	0	0	0	0,00
PLO12	2	1	1	100	80	0	20	7	1	0	79	0	0	0	0,00
PLO13	2	1	2	85	97	3	0	4	1	15	97	3	0	4	1,91
PLO14	1	1	1	100	84	0	16	7	1	0	89	0	0	0	0,00
PLO15	2	1	1	100	95	2	3	6	1	0	79	0	0	0	0,00
PLO16	2	2	1	100	52	0	48	2	1	0	90	0	0	0	0,00
PLO17	2	1	1	100	92	1	7	3	1	0	64	0	0	0	0,00
PLO18	3	1	2	0	0	100	0	10	1	100	98	0	2	6	1,52
PLO19	2	1	1	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00
PLO20	2	1	1	100	4	27	69	2	1	0	0	0	0	0	0,00
PLO21	2	1	1	100	86	0	14	6	1	0	0	0	0	0	0,00
PLO22	2	2	1	100	92	1	7	7	1	0	0	0	0	0	0,00
PLO23	3	1	2	77	11	8	81	1	1	23	52	0	48	7	2,15
PLO24	2	2	1	100	95	1	4	6	1	0	0	0	0	0	0,00
PLO25	2	2	1	100	100	0	0	5	1	0	0	0	0	0	0,00
PLO26	2	1	1	100	96	1	3	6	1	0	0	0	0	0	0,00
PLO27	2	2	1	100	97	0	3	7	1	0	0	0	0	0	0,00
PLO28	3	1	1	100	73	0	27	5	1	0	0	0	0	0	0,00
PLO29	2	1	1	100	93	1	6	5	1	0	0	0	0	0	0,00
PLO30	2	1	1	100	92	0	8	7	1	0	0	0	0	0	0,00
PLO31	2	1	1	100	93	1	6	5	1	0	0	0	0	0	0,00
PLO32	3	1	2	20	87	13	0	4	1	44	100	0	0	5	1,14
PL033	2	2	1	100	95	1	4	5	1	0	0	0	0	0	0,00
PL034	3	1	1	100	93	0	7	5	1	0	0	0	0	0	0,00
PL035	2	1	1	100	92	0	8	5	1	0	0	0	0	0	0,00
PL036	2	2	1	100	12	5	83	2	1	0	0	0	0	0	0,00
PL037	2	1	2	9	91	9	0	1	1	91	33	0	67	10	1,20
PL038	2	1	1	100	97	3	0	4	1	0	0	0	0	0	0,00
PL039	2	1	1	100	95	1	4	8	1	0	0	0	0	0	0,00
PL040	2	1	1	100	48	0	52	4	1	0	0	0	0	0	0,00
PL041	2	1	1	100	52	0	48	12	1	0	0	0	0	0	0,00
PL042	2	2	1	100	97	0	3	5	1	0	0	0	0	0	0,00
PL043	3	1	2	73	16	8	76	1	1	27	80	0	20	4	1,84
PL044	2	1	1	100	97	0	3	5	1	0	0	0	0	0	0,00
PL045	2	2	1	100	76	0	24	4	1	0	0	0	0	0	0,00
PL046	2	1	1	100	93	3	4	5	1	0	0	0	0	0	0,00
PL047	2	1	1	100	100	0	0	6	1	0	0	0	0	0	0,00
PL048	2	1	2	84	19	0	81	2	1	16	100	0	0	4	2,21
PL049	2	2	1	100	92	0	8	4	1	0	0	0	0	0	0,00
PL050	2	1	1	100	93	1	6	5	1	0	0	0	0	0	0,00
PL051	3	1	2	80	97	0	3	5	1	20	75	10	15	10	1,37
PL052	2	2	1	100	100	0	0	6	1	0	0	0	0	0	0,00
PL053	2	1	1	100	25	0	75	4	1	0	0	0	0	0	0,00
PL054	3	1	2	18	50	0	50	2	1	82	95	0	5	9	1,29
PL055	2	1	1	100	45	0	55	7	1	0	0	0	0	0	0,00
PL056	2	1	1	100	88	0	12	3	1	0	0	0	0	0	0,00
PL057	3	1	2	13	100	0	0	1	1	87	79	1	20	3	1,20
PL058	2	1	1	100	91	0	9	4	1	0	0	0	0	0	0,00
PL059	3	1	2	41	17	0	83	2	1	59	94	0	6	8	1,41
PL060	3	1	2	70	100	0	0	2	1	30	89	2	9	4	1,27
PL061	2	2	1	100	77	0	23	7	1	0	0	0	0	0	0,00
PL062	2	1	1	100	8	25	67	3	1	0	0	0	0	0	0,00
PL063	3	1	2	85	98	2	0	8	1	15	79	8	13	33	0,95
PL064	3	1	2	59	100	0	0	6	1	41	90	2	8	6	1,15
PL065	2	1	1	100	78	1	21	4	1	0	0	0	0	0	0,00
PL066	2	2	1	100	94	1	5	6	1	0	0	0	0	0	0,00
PL067	2	1	1	100	94	0	6	2	1	0	0	0	0	0	0,00
PL068	3	1	2	85	67	8	25	3	1	15	64	5	31	5	1,90
PL069	3	1	1	100	94	0	6	6	1	0	0	0	0	0	0,00

Fuente: Laboratorio de Citometría de flujo SOLCA-Cuenca



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

Base datos elaborada por Pablo Farfán

## 3.4 ESTUDIO ESTADÍSTICO Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

**Tabla 2.** En base a la tabla 1 se estableció la Frecuencia de Edad por rangos.

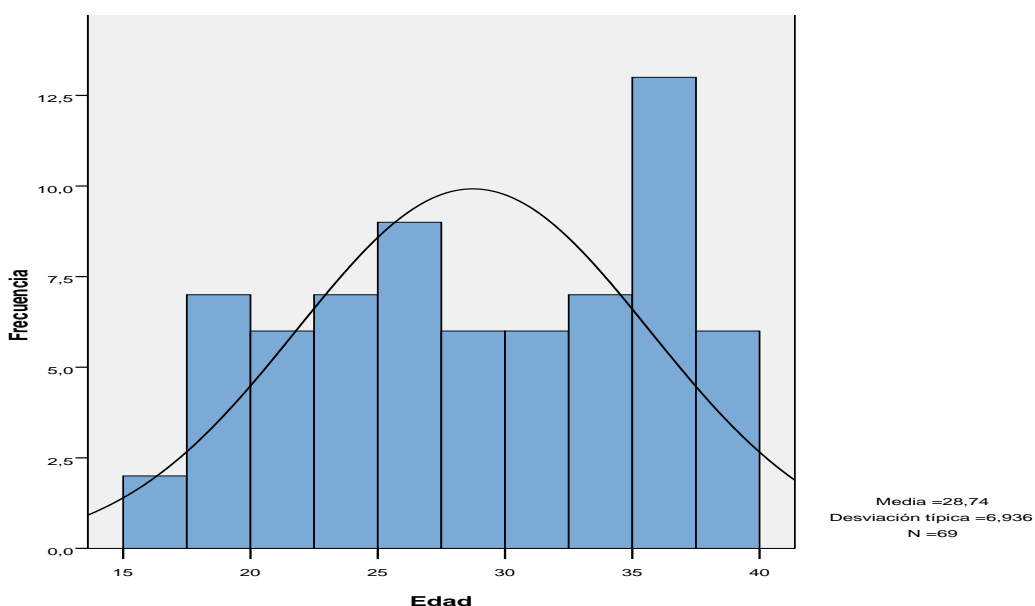
	Frecuencia n=69	%
≤ a 18 años	3	4,3
19 a 34 años	49	71,0
≥ a 35 años	17	24,6
<b>Total</b>	<b>69</b>	<b>100,0</b>

Fuente: Laboratorio de Citometría de flujo SOLCA-Cuenca  
Base datos elaborada por Pablo Farfán

El factor edad es determinante en el resultado del embarazo porque del 85% al 90% de los embarazos en mujeres entre 20 y 30 años evolucionan en forma normal. La frecuencia de nacidos vivos disminuye en forma progresiva después de los 33 a 35 años, para llegar a un 70% después de los 40 años de edad. <sup>(41)</sup>

De los 69 casos estudiados 3 casos corresponden a una edad menor o igual a 18 años, 49 casos se encuentran en una edad comprendida entre los 19 a los 34 años y 17 casos corresponden a mayores de 35 años.

### Grafico 1. Representación de la frecuencia de edad. (Datos Tabla1)



Fuente: Laboratorio de Citometría de flujo SOLCA-Cuenca



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

Base datos elaborada por Pablo Farfán

Se estudiaron 69 pacientes, con una edad comprendida entre los 15 a 40 años. La media de la edad es de 28,74 años, con una desviación estándar de 6,936

**Tabla 3. Determinación del contenido de ADN. (Tabla 1)**

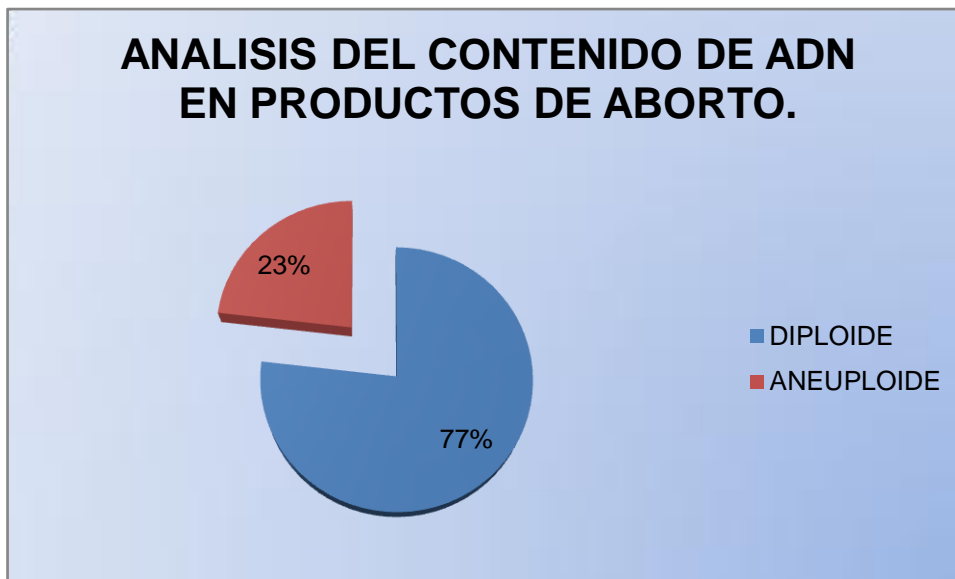
	Frecuencia n=69	%
<b>Diploide</b>	52	76,8
<b>Aneuploide</b>	17	23,2
<b>Total</b>	69	100,0

Fuente: Laboratorio de Citometría de flujo SOLCA-Cuenca  
Base datos elaborada por Pablo Farfán

En la tabla 3 se puede distinguir que 53 casos son Diploides, mientras que 17 casos son aneuploides.

Se calcula que un 20-30% de las gestaciones humanas terminan en aborto espontáneo y de estos entre un 60% a un 70% de los abortos espontáneos producidos durante el primer trimestre del embarazo, son consecuencia de defectos genéticos o deficiencias cromosómicas que interfieren en la vitalidad fetal<sup>(41)</sup>. En este estudio se encuentra que el 23% de los abortos de deben a falla genética.

**Grafico 2. Representación del Contenido de ADN expresado en porcentaje de acuerdo a tabla 3**



*Fuente: Laboratorio de Citometría de flujo SOLCA-Cuenca  
Base datos elaborada por Pablo Farfán*

En el gráfico 2 se puede observar, que de los 69 casos que corresponden al 100% de la población analizada, el 77% son Diploides, mientras que el 23% son aneuploides.

**Tabla 4. Frecuencia de aborto en relación a las Semanas de Gestación. (Tabla 1)**

	<b>Frecuencia n=69</b>	<b>%</b>
<b>0 a 11 semanas (Aborto Temprano)</b>	52	75,4
<b>12 a 20 semanas (Aborto Tardío)</b>	17	24,60
<b>TOTAL</b>	69	100

*Fuente: Laboratorio de Citometría de flujo SOLCA-Cuenca  
Base datos elaborada por Pablo Farfán*

La organización mundial de la salud define como aborto la expulsión o extracción de su madre del embrión o feto con una edad gestacional hasta de 22 semanas y lo clasifica como aborto temprano al que ocurre antes de la semana 12 y aborto tardío el que se da entre las 12 y 22 semanas.

De los datos analizados en la tabla 4 se establece que 52 casos corresponden a abortos tempranos y 17 casos son abortos tardíos.



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

**Tabla 5. Frecuencia del Contenido de DNA en la población (tabla 1).**

	Frecuencia n=69	%
<b>Hiperdiploide</b>	9	13,0
<b>Triploide</b>	4	5,8
<b>Tetraploide</b>	2	2,9
<b>Hipodiploide</b>	2	2,9
<b>Diploide</b>	52	75,4
<b>Total</b>	69	100,0

Fuente: Laboratorio de Citometría de flujo SOLCA-Cuenca  
Base datos elaborada por Pablo Farfán

Se define como índice de DNA al cociente entre la moda del pico G0/G1 de la población problema y la moda G0/G1 del control (%), de ahí, se define diploide si el ID=1; Aneuploide si ID  $\neq$  1; Hiperdiploide si ID > 1; Hipodiploide si ID < 1 y Ploidiploide si ID = 2; 2,5.

De los 69 casos analizados según el índice de DNA, 9 son hiperdiploides, 2 son hipodiploides, 6 son polidiploides y 52 son diploides. Las aneuploidias son las más comunes y resultan de una falta de separación cromosómica durante la meiosis. Las poliploidias se producen generalmente por la fecundación del óvulo con un cromosoma haploide normal por dos espermatozoides también normales (dispermia).<sup>(16)</sup>

**Tabla 6. Contenido de DNA vs Edad**

	frecuencia diploide	% diploide	frecuencia aneuploide	% aneuploide	Frecuencia n=69	%
<b>≤18 años</b>	3	100%	0	0	3	100%
<b>De 19 a 34 años</b>	46	93.9%	3	6.10%	49	100%
<b>≥ 35 años</b>	4	23.50%	13	76.50	17	100%
<b>Total</b>	23	76.80	16	23.20	69	100%

Fuente: Laboratorio de Citometría de flujo SOLCA-Cuenca  
Base datos elaborada por Pablo Farfán

Las mujeres cuya edad supera los 35 años presentan una mayor incidencia de aborto por anomalías genéticas (25%). De 69 casos estudiados, 17 de



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

ellos corresponden a pacientes con una edad igual o mayor a 35 años, de estos 13 casos son aneuploides. No existe asociación estadísticamente significativa entre el contenido de DNA y la edad de las pacientes, esto puede deberse al tamaño de la muestra por lo que se aconseja aumentar la población de estudio.



**Tabla 7. Contenido de DNA vs Semanas de gestación**

	frecuencia diploide	% diploide	frecuencia aneuploide	% aneuploide	total	*p≤0,05
<b>0 a 11 semanas (aborto temprano)</b>	36	69,2%	16	30,8%	52	
<b>12 a 20 semanas (aborto tardío)</b>	17	100%	0	0	17	
<b>TOTAL</b>	53		16		69	

*\*p: calculado con Chi cuadrado de Pearson*

*Fuente: Laboratorio de Citometría de flujo SOLCA-Cuenca  
Base datos elaborada por Pablo Farfán*

Entre los abortos que ocurren antes de las 12 semanas de gestación se encuentran anomalías cromosómicas en 50-60% de los casos; En abortos espontáneos tardíos (mayores de 12 semanas de gestación), la incidencia relativa de las anormalidades cromosómicas disminuye a aproximadamente 5%. En el presente estudio 52 casos corresponden a abortos tempranos, de los cuales 36 son diploides y 16 son aneuploides que representa el 31%. Mientras que 17 corresponden a abortos tardíos, siendo todos diploides. Existe asociación estadísticamente significativa entre el contenido de DNA y las semanas de gestación. ( $p \leq 0,05$ )



## CAPITULO IV

### 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1 CONCLUSIONES

Luego de realizado el presente estudio en 69 productos de aborto espontáneo por técnicas de Citometría de Flujo, procedentes del Hospital Vicente Corral Moscoso y del Instituto del Cáncer SOLCA CUENCA se llegó a las siguientes conclusiones:

- El rango de edad mayoritario en la población analizada se encuentra entre 19 a 34 años con una edad media de 28 años.
- La población que presenta alteración en contenido de ADN “aneuploidía”, corresponde a 16 casos que representa el 23% del universo total estudiado.
- La frecuencia de abortos tempranos (75%) es mayor en comparación con los abortos tardíos (25%).
- En la población aneuploide analizada con  $ID < 1,5$  se encontró 11 casos que podrían estar relacionados con una falta de separación cromosómica durante la meiosis y 6 casos, que corresponde a triploidías y tetraploidías que pueden estar relacionarse con dispermía, además todos los casos de triploidias y tetraploidías se presentaron en abortos tempranos.





# UNIVERSIDAD DE CUENCA

- Las mujeres en estado de embarazo, con una edad mayor a 35 años presentan una mayor posibilidad de aborto espontáneo por alteraciones en el contenido de ADN, a pesar de no existir una asociación estadística significativa, probablemente por el tamaño de la muestra.
- Los abortos tempranos están relacionados con anomalías genéticas y se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el contenido de ADN y semanas de gestación.
- La ploidía de ADN en productos de aborto es un factor predictivo de alteraciones en el contenido de ADN.

## 4.2 Recomendaciones.

- Se recomienda a las mujeres mayores a 35 años o mujeres con abortos espontáneos recurrentes realizarse un estudio de ploidía con el fin de descartar que la pérdida fetal se deba a problemas genéticos.
- Si la causa del aborto es consecuencia de una falla genética, es necesario que la pareja se realice un estudio citogenético con el fin de encontrar el origen del problema o busque consejería genética.
- Ampliar el universo del presente estudio y correlacionar con un estudio citogenético.

## GLOSARIO.



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- Apaf:** Factor promotor de apoptosis.
- APC:** Complejo promotor de anafase.
- ARN:** Ácido ribonucleico
- cdc:** Ciclo de división celular.
- Cdk:** Cinasa dependiente de ciclina.
- CIP:** Proteínas inhibidoras de cdk's.
- CV:** Coeficiente de variación.
- E2F:** Factor de transcripción.
- FAK:** Cinasa de adhesión focal.
- FITC:** Isotiocianato de fluoresceína.
- FL:** Fluorescencia.
- G0:** Fase de reposo
- G1:** Fase de síntesis de proteínas y ARN
- G2:** Fase de síntesis de proteínas.
- GTP:** Guanosín Trifosfato
- GDP:** Guanosín Difosfato
- ID:** Índice de ADN
- INK4:** Inhibidores de cinasa 4.
- M:** Fase de división celular.
- MAPK:** Cinasas activadas por mitógenos.
- Mdm2:** Proteína que funciona como marcador para P53.
- MPF:** Factor promotor de mitosis.
- ORC:** Complejo de reconocimiento del origen.
- PFR:** Pérdida fetal recurrente.
- PMT:** Fotomultiplicadores.
- Rb:** Proteína del retinoblastoma.
- S:** Fase de síntesis del material genético.



## BIBLIOGRAFIA.

1. Alberts, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter. "Molecular Biology of the Cell". 4a edición. Garland Science, 2002.
2. Carter, N.P., Meyer, E.W.: "Introduction to the principles of flow cytometry". En: Flow Cytometry, a practical approach. Editor: Ormerod, M.G.: IRL Press, Oxford University Press, Oxford, 1990.
3. Cooper, Geoffrey M. Cooper "The Cell a Molecular Approach" 2a ed, Sinauer, 2000.
4. Curtis, Barnes, Schenek, Massarini. : "CURTIS BIOLOGÍA" 7a ed, Buenos Aires. Argentina 2008; 2:137-146.
5. Clevenger, C.V., Bauer, K.A., Epstein, A.L.: A method for simultaneous nuclear immunofluorescence and ADN content quantitation using monoclonal antibodies and flow cytometry. Cytometry, 1985; 6:208-214.
6. Delia, D., Martínez, E., Fontanella, E., Aiello, A.: Two and three-color immunofluorescence using aminocumarin, fluorescein, and phycoerythrin-labeled antibodies and single laser flow cytometry. Cytometry, 1991; 12:537-544.
7. Dufour, M., Bertrand, L., Bolton, W.E., Laquerre, S., Lagacé, L., Chafouleas, J.G.: Flow cytometric analysis of the distribution of proliferating cell nuclear antigen during quiescence and cell cycle. Genome, 1988; 30:189.
8. Duz, R., Kindler-Röhrborn, A., Lennartz, R., Ratewsky, M.F.: Calibration of fluorescence intensity to quantify antibody binding



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

surface determinants of cell subpopulations by flow cytometry. *Cytometry*, 1990; 12:422-428.

9. Drugan A, Koppitch FC, Williams JC, Johnson MP, MoghissiKS, Evans MI. "Prenatal genetic diagnosis following recurrentearly pregnancy loss". *Obstet Gynecol* 1990; 75(3 Pt1):214-27.
10. Gilbert, Scott F. "Developmental Biology" 7a ed. Sinauer, 2003.
11. Gratzner, H.G., Leif, R.C.: An immunofluorescence method for monitoring DNA synthesis by flow cytometry. *Cytometry*, 1981; 1:385-389.
12. Gray, J.W., Dolbeare, F., Pallavicini, M.B.: Quantitative cell-cycle analysis. En: *FlowCytometry and Sorting*. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L.: Wiley-Liss, 1991.
13. Greimers, R., Rongy, A.M., Schaaf-Lafontaine, N., Bonivar, J.: CUBIC: a three dimensional colored projection of Consort 30 generated trivariate flow cytometry data. *Cytometry*, 1991; 12:570-578.
14. Hiebert, R.D.: Electronics and signal processing. In: *Flow Cytometry and Sorting*. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L.: Wiley-Liss, 1991.
15. Horan, P.K., Muirhead, K.A., Slezak, S.E.: Standards and controls in flow cytometry. En: *Flow Cytometry and Sorting*. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L.: Wiley-Liss, 1991.
16. Jacobberger, J.W., Foglemen, D., Lehman, J.M.: Analysis on intracellular antigens by flow cytometry. *Cytometry*, 1986; 7:356-364.



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

17. Kachel, V., Fellner-Feldegg, H., Menke, E.: Hydrodynamic properties of flow cytometry instruments. En: Flow Cytometry and Sorting. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L.: Wiley-Liss, 1991.
18. Laerum, O.D., Farsuna, T.: Clinical application of flow cytometry: a review. Cytometry, 1981; 2:1-13.
19. Langlois, R.G.: DNA stains as cytochemical probes for chromosomes. En: Analytical Flow Cytology Series. Flow Cytogenetics. Editor: Gray, J.W. Academic Press, Londres, 1989.
20. Larsen, J.K., Christensen, I.J., Christiansen, J., Mortensen, B.T.: Washless double staining of unfixed nuclei for flow cytometric analysis of DNA and a nuclear antigen (Ki-67 or bromodeoxyuridine). Cytometry, 1991; 12:429-437.
21. Linden, M.D.: Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessment of cell proliferation. Am J clin Pathol, 1992; 97; s4-s13.
22. Lindomo, T, Peters, D.C., Sweet, R.G.: Flow sorters for biological cells. En: Flow Cytometry and Sorting. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L.: Wiley-Liss, 1991.
23. Lodish, Harvey; Berk, Arnold; Zipursky, S. Lawrence; Matsudaira, Paul; Baltimore, David; Darnell, James E. "Molecular Cell Biology", WH Freeman and Company, 2000.
24. Lodish, Berk, Zipursky, Matsudaira, Baltimore, Darnell, "BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR" 4ta ed panamericana, 2002



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

25. Melamed, M.R., Mullaney, P.F., Shapiro, H.M.: An historical review of the development of flow cytometers and sorters. En: Flow Cytometry and Sorting. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L.: Wiley-Liss, 1991.
26. Miller JF Williamson E, Glue J, Gordon Y, Grudzinskas J, Sykes A. "Fetal loss after implantation". Lancet 1980; 2(8194):554-6.
27. Nelson, D. L., Cox, M. M., Lehninger. Principios de bioquímica. 3ª edición (e ediciones anteriores de Lehninger). Ed. Omega. 2001.
28. Ormerod, M.G.: Analysis of DNA: 4A. General methods. En: Flow Cytometry, a practical approach. Editor: Ormerod, M.G.: IRL Press, Oxford University Press, Oxford, 1990.
29. Rabinovitch, P.S.: Multicycle. A program for DNA content and cell cycle analysis. Phoenix Flow Systems, San Diego, 1991.
30. Rabinovitch, R., June, C.H.: Measurement of intracellular ionized and membrane potential. En: Flow Cytometry and Sorting. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L.: Wiley-Liss,
31. Remohi J, Gallardo E, Levy M, Valbuena D, de los Santos MJ, Simon C, Pellicer A. "Oocyte donation in women with recurrent pregnancy loss". Hum Reprod 1996; 11(9):2048-51.
32. Roberto Votta; Osvaldo Parada. "Compendio de Obstetricia" ed. Prensa medica Argentina 2003.
33. Salzman, G.C., Singham, S.B., Johnston, R.G., Bohren, C.F.: Light scattering and cytometry. En: Flow Cytometry and Sorting. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L.: Wiley-Liss, 1991.



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

34. Shackney, S.E., Burholt, D.R., Pollice, A.A., Smith, C.A., Pugh, R.P., Hartsock, R.J. "Discrepancies between flow cytometric and cytogenetic studies in the detection of aneuploidy in human solid tumors. *Cytometry*, 1990; 11:94-104.
35. Sharpe, P.T.: Methods of cell separation. En: *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Editores: Burdon, R.H., van Knippenberg, P.H.: Elsevier, Amsterdam, 1988.
36. Steen, H.B.: Characteristics of flow cytometers. En: *Flow Cytometry and Sorting*. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L.: Wiley-Liss, 1991.
37. Stein Z, Kline J, Susser E, ShROUT-Pwarburton D, Susser M. "Maternal age and spontaneous abortion". In: Porter IH, Hook EB, editors. *Human embryonic and fetal death*. New York: Academic Press, 1980.
38. Vitale, M., Manzoli, L., Maraldi, N.M., Papa, S.: Chromosome karyotyping in flow. En: *Reunión Internacional de Citometría. Libro de Ponencias y Comunicaciones*. Salamanca, 1990.
39. Waggoner, A.S.: Fluorescent probes for cytometry. En: *Flow Cytometry and Sorting*. Editores: Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L.: Wiley-Liss, 1991.
40. Wersto, R.P., Liblit, R.L., Koss, L.G.: Flow cytometric DNA analysis of human solid tumors: a review of the interpretation of DNA histograms. *Hum Pathol*, 1991; 22:1085-1098.
41. Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor J. "Incidence of early loss of pregnancy". *N Engl J Med* 1988; 319(4):189-94.



# UNIVERSIDAD DE CUENCA





## ANEXOS.

Anexo 1.

### VARIABLES E INDICADORES

<b>Variable Dependiente</b>	<b>Concepto</b>	<b>Dimensión</b>	<b>Indicador</b>	<b>Escala</b>
Ploidía	Contenido de ADN que posee una célula	Diploide	Indice de DNA=1 (46 cromosomas)	Si o No
		Aneuploide	Indice de DNA $\neq$ 1 ( $\neq$ 46 cromosomas)	Si o No

<b>Variable Independiente</b>	<b>Concepto</b>	<b>Dimensión</b>	<b>Indicador</b>	<b>Escala</b>
Edad	Tiempo en que la persona ha vivido desde que nació hasta el estudio	Tiempo en años	# en años	
Semanas de gestación	Tiempo transcurrido desde que se ha producido la concepción	Tiempo en semanas	# en semanas	

## Anexo 2.

Formación de una suspensión celular.



## Anexo 3.

Marcaje con Ioduro de propidio.





# UNIVERSIDAD DE CUENCA

Anexo 4.

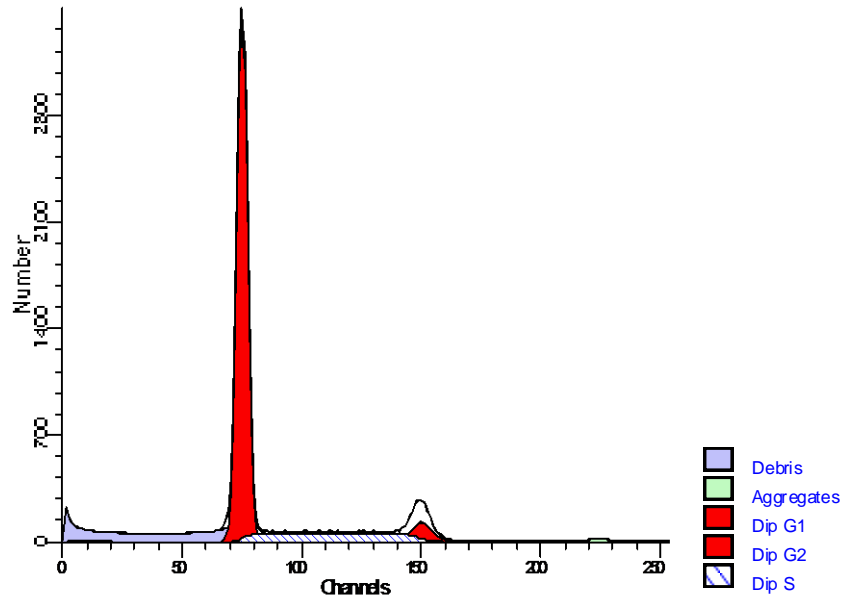
Adquisición y Análisis.





## Anexo 5.

Análisis en software Modfit LT.

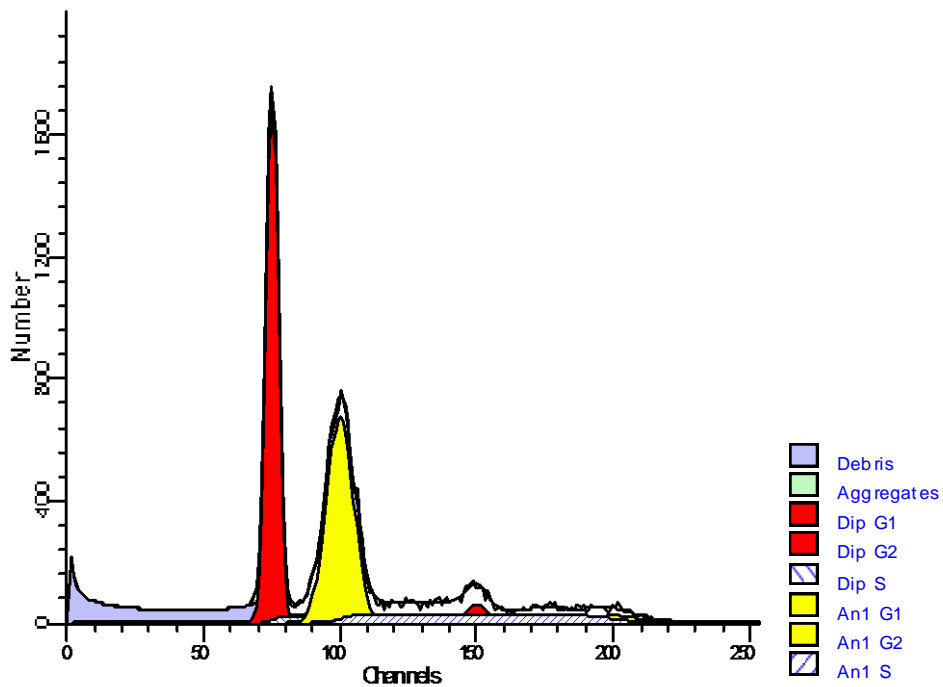


Date analyzed: 2-March-2011  
Model: 1DA0n\_DSD aborto 12  
Ploidy Mode: First cycle is diploid

Diploid: 100.00 %  
Dip G1: 79.82 % at 75.02  
Dip G2: 5.54 % at 150.04  
Dip S: 14.64 % G2/G1: 2.00  
%CV: 2.97

Total S-Phase: 14.64 %  
Total B.A.D.: 12.29 %

Debris: 9.09 %  
Aggregates: 7.92 %  
Modeled events: 32775  
All cycle events: 23921  
Cycle events per channel: 315  
RCS: 0.380



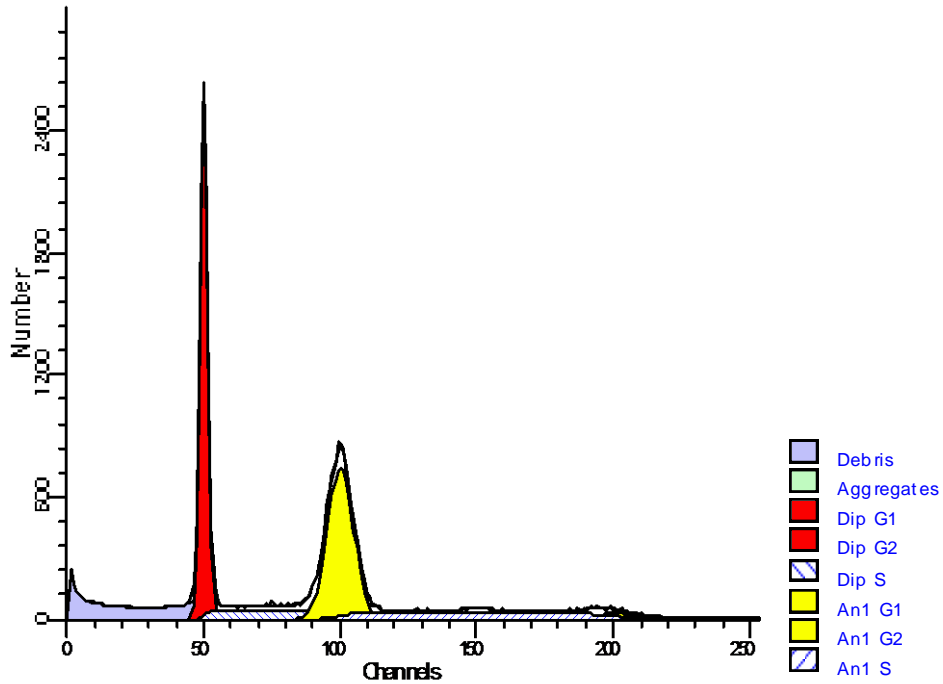
Date analyzed: 3- April-2011  
Model: 2DA0n\_DSD\_ASD Aborto15  
Analysis type: Automatic analysis  
Ploidy Mode: First cycle is diploid

Diploid: 49.78 %  
Dip G1: 80.08 % at 75.02  
Dip G2: 5.53 % at 150.05  
Dip S: 14.39 % G2/G1: 2.00  
%CV: 3.00

Aneuploid 1: 50.22 %  
An1 G1: 69.92 % at 99.87  
An1 G2: 5.22 % at 199.74  
An1 S: 24.86 % G2/G1: 2.00  
%CV: 4.97 DI: 1.33

Total Aneuploid S-Phase: 24.86 %  
Total S-Phase: 19.65 %  
Total B.A.D.: 11.38 %

Debris: 7,15 %  
Aggregates: 4.14 %  
Modeled events: 31236  
All cycle events: 23967  
Cycle events per channel: 191  
RCS: 0.908



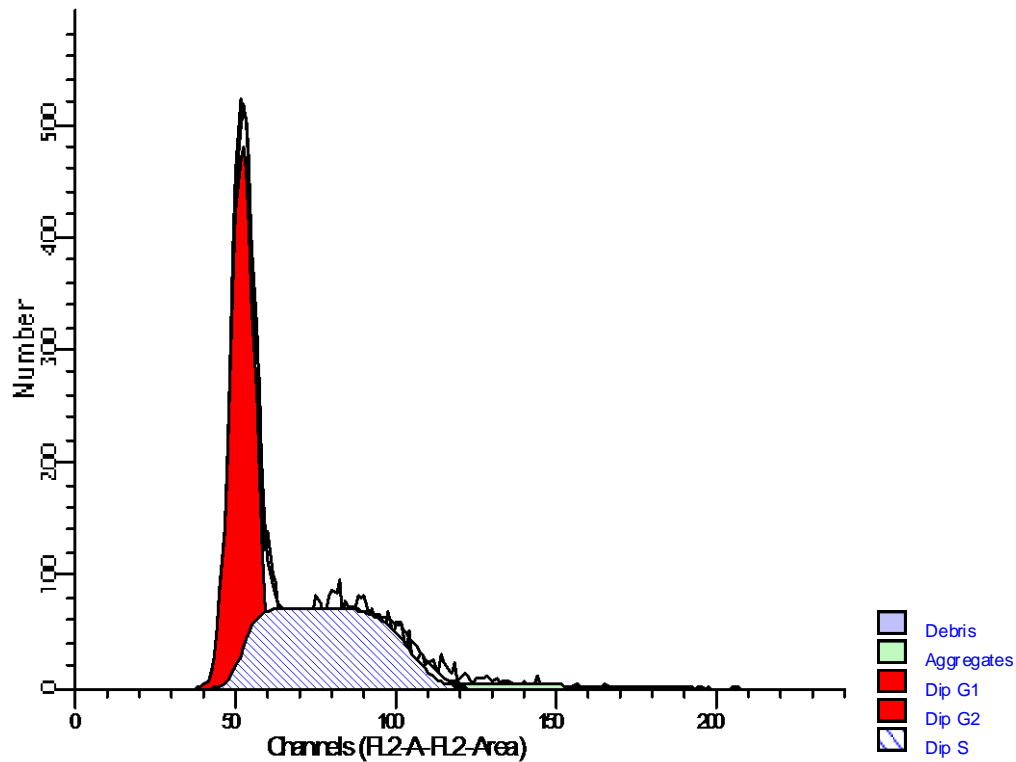
Date analyzed: 6-February-2011  
Model: 2DA0n\_DS<sub>n</sub>\_TSD Aborto8  
Ploidy Mode: First cycle is diploid

Diploid: 51.52 %  
Dip G1: 76.49 % at 50.02  
Dip G2: 8.00 % at 100.03  
Dip S: 15.51 % G2/G1: 2.00  
%CV: 2.94

Tetraploid: 48.48 %  
An1 G1: 68.10 % at 100.03  
An1 G2: 5.32 % at 200.07  
An1 S: 26.58 % G2/G1: 2.00  
%CV: 4.79 DI: 2.00

Total Aneuploid S-Phase: 26.58 %  
Total S-Phase: 20.88 %  
Total B.A.D.: 12.86 %

Debris: 18.83 %  
Aggregates: 3.83 %  
Modeled events: 31252  
All cycle events: 24172  
Cycle events per channel: 160  
RCS: 0.804



Date analyzed: 16-March-2011  
Model: 1DA0n\_DSD Aborto45  
Analysis type: Automatic analysis  
Ploidy Mode: First cycle is diploid

Diploid: 100.00 %  
Dip G1: 55.13 % at 51.87  
Dip G2: 0.63 % at 103.74  
Dip S: 44.25 % G2/G1: 2.00  
%CV: 7.14

Total S-Phase: 44.25 %  
Total B.A.D.: 0.86 %

Debris: 0.00 %  
Aggregates: 3.56 %  
Modeled events: 8433  
All cycle events: 8133  
Cycle events per channel: 154  
RCS: 1.188