



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Facultad de Medicina

Departamento de Especialidades Quirúrgicas,

Bioquímica e Inmunología

Tesis Doctoral

**ESTUDIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS
IMPLICADOS EN EL METABOLISMO DE
HORMONAS SEXUALES Y SU ASOCIACIÓN
CON ABORTOS ESPONTÁNEOS DE CAUSA
DESCONOCIDA**

BEATRIZ PÉREZ NEVOT

Málaga, 2016



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Beatriz Pérez Nevot

 <http://orcid.org/0000-0002-7778-2624>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE ESPECIALIDADES QUIRÚRGICAS,
BIOQUÍMICA E INMUNOLOGÍA

**ESTUDIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS
IMPLICADOS EN EL METABOLISMO DE
HORMONAS SEXUALES Y SU ASOCIACIÓN CON
ABORTOS ESPONTÁNEOS DE CAUSA
DESCONOCIDA**

Directores de Tesis

PROF. ARMANDO REYES ENGEL

PROF. MAXIMILIANO RUIZ GALDÓN

Doctoranda

BEATRIZ PÉREZ NEVOT



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Departamento de Especialidades Quirúrgicas,
Bioquímica e Inmunología
FACULTAD DE MEDICINA

D. ARMANDO REYES ENGEL

Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular

D. MAXIMILIANO RUIZ GALDÓN

Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular

CERTIFICAN: que la Tesis Doctoral que presenta D^a Beatriz Pérez Nevot, Licenciada en Farmacia, ha sido realizada bajo su dirección, con el título “Estudio de polimorfismos genéticos implicados en el metabolismo de hormonas sexuales y su asociación con Abortos Espontáneos de causa desconocida” para su lectura y defensa ante el Tribunal designado por la Comisión de Doctorado de la Universidad de Málaga. Una vez redactado el presente trabajo, ha sido revisado encontrándose conforme para ser defendido y aspirar al grado de Doctor. Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, se expide el presente certificado.

Lo que se firma en Málaga, en diciembre de 2015

Fdo.: Armando Reyes Engel

Fdo.: Maximiliano Ruiz Galdón





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

A mis padres



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AGRADECIMIENTOS

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, he recibido el apoyo de numerosas personas a las que quisiera expresar mi gratitud:

En primer lugar, al Profesor Armando Reyes Engel, director de esta investigación, por la orientación, el seguimiento y su supervisión. Gracias por esas largas conversaciones con las que nos hemos entusiasmado y que nos han permitido sentar las bases de este trabajo. Por transmitir y compartir conmigo la pasión por la Genética Humana.

Al Profesor Maximiliano Ruíz Galdón, codirector en este trabajo, por abrirme las puertas de su despacho y confiar desde el primer momento en mí. Gracias por tu generosidad, tu tiempo, apoyo profesional, científico y personal. Eres un gran maestro.

A Arturo, Ana y Miriam, los mejores compañeros de viaje que se puede tener. Gracias por vuestra amistad.

A los Hermanos Porta, Tamara e Irene, especialmente por su ayuda en la puesta a punto de las técnicas necesarias para la realización de esta Tesis. Habéis hecho que lo más complicado sea muy sencillo a vuestro lado.

A la Dra. Jiménez por su acogida en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Materno Infantil de Málaga. Gracias por tu ayuda desinteresada e impecable trabajo.

A todos los facultativos del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Virgen de la Victoria y a mis compañeros de residencia por estar disponibles y dispuestos a tenderme siempre una mano. Porque aunque el tiempo pase siempre me hacéis sentir muy querida.

A Carlos, por su paciencia y por repetirme cada día que está orgulloso de mí. Muchas horas de las aquí invertidas se las he robado a él.

Por último, pero no por ello menos importante, quiero expresar un especial agradecimiento a mis padres, hermanos y amigos. Sin vuestra ayuda nada de esto habría sido posible. Soy muy afortunada por contar siempre con vuestro amor, comprensión y ejemplo. A Yarik por todo lo que nos ha enseñado a mí y a mi familia antes y después de venir.

Málaga, 2016

ABREVIATURAS

μL: Microlitro

μm: Micrómetro

A260: Absorbancia a 260 Nanómetros

A280: Absorbancia a 280 Nanómetros

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: ADN Complementario

AE: Aborto Espontáneo

AIC: Criterio de Información de Akaike

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

APCR: Resistencia a la Proteína C Activada

AR: Receptor de Andrógenos

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: ARN Mensajero

BIC: Criterio de Información Bayesiano

ClH: Ácido Clorhídrico

CRL: Longitud céfalo-caudal

DHT: Dihidrotestosterona

DL: Desequilibrio de Ligamiento

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EHW: Equilibrio de Hardy-Weinberg

EM: Algoritmo Esperanza-Maximización

ER: Receptor de Estrógenos

ESR1: Receptor de Estrógenos tipo 1

EtOH: Etanol

EUR: European

FDA: Food and Drug Administration

FIV: Fecundación In Vitro

FSH: Hormona Folículoestimulante

GnRH: Hormona Liberadora de Gonadotropina

hCG: Gonadotropina coriónica humana

HMG: High Mobility Group

HREs: Elementos de Respuesta a Hormona

IBS: Iberian Population in Spain

IMC: Índice de Masa Corporal

kDa: Kilodaltons

LDL: Lipoproteína de baja densidad

LH: Hormona Luteinizante

M: Molar

mL: Mililitro

mM: Milimolar

MTHFR: Metilen-tetrahidrofolato Reductasa

nm: Nanómetro

nt: Nucleótido

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: Odds Ratio

pb: Pares de Bases

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PIH: Hipertensión Inducida por el Embarazo

QF-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa y Fluorescente

r: Coeficiente de correlación

Rpm: Revoluciones Por Minuto

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa

SAF: Síndrome Antifosfolípido

SDS: Dodecilsulfato sódico

SNP: Polimorfismo de nucleótido simple

SRY: Región determinante del sexo en Y



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. DESARROLLO EMBRIO-FETAL	4
1.1.1. Periodo embrionario.....	5
1.1.2. Periodo fetal	6
1.2. CONCEPTO DE ABORTO ESPONTÁNEO.....	7
1.3. EPIDEMIOLOGÍA DEL ABORTO ESPONTÁNEO	10
1.4. ETIOPATOLOGÍA DEL ABORTO ESPONTÁNEO	14
1.4.1. Anomalías cromosómicas y monogénicas.....	15
1.4.2. Anomalías anatómicas.....	16
1.4.3. Infecciones microbianas.....	17
1.4.4. Trastornos endocrinos u hormonales.....	17
1.4.5. Factor seminal severo.....	18
1.4.6. Trombofilias adquiridas y trombofilias heredadas.....	19
1.4.7. Factores ambientales y de estilo de vida.....	20
1.4.8. Factor fármacológico.....	21
1.4.9. Factores inmunológicos.....	25
1.5. HORMONAS SEXUALES	27
1.5.1. Estrógenos.....	29
1.5.2. Andrógenos	34
1.5.3. Diferenciación gonadal y sexual.....	37
1.5.4. Biosíntesis y secreción de las hormonas gonadales.....	41
1.5.5. Mecanismo de acción del receptor esteroideo	46
1.6. HORMONAS SEXUALES Y SU RELACIÓN CON ABORTOS ESPONTÁNEOS DE CAUSA DESCONOCIDA	49

1.7.	POLIMORFISMOS ESTUDIADOS	51
1.7.1.	SRD5A2.....	51
1.7.2.	CYP19A1	54
1.7.3.	ESR1	58
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	63
2.1.	HIPÓTESIS.....	66
2.2.	OBJETIVOS.....	67
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	69
3.1.	TIPO DE ESTUDIO.....	71
3.2.	POBLACIÓN DE ESTUDIO	72
3.2.1.	Grupo Fetal	72
3.2.2.	Grupo Control	73
3.3.	EVALUACIÓN CLÍNICA	75
3.3.1.	Criterios de inclusión	75
3.3.2.	Criterios de exclusión	75
3.4.	DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS	78
3.4.1.	Extracción de DNA.....	78
3.4.2.	Análisis de calidad DNA extraído	81
3.4.3.	Determinación de los polimorfismos genéticos a estudiar	82
3.5.	ANÁLISIS DE CROMOSOMOPATÍAS EN UNA SUBPOBLACIÓN DE ABORTOS ESPONTÁNEOS	84
3.6.	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	89
3.6.1.	Análisis descriptivo de polimorfismos.....	90
3.6.2.	Equilibrio de Hardy-Weinberg	90
3.6.3.	Análisis de asociación de polimorfismos con la enfermedad	91
3.6.4.	Estudio del desequilibrio de ligamiento.....	94
3.6.5.	Estudio de asociación haplotípica.....	96

3.6.6.	Estudio de interacciones génicas	97
3.6.7.	Estimación de la función de supervivencia.....	98
4.	RESULTADOS	103
4.1.	CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LAS POBLACIONES ESTUDIADAS	105
4.1.1.	Grupo Fetal	105
4.1.2.	Grupo Control	108
4.2.	FRECUENCIAS ALÉLICAS Y FRECUENCIAS GENOTÍPICAS.....	109
4.3.	EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG	111
4.4.	ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN DE GENOTIPOS INDIVIDUALES Y MODELOS DE HERENCIA	114
4.4.1.	Modelos de herencia	116
4.4.2.	Genotipos individuales divididos por trimestres gestacionales	122
4.5.	ESTUDIO DEL DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO	126
4.5.1.	Gen SRD5A2	126
4.5.2.	Gen CYP19A1	127
4.5.3.	Gen ESR1.....	128
4.6.	ESTUDIO DE ASOCIACIÓN HAPLOTÍPICA.....	130
4.6.1.	Gen SRD5A2	130
4.6.2.	Gen CYP19A1	130
4.6.3.	Gen ESR1.....	131
4.7.	ESTUDIO DE INTERACCIONES GÉNICAS	133
4.8.	ESTUDIO DE CROMOSOMOPATÍAS Y SEXO FETAL	139
4.9.	ESTUDIO DE POLIMORFISMOS EN UNA SUBPOBLACIÓN EUPLOIDE DE ABORTOS ESPONTÁNEOS	140
4.9.1.	Análisis de asociación de genotipos individuales en subpoblación euploide ..	140
4.9.2.	Genotipos individuales divididos por sexo fetal	143
5.	DISCUSIÓN	145

5.1. SOBRE CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LAS POBLACIONES ESTUDIADAS	147
5.1.1. Grupo Fetal	147
5.1.2. Grupo Control	148
5.2. SOBRE CRITERIOS DE CALIDAD DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS ...	149
5.2.1. Comparación de frecuencias alélicas y genotípicas con bases de datos científicas 149	
5.2.2. Equilibrio de Hardy-Weinberg	149
5.3. SOBRE EL ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN DE GENOTIPOS INDIVIDUALES Y MODELOS DE HERENCIA.....	151
5.3.1. Genotipos individuales divididos por trimestres gestacionales	156
5.4. SOBRE EL DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO Y ASOCIACIONES HAPLOTÍPICAS	158
5.4.1. Gen SRD5A2	159
5.4.2. Gen CYP19A1	159
5.4.3. Gen ESR1.....	160
5.5. SOBRE EL ESTUDIO DE INTERACCIONES GÉNICAS	162
5.6. SOBRE EL ESTUDIO DE CROMOSOMOPATÍAS Y POLIMORFISMOS EN LA SUBPOBLACIÓN EUPLOIDE	164
5.7. LIMITACIONES	167
5.8. PERSPECTIVAS FUTURAS	168
6. CONCLUSIONES.....	169
7. BIBLIOGRAFÍA.....	173
8. ANEXOS.....	201

1. INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El grupo de investigación en el que participo trabaja en el ámbito de la Genómica de la Fertilidad Humana desde tres ejes metabólicos (folatos, neurotransmisores y hormonas sexuales) con posibles relaciones hipostáticas o epistáticas, relacionando polimorfismos genéticos con indicadores bioquímicos y cuadros clínicos.

Se podría decir que las pérdidas reproductivas precoces constituyen en la práctica médica el cuadro clínico de mayor incidencia en el ser humano. Hasta un 15% de los embarazos reconocidos fracasan, y una de cada cuatro mujeres experimentará un aborto espontáneo (AE) en algún momento de su vida (Blumenthal, 1992). Dada su gran frecuencia, el AE constituye una grave preocupación de salud pública, además, porque sin un tratamiento adecuado puede provocar una alta morbilidad e incluso mortalidad para la madre.

1.1. DESARROLLO EMBRIO-FETAL

La vida humana debe ser entendida como un proceso continuo en el cual la fecundación resulta un momento crítico en tanto que, en condiciones normales, conforma un nuevo individuo genéticamente distinto, a pesar de que el genoma embrionario no se activará realmente hasta que se formen 4-8 células (a los 2-3 días post fecundación aproximadamente).

La **fecundación** es el conjunto de acontecimientos que comienzan cuando un espermatozoide contacta con un ovocito secundario o sus cubiertas y que conducirá finalmente a la mezcla de cromosomas paternos y maternos en la metafase de la primera división mitótica del embrión unicelular (zigoto). Este complejo proceso, que dará entidad al embrión como unidad genética, se extiende durante horas, por lo que, a pesar de que resulte didáctico considerarlo así, no está justificado hablar del “momento de la fecundación”.

Aunque el **desarrollo embrio-fetal** debe ser entendido como un proceso continuo con límites no siempre fácilmente precisables, existen ciertas subdivisiones dentro del mismo cuyo interés resulta más didáctico que biológico (**Figura 1**). Entre ellas destaca aquella que fragmenta el periodo de desarrollo en dos fases, **embrionaria y fetal**, atendiendo a cronología. La primera de ellas se extiende hasta la octava semana gestacional y viene definida por la génesis tisular, mientras que la segunda ocupa desde este límite temporal hasta la fecha del parto, caracterizándose por un continuo proceso de maduración y crecimiento tisular.

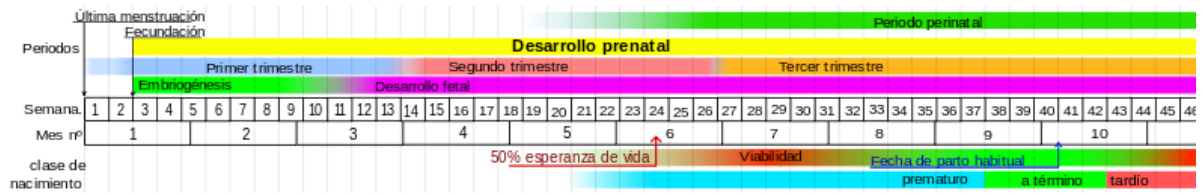


Figura 1. Periodos del desarrollo prenatal.

1.1.1. Periodo embrionario

Se extiende desde la 3ª semana **hasta las 8ª semana**. En él las células embrionarias dan origen a sus propios tejidos y sistemas orgánicos, apareciendo como consecuencia de ello los caracteres principales del cuerpo.

El **ectodermo** da origen a los órganos y estructuras en contacto con el mundo exterior: sistemas nervioso central y periférico, epitelio sensorial del oído, nariz y ojo, piel y sus anexos; la hipófisis, glándulas mamarias, sudoríparas y esmalte dentario.

El **mesodermo** da origen al sistema vascular, urogenital, bazo y corteza de las glándulas suprarrenales. Se divide en: para-axial, intermedio y lateral. El para-axial forma las somítomeras, que darán origen al mesénquima de la cabeza y se organiza en somitas en los segmentos occipital y caudal. Cada somita posee un miotoma, esclerotoma y dermatoma.

El **endodermo** forma el epitelio de revestimiento del tracto respiratorio, gastrointestinal y la vejiga. Forma el parénquima de: tiroides, paratiroides, hígado y páncreas.

Como consecuencia del crecimiento del sistema nervioso central, el disco embrionario aplanado empieza a plegarse en dirección cefalocaudal y transversal, formando las curvas cefálica y caudal y la forma redondeada del cuerpo del embrión. Durante esta

etapa se mantiene la conexión del saco vitelino y la placenta por medio del conducto vitelino y el cordón umbilical respectivamente.

1.1.2. Periodo fetal

Este periodo comprende de la **semana 9ª a la fecha del parto** y se caracteriza por la maduración de los órganos y tejidos y el crecimiento rápido del cuerpo, siendo más lento el desarrollo de la cabeza. Se produce la maduración de los esbozos embrionarios, su ubicación topográfica definitiva y el inicio de su función para cubrir parte de las necesidades biológicas.

Para la consecución de un organismo completo a partir del cigoto, el desarrollo normal implica crecimiento y diferenciación, sometidos ambos a una estrecha coordinación y a una organización rigurosa. Esta regulación es genética, la cual determina la especificidad del organismo, y epigenética, que asegura primero la formación progresiva de los esbozos y de los órganos definitivos después, merced a complejos mecanismos de motilidad celular, inducción, regresión y regulación.

Al comenzar el 3º mes, el desarrollo de la cabeza se vuelve más lento en comparación con el resto del cuerpo. La cara adquiere un aspecto más humano y en torno a la semana 12 aparecen los centros de osificación primaria en los huesos largos y del cráneo.

Durante el 3º, 4º y 5º mes el feto crece en longitud, mientras que el incremento de peso se realiza en los últimos meses antes del parto. Inicialmente la piel fetal tiene aspecto arrugado por la falta de conectivo y su piel es rojiza, pero en los últimos meses se redondea el contorno corporal por el depósito de grasa subcutánea. Hacia el final de la vida intrauterina el feto está cubierto de vernix caseoso.

1.2. CONCEPTO DE ABORTO ESPONTÁNEO

Se define **aborto espontáneo** como la pérdida de un embrión o feto por causas no provocadas intencionalmente, distinguiéndose del aborto inducido o interrupción voluntaria del embarazo. Además, según la clasificación clásica, aborto es la finalización de la gestación antes de que el feto alcance la edad gestacional suficiente para sobrevivir fuera del claustro materno, es decir, antes de la **viabilidad fetal** (Acién, 1998). En un principio el concepto resulta claro, sin embargo, la mayor dificultad reside en la definición de viabilidad fetal, dado que el pronóstico de supervivencia ha variado sensiblemente en los últimos años. Por tanto, esta definición es imprecisa ya que no aporta dato objetivo alguno que nos permita delimitar con exactitud un aborto de un parto inmaduro.

En 1977, la Organización Mundial de la Salud (OMS), con el objetivo de unificar criterios y no subestimar la mortalidad neonatal, definió el aborto como la expulsión o extracción uterina de un embrión o feto de **500 gramos o menos** (WHO: recommended definitions, terminology and format for statistical table related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths). Posteriormente, la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO) estableció además la edad gestacional de **22 semanas** como límite, aunque este dato varía según la bibliografía y medio que se consulte. La literatura anglosajona refiere, en general, el límite de las 20 semanas, mientras que en nuestro medio, se prefiere 22 semanas de gestación dado que coincide aproximadamente con el peso establecido por la OMS y con la edad vigente en la legislación española para la interrupción voluntaria del embarazo.

INTRODUCCIÓN

La introducción de la edad gestacional permite diferenciar además aquellas gestaciones que pueden presentar un crecimiento intrauterino retardado con un peso al nacimiento inferior a 500 gramos, pero con una edad gestacional superior a 22 semanas y que por tanto, ya no sería considerado aborto.

Sin embargo, la **viabilidad clínica** es un concepto más amplio que implica la capacidad de la medicina actual de prestar asistencia contra la premadurez extrema, y está determinada por el desarrollo anatómico funcional del pulmón, o sea la capacidad de intercambio gaseoso pulmonar, que ocurre aproximadamente entre las 24 a 26 semanas de gestación.

Finalmente, según la edad gestacional en que se produce el aborto, podemos diferenciar los **abortos precoces**, los cuales ocurren durante el primer trimestre (hasta 12 semanas), o **tardíos**, que corresponden a los que se producen en el segundo trimestre. Los abortos precoces (80-85%) predominan sobre los tardíos, por ser más frecuentes las causas que actúan de forma más precoz en la gestación.

El **aborto de repetición**, término establecido por Malpas (1938), se define como “la pérdida espontánea de tres o más gestaciones consecutivas o de cinco gestaciones alternando con embarazos de resultado normal antes de la 22ª semana de gestación”. En la actualidad se utiliza el término más amplio de pérdida gestacional, que englobaría también pérdidas reproductivas distintas del aborto, como los abortos subclínicos, los embarazos ectópicos, las molas, los partos inmaduros, etc.

En la práctica clínica, numerosos grupos de trabajo recomiendan que la existencia de dos AEs ya constituya una situación de aborto recurrente y, por tanto, merece estudio de investigación (Coulam, 1991). Así, el grupo de consenso de la SEGO considera que existe

INTRODUCCIÓN

un aborto de repetición cuando se han producido al menos dos abortos consecutivos o más de dos alternos.

1.3. EPIDEMIOLOGÍA DEL ABORTO ESPONTÁNEO

La incidencia de interrupciones espontáneas del desarrollo del proceso reproductivo es muy alta, sobre todo cuando se considera desde las etapas más precoces. Se calcula que, teniendo en cuenta los fallos de la fecundación, de cada 100 “embarazos potenciales” tan sólo 31 llegan a término con un feto vivo (Bajo et al., 2009).

La frecuencia del “aborto”, considerando a éste como la “interrupción espontánea de la gestación antes de que el feto haya alcanzado una edad gestacional que lo haga viable”, depende por tanto del criterio que utilicemos para definir que el embarazo existe. Cuando tan sólo se tienen en cuenta los **embarazos que llegan a la fase de implantación**, la frecuencia de aborto es del **30% al 40%**, **alcanzado el diagnóstico clínico de embarazo**, la frecuencia baja al **10%-15%**, y si la gestación progresa y se observa un producto vivo, la probabilidad de aborto baja notablemente, hasta llegar a cifras comprendidas entre el 3% y el 4% (Bajo et al., 2009). Estas frecuencias dependen del criterio que se utilice, y por ello, si no se especifica claramente, los datos que se muestran en las diversas publicaciones no son comparables.

Estudios meticulosos realizados en mujeres jóvenes, sanas y con ciclos menstruales normales que intentaban un embarazo, han demostrado que es frecuente detectar transitoriamente Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) en la orina de mujeres que por lo demás ignoraban por completo que habían concebido y abortado (Gosden, 1985; Edwards, 1986; Wilcox et al., 1988; Zinaman, Clegg, Brown, O’Connor, & Selevan, 1996).

Cuando el embrión está vivo entre la octava y la 12ª semana, la tasa de aborto hasta la semana 20ª es de tan sólo el 2%. Sin embargo, Rempen (1993) cuando encuentra latido

cardíaco entre la quinta y la 13ª semana, comunica una tasa de abortos del 8.6%; cuando el latido cardíaco ha sido detectado antes de la novena semana, el grupo presenta una tasa de abortos superior, del 12.5%. Además, comprueba que si la mujer tiene más de 34 años, la frecuencia asciende al 15,5%, y si existe hemorragia vaginal, al 16.3%.

Levi, Lyons, Zheng, Lindsay y Holt (1990) encuentran una tasa de abortos del 24% cuando existe latido cardíaco positivo pero el embrión tiene una longitud céfalo-caudal (CRL) menor de 5mm.

Pandya, Snijders, Psara, Hilbert y Nicolaidis (1996) en exploraciones realizadas entre la décima y la 13ª semana, observan un 2.8% de embarazos interrumpidos. El 52.5% correspondían a abortos diferidos, y el 37.5% a gestaciones anembrionadas. También hallan asociación significativa con la edad materna y el antecedente de hemorragia vaginal.

Otros autores como Goldstein y cols. (1994) permiten conocer la probabilidad de aborto en función de los hallazgos ecográficos.

Por otro lado, basándose en estudios poblacionales se ha tratado de relacionar qué factores pueden influir negativamente sobre la gestación produciendo un incremento de la ya de por sí elevada incidencia de AE. Dentro de los factores estudiados destacan los siguientes:

- **Edad materna:** En un estudio amplio se ha observado que el riesgo de presentar un aborto se incrementa a medida que aumenta la edad materna (Nybo, Wohlfahrt, Christens, Olsen & Melbye, 2000); el riesgo de aborto para mujeres entre 12 y 19 años era del 13.3 %, frente al 51 % en mujeres entre 40 y 44 años. Varios estudios han demostrado un incremento del riesgo de AE en mujeres con edades superiores o iguales a 35 años (Dominguez et al., 1991;

Osborn, Cattaruzza, & Spinelli, 2000). El factor que influye de manera más determinante en el incremento del riesgo es la calidad de los ovocitos, que empeora con la edad materna y condiciona un aumento de la frecuencia de alteraciones cromosómicas (Nybo et al., 2000). Adicionalmente, dado que los fetos con defectos cromosómicos es más probable que mueran en el útero que los fetos euploides, el riesgo disminuye con la gestación.

- **Edad paterna:** Se ha visto que si el hombre tiene una edad superior o igual a 40 años, la edad materna comienza a tener un efecto negativo antes de los 35 años, desde los 30 años; y en el caso de que la mujer tenga ya 35 años o más, si el hombre tiene más o igual a 40 años, el aumento del riesgo de interrupción espontánea de la gestación es mucho mayor (De la Rochebrochard & Thonneau, 2005; De la Rochebrochard & Thonneau, 2002). En definitiva, se ha encontrado un claro efecto negativo de la edad paterna después de los 40 años (De la Rochebrochard & Thonneau, 2003). Mediante la investigación con técnicas fluorescentes de hibridación in-situ se ha sugerido que la probabilidad de producir embriones aneuploides es más alta para los padres mayores (≥ 50 años) que para los más jóvenes (< 30 años) (Griffin et al., 1995). Un análisis reciente comparando hombres con una edad comprendida entre 23 y 39 años, con hombres de 59-74 años de edad, también concluyó que hay más frecuencia de aberraciones cromosómicas en los espermatozoides de los hombres mayores (Sartorelli, Mazzucatto & de Pina-Neto, 2001).
- **Retraso en la concepción:** Se ha observado que el riesgo de AE es más alto en parejas que tardan más de 6 meses en concebir (De la Rochebrochard & Thonneau, 2002). Varios estudios han documentado la relación entre un largo

INTRODUCCIÓN

tiempo requerido para conseguir embarazo y un riesgo más alto de fracaso de la gestación (Rachootin & Olsen, 1982; Gray & Wu, 2000), relación que puede ser debida en parte a una asociación con abortos subclínicos que pueden constituir un factor importante en el tiempo de concepción declarado por la mujer.

En resumen, entre el 10-15% de todos los embarazos reconocidos clínicamente concluyen en un AE, pero la incidencia verdadera de aborto, que incluye los abortos precoces, es entre dos y cuatro veces más elevado (30-60%). Además, hay coincidencia en todos los estudios en relacionar la edad materna avanzada (y en menor grado la paterna) y los antecedentes de abortos previos como “factores de riesgo” de AE (Suzumori & Sugiura-Ogasawara, 2010).

1.4. ETIOPATOLOGÍA DEL ABORTO ESPONTÁNEO

El proceso reproductivo implica una fina coordinación de gran número de procesos en los cuales pueden producirse alteraciones que conduzcan a errores irreparables manifestados en forma de aborto. Resulta difícil hablar de etiología del AE porque aunque han sido muchas las “causas” descritas, no hay estudios adecuadamente controlados que establezcan un claro vínculo causa-efecto. En realidad, más que de factores etiológicos deberíamos hablar de factores asociados a un proceso del cual desconoceremos el agente causal en un gran porcentaje de casos (**AE de causa desconocida**).

Por tanto, los AE se han asociado a múltiples causas, destacando las anomalías intrínsecas del producto y algunas ambientales, pero en la práctica clínica habitual no se identifican en la mitad de los casos (Hanna, Bretherick, Liu, Stephenson & Robinson, 2010).

Por otro lado, dentro de los efectos adversos asociados al consumo de fármacos (teratogénesis), el creciente desarrollo de la genética está demostrando que dichos agentes agresores prenatales actúan sobre un terreno genéticamente predispuesto, es decir, existe una estrecha relación entre genotipo y ambiente en lo relativo a la teratogenicidad embrio-fetal. La existencia de determinadas mutaciones genéticas más la acción del ambiente puede conllevar a una alteración en un metabolito o enzima que intervenga en la vía metabólica de la degradación de dicho medicamento.

Las principales etiologías propuestas para los AE se pueden clasificar en los siguientes grupos:

1.4.1. Anomalías cromosómicas y monogénicas.

En general, los **factores genéticos** juegan un papel muy importante en los AEs (Rynekrova, Kasparova, Adamkova, Fait & Hubacek, 2012; García-Enguïdanos, Calle, Valero, Luna & Domínguez-Rojas, 2002; Pandey, Rani & Agrawal, 2005) y, en particular, se sabe que las anomalías cromosómicas son la causa más frecuente de AE del primer trimestre (50-60%). En el segundo trimestre de gestación la frecuencia desciende a un 5-15% (Simpson, 2007).

Algunas anomalías **monogénicas** como la deficiencia de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (Toncheva & Tzoneva, 1985) o alteraciones en la inactivación del cromosoma X han sido asociadas a una mayor tasa de AE de repetición (Beever et al., 2003; Lanasa et al., 2001).

Sin embargo, las causas demostradas en la actualidad son realmente las **cromosómicas**. Las cromosomopatías “de novo” en los embriones pueden ocurrir en un 50-60% de los AEs, sobre todo los que ocurren muy precozmente, siendo las más frecuentes las trisomías autosómicas (Boue, Boué & Lazar, 1975; Kalousek, Pantzar, Tsai & Paradice, 1993; Lauritsen, 1975) y siendo ésta también una causa de los abortos de repetición. Las poliploidías se presentan en un 20% de los casos y las monosomías en un 10% (Salazar, Álamos, Arriagada & Selman, 2011). Diferentes estudios coinciden en que la trisomía 16 seguida de las 22, 13 y 21 son las más prevalentes y en ningún caso se observa trisomía del cromosoma 1 (Quiroga de Michelena et al., 2007; Fritz et al., 2001). También se han encontrado anomalías cromosómicas asociadas a los gametos de los progenitores en un 3-10% de los casos de aborto (Carp, Feldman, Oelsner & Schiff, 2004; De Braekeleer & Dao, 1990).



Existe controversia en cuanto a la creencia de la aneuploidía recurrente como origen del aborto de repetición. Hassold (1980) mostró que el cariotipo de un segundo aborto sucesivo era anormal en cerca del 70% de los casos en los que se encontró una aneuploidía en el primer aborto, y sólo en un 20% de los casos si el primer aborto era cromosómicamente normal (Hassold, 1980). Sin embargo, esta observación podía deberse más a la edad materna que a cualquier otro factor. Más recientemente, otros dos grupos volvieron a mostrar que el siguiente aborto en mujeres con aborto habitual era cromosómicamente anormal en por lo menos el 48% de los casos, sugiriendo la posibilidad de una aneuploidía recurrente a pesar de la normalidad de los cariotipos paternos (Daniely, Aviram-Goldring, Barkai & Goldman, 1998; Stern, Dorfmann, Gutiérrez-Najar, Cerrillo & Coulam, 1996). En un estudio de otro grupo se observó que, en 14 parejas con antecedentes de aborto de repetición, la proporción de embriones anormales en dos ciclos consecutivos de fecundación in vitro era similar (Rubio et al., 2003). Estos datos sugieren la recurrencia de tasas similares de cromosomopatías en las mujeres que sufren aborto habitual. Sin embargo, otros autores cuestionan la aneuploidía recurrente como origen del aborto de repetición (Ogasawara, Aoki, Okada & Suzumori, 2000; Sullivan et al., 2004).

1.4.2. Anomalías anatómicas.

Las anomalías anatómicas como las malformaciones uterinas o los miomas pueden ser causas probables pero no demostradas de AE de repetición en primer y segundo trimestre del embarazo (Homer, Li & Cooke, 2000; Li, Tuckerman & Laird, 2002). Por ejemplo, el útero septo es el más frecuente y el que peor pronóstico tiene en lo que se refiere a la reproducción. Está dudosamente relacionado con abortos precoces por posibles defectos en la vascularización en el septo (Fedele, Dorta, Brioschi, Giudici & Candiani, 1989) y de forma

más consistente con abortos tardíos debidos a incompetencia cervical y a un reducido volumen intracavitario (Propst & Hill, 2000). Sin embargo, no existe ningún estudio hasta el momento que haya demostrado que al corregir un problema uterino determinado, las pacientes intervenidas aborten menos que las no operadas (Rai & Regan, 2006).

1.4.3. Infecciones microbianas.

La presencia de infecciones o una flora bacteriana anormal en el tracto genital externo, vagina y cérvix pueden ser causa de AE (Martin et al., 1982). Pacientes no inmunizadas frente a Toxoplasma o Rubeola y que contraen dicha infección pueden sufrir un AE esporádico, pero casi de forma imposible podrá ser la causa de aborto de repetición ya que la primoinfección genera inmunidad a largo plazo que suele proteger a la mujer durante el resto de su edad fértil.

1.4.4. Trastornos endocrinos u hormonales.

Existe una débil y no del todo demostrada asociación entre el aborto y, por extensión, el aborto de repetición, y los desórdenes endocrinos u hormonales como el síndrome de ovarios poliquísticos, diabetes mellitus o mujeres con problemas de tiroides (especialmente hipotiroidismo), hipersecreción de LH, disminución de la progesterona o con defectos en la fase lútea del ciclo (Coulam & Stern, 1994; Kalter, 1987; Tulppala, Stenman, Cacciatore & Ylikorkala, 1993).

1.4.5. Factor seminal severo.

La mayor presencia de anomalías cromosómicas o menor cantidad de espermatozoides de morfología normal en varones cuya pareja sufre aborto de repetición ha sido propuesta en algunos estudios como una posible etiología (Carranza-Lira & Celis-Rico, 2011; Collodel et al., 2009). Se propone como hipótesis una mayor velocidad de los espermatozoides con aneuploidías, por lo cual consiguen llegar al óvulo con mayor probabilidad, crear una fecundación anómala y ser responsables de la pérdida de la gestación de forma recurrente (Giorlandino, Calugi, Iaconianni, Santoro & Lippa, 1998). Sin embargo, la asociación entre anomalías espermáticas y el aborto de repetición no ha podido ser confirmada en otros trabajos, en especial en ausencia de patología seminal severa (Bronet et al., 2012). Pese a la relación inicialmente establecida entre microdeleciones del cromosoma Y (Dewan, Puscheck, Coulam, Wilcox & Jeyendran, 2006) y fragmentación aumentada del ADN espermático (Carrell et al., 2003) con el aborto de repetición, recientes estudios (Bellver et al., 2010; Wettasinghe, Jayasekara & Dissanayake, 2010) han mostrado que los varones de parejas con aborto de repetición idiopático y patología seminal ausente o no severa, no presentan mayor prevalencia de microdeleciones Y, y que, aunque muestran un incremento significativo de los índices de oxidación y fragmentación del ADN espermático, similar al de varones con oligozoospermia severa, dichos índices se solapan tanto con los de varones fértiles que no presentan ningún valor predictivo sobre la ocurrencia de aborto de repetición. Es decir, que si bien puede estar algo más elevada la oxidación y la fragmentación del ADN espermático, estos valores no predicen de forma adecuada qué varones sufrirán o no aborto de repetición, no presentando su evaluación por tanto ninguna utilidad diagnóstica.

1.4.6. Trombofilias adquiridas y trombofilias heredadas.

Las trombofilias representan un grupo de patologías que se caracterizan por un desequilibrio entre los sistemas de coagulación y fibrinólisis, a favor del primero. Pueden ser adquiridas, como el Síndrome Antifosfolípido (SAF) o algunos casos de resistencia a la proteína C activada (APCR), o congénitas, como los déficits de proteína C o S y de antitrombina III, o mutaciones puntuales de genes implicados en la cascada de coagulación (Adelberg & Kuller, 2002). En principio, todas ellas podrían producir complicaciones gestacionales, como aborto de repetición, por su efecto trombogénico.

Con respecto al SAF, es la única causa no genética que ha demostrado invariablemente, a través de ensayos clínicos prospectivos aleatorizados, revisiones sistemáticas y metaanálisis, ser origen del aborto de repetición, pues su tratamiento etiológico reduce drásticamente la probabilidad de un nuevo aborto (Rai & Regan, 2006). Se considera responsable de un 10-15% de los casos (Branch, Silver, Pierangeli, van Leeuwen & Harris, 1997; Kutteh, 1996). Los anticuerpos anticoagulante lúpico y anticardiolipina IgG son los más importantes ya que son los que tienen mayor poder trombogénico y abortivo.

El SAF parece actuar de dos maneras distintas en la génesis del aborto:

- a) Su efecto trombogénico arterial y venoso sólo parece ser responsable de los abortos más tardíos, originados a partir de las 8-10 semanas, momento en que las conexiones vasculares placentarias ya están formadas y son susceptibles de trombosis.
- b) Antes de este tiempo, es posible que en su mecanismo de actuación intervenga un desequilibrio en la producción hormonal y una deficiente invasión trofoblástica endovascular (Chamley, 2002; Levine, Branch & Rauch, 2002), debida a la unión de los anticuerpos antifosfolípido a los fosfolípidos de

membrana del trofoblasto o a las células endoteliales de los vasos deciduales o trofoblásticos (Sebire et al., 2002).

Este doble mecanismo del SAF (alteración de la implantación embrionaria y posterior efecto trombótico en los vasos útero-placentarios) explicaría también el problema de insuficiencia placentaria originada por el síndrome, responsable de los distintos trastornos asociados a la gestación (preeclampsia, desprendimiento de placenta, retraso de crecimiento intrauterino, muerte fetal intraútero, parto prematuro), y justificaría la vasculopatía de los vasos deciduales presente en los estudios anatomopatológicos realizados tras los abortos (Heilmann, von Tempelhoff & Pollow, 2003).

1.4.7. Factores ambientales y de estilo de vida.

En general, el estrés, tabaco, alcohol, radiaciones, factores psicológicos y un IMC superior a 30 pueden estar relacionados con los AEs y de repetición (Harlap & Shiono, 1980; Sugiura-Ogasawara et al., 2002), aunque no han sido claramente relacionados con los últimos.

Clásicamente se ha relacionado el **estrés** en la mujer como factor que puede actuar negativamente en la gestación. En un estudio prospectivo sobre 336 mujeres en las cuales se determinó el estrés mediante tres tests diferentes y la determinación de cortisol sanguíneo, no se observó que incrementara el riesgo de AE (Nelson et al., 2003).

En cuanto al **tabaco**, aunque existen estudios que habían relacionado éste como un factor de riesgo de aborto, se ha discutido su metodología, y estudios recientes no confirman esta asociación, incluso en gestantes que fuman 20 cigarrillos o más (Wisborg, Kesmodel, Henriksen, Hedegaard, & Secher, 2003; Rasch, 2003; Harlap & Shiono, 1980).

Existen indicios en estudios realizados sobre un número amplio de gestantes con embarazo único (24.679) que indican que un consumo de cinco o más bebidas alcohólicas por semana durante la gestación puede incrementar el riesgo de AE en el primer trimestre (Rasch, 2003; Harlap & Shiono, 1980; Parazzini et al., 1994). Sin embargo, es común en este tipo de estudios que el consumo de **alcohol** pueda estar infraestimado porque la paciente no reconoce la cantidad consumida. Armstrong et al. calcularon que el riesgo de abortos aumentaba un promedio de 1,3 por cada día en que se bebiera (Armstrong, McDonald, & Sloan, 1992). En cambio, King & Fabro en un trabajo prospectivo con 564 mujeres, comunicó que un bajo nivel de consumo durante el embarazo no se asociaba con riesgo significativo de aborto (King & Fabro, 1983).

1.4.8. Factor farmacológico.

Hace décadas se creía que la placenta servía de barrera estanca que protegía al feto de los efectos adversos de los fármacos. El desastre de la talidomida cambió completamente esta idea, demostrando que la exposición embrio-fetal a fármacos durante los periodos críticos del desarrollo podía producir daños irreversibles. El comprobado por este fármaco ha sugerido la posibilidad de que cualquier fármaco pueda ser una nueva talidomida, lo que ha conducido, en ocasiones, al extremo contrario como es tener una percepción de teratogénesis alejada del perfil de seguridad real del fármaco (Koren, Pastuszak, & Ito, 1998).

Por **teratogénesis** o dismorfogénesis entendemos la alteración morfológica, bioquímica o funcional, inducida durante el embarazo y que es detectada durante la gestación, en el nacimiento o con posterioridad (Pérez-Landeiro, Allende-Bandrés, Fernández, J, & Palomo Palomo, 2002).

INTRODUCCIÓN

Los medicamentos pueden dañar al feto en cualquier periodo del embarazo, aunque el momento de **mayor riesgo es el primer trimestre** ya que durante la fase embrionaria (especialmente en los días 20-55 posfecundación) tiene lugar la formación de la mayoría de los órganos. Evidentemente, un factor de gran importancia es el tipo de sustancia consumida.

Los efectos nocivos que los fármacos administrados a la madre pueden tener sobre el feto han sido conceptualizados en tres tipos: teratogenia, efectos indeseables sobre el desarrollo y efectos secundarios sobre el feto y/o neonato. Los mecanismos de lesión embrio-fetal son múltiples: la acción que pueden producir sobre el material hereditario, las alteraciones del crecimiento de los tejidos, la detención o modificación de la morfogénesis normal y la destrucción celular. Por su parte, la variabilidad en la expresión del potencial teratogénico de un medicamento depende de factores como la dosis consumida, el período del embarazo en que se administró, la interacción con otros factores ambientales (por ejemplo la multiterapia) y la susceptibilidad individual de la madre y el feto (Mitchell, 2003).

Lógicamente, cuanto más inmaduro es el producto de la concepción, más sensible resulta a los posibles agentes nocivos. Pero, además del agente en sí, interesa el momento en que actúa a modo de noxa farmacológica. El amplio conocimiento actualmente existente sobre desarrollo embriológico humano permite tener bien establecido el momento de mayor vulnerabilidad para cada órgano o sistema de órganos. Según se muestra en la **Figura 2** queda bien establecido el **momento de mayor vulnerabilidad para cada órgano o sistema de órganos**. Las barras de color morado corresponden a los períodos de mayor susceptibilidad, en dependencia del calendario de morfogénesis por períodos del desarrollo y que corresponde a la fase de máxima intensidad en la síntesis de ADN en cada uno de esos órganos o sistemas (Taboada Lugo, Lardoeyt Ferrer, Quintero Escobar, & Torres Sánchez, 2004).

INTRODUCCIÓN

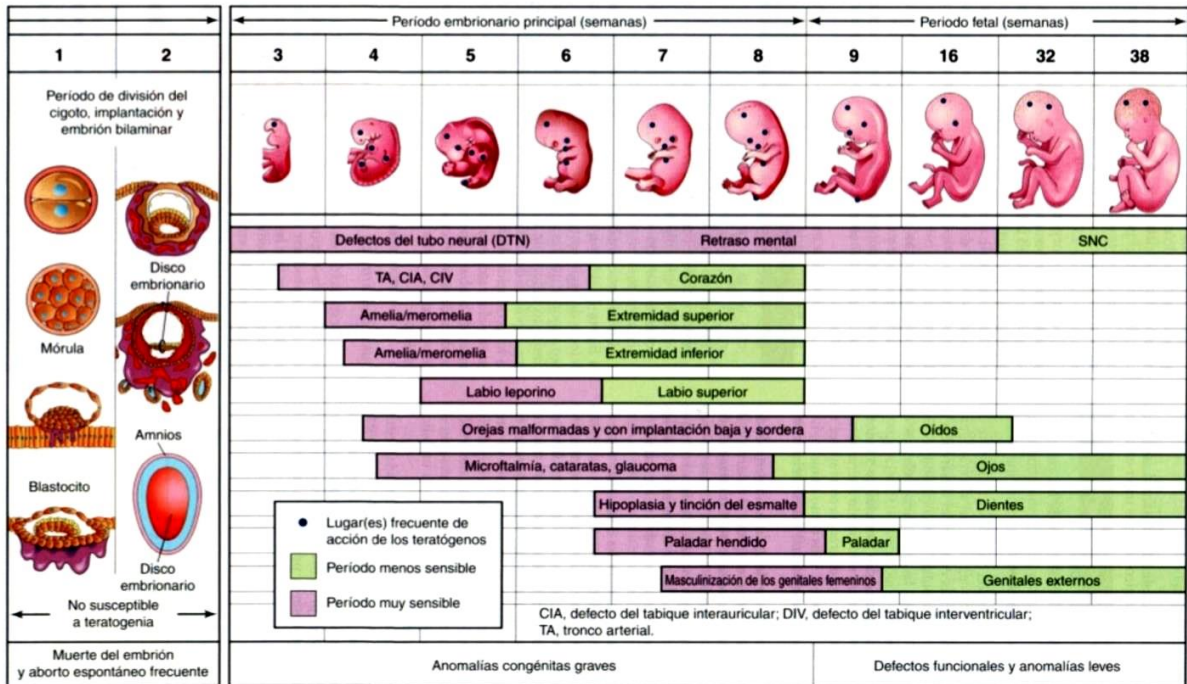


Figura 2. Fases del desarrollo, consecuencias de la acción teratógena de los fármacos en cada fase y periodos de mayor sensibilidad a la acción teratógena de los fármacos. Esquema de Moor modificado (tomado de Alonso et al., 1987).

El creciente desarrollo de la genética está demostrando que los agentes agresores prenatales de naturaleza ambiental actúan sobre un terreno genéticamente predispuesto, por lo que existe una **relación estrecha entre genotipo y ambiente en lo relativo a la teratogenicidad** embrio-fetal inducida por medicamentos. Esto explica el hecho de que un mismo medicamento no presente la misma potencialidad teratogénica en dos gestantes que lo hayan consumido en el mismo período y con igual dosis, lo que pudiera deberse a la existencia en tal caso de un defecto génico que conlleve una alteración en un metabolito o enzima que intervenga en la vía metabólica de la degradación de dicho medicamento. Un ejemplo en tal sentido lo constituye la administración de un aminoglucósido a dosis mínima en dos gemelos dicigóticos, que produjo sordera en uno de ellos y en el otro no. La existencia

de la mutación 1555 en el ADN mitocondrial explica tal situación, pues la presencia de esta mutación predispone a la ototoxicidad por aminoglucósidos. Sin embargo esta alteración del genotipo constituye una causa necesaria pero no suficiente; para que se desarrolle la sordera es preciso la intervención del ambiente, en este caso la administración de algún fármaco de este grupo farmacológico (Taboada et al., 2004).

En la **Figura 3** se resumen los mecanismos de acción teratógena, así como los factores que influyen en la misma:

TERATOGENIA POR FÁRMACOS	
MECANISMOS DE ACCIÓN TERATÓGENA	FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ACCIÓN TERATÓGENA
<ul style="list-style-type: none"> - Mutaciones en las células fetales. - Aparición de alteraciones cromosómicas: <ul style="list-style-type: none"> o Defectos en la separación cromosómica o Interferencias en las mitosis - Efectos directos sobre el embrión-feto: <ul style="list-style-type: none"> o Cambios en las hormonas que regulan la diferenciación sexual. o Alteraciones en la composición o características de las membranas celulares. o Inhibición en la síntesis y/o actividad enzimática. - Efectos indirectos sobre el embrión-feto: <ul style="list-style-type: none"> o Disminución del aporte materno de nutrientes esenciales. o Disminución en el paso trasplacentario de nutrientes esenciales. 	<ul style="list-style-type: none"> - Naturaleza del agente. - Intensidad y duración del estímulo, dependiente del paso trasplacentario: <ul style="list-style-type: none"> o Características físico-químicas del fármaco. o Grosor y superficie de las membranas que separan circulaciones materna y fetal. o Flujo sanguíneo placentario. o Farmacocinética del feto. o Actividad metabólica placentaria. o Administración concomitante de otros tóxicos. - Fase del desarrollo. - Susceptibilidad genética. - Edad materna. - Estado nutricional materno. - Patología materna útero-placentaria. - Patología materna sistémica

Figura 3. Mecanismos de acción teratógena y factores que influyen en la acción teratógena (tomado de Armijo&Benitez, 1997).

La teratogenicidad embrio-fetal inducida por agentes químicos puede ser sospechada por la presencia de ciertas características fenotípicas comunes, alteraciones en la

morfogénesis y/o alteraciones funcionales. Además, algunos medicamentos muestran "predilección" por algún órgano o sistemas de órganos específicos, por tratarse de estructuras embrionarias para las que tienen receptores o especial afinidad.

La embriofetopatía causada por agentes con un alto riesgo teratogénico como la talidomida o la warfarina, son relativamente fáciles de identificar, pero desafortunadamente resulta más difícil detectar un teratógeno débil que origina defectos congénitos tan sólo en un número reducido de casos. Esto se debe a la incidencia relativamente elevada de los defectos congénitos y al hecho de que muchas embarazadas toman medicamentos en algún momento de la gestación para el tratamiento de enfermedades frecuentes pero leves (Taboada et al., 2004).

1.4.9. Factores inmunológicos.

Por último, los AEs pueden ser producidos por factores inmunológicos, tanto aloinmunes como autoinmunes. Si bien, un proceso autoinmunitario hace referencia a una reacción inmunitaria contra «lo propio», un proceso aloinmune define una reacción inmunitaria contra «lo no propio».

Hoy en día, un embarazo satisfactorio sigue siendo un enigma inmunológico ya que los antígenos fetales deben de pasar desapercibidos por el sistema inmunitario materno. De este modo, los trastornos aloinmunes que son causa de aborto vendrían originados por el rechazo, por parte de la madre, de los antígenos de origen paterno expresados por el feto, fundamentalmente a nivel endometrial, en la interfase maternofetal. Para que esto no suceda, en condiciones fisiológicas se desarrollan una serie de mecanismos de "tolerancia inmunitaria". Un desajuste en el engranaje del sistema inmunitario o en la relación inmune feto-materna puede generar patologías como son el aborto de repetición, hipertensión

INTRODUCCIÓN

inducida por el embarazo (PIH) (Sheffer-Mimouni, Mashiach, Dor, Levran & Seidman, 2002) o la amenaza de parto pre-término. Incluso las patologías placentarias como el retardo del crecimiento fetal o pre-eclampsia, están relacionadas con la respuesta inmune materna, la cual es aún más acusada en embarazos conseguidos con donación ovocitaria (Gundogan, Bianchi, Scherjon & Roberts, 2009).

Incluso hoy día, sigue siendo una incógnita la contribución real de los factores inmunológicos en la etiología del aborto esporádico. En gran medida, ello se debe a que seguimos sin conocer con exactitud cuáles son los complejos mecanismos inmunológicos que contribuyen al éxito del embarazo normal.

A pesar de todos estos factores que podrían producir la pérdida de la gestación, un 30-50% de los abortos, según estudios, quedan sin un diagnóstico etiológico (Li, Makris, Tomsu, Tuckerman & Laird, 2002). Por ello, hoy día, muchas investigaciones, se dirigen a relacionar los factores inmunológicos como posible origen de los AEs (Christiansen, 2006).

1.5. HORMONAS SEXUALES

El término **hormona sexual** es sinónimo de *esteroide sexual*. Éstos son hormonas esteroides que interactúan con los receptores androgénicos o estrogénicos de vertebrados (Guerrero, 2009). Sus efectos están mediados por lentos mecanismos genómicos a través de receptores nucleares como también por mecanismos no-genómicos a través de receptores de membranas y cascadas de señales (Thakur & Paramanik, 2009). Las hormonas no esteroides hormona luteinizante (LH), hormona foliculoestimulante (FSH), y hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) generalmente no son consideradas como hormonas sexuales, a pesar de que desempeñan importantes roles relacionados con el sexo.

Los esteroides sexuales naturales son sintetizados por las gónadas (ovario o testículo), por la glándula suprarrenal, o por la conversión de otros esteroides sexuales en otros tejidos tales como en el hígado o el tejido graso (Brook, 1999).

En muchos contextos, las dos clases principales de esteroides sexuales (y el objeto de nuestro estudio) son los **andrógenos y los estrógenos**, de los cuales los derivados más importantes humanos son la testosterona y estradiol, respectivamente. Otros contextos incluyen los **progestágenos** como una tercera clase de esteroide sexual, distinto de los andrógenos y estrógenos. La progesterona es el principal progestágeno humano de origen natural.

En general, los andrógenos son considerados "hormonas sexuales masculinas", ya que tienen efectos masculinizantes, mientras que los estrógenos y progestágenos son

considerados "hormonas sexuales femeninas"(ElAttar & Hugoson, 1974), sin embargo todos los tipos están presentes en ambos sexos, pero a diferentes niveles de concentración.

Además, hay muchos esteroides sexuales **sintéticos**. Los andrógenos sintéticos suelen denominarse como *esteroides anabólicos*. Los estrógenos y progestinas sintéticas se utilizan en los métodos de anticoncepción hormonal. El etinilestradiol es un estrógeno semi-sintético. Compuestos específicos que tienen una actividad agonista parcial para los receptores de esteroides, y por lo tanto actúan en parte como las hormonas esteroides naturales, se utilizan en condiciones médicas que requieren tratamiento con esteroides en un tipo de célula, pero donde los efectos sistémicos del esteroide en particular en todo el organismo son sólo deseables dentro de ciertos límites (Copland et al., 2009).

En resumen, podemos clasificar las hormonas sexuales en los siguientes tipos:

- Estrógenos:
 - Estradiol
 - Estriol
 - Estrona
- Andrógenos:
 - Androstenediona
 - Dehidroepiandrosterona
 - Dihidrotestosterona
 - Testosterona
- Progestágenos:
 - Progesterona (no incluido en nuestro estudio)

1.5.1. Estrógenos

Los estrógenos son hormonas sexuales esteroideas derivadas del colesterol de tipo femenino, producidos por los ovarios, la placenta durante el embarazo, y en menores cantidades, por las glándulas adrenales.

Los principales estrógenos son: **17 β -estradiol**, **el estriol** y **la estrona** (Figura 4). Poseen **18 C** y es característica específica la existencia de un anillo aromático o fenólico en A, y la carencia del grupo metilo en el C19. Otros esteroides naturales son los obtenidos de la orina de caballo y yegua: equilina y equilenina (Amado & Flórez, 2003).

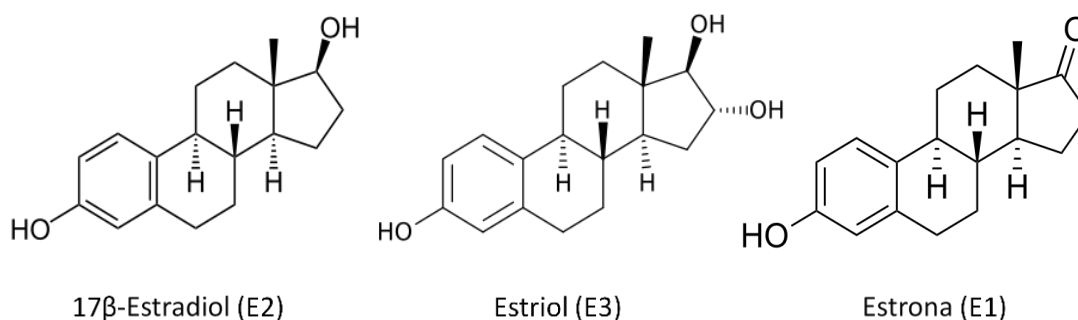


Figura 4. Principales estrógenos.

1.5.1.1. Receptor estrogénico

En ausencia de estrógenos, los receptores estrogénicos (RE) se encuentran predominantemente, pero no de forma exclusiva, en el citoplasma con un valor de 8 S en gradientes hipotónicos (PM: 360.000) y de 4 S en gradientes hipertónicos (PM: 80.000). El número de receptores es de unos 10.000 por célula, mostrando el **17 β -estradiol una alta afinidad** (0,1 nM); en cambio, la estrona y el estriol presentan menor afinidad, lo que facilita su disociación del receptor y ello explica su menor actividad (Amado & Flórez, 2003).

Se han identificado dos formas diferentes del RE, normalmente referidas como las **formas α y β** , ambas codificadas por genes diferentes e independientes (ESR1 y ESR2, respectivamente). La conformación activada del RE forma un dímero y, puesto que ambas variantes son coexpresadas en diversos tipos de células, los receptores pueden formar homodímeros del tipo RE α ($\alpha\alpha$) o RE β ($\beta\beta$), o heterodímeros del tipo RE $\alpha\beta$ ($\alpha\beta$) (X. Li et al., 2004). Los RE α y β muestran una significativa similitud de secuencia, y ambos se componen de siete dominios (**Figura 5**).

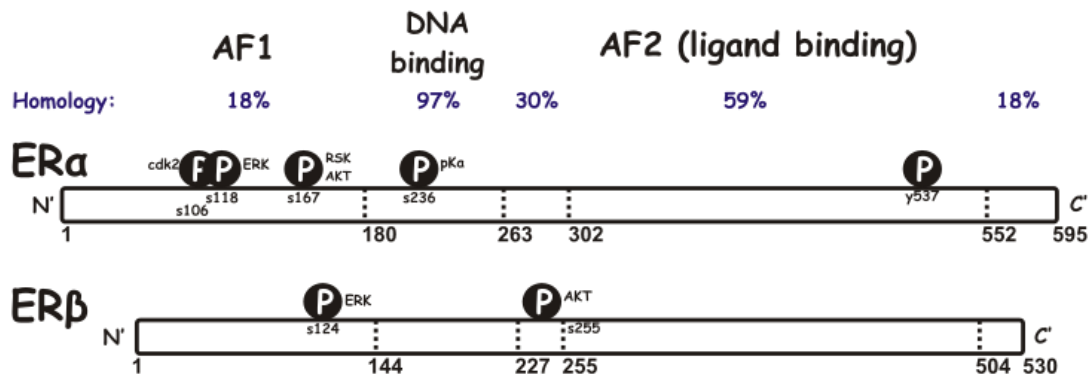


Figura 5. Dominios de RE α y RE β , incluyendo algunos de los sitios de fosforilación conocidos implicados en la regulación independiente de ligando.

El dominio AF-1 reside en la parte aminoterminal de la molécula y no necesita fijar estrógeno para iniciar la transcripción génica. El dominio AF-2 reside en la porción carboxiterna donde se fijan los estrógenos. El complejo receptor-estrógeno cambia las características del receptor y, una vez introducido en el núcleo, permite la unión de una larga serie de factores de transcripción intermedios (proteínas coactivadoras) que inician la transcripción génica. Recientemente se ha descrito la existencia de un segundo RE, lo que añade más complejidad al mecanismo de acción de los estrógenos (Amado & Flórez, 2003).

Ambos tipos de receptores se expresan en una amplia variedad de tejidos (**Figura 6**), aunque existen notables diferencias en sus patrones de expresión (Couse, Lindzey, Grandien, Gustafsson, & Korach, 1997):

El RE- α es expresado mayoritariamente en **testículo, epidídimo, ovario (células de la granulosa y células de la teca, glándula mamaria, el cerebro (glándula pituitaria), tejido adiposo, hueso, corazón y el útero** (Grohé et al., 1997; Kuiper et al., 1997; Drummond, Baillie, & Findlay, 1999; Pelletier & El-Alfy, 2000; Taylor & Al-Azzawi, 2000; Anwar et al., 2001; Horner, Beavan, & Compston, 2001; Morani, Warner, & Gustafsson, 2008; Weiser, Foradori, & Handa, 2008).

En cambio, el RE- β es expresado mayoritariamente el **ovario (células de la granulosa y células de la teca, cuerpo lúteo y ovocito), colon, hipotálamo, trompas de Falopio, pulmón, adipocito, riñón, hueso, corazón, vejiga, suprarrenales, testículos y próstata** (Enmark et al., 1997; Grohé et al., 1997; Kuiper et al., 1997; Saunders, Maguire, Gaughan, & Millar, 1997; Taylor & Al-Azzawi, 2000; Anwar et al., 2001; Bord, Horner, Beavan, & Compston, 2001; Bocca, Billiar, Albrecht, & Pepe, 2008; Driesche, Smith, Myers, & Duncan, 2008; Morani, Warner, & Gustafsson, 2008; Weiser Foradori, & Handa, 2008).

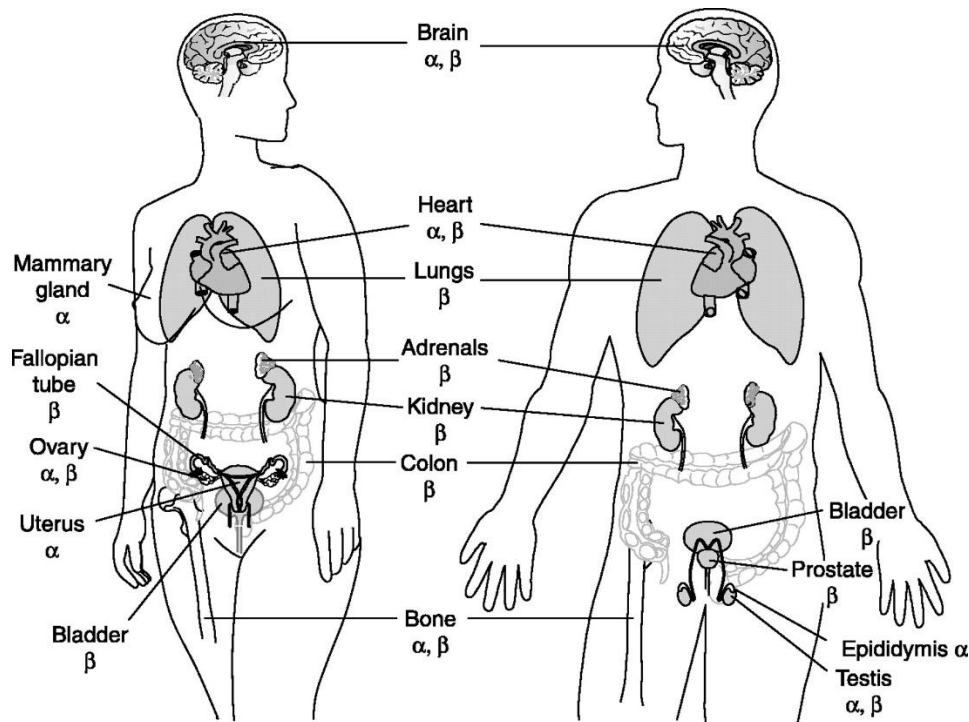


Figura 6. Representación esquemática de la localización del receptor de estrógenos en el tejido humano (de tomado Drummond & Fuller, 2010).

Los receptores de estrógeno son receptores citoplásmicos en ausencia de ligando, pero los últimos estudios llevados a cabo han demostrado que una fracción de estos receptores se localizan en el núcleo celular (Htun, Holth, Walker, Davie, & Hager, 1999).

1.5.1.2. Acciones de los estrógenos

Los estrógenos son considerados principalmente **hormonas feminizantes**. Entre sus efectos se encuentran los cambios en los depósitos de grasa corporal, el desarrollo y crecimiento mamario, la estimulación de la proliferación celular del útero, trompas de Falopio y epitelio vaginal, la maduración de los ovarios y la producción de hormonas esteroideas durante la fase luteal del embarazo (Sherwood, 2011; Telleria et al., 1998). Asimismo, también se encuentran implicados en el control de la conducta sexual

femenina a nivel del SNC (Freeman, 2006). Por otro lado, además de participar en la función reproductiva, los estrógenos son necesarios para el **mantenimiento del equilibrio hidroelectrolítico y de la masa ósea** (de ahí los problemas de osteoporosis que se presentan después de la menopausia) y participan en aspectos relacionados con la **fisiología vascular** tales como la proliferación epitelial de los vasos sanguíneos, siendo factores **cardioprotectores**, entre otras funciones (Harris, 2007; Sherwood, 2011),

No obstante su importante papel en la fisiología femenina, los estrógenos también son necesarios en procesos fisiológicos de los machos, lo que ha dejado atrás la idea de que las características definitorias de machos y hembras se deben a andrógenos y estrógenos respectivamente. Uno de los **efectos estrogénicos** más estudiados en el macho es el **feedback negativo sobre la secreción de testosterona**. Este fenómeno consiste en la inhibición que los estrógenos ejercen sobre la secreción de la LH en pituitaria (Sandberg, 1980; Ricke et al., 2008). Puesto que esta hormona se encarga de estimular la secreción de testosterona por parte de las células de Leydig testiculares, el feedback negativo producido por los estrógenos resulta en disminución de los niveles testosterona, que a su vez lleva a una menor producción de DHT (Ricke et al., 2008; Sharpe, 1998).

El **desarrollo y función testicular** también requieren de los estrógenos, lo cual queda evidenciado por el macroorquidismo y la oligozoospermia que se observan en hombres con niveles bajos de E2. Sin embargo, quizá el efecto estrogénico más importante a nivel del éxito reproductivo del macho sea el **control de la reabsorción de fluidos a nivel del epidídimo**, proceso que causa un aumento en la cantidad de espermatozoides en el semen y por lo tanto aumenta la probabilidad de que se produzca la fecundación (Sharpe, 1998; Hess et al., 1997)

1.5.2. Andrógenos

El principal andrógeno es la **testosterona**, que contiene **19 C** con dos grupos metilo en posiciones 18 y 19, y doble enlace en 4-5. En muchos tejidos la testosterona se convierte en **dihidrotestosterona** (DHT), por reducción en posición 5 α , comportándose como metabolito activo (**Figura 7**). Existen otros andrógenos naturales con actividad débil; los principales son los precursores **androstenediona** y el andrógeno de origen suprarrenal **deshidroepiandrosterona**.

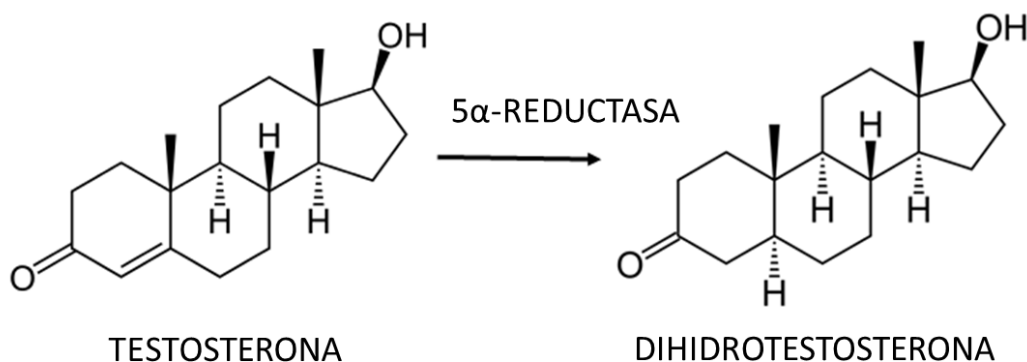


Figura 7. Transformación de testosterona en dihidrotestosterona por acción de la enzima 5 α -reductasa.

Los andrógenos son hormonas sexuales esteroideas derivadas del colesterol de tipo masculino, por los testículos, pero también por los ovarios en la mujer (androstenediona) y por la corteza suprarrenal de las glándulas suprarrenales (principalmente dihidroepiandrosterona).

1.5.2.1. Receptor androgénico

El receptor de los andrógenos tiene la **misma estructura básica de los receptores esteroides**, pero su concentración celular es más baja que la de otros receptores esteroides, incluso en los tejidos andrógeno-dependientes. Su gen se localiza en el cromosoma X y su mecanismo de acción es similar al de todos los receptores esteroides. El receptor responde a la testosterona, pero tiene tres veces más afinidad por la DHT (Hemat, 2004), un derivado de la testosterona que se produce en diversas células mediante el efecto de la 5 α -reductasa (**Figura 8**). El receptor no sólo tiene más afinidad por la DHT sino que además el complejo DHT-receptor es más estable que el complejo testosterona-receptor.

Hay dos enzimas 5 α -reductasa, con el 50 % de homología en su secuencia de aminoácidos. El gen de la enzima de tipo 1 (**SRD5A1**) se encuentra en el cromosoma 5 y la enzima se expresa preferentemente en la **piel del área no genital** (p. ej., en el cuero cabelludo), **hígado y cerebro**, mientras que el gen de la enzima de tipo 2 (**SRD5A2**) se encuentra en el cromosoma 2 y la enzima se expresa en los tejidos genitales del varón (**piel escrotal, epidídimo, vesículas seminales y próstata**) e **hígado**. Esta última enzima se encuentra asociada a la membrana nuclear y es inhibida por el antagonista finasterida (Rittmaster, 1994).

1.5.2.2. Acciones de los andrógenos

Los efectos de los andrógenos no son resultado de distintas acciones de una misma hormona, sino que son el reflejo de la misma acción sobre diferentes tejidos.

- **Acciones androgénicas.** Los andrógenos son los responsables de que se desarrollen los caracteres sexuales secundarios del varón, que empiezan en la pubertad y terminan en la madurez.

La testosterona origina:

INTRODUCCIÓN

- Crecimiento y maduración de los órganos sexuales.
- Crecimiento del pelo
- Efecto sobre la voz, hipertrofia de la mucosa laríngea.
- Aumenta el espesor de la piel y la resistencia de los tejidos subcutáneos.
- **Acciones anabolizantes (síntesis proteica).** Los andrógenos favorecen el desarrollo muscular mediante la incorporación de aminoácidos en las proteínas musculares (Salvador, Moya-Albiol, Martínez-Sanchis & Simon, 1999). En este sentido han sido administrados en la vejez para aumentar la fortaleza muscular y el vigor (Johansen, Mulligan & Schambelan 1999). También se ha observado un bloqueo post-ejercicio del catabolismo proteico. Se invierten los efectos catabólicos de los glucocorticoides puesto que sus receptores son ocupados por los andrógenos (Wilson, 1988).
- **Efecto sobre el crecimiento óseo y la retención del calcio.** Gracias a la acción de los andrógenos el espesor de los huesos aumenta de manera considerable, tanto a nivel cortical como trabecular (Chesney, Mazess & Rose, 1978) y además, se depositan en ellos gran cantidad de sales de calcio.
- **Aumento de la eritropoyesis.** Los andrógenos incrementan el número de células rojas, hemoglobina y hematocrito, además de incrementar también la síntesis de eritropoyetina (Palacios, Campfield, Mclure, Steiner & Swerdloff, 1983). Hecho por el cual se produce un aumento de la capacidad aeróbica.
- **Efecto sobre el equilibrio de electrolitos y agua.** Aumenta la reabsorción de sodio en los riñones, por lo que se retiene agua y cloruro sódico. Este fenómeno provoca un aumento de peso.
- **Estimulan la lipólisis.** Se ha visto que parecen aumentar el número de betaadrenorreceptores en el tejido adiposo (Xu, Pergola & Björntorp, 1990)

- Otros efectos. Los andrógenos inhiben la secreción gonadotrópica de la adenohipófisis (Bijlsma, Duursma, Thijssen & Huber, 1982), disminuyen la concentración plasmática de SHBG, elevan las concentraciones plasmáticas de LDL-colesterol y provocan un descenso del HDL colesterol (Crist, Peake & Stackpole, 1986), aumentan la excreción de 17-cetoesteroides.

1.5.3. Diferenciación gonadal y sexual

La existencia de hormonas gonadales en un individuo y su concentración en un momento determinado de su vida constituyen un marco de referencia que, en condiciones fisiológicas, se halla establecido por los mecanismos de diferenciación sexual. La determinación del sexo y la diferenciación sexual son procesos secuenciales que implican, de manera sucesiva, el establecimiento del sexo genético o cromosómico del cigoto en el momento de la concepción, la determinación del sexo gonadal o primario en respuesta al sexo genético y la regulación por parte del sexo gonadal de la diferenciación del aparato genital que define al sexo fenotípico. El desarrollo de los caracteres sexuales secundarios, específicos de cada sexo, en la época de la pubertad refuerza la expresión fenotípica del dimorfismo sexual.

La determinación del sexo está íntimamente relacionada con el control del desarrollo del sexo gonadal o primario, es decir, de los ovarios o los testículos, y la diferenciación sexual depende de los sucesos que ocurran después de la organogénesis gonadal. Estos procesos están regulados por no menos de 30 genes localizados en los cromosomas sexuales y autosomas, los cuales actúan mediante diversos mecanismos, como los factores de organización, las hormonas esteroideas gonadales, ciertas secreciones peptídicas y receptores tisulares específicos (Marx, 1995). Tanto el embrión masculino como el femenino

INTRODUCCIÓN

poseen órganos primarios comunes e indiferenciados que siguen una tendencia inherente hacia la feminización, a menos que en su desarrollo sean interferidos por factores masculinizantes de diversa naturaleza, es decir, un ovario se diferencia como tal a menos que la gónada embrionaria indiferente sea desviada por un factor organizador del testículo, el cual es regulado por el cromosoma Y. Más aún, la diferenciación femenina de las estructuras somáticas sexuales (el tracto genital interno y externo) es independiente de la existencia de las hormonas gonadales y aparecerá siempre que no existan testículos, aun cuando no existan ovarios. Por consiguiente, el dimorfismo sexual del fenotipo, derivado de la diferenciación sexual, está mediado por el testículo fetal y sus secreciones hormonales, no por el ovario. La diferenciación masculina si existen testículos surge a pesar de que el feto se encuentra en un ambiente rico en estrógenos y gestágenos de origen placentario.

La principal función del cromosoma Y es dirigir la gónada embrionaria bipotencial e indiferenciada hacia la diferenciación como testículo y asegurar la espermatogénesis. La organización testicular se origina hacia los 45 días de la gestación, a diferencia del ovario que no sale de su etapa indiferenciada hasta los 3 meses. Las primeras células específicas del varón que se diferencian son las células de Sertoli, que rodean las células germinales. Estas células obligatoriamente han de tener la dotación cromosómica Y. La siguiente diferenciación de las células de Leydig (hacia los 60 días) parece que está bajo el control de las células de Sertoli. Estas células germinales no dirigen la diferenciación gonadal; sólo toman la forma de la gónada en la que se encuentran (oocitos en el ovario normal y espermatogonias en el testículo normal).

Los genes WT1, codificador de la proteína del tumor de Wilms, y SF1, codificador del factor esteroideogénico 1, son esenciales para el desarrollo de la gónada indiferenciada (Barrionuevo, Burgos, Scherer, & Jiménez, 2012).

Posteriormente, en la diferenciación hacia testículo desempeña un papel esencial el gen SRY (Región determinante del sexo en Y) del cromosoma Y. La proteína SRY tiene una secuencia central de 80 aminoácidos homóloga a las proteínas HMG (high mobility group), que se fija al ADN y actúa como un factor de transcripción (Lefebvre, Dumitriu, Penzo-Méndez, Han, & Pallavi, 2007). También resulta esencial para la diferenciación hacia testículo un gen del cromosoma 17, el SOX9, que también codifica una proteína HMG, la cual es potenciadora de los efectos de la proteína SRY (Clarkson & Harley, 2002). Además, en la diferenciación hacia ovario es necesaria la actuación de un gen del cromosoma X, el DAX1, que pertenece a la superfamilia de los receptores nucleares de hormonas.

Conseguida la diferenciación testicular, las células de Sertoli segregan, entre otros elementos, la sustancia inhibidora del conducto de Müller, una glucoproteína que funciona como secreción paracrina, que avanza por difusión y disuelve el conducto. Esta proteína pertenece a la familia del factor de crecimiento transformante b, es similar a la inhibina y su gen se ha localizado en el cromosoma 19. Las células de Leydig comienzan a sintetizar testosterona a las 9 semanas, al tiempo que aparecen en ellas receptores para las gonadotropinas hCG (Gonadotropina coriónica humana) y LH.

Aunque la involución mülleriana no depende de la testosterona, la estimulación de los conductos de Wolff para que se diferencien en epidídimo, conducto deferente y vesículas seminales depende de la existencia de testosterona y de receptores androgénicos. Curiosamente, el gen responsable de la síntesis de receptores androgénicos está localizado en el cromosoma X. En cambio, la diferenciación de los genitales externos masculinos y del seno urogenital se debe a la dihidrotestosterona (DHT), derivado activo producido por la enzima 5α -reductasa. La próstata y las glándulas bulbouretrales provienen del seno urogenital y su diferenciación está mediada también por la DHT. Las máximas concentraciones de testosterona fetal (200-600 ng/dl) se alcanzan a las 16 semanas de

gestación, y son comparables a las del adulto. Entre las semanas 16^a y la 20^a cae la testosterona a 100 ng/dl, y tras la 24^a semana, la concentración es mínima y similar a la de la fase prepuberal (Yen, Jaffe, & Barbieri, 2001). Durante la diferenciación sexual masculina, la hCG segregada en el sincitiotrofoblasto estimula la secreción de testosterona. Pasado el período crítico de diferenciación sexual, las gonadotropinas hipofisarias mantendrán el crecimiento y la función del testículo fetal. La LH hipofisaria actúa concertadamente con la hCG para promover el crecimiento normal del pene y del escroto ya diferenciados, y el descenso de los testículos.

En ausencia de cromosoma Y, el primordio gonadal tiene una tendencia inherente a desarrollarse como ovario, siempre que existan células germinales y pervivan. Este estado indiferente persiste en el feto femenino hasta varias semanas después que el masculino haya iniciado la organogénesis testicular. Hacia la 12^a semana de gestación, las células intersticiales del primordio ovárico muestran signos de esteroidogénesis, si bien el feto aún se encuentra bañado en estrógenos de origen placentario. El ovario, a diferencia del testículo, no influye en la diferenciación sexual del tracto genital femenino, que sigue su curso para que se desarrollen las trompas de Falopio y el útero a partir de los conductos de Müller e involucionen los conductos de Wolff. Posteriormente, se desarrollan los genitales externos femeninos, sin que sea precisa la mediación estrogénica fetal.

La unidad gonadotrópica hipotálamo-hipofisaria (responsable de la secreción pulsátil y variable de la GnRH hipotalámica y de la FSH y LH hipofisarias) madura ya en la vida fetal, sufre un aletargamiento en la infancia y la niñez, y se reactiva al comienzo de la pubertad. El patrón de la secreción de FSH y LH varía según el sexo. El varón segrega FSH y LH de forma pulsátil, pero relativamente constante (secreción tónica), mientras que en la mujer la secreción continúa siendo pulsátil, pero además cíclica, con aumentos preovulatorios que ocasionan la ovulación. De nuevo, la tendencia natural es desarrollar un

patrón hipotalámico femenino de secreción que origine variaciones cíclicas de gonadotropinas.

1.5.4. Biosíntesis y secreción de las hormonas gonadales

Las hormonas gonadales, cuando se sintetizan, presentan aspectos comunes que posteriormente se diversifican según el tejido y los mecanismos en que se llevan a cabo para producir los tres tipos de esteroides: andrógenos, estrógenos o progestágenos. **El precursor de todos ellos es el colesterol**, el cual es formado intracelularmente a partir de acetil coenzima A o es incorporado por las células y utilizado en las mitocondrias. En este caso, el colesterol sufre la rotura de la cadena lateral y se transforma en **pregnenolona (Figura 8)** por acción de la enzima desmolasa, **reacción limitante** de la velocidad de síntesis. Esta reacción es AMPc dependiente; el AMPc es inducido por la interacción de la LH o de la hCG con sus receptores específicos. A partir de la pregnenolona, la síntesis puede seguir **dos vías**, de acuerdo con la posición en que se va a mantener la instauración de la molécula esteroidea **(Figura 8)**.

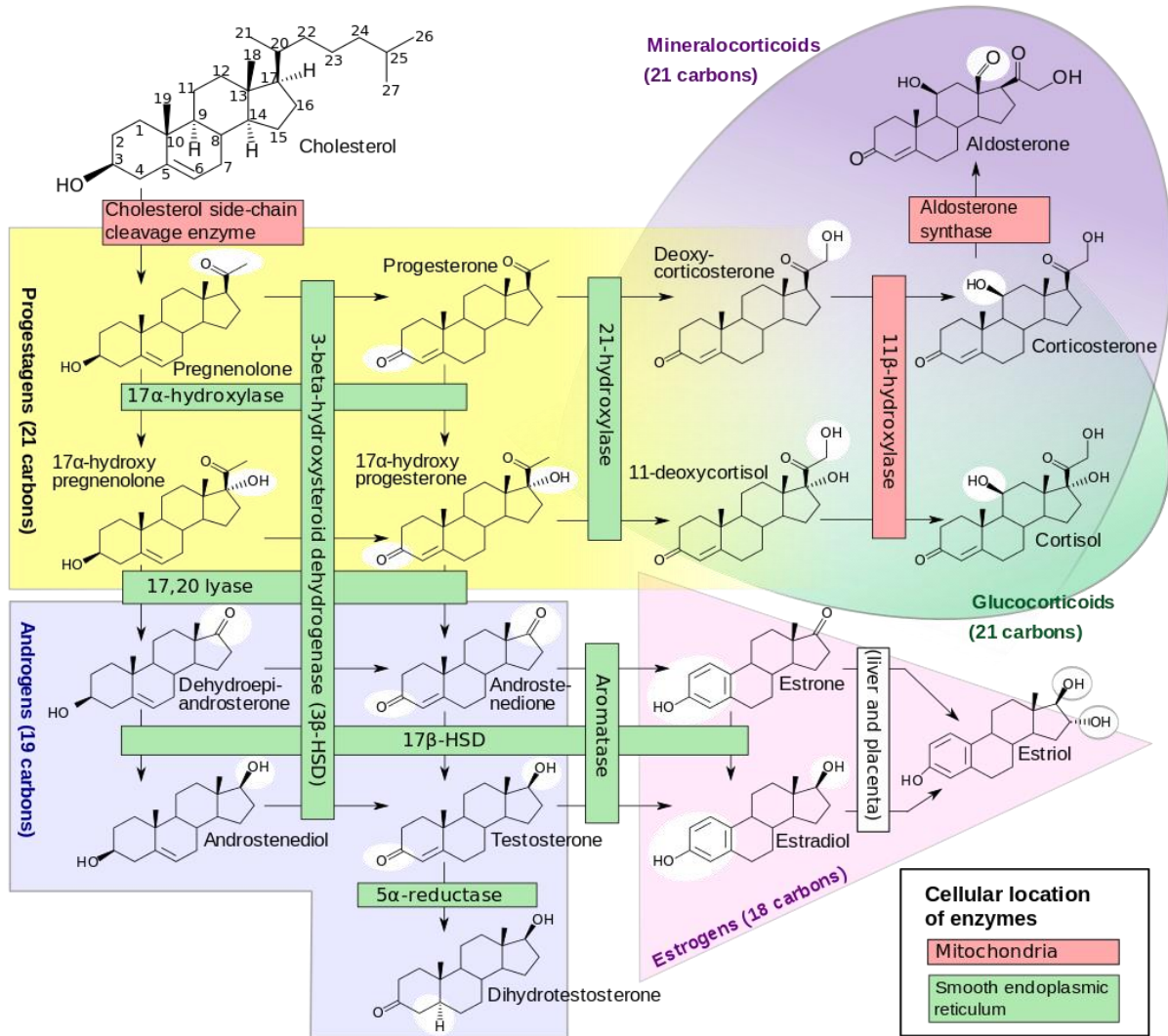


Figura 8. Esteroidogénesis humana.

1.5.4.1. Síntesis de andrógenos

En las **células de Leydig** del testículo la pregnenolona se convierte en **17 α -hidroxipregnenolona**, **deshidroepiandrosterona**, **androstenediol** y **testosterona** (Figura 8). El estímulo proviene de la LH segregada por la adenohipófisis; la testosterona circulante, a su vez, ejerce una acción negativa sobre la GnRH hipotalámica y la LH hipofisaria (Figura 9). Los andrógenos son sintetizados también en otros órganos, como *ovario*, *corteza suprarrenal* y *placenta*, en la forma de precursores que posteriormente se convierten en andrógenos activos en los tejidos periféricos: *hígado*, *piel* y *tejido adiposo*.

INTRODUCCIÓN

El testículo produce diariamente 2,5-10 mg de testosterona en el hombre adulto, originando unos niveles plasmáticos de 350-1.000 ng/dl, que fluctúan de forma circadiana. En el adulto castrado, los niveles son de 45 ng/dl, en los varones impúberes, 6-7 ng/dl; en mujeres, los andrógenos producidos por el ovario y las suprarrenales alcanzan 0,25 mg, siendo los niveles plasmáticos de 15-120 ng/dl.

En los tejidos andrógeno-dependientes, la testosterona es reducida por la 5 α -reductasa a DHT en el retículo endoplásmico y el núcleo. **La DHT tiene una afinidad por el receptor androgénico tres veces más alta que la testosterona** (Hemat, 2004), pero su concentración plasmática es muy baja: 35- 75 ng/dl. A diferencia de otros andrógenos como la testosterona, la DHT no puede ser transformada a estradiol por la enzima aromatasa. Este hecho es usado frecuentemente en contextos de investigación para distinguir entre los efectos de la testosterona unida a un receptor de andrógenos y a los causados por la testosterona transformada a estradiol y posteriormente unida a los receptores de estrógeno (Swerdloff & Wang, 1998).

INTRODUCCIÓN

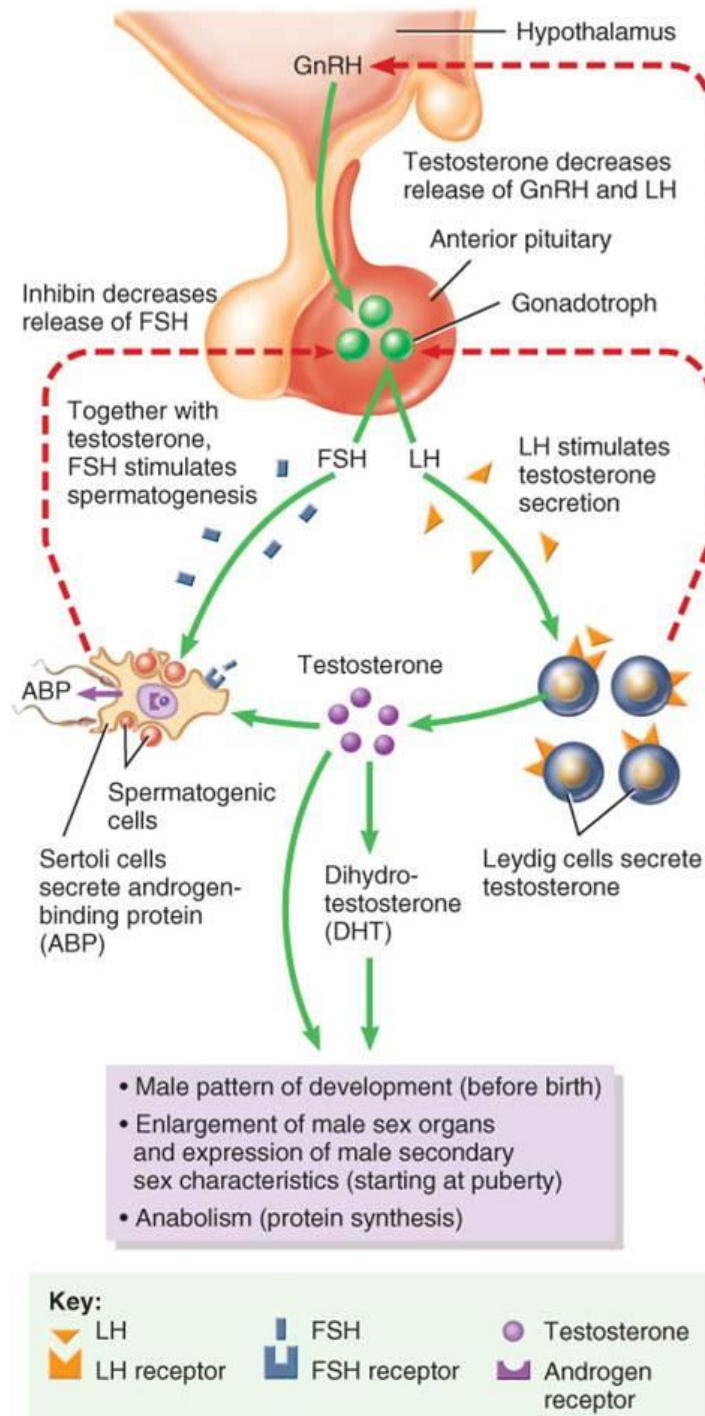


Figura 9. Regulación hormonal testicular.

GnRH=Factor liberador de gonadotrofinas, FSH=Hormona Folículo Estimulante, LH= Hormona Luteinizante, ABP= Proteína fijadora de Andrógenos, DHT= Dihidrotestosterona

1.5.4.2. Síntesis de estrógenos

En las **células de la granulosa del ovario**, durante la fase folicular, la pregnenolona formada a partir del colesterol sigue la vía para formar 17 α -hidroxipregnenolona, deshidroepiandrosterona, androstenodiona y testosterona, la cual sufre el proceso de aromatización del anillo A del esteroide con pérdida de C19, para convertirse en el estrógeno **17 β -estradiol (Figura 8)**; en el ovario, una pequeña parte de éste se convierte en **estróna**, pero en **hígado, piel, tejido adiposo, músculo, endometrio e hipotálamo**, la conversión en estróna es muy abundante (Bonkhoff & Berges, 2009). En la fase folicular, la FSH es el estímulo de la secreción 17 β -estradiol tras la interacción con sus receptores de la granulosa (**Figura 10**). En la fase lútea persiste la secreción de 17 β -estradiol a partir de la producción de androstenodiona y testosterona en las células tecaes estimuladas por la LH; los andrógenos difunden a las células de la granulosa, donde sufren la aromatización correspondiente.

Las mujeres premenopáusicas producen 17 β -estradiol de forma variable a lo largo del ciclo: de 100 a 600 mg/día, lo que origina unos niveles plasmáticos que oscilan desde un mínimo de 50 pg/ml a un máximo preovulatorio de 250-300 ng/ml.

También se segregan estrógenos en el testículo, en pequeñas cantidades por aromatización de una pequeña fracción de testosterona, y en la placenta. La síntesis en la placenta es abundante, a partir principalmente del sulfato de deshidroisoandrosterona que se forma en la bien desarrollada corteza suprarrenal del feto.

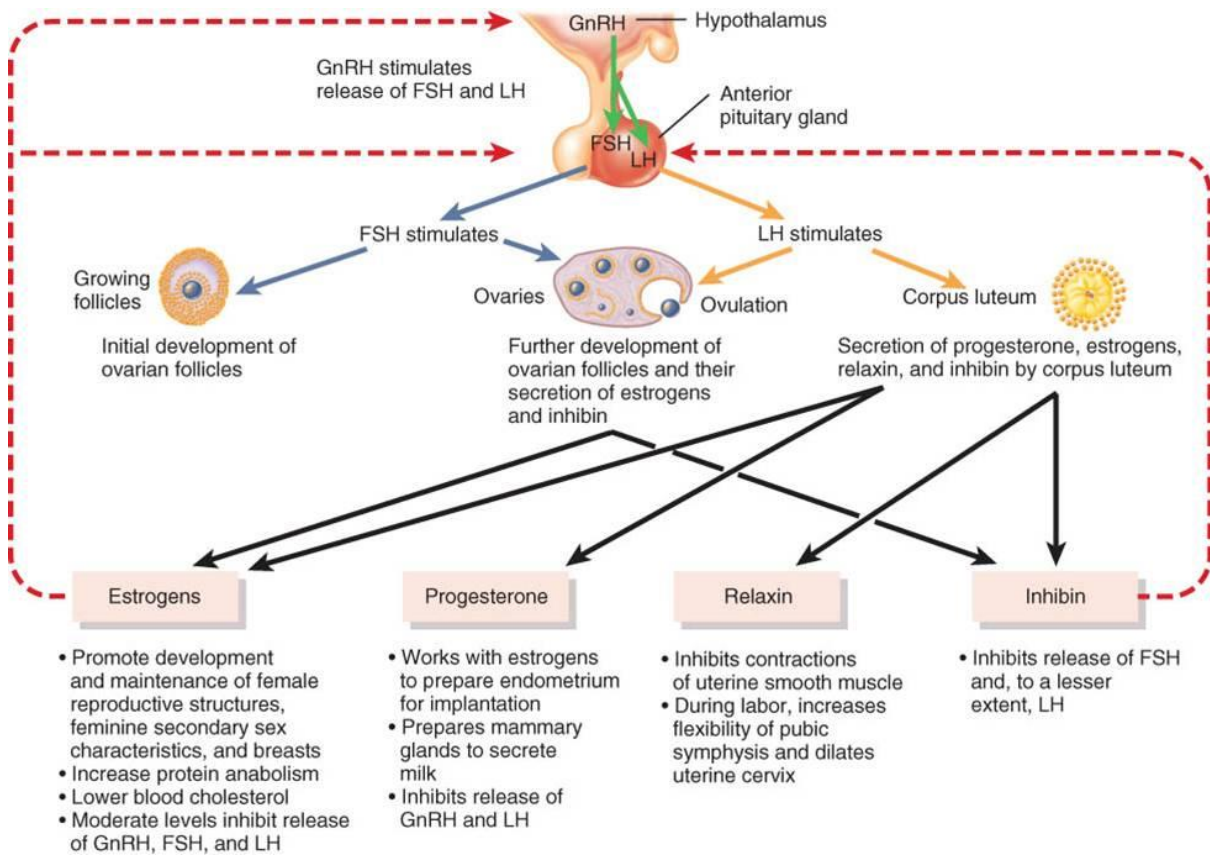


Figura 10. Regulación hormonal del ciclo reproductor femenino.

1.5.5. Mecanismo de acción del receptor esteroideo

Los receptores esteroideos pertenecen a una superfamilia de proteínas (receptores de hormonas esteroideas, hormonas tiroideas, vitamina D y A y otras) que reconocen pequeñas estructuras lipófilas y activan la transcripción de ciertos genes. Dichos receptores son activados por la presencia del ligando, formando dímeros. Los receptores nucleares actúan uniéndose a través de su dominio de unión a DNA a los elementos de respuesta a hormona (HREs), cortas secuencias de DNA palindrómicas AGGTCA o AGGACA espaciadas por un número variable de nucleótidos.

INTRODUCCIÓN

Estos HREs están alejados del sitio de inicio de transcripción, lo que implica la formación de un bucle en el DNA que los acerque al promotor génico. Los efectos transcripcionales de los receptores nucleares están mediados por el reclutamiento de coactivadores y correpresores.

En el caso de las hormonas esteroideas los receptores nucleares pertenecen a una subfamilia llamada tipo I. Las hormonas esteroideas penetran en las células por difusión (**Figura 11**); en sus células diana, es decir, las que son sensibles a la hormona, el esteroide se une a dichos receptores de manera específica y con gran afinidad, las cuales se encuentran tanto en el citoplasma como en el núcleo de la célula, formando dímeros. La fijación del complejo receptor-esteroide a los HREs modifica la transcripción de ciertos ARNm, su procesamiento y traducción a proteínas específicas en genes alejados de los sitios de unión, gracias a la presencia de coactivadores/correpresores. Una vez que el complejo receptor-esteroide ha interactuado con los sitios aceptores del núcleo, sufre reacciones que terminan por desocupar el receptor, que es reciclado, y eliminar el esteroide de la célula.

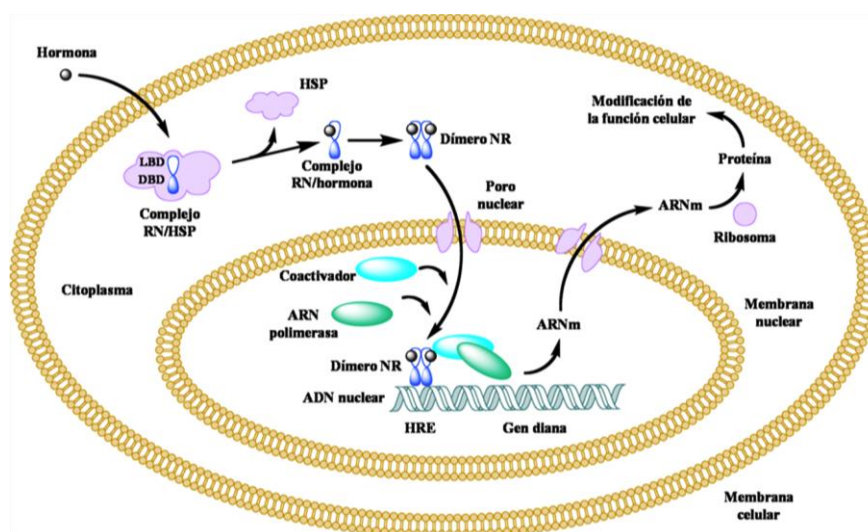


Figura 11. Mecanismo de acción clase I de los receptores nucleares.

INTRODUCCIÓN

Los receptores esteroideos pueden constar de diversas subunidades y mostrar grados distintos de asociación según si el esteroide está unido o no y según si progresa hacia el núcleo o permanece en el citoplasma. Una manera de detectar estos cambios en la asociación de subunidades es la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, en condiciones de alta (0,3M ClK) o baja (no ClK) fuerza iónica. En el primer caso, las constantes de sedimentación suelen ser de 3,5 S a 4 S; en el segundo de 6 S a 10 S. Un coeficiente alto de sedimentación en ambiente de fuerza iónica baja indica que se ha formado un complejo que contiene, por lo menos, una subunidad fijadora de hormona.

1.6. HORMONAS SEXUALES Y SU RELACIÓN CON ABORTOS ESPONTÁNEOS DE CAUSA DESCONOCIDA

En cuanto a la relación de los polimorfismos genéticos en el desarrollo de AE de causa desconocida no está aún clara (Pandey et al., 2005). En los últimos años ha habido grandes esfuerzos en investigar el papel de las variantes comunes genéticas en la predisposición a padecer un AE, como por ejemplo, polimorfismos del sistema inmune, variaciones en el gen del factor V, o en el gen de MTHFR (Rynekrova et al., 2012).

Sin embargo, aunque las hormonas sexuales están implicadas en todas las etapas de reproducción y en el desarrollo fetal, polimorfismos de genes implicados en sus vías metabólicas no han sido tan extensamente estudiados.

Se sabe que los niveles reducidos de **progesterona** pueden conducir a AE (Szekeres-Bartho, Wilczynski, Basta & Kalinka, 2008) en las primeras etapas de gestación. Algunos estudios han encontrado relación entre polimorfismos del receptor de progesterona y AE (Schweikert et al., 2004; Su, Lee, Chen & Kuo, 2011) pero no ha sido confirmado por otros autores (Traina et al., 2011; Aruna et al., 2010; Su, Lin & Chen, 2011).

Los **estrógenos** son también importantes para el éxito reproductivo, ya que influyen en el desarrollo del endometrio, así como la función placentaria, la maduración y la perfusión (Albrecht, Aberdeen & Pepe, 2000; Guibourdenche, Fournier, Malassiné & Evain-Brion, 2009). Varios polimorfismos que codifican para los receptores de estrógenos tipo 1 (ESR1) han sido evaluados en pacientes con AE de repetición, pero dicha asociación requiere

de una mayor investigación. También se han encontrado asociaciones entre polimorfismos del gen que codifica la enzima aromatasa CYP19A1 y AE (Cupisti et al., 2009).

Y en cuanto a los **andrógenos**, también se conoce que son un factor esencial para el éxito de la reproducción (Walters, Simanainen & Handelsman, 2010). A nivel molecular, sus efectos son mediadas a través de la activación de los receptores de andrógenos (AR), a través de la conversión de testosterona en DHT mediante la enzima 3-oxo-5-alfa-esteroide 4-deshidrogenasa (SRD5A1 y 2). Aunque no se han encontrado estudios en mujeres abortadoras, estudios en modelos animales encuentran una asociación entre la deficiencia de esta enzima y la pérdida fetal (Mahendroo, Cala, Landrum & Russell, 1997).

Por tanto, existen evidencias para pensar que ciertas alteraciones genéticas en las vías metabólicas de las hormonas sexuales puedan tener una influencia en el riesgo de pérdida fetal. Es interesante indicar que en la actualidad la mayoría de los trabajos relacionados con este tema, se han realizado en madres abortadoras de repetición y muy pocos estudios hacen el análisis genético en el propio tejido fetal, como es nuestro caso.

El presente trabajo, pretende investigar en muestras de tejido fetal 8 polimorfismos de genes implicados en el metabolismo de hormonas sexuales (ESR1, CYP19A1 y SRD5A2) y su asociación con los AE de causa desconocida.

1.7. POLIMORFISMOS ESTUDIADOS

Ver **Anexo I**: Características de los genes y polimorfismos estudiados.

1.7.1. SRD5A2

La enzima 3-oxo-5-alfa-esteroide delta 4-deshidrogenasa 2 es codificada por el gen SRD5A2 (2p23.1). Este gen se extiende por más de 40 kilobases de ADN genómico y contienen 5 exones y 4 intrones. La proteína está compuesta por 254 aminoácidos.

Cataliza la conversión irreversible intracelular de testosterona en el más potente andrógeno, la DHT, la cual es esencial para una diferenciación normal de los genitales masculinos externos y el desarrollo del seno urogenital. Esta proteína (isoenzima 2) se expresa en niveles altos en estructuras andrógeno-dependiente, tales como la próstata, el epidídimo (especialmente en las células basales), y las vesículas seminales. Es activa a pH ácido, presentando un estrecho intervalo de pH óptimo (alrededor de 5) y es sensible a inhibidores 4-azasteroide, por ejemplo finasteride (facilitado por RefSeq, Julio 2008). Mediante la inhibición se bloquea la conversión de testosterona en DHT, produciendo reducciones significativas de los niveles de DHT en suero y tejidos.

Tanto la isoenzima 1 como la 2 tienen como sustrato preferente a la progesterona, seguido por la testosterona y con una considerable distancia, la corticosterona (Negri-Cesi, Poletti, A., & Celotti, 1996).

La deficiencia en la isoenzima 2 es un trastorno autosómico recesivo poco frecuente que provoca un *Pseudohermafroditismo masculino* en el hombre. Es una enfermedad caracterizada por una diferenciación incompleta de los genitales masculinos en pacientes con genotipo 46 X-Y.

Por su parte, el síndrome clásico (*Hipospadias pseudovaginales perineoscrotales*) se caracteriza en el nacimiento por la presencia de unos genitales externos ambiguos con un falo de aspecto clitoriano, hipospadias, escroto bífido y seno urogenital persistente con un orificio vaginal perineal ciego. Sin embargo, los fenotipos de los genitales externos pueden ir desde un aspecto femenino completo a uno masculino con hipospadias y/o micropene.

En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de los siguientes polimorfismos del SRD5A2:

1.7.1.1. rs523349

El polimorfismo rs523349 (V89L), ubicado en chr2:31805706-31805706, es una variante C>G que corresponde a una mutación de sentido equivocado por sustitución de valina por leucina en el codón 89 (V89L). Se sabe que la variante G (leucina) disminuye la tasa de conversión de testosterona en DHT tanto *in vitro* como *in vivo* (Makridakis et al., 1997).

Un estudio publicado en el año 2007 de 1466 casos, relacionó al alelo G de este SNP con aumento de riesgo de cáncer de ovario (Beesley et al., 2007).

Las frecuencias poblacionales alélicas de 5 sub-poblaciones Europeas del rs523349 se encuentran expresadas en la **Figura 12** («1000 Genomes browser: Homo sapiens - Population genetics - rs523349 (SNP)», s. f.).

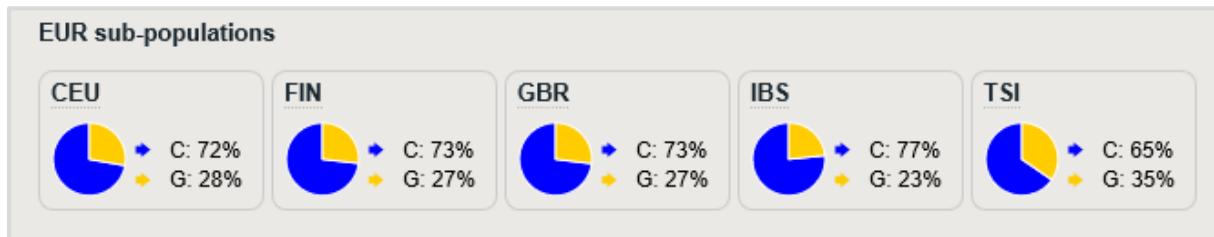


Figura 12. Frecuencias sub-poblacionales Europeas de rs523349. CEU= Utah Residents (CEPH) with Northern and Western European Ancestry, FIN= Finnish in Finland, GBR= British in England and Scotland, IBS= Iberian Population in Spain, TSI= Toscani in Italia.

1.7.1.2. rs9282858

El SNP rs9282858 (A49T), en posición chr2:31805826-31805826, es una variante A>G que corresponde a una mutación de sentido equivocado. Provoca un cambio de aminoácido alanina por treonina en posición 49 (A49T) lo cual incrementa la actividad SRD5A2 *in vitro* (Makridakis, di Salle & Reichardt, 2000).

Las frecuencias poblacionales alélicas de 5 sub-poblaciones Europeas del rs9282858 se encuentran expresadas en la **Figura 13** («1000 Genomes browser: Homo sapiens - Population genetics - rs9282858 (SNP)», s. f.).

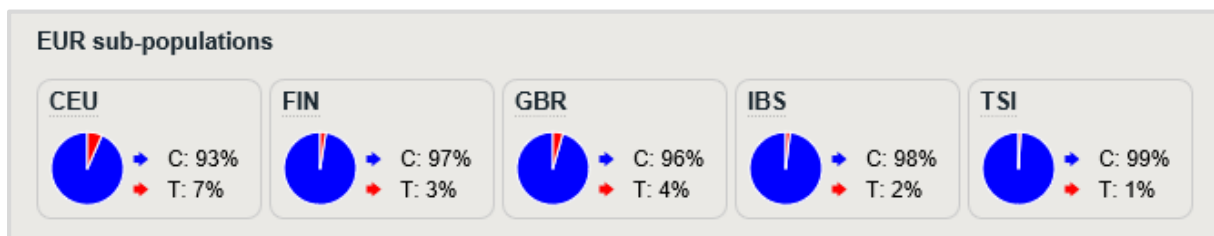


Figura 13. Frecuencias sub-poblacionales Europeas de rs9282858. CEU= Utah Residents (CEPH) with Northern and Western European Ancestry, FIN= Finnish in Finland, GBR= British in England and Scotland, IBS= Iberian Population in Spain, TSI= Toscani in Italia.

1.7.2. CYP19A1

El gen CYP19A1, ubicado en el cromosoma 15q21.1, codifica un miembro de la superfamilia de enzimas del citocromo p450, la enzima aromatasa. El gen está constituido por 10 exones separados por intrones de longitud variable, que dan lugar a un ADNc de 3,4 kb y codifican una proteína de 503 aminoácidos (pm 55 kDa). Al menos cuatro promotores distintos se han identificado para la aromatasa, dando lugar a diferentes regulaciones tisulares de su expresión.

La proteína codificada se localiza en el retículo endoplasmático de la célula y cataliza los últimos pasos de la biosíntesis de los estrógenos, tres hidroxilaciones consecutivas en el C18 junto con 2 deshidrataciones que conducen a la aromatización del anillo de androstenediona a estrona (**Figura 14**). Es una enzima limitante de la velocidad de conversión de andrógenos en estrógenos (Ghimenti et al., 2013). Puede ser encontrada en varios tejidos incluyendo las gónadas, cerebro, tejido adiposo, placenta, vasos sanguíneos, piel, huesos, y endometrio, como también en los tejidos de la endometriosis, fibroides uterinos, cáncer de mama, y cáncer de endometrio.

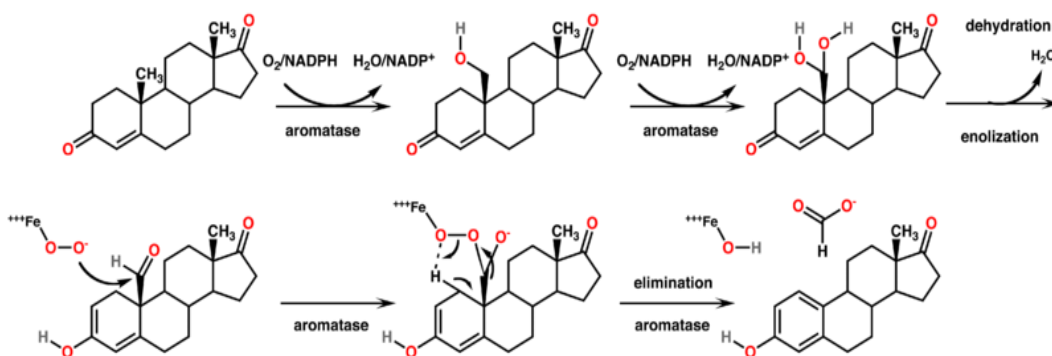


Figura 14. Biosíntesis de estrógenos.

Las mutaciones en este gen pueden resultar en un aumento o disminución de la actividad aromatasas; los fenotipos asociados sugieren que el estrógeno funciona tanto como una hormona esteroide sexual como un factor de crecimiento y diferenciación. Este gen expresa las dos variantes de la transcripción (facilitado por RefSeq, Mayo 2014).

Se ha descrito un síndrome causado por una mutación del gen CYP19 que es heredado de una forma autosómica recesiva: *Síndrome de deficiencia de la aromatasas*. La acumulación de andrógenos durante el embarazo puede llevar a una virilización de una mujer al nacer. Las mujeres tendrán amenorrea primaria y los individuos de ambos sexos son altos, ya que la falta de estrógenos no llevará la epífisis al cierre.

En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de los siguientes polimorfismos del CYP19A1:

1.7.2.1. rs4646

El SNP rs4646, en posición chr15:51502844-51502844, es una variante 3' UTR A>C. El alelo C (o G) ha sido asociado con aumento de niveles de estrógenos (Raskin et al., 2009). Recientemente se ha publicado que la frecuencia G-G del haplotipo establecido entre rs4646-rs700518 es significativamente mayor en mujeres con preeclampsia en comparación con muestras control (Shimodaira et al., 2012).

Las frecuencias poblacionales alélicas de 5 sub-poblaciones Europeas del rs4646 se encuentran expresadas en la **Figura 15** («1000 Genomes browser: Homo sapiens - Population genetics – rs4646 (SNP)», s. f.).

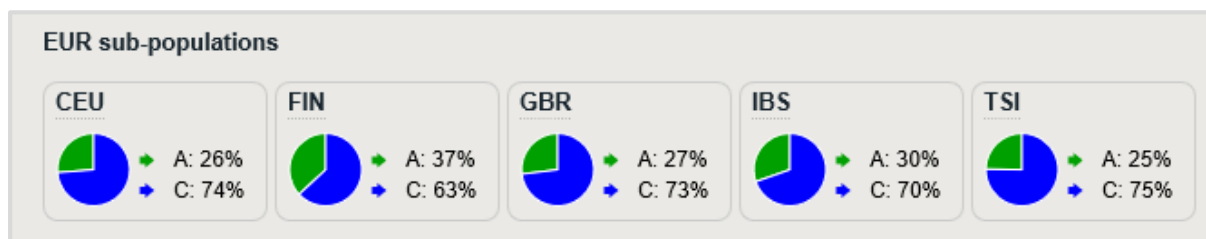


Figura 15. Frecuencias sub-poblacionales Europeas de rs4646. CEU= Utah Residents (CEPH) with Northern and Western European Ancestry, FIN= Finnish in Finland, GBR= British in England and Scotland, IBS= Iberian Population in Spain, TSI= Toscani in Italia.

1.7.2.2. rs10046

El polimorfismo rs10046 del gen de la aromatasa se localiza en la región 3'-UTR G>A del gen CYP19A1 (chr15:51502986-51502986). El alelo A (o T) ha sido relacionado con mayor actividad enzimática al parecer mediada por un aumento de los niveles de ARNm de CYP19A1 (Fasching et al., 2008). Por otro lado, Dunning et al. (2004) encontraron en mujeres postmenopáusicas que el SNP rs10046 fue un factor predictivo de diferentes niveles de estradiol, estrona, y ratio estradiol:testosterona, aunque este polimorfismo solo está presente en el 1,6% de la varianza total. Además, y en relación al tema que nos ocupa, Cupisti et al. (2009), publica el primer estudio que identifica este polimorfismo de la aromatasa y su asociación con el riesgo de AEs.

Las frecuencias poblacionales alélicas de 5 sub-poblaciones Europeas del rs10046 se encuentran expresadas en la **Figura 16** («1000 Genomes browser: Homo sapiens - Population genetics – rs10046 (SNP)», s. f.).

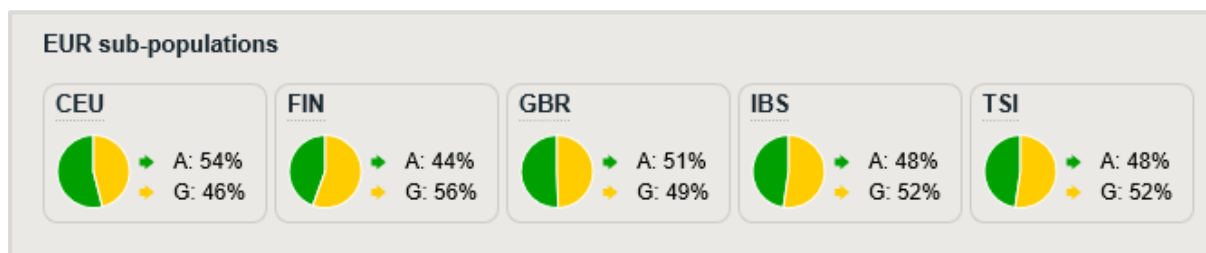


Figura 16. Frecuencias sub-poblacionales Europeas de rs10046. CEU= Utah Residents (CEPH) with Northern and Western European Ancestry, FIN= Finnish in Finland, GBR= British in England and Scotland, IBS= Iberian Population in Spain, TSI= Toscani in Italia.

1.7.2.3. rs2236722

El SNP rs2236722, ubicado en chr15:51534995-51534995, es una variante C>T que corresponde a una mutación de sentido equivocado por sustitución de triptófano por arginina en el codón 39 (Trp39Arg, también denominado W39R). Hasta el momento solo se ha asociado este polimorfismo en mujeres japonesas con cáncer de mama, mostrándose la variante del alelo arginina como un factor protector de su desarrollo (Hamaguchi et al., 2008). Parece ser que este hecho está relacionado con un estudio experimental in vitro realizado por Nativelle-Serpentini, Lambard, Séralini y Sourdain (2002), donde se concluye que la variante mutada R codifica una proteína aromatasa inactiva, lo que deriva a una incapacidad de síntesis de estrógenos, lo cual está relacionado con el menor riesgo de desarrollo de cáncer de mama estrógeno dependiente (Nativelle-Serpentini et al., 2002).

Las frecuencias poblacionales alélicas de 5 sub-poblaciones Europeas del rs2236722 se encuentran expresadas en la **Figura 17** («1000 Genomes browser: Homo sapiens - Population genetics – rs2236722 (SNP)», s. f.).

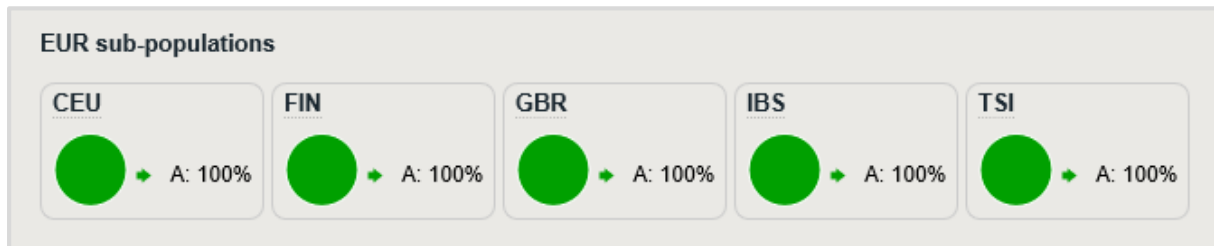


Figura 17. Frecuencias sub-poblacionales Europeas de rs2236722. CEU= Utah Residents (CEPH) with Northern and Western European Ancestry, FIN= Finnish in Finland, GBR= British in England and Scotland, IBS= Iberian Population in Spain, TSI= Toscani in Italia.

1.7.3. ESR1

Este gen, localizado en el cromosoma 6q25.1 y constituido por 8 exones de más de 140 kb, codifica el receptor humano de estrógenos 1 (también denominado *forma alfa*). Se compone de varios dominios importantes para la unión de la hormona, el ADN y la activación de la transcripción. La proteína codificada se localiza en el interior de la célula, en el núcleo, donde se puede formar un homodímero o un heterodímero con el receptor de estrógenos tipo 2 (facilitado por RefSeq, Marzo 2014).

La principal función del receptor de estrógeno es la de actuar como factor de transcripción que se une al ADN con el fin de regular la expresión génica. Sin embargo, el receptor de estrógeno presenta funciones adicionales independientes de la unión a ADN. El receptor ER α es expresado mayoritariamente en endometrio, células de cáncer de mama, células del estroma ovárico e hipotálamo.

Se han descrito hasta 3 isoformas del ER α obtenidas mediante splicing alternativo. Los genes del receptor de estrógenos albergan diversas variaciones de la secuencia de ADN

que pueden influir en el riesgo de desarrollar trastornos ginecológicos asociados a la infertilidad y resultados negativos en FIV (Altmäe et al., 2007). Mutaciones en este gen dan lugar al denominado *Síndrome de resistencia a estrógenos*.

El intrón 1 del ESR1 contiene dos polimorfismos de un solo nucleótido en los sitios de restricción: XbaI (A/G) y PvuII (T/C), rs9340799 y rs2234693 respectivamente (**Figura 18**). Estos dos polimorfismos están separados entre sí 50pb y están en desequilibrio de ligamiento (Ayvaz, Ekmekçi, Baltacı, Onen & Unsal, 2009).

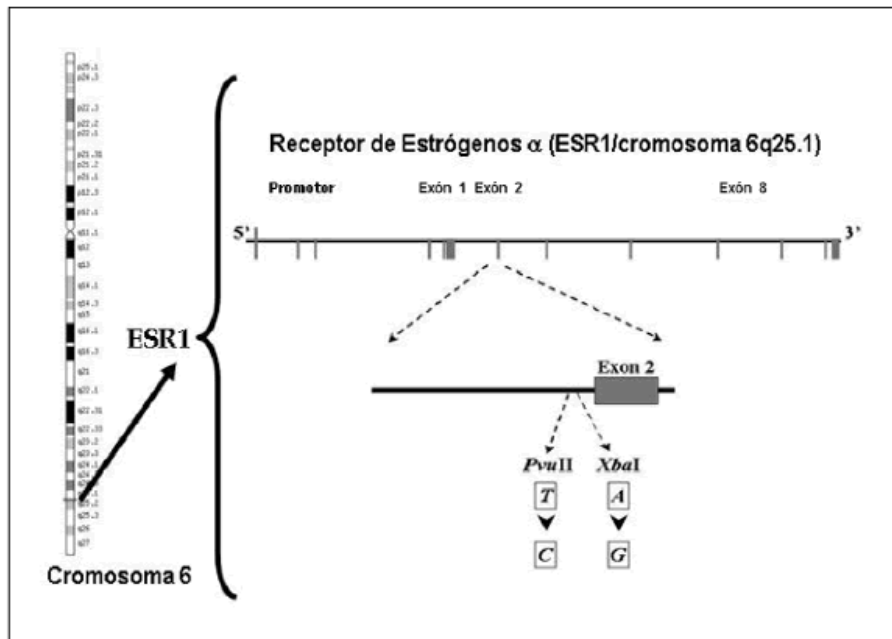


Figura 18. Receptor de Estrógenos α (ESR1).

A continuación describimos los polimorfismos objeto de estudio:

1.7.3.1. rs9340799

El SNP rs9340799 [XbaI (A/G)], ubicado chr6:152163381-152163381, es una variante 351A>G intrónica. Aunque la mutación es silenciosa, y no causa sustitución de

aminoácidos, puede estar en desequilibrio de ligamiento con otras mutaciones del ESR1, y afectar tanto la expresión del gen como su función (Ayvaz et al, 2009). Se ha demostrado que este SNP puede alterar la expresión del receptor e incluso modificar el sitio de unión del factor de transcripción (Maruyama et al., 2000 y Herrington et al., 2002).

El locus XbaI de ESR1 está asociado con endometriosis (Hsieh, Wang, Chang & Lin, 2007) y con fracaso en el resultado tras técnicas de reproducción asistida (Georgiou, Konstantelli, Syrrou, Messinis & Lolis, 1997; Sundarrajan, Liao, Roy & Ng, 1999).

Las frecuencias poblacionales alélicas de 5 sub-poblaciones Europeas del rs9340799 se encuentran expresadas en la **Figura 19** («1000 Genomes browser: Homo sapiens - Population genetics – rs9340799 (SNP)», s. f.).

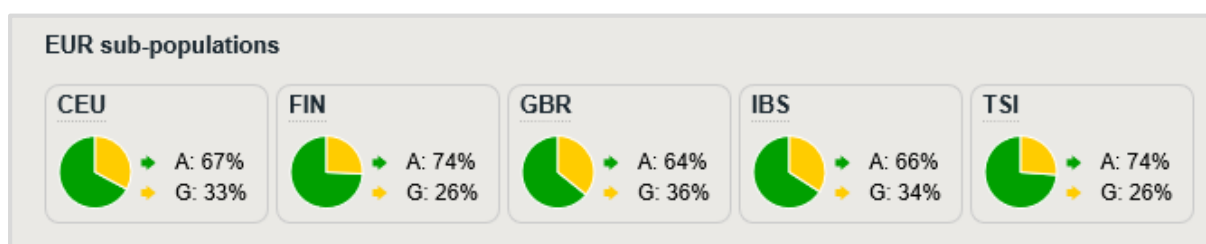


Figura 19. Frecuencias sub-poblacionales Europeas de rs9340799. CEU= Utah Residents (CEPH) with Northern and Western European Ancestry, FIN= Finnish in Finland, GBR= British in England and Scotland, IBS= Iberian Population in Spain, TSI= Toscani in Italia.

1.7.3.2. rs2234693

El SNP rs2234693 [PvuII (T/C)], ubicado chr6:152163335-152163335, es una variante 397T>C intrónica.

El polimorfismo PvuII parece estar asociado en varones a azoospermia u oligospermia severa idiopática (Kukuvitis et al., 2002).

Las frecuencias poblacionales alélicas de 5 sub-poblaciones Europeas del rs2234693 se encuentran expresadas en la **Figura 20** («1000 Genomes browser: Homo sapiens - Population genetics – rs2234693 (SNP)», s. f.).

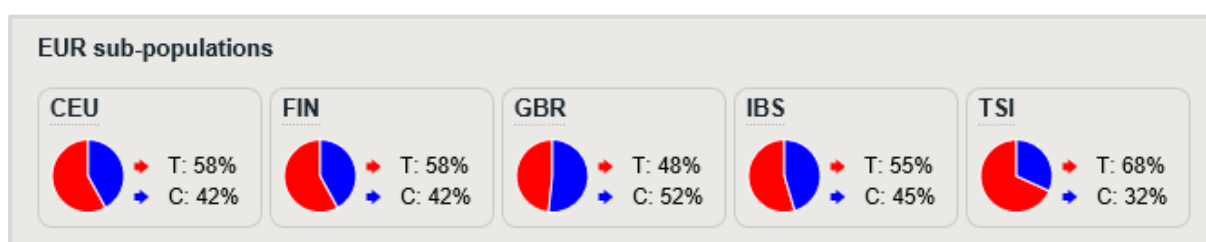


Figura 20. Frecuencias sub-poblacionales Europeas de rs2234693. CEU= Utah Residents (CEPH) with Northern and Western European Ancestry, FIN= Finnish in Finland, GBR= British in England and Scotland, IBS= Iberian Population in Spain, TSI= Toscani in Italia.

1.7.3.3. rs6932902

El SNP rs6932902, ubicado chr6:152376524-152376524, es una variante A>G intrónica.

Se ha asociado con diferentes rangos de severidad de criptorquidia pero no con la ocurrencia de ésta (Wang et al., 2008). Además, la copia materna de la variante parece estar asociada con un mayor riesgo de hipospadias en hijos de padres con dicho SNP. Esto sugiere que los alelos maternos de ESR1 se expresa más plenamente que el alelo derivado del padre. Aunque ESR1 no es uno de los genes impresos conocidos actualmente, la identificación experimental de este tipo de genes sigue siendo un reto, ya que la expresión monoalélica de los genes impresos puede ocurrir sólo en determinados tejidos, en etapas particulares del

desarrollo, o en alguna de la isoformas. Por lo tanto, es poco probable que todos los genes impresos humanos sean ya conocidos (Van der Zanden et al., 2012).

Las frecuencias poblacionales alélicas de 5 sub-poblaciones Europeas del rs6932902 se encuentran expresadas en la **Figura 21** («1000 Genomes browser: Homo sapiens - Population genetics – rs6932902 (SNP)», s. f.).

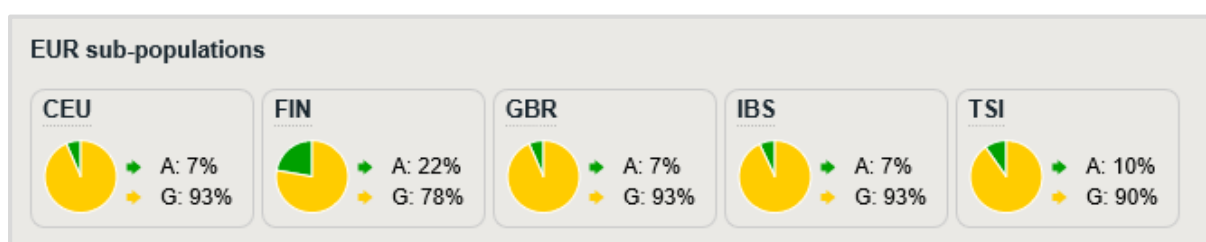


Figura 21. Frecuencias sub-poblacionales Europeas de rs6932902. CEU= Utah Residents (CEPH) with Northern and Western European Ancestry, FIN= Finnish in Finland, GBR= British in England and Scotland, IBS= Iberian Population in Spain, TSI= Toscani in Italia.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La incidencia de interrupciones del desarrollo reproductivo es un proceso frecuente en el embarazo (entre el 4% y el 10%, dependiendo del periodo de gestación). Mientras que las infecciones, la toxicidad química y farmacológica, desórdenes endocrinos, enfermedades maternas (fibromas uterinos, diabetes mellitus, trastornos tiroideos, trombofilias, anticuerpos antifosfolípido y anticoagulante lúpico, hiperhomocisteinemia, hipertermia materna...) y otros factores han sido considerados como un impacto negativo para el desarrollo embrionario, es evidente que los factores genéticos juegan un papel muy importante en el AE. En particular, se sabe que las anomalías cromosómicas son causa frecuente de AE.

Sin embargo, una vez descartadas las patologías anteriormente mencionadas queda un porcentaje de AE donde no se encuentra causa etiológica. El creciente desarrollo de la genética está demostrando que ciertos polimorfismos genéticos maternos o fetales pueden relacionarse con esos AEs no clasificables (ver introducción).

2.1. HIPÓTESIS

En nuestro trabajo nos hemos centrado en el estudio de 8 polimorfismos relacionados con el metabolismo de las hormonas sexuales en el feto y su relación con los AE de causa desconocida, bajo la hipótesis de que un *desequilibrio en la producción de hormonas sexuales en el feto está implicada en la interrupción de la gestación*.

Para ello se han seleccionado muestras de tejido fetal procedentes de AE de causa desconocida y se han estudiado varios polimorfismos de dos enzimas presentes en dicho eje hormonal y un receptor:

- La enzima 5α -reductasa (**SRD5A2**), que cataliza la conversión de testosterona en dihidrotestosterona;
- La enzima aromatasa (**CYP19A1**), responsable de la conversión de testosterona en estradiol; y
- El receptor de estrógenos tipo 1 (**ESR1**).

2.2. OBJETIVOS

Demostrar la asociación de variaciones genéticas polimórficas con **Abortos Espontáneos de causa desconocida** en muestras fetales, por sus *segregaciones alélicas* y *genotípicas* en valoraciones; **individuales, en interacciones y haplotipos**, aplicando dos perspectivas:

- 1) Asociación de la **edad gestacional** del aborto con las variaciones polimórficas seleccionadas,
- 2) Asociación del **sexo fetal** a las variantes estudiadas y su relación con la edad gestacional.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. TIPO DE ESTUDIO

El estudio realizado es de tipo epidemiológico, observacional, retrospectivo de **casos y controles**. Fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario Virgen de la Victoria (Málaga). Las muestras del grupo control fueron obtenidas con el consentimiento informado por escrito de los sujetos. El estudio se hizo conforme a la *declaración de Helsinki* (General Assembly of the World Medical Association, 2014).

3.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO

3.2.1. Grupo Fetal

El grupo de estudio consistió en **206 muestras de tejidos fetales de AE** de entre los años 2009 y 2010, fijados en formol tamponado neutro e incluidos en parafina, obtenidos del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Materno-Infantil del Centro Regional Hospitalario Carlos de Haya (Málaga).

3.2.1.1. Procedimiento para la recogida

- A. Búsqueda de los estudios correspondientes a abortos mediante el programa informático PAT-Win v.3.4.1 en el registro de biopsias histopatológicas del Hospital Materno Infantil de Málaga.
- B. Filtraje mediante criterios de inclusión-exclusión (detallado en el siguiente apartado) de AE de causa desconocida y búsqueda de las preparaciones histológicas seleccionadas.
- C. Corte con micrótopo en secciones de 3-4 μm y tinción con hematoxilina-eosina. El orden preferente de elección del tipo de tejido fue: timo, otros y por último macerado.
- D. Observación de las preparaciones teñidas al microscopio óptico y selección de tejido embrionario o fetal (sin contaminación de placenta, decidua u otros tejidos). Fue frecuente la observación de cambios involutivos en la placenta producidos tras la muerte fetal y autólisis más o menos avanzada en el tejido fetal.

- E. Búsqueda de los **bloques de parafina seleccionados** como válidos y corte de los mismos con microtomo en **secciones de 15-20 μm** . Etiquetado con el número de biopsia de los archivos de anatomía patológica.
- F. Recogida de datos en tabla: año, número de biopsia, bloque de parafina seleccionado, edad gestacional, edad materna, y datos resultantes del estudio histopatológico.

3.2.2. Grupo Control

El grupo control fue constituido por una población de **331 estudiantes** universitarios voluntarios de la Facultad de Medicina (Universidad de Málaga) de raza blanca, sanos y europeos, nacidos en Málaga en la década de los noventa, con una media de edad 20,73 años y una desviación típica de 2,69 años. La generación de los alumnos correspondería a la del grupo fetal teniendo en cuenta el año de procedencia de la muestra. El 42% del grupo control eran varones y el 58% mujeres.

Hemos considerado por tanto, que el grupo de alumnos ha tenido la misma probabilidad de exposición a la variable independiente de nuestro estudio (AE) que la experimentada por el caso, tanto en cantidad como en oportunidad.

3.2.2.1. Procedimiento para la recogida

Extracción de **células epiteliales de saliva** mediante frotis con hisopos estériles en seco de la mucosa bucal.

Se realizaron dos tomas: con un hisopo se frotó la cara interna del carrillo derecho y con el otro, la cara interna del carrillo izquierdo. Los hisopos correctamente identificados se dejaron secar a temperatura ambiente en un lugar protegido. No se introdujeron en sus

respectivas fundas hasta no estar completamente secos, para evitar proliferaciones bacterianas con la humedad y posterior degradación del ADN.

La recogida de la muestra se realizó media hora antes de ingerir o beber cualquier alimento o bebida.

3.3. EVALUACIÓN CLÍNICA

3.3.1. Criterios de inclusión

3.3.1.1. Grupo Fetal

Estas muestras fueron seleccionadas por el control previo de la **historia clínica**, y estableciendo como criterio de inclusión:

- Confirmación histológica de AE de **igual o menos de 24 semanas** de gestación (± 2 semanas).
- **Etiología desconocida**. Para establecer la causa desconocida de los abortos nos basamos en la historia clínica del padre y madre, ausencia de enfermedades gestacionales (preeclampsia, traumatismos, infecciones, trombosis...) y en el análisis histológico de los tejidos fetales.

3.3.1.2. Grupo Control

- Todos los individuos seleccionados son europeos.
- Residentes en Málaga (sur de España).
- Los padres y abuelos de los incluidos son también europeos y nacidos en España.
- Firma del consentimiento informado.

3.3.2. Criterios de exclusión

3.3.2.1. Grupo Fetal

Las siguientes patologías fueron descartadas:

- Acráneo
- Agenesia renal
- Anencéfalo
- Bridas amnióticas
- Coriamnionitis
- Degeneración hidrópica
- Desprendimiento placenta
- Embarazo tubárico
- Eritroblastosis
- Feto mal formado
- Higroma quísticoconucal
- Hipoplasia pulmonar
- Isoinmunización RH
- Labio leporino
- Mola parcial
- Neumonía/Bronconeumonía
- Onfalocele
- Quistes bucales
- Raquisquisis
- Riñón pélvico
- Siringomelia
- Toxoplasmosis congénita
- Villitas aguda
- Villitas crónica necrotizante

Además se excluyeron los productos del aborto de madres con historia clínica de **abortos de repetición** o que habían sido sometidas a **tratamientos de reproducción asistida** en años anteriores.

3.3.2.2. Grupo Control

- Limitación intelectual o social para la comprensión y/o seguimiento del estudio.
- Fueron rechazados del estudio todos los sujetos que demostraron padecer o haber padecido enfermedades hepáticas, renales, gastrointestinales y/o cardiovasculares, así como los que informaron haber recibido tratamiento de algún tipo tres meses antes del estudio.

3.4. DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS

3.4.1. Extracción de DNA

Para la extracción de DNA de las muestras del grupo fetal y control se llevaron a cabo dos protocolos normalizados de trabajo diferentes debido a las distintas características de éstas.

En el grupo fetal, el estudio genético de los productos del embarazo abortado es muy complejo, ya que el tiempo transcurrido desde que el aborto tiene lugar y las alteraciones consecuentes a una maniobra evacuadora (generalmente un legrado) impiden habitualmente un análisis adecuado del material.

3.4.1.1. Tejidos parafinados de Abortos Espontáneos (Grupo Fetal)

Las muestras fetales fueron obtenidas de tejidos parafinados y fijados en formol tamponado neutro procedentes de los archivos histológicos de Anatomía Patológica. Los tejidos fueron **previamente desparafinados** mediante tratamiento con xilol (Coura, Prolla, Meurer & Ashton-Prolla, 2005). La extracción de DNA se llevó a cabo mediante técnica de *salting-out* (Miller, Dykes & Polesky, 1988).

Se detalla el protocolo llevado a cabo en las muestras del grupo fetal:

- **Preparación de la muestra e identificación**
 - Cortes en secciones de 15-20 μm siguiendo los criterios de inclusión-exclusión para el grupo fetal anteriormente descritos.
 - Registro de la muestra con su número de identificación en la base de datos.

▪ **Desparafinización**

- Xilol: 1mL (10 min, 65°C).
- Centrifugar a 12000 rpm, 5 min.
- Descartar sobrenadante.

(Repetir proceso anterior 5 veces)

- Etanol Absoluto, 96%, 70%: 1ml. Lavar la muestra con la serie descendente de alcoholes, homogenizando y centrifugando a 12000 rpm, 5 min y descartando sobrenadante.
- Agua destilada: 100µL. Diluir el pellet.
- Tris ClH 1 M, EDTA 100 mM: 1mL (lavar).
- Centrifugar a 13000 rpm, 10 min.
- Descartar sobrenadante.
- Tris ClH 1 M, EDTA 100 mM con SDS 1%: 0.6 mL, Tris ClH 1 M, EDTA 100 mM: 0.6 mL y Proteinasa K: 40 µL.

Añadir al pellet e incubar a 55°C toda la noche. Agitar.

▪ **Extracción DNA (Salting Out)**

- *Precipitación salina en frío:*

En esta etapa se precipitan los restos celulares. Se realiza en frío, introduciendo los viales en hielo picado, y añadiendo la solución salina (NaCl 6M).

1. Añadir 320µL de NaCl 6M (solución de precipitación), agitar los viales e introducir en frío 10 minutos.

2. Centrifugar 3 min, 4°C a máximas rpm.
3. Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo, el DNA está en la solución.
4. Repetir la operación.

— *Precipitación del DNA con isopropanol*

1. Añadir 600 µL de isopropanol y mantener 10 minutos a temperatura ambiente.
Mezclar suavemente.
2. Centrifugar 3 min, 4°C a máximas rpm.
3. Retirar el sobrenadante, el pellet es el DNA precipitado.

— *Etanol 70*

1. Añadir 500µL de EtOH 70°C en frío. Mezclar suavemente.
2. Centrifugar 3min, 4°C a máximas rpm.
3. Retirar el máximo posible de EtOH y secar muy bien antes de la elución.

— *Elución en agua*

1. Añadir 200µL de agua libre de nucleasas a 55°C y dejar media hora en el bloque caliente. Después se mantendrá en agitación a 37°C, 600 rpm durante una hora.

3.4.1.2. Saliva (Grupo Control)

En el grupo control la extracción de DNA se llevó a cabo en saliva mediante el kit comercial *Wizard Genomic DNA purification* (Promega®). El procedimiento consiste básicamente en una lisis celular en presencia de proteinasa K y RNAasa, precipitación de proteínas y precipitación de DNA con isopropanol. El DNA precipitado se seca con etanol y se rehidrata con agua libre de DNAasa.

3.4.2. Análisis de calidad DNA extraído

Una vez extraído el DNA, tanto del grupo fetal como del grupo control, se llevó a cabo un análisis de calidad. Para ello se evaluó concentración, pureza y fragmentación.

3.4.2.1. Concentración y pureza

La cuantificación del DNA se basa en medidas de absorbancia mediante **espectrofotometría**, utilizando el espectro de luz ultravioleta. El método espectrofotométrico está basado en la medida directa de la absorción de la radiación electromagnética por parte de la muestra, siendo ésta cuantificable mediante la correlación de la absorbancia con la concentración del ácido nucleico a determinar. La concentración de ácidos nucleicos se determina midiendo a 260 nm y comparando con un blanco.

Para este trabajo se utilizó el espectrofotómetro de amplio espectro *NanoDrop*®, que mide muestras de 1 µl con alta precisión y reproducibilidad mediante métodos de tensión superficial.

Dado que la absorbancia máxima (A) de las soluciones de ADN y ARN corresponde a 260 nm y la de las soluciones de proteínas es a 280 nm, el cociente de los valores obtenidos a 260 nm y a 280 nm (A_{260}/A_{280}) proporciona una estimación del grado de pureza de los ácidos nucleicos. Consideramos una extracción lo suficientemente pura para el análisis de polimorfismos los valores obtenidos de A_{260}/A_{280} **superiores a 1,8**. Si la muestra también contiene proteínas, el cociente A_{260}/A_{280} será considerablemente inferior a dichos valores y no podrá determinarse con exactitud la cantidad de ácidos nucleicos.

3.4.2.2. Fragmentación

Se valoró la integridad del DNA extraído mediante su **visualización en gel de agarosa** al 0,8%. Se eligió un total de 15 muestras al azar para la comprobación.

La totalidad de las muestras pertenecientes al grupo fetal presentaron rasgos de fragmentación pero en todas ellas se evidenció fragmentos superiores a 3000 pb.

La amplificación de ADN a partir de tejidos embebidos en parafina en los servicios de Anatomía Patológica, mediante reacción en cadena de la polimerasa, es afectado por el tipo de fijador y los tiempos empleados (García, Benavente, Melo, Roa & Roa, 2006). Este tratamiento de la muestra repercute negativamente en la integridad del DNA, lo que ha añadido un nivel de dificultad al análisis de polimorfismos en la muestra de tejido fetal.

3.4.3. Determinación de los polimorfismos genéticos a estudiar

En el presente trabajo se han estudiado 2 polimorfismos de SRD5A2 (rs523349, rs9282858), 3 polimorfismo del CYP19A1 (rs4646, rs10046, rs2236722) y 3 polimorfismos del receptor de ESR1 (rs9340799, rs2234693, rs6932902) tanto en el grupo fetal como en el grupo control.

El análisis de SNP se realizó mediante **RT-PCR con sondas TaqMan®** usando una técnica de **microarray** comercializada (*TaqMan® Open Array Genotyping System - Applied Biosystems*). Los resultados obtenidos fueron posteriormente procesados mediante el programa informático *TaqMan Genotyper® Software*.

TaqMan® Open Array Genotyping System (Applied Biosystems) es una plataforma de genotipado de SNPs compuesta por un cargador automático de muestras, un termociclador específico para amplificación en arrays y un sistema de toma de imagen para captura de señal fluorescente de la sonda.

Esta plataforma permite el genotipado masivo de SNPs combinando la química TaqMan® y la nanofluídica en un soporte o array dividido en 48 sub-arrays compuestos por 64 orificios. Así, el array cuenta con 3072 orificios (capacidad de 33 nl retenido por capilaridad) que permite la obtención simultánea de 3072 genotipos. En dichos orificios se

ubican las sondas específicas (previamente seleccionadas por el usuario y sintetizadas por la casa comercial) y se llevan a cabo las reacciones TaqMan® específicas.

Para extraer la información de genotipos se utilizó *TaqMan Genotyper® Software* que permite interpretar los datos de fluorescencia de sondas Taqman por RT-PCR para convertirlos a genotipo.

El flujo de trabajo consistió en la mezcla de las muestras con *TaqMan® OpenArray® Genotyping Master Mix*, el producto se cargó sobre la placa de genotipado previamente diseñada, se selló, se programó el ciclo adecuado y se capturó el resultado en forma de imagen.

Para nuestro estudio, la placa diseñada permitió el genotipado de 64 SNPs (es este trabajo solo se expone 8 de esos SNPs) para cada una de las 48 muestras procesadas simultáneamente. Se consideró como criterio de correcta amplificación la detección de más de 58 SNPs de los 64 estudiados (aproximadamente el 90%) por muestra.

El diseño de las sondas y cebadores utilizados fue realizado por la casa comercial Applied Biosystems en base a las secuencias adyacentes y la zona polimórfica de los SNPs de interés nuestros («TaqMan Search», s. f.).

3.5. ANÁLISIS DE CROMOSOMOPATÍAS EN UNA SUBPOBLACIÓN DE ABORTOS ESPONTÁNEOS

El análisis de cromosomopatías se llevó a cabo en una subpoblación de 94 AEs seleccionados al azar. Para su estudio se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa y fluorescente (**QF-PCR**), que utiliza varios marcadores polimórficos (pequeñas repeticiones en tandem o microsatélites) específicos para cada cromosoma. Se analizaron los marcadores clásicos de las aneuploidías utilizadas en el diagnóstico clínico, **13, 18, 21 X e Y** y además se añadieron marcadores de los cromosomas **15, 16 y 22**. De esta forma, podemos detectar por encima del 70% de las cromosomopatías más prevalentes encontradas en AEs (Quiroga de Michelena et al., 2007; Fritz et al., 2001).

Para ello el DNA fetal se amplificó en **tres reacciones de multiplex** (A, B y C). La mezcla de cebadores que se utilizó en cada reacción, así como su secuencia, concentración y marcador fluorescente se muestra en la **Tabla 1**.

Las condiciones de PCR llevadas a cabo fueron: 100 ng de ADNg, 1X TaqGold Buffer, 1,5 mM de Cl₂Mg, 200nM de dNTPs, 3 µl de la mezcla de primers (**Tabla 1**) y 2U de *Amplitaq Gold DNA Polimerase* (Applied Biosystems).

La reacción de PCR de cada marcador se ha estudiado individualmente en el termociclador con gradiente de temperatura *Perkin-Elmer 9600*®. El análisis tiene las mismas condiciones de amplificación para las 3 mezclas. La amplificación se llevó a cabo en termociclador ABI2720 (Applied Biosystems) usando: 94°C 10 min, seguido de 32 ciclos de 94°C 1 min, 58°C 1min, 72°C 1 min, con una extensión final de 15 min a 72°C (**Tabla 2**). Los productos de las reacciones fueron analizados utilizando un secuenciador automático

ABI 3130 (Applied Biosystems). El tamaño de los alelos y las áreas de cada uno de ellos fue determinado y revisado con el software *Genotyper Versión 4.0* (Applied Biosystems). Se ha incluido un control negativo (H₂O) en todas las series de trabajo.

Tabla 1. Secuencia de los cebadores, concentración de éstos y posición en el cromosoma en cada mezcla de reacción multiplex (A, B y C).

NOMBRE	MEZCLA	SECUENCIA CEBADORES	CONCENTRACIÓN	LOCALIZACIÓN
D13S742 Fwd	A	PET -ATAACTGGGCTAGGAATGGAAATA	55nM	13q12.12
D13S742 Rev	A	GACTTCCCAATTCAGGAGGACT	55nM	13q12.12
D13S258 Fwd	A	FAM -ACCTGCCAAATTTTACCAGG	35nM	13q21
D13S258 Rev	A	GACAGAGAGAGGGAATAAACCC	35nM	13q21
D13S631 Fwd	A	PET -GGCAACAAGAGCAAAACTCT	35nM	13q31-32
D13S631 Rev	A	TAGCCCTCACCATGATTGG	35nM	13q31-32
D13S628 Fwd	A	FAM -TAACATTCATTGTCCCTTACAGAT	110nM	13q31-q32
D13S628 Rev	A	GCAAGGCTATCTAACGATAATTCA	110nM	13q31-q32
D18S391 Fwd	A	PET -GGACTTACCACAGGCAATGTGACT	35nM	18pter-18p11.22
D18S391 Rev	A	TAGACTTCACTATTCCCATCTGAG	35nM	18pter-18p11.22
D18S535 Fwd	A	NED -TCATGTGACAAAAGCCACAC	70nM	18q12.2
D18S535 Rev	A	AGACAGAAATATAGATGAAATGCA	70nM	18q12.2
D18S858 Fwd	A	FAM -AGCTGGAGAGGGATAGCATT	55nM	18q21.1
D18S858 Rev	A	TGCATTGCATGAAAGTAGGA	55nM	18q21.1
D18S499 Fwd	A	FAM -CTGCACAACATAGTGAGACCTG	70nM	18q21.32-q21.33
D18S499 Rev	A	AGATTACCCAGAAATGAGATCAGC	70nM	18q21.32-q21.33
D18S390 Fwd	A	NED -TAACCAAAGCAAATCCCTGG	30nM	18q22.2
D18S390 Rev	A	CACTTACTGTTATCCCTGG	30nM	18q22.2
D21S1435 Fwd	A	VIC -CCCTCTCAATTGTTTGTCTACC	35nM	21q21
D21S1435 Rev	A	GCAAGAGATTTCAATGCCAT	35nM	21q21
D21S1437 Fwd	A	FAM -ATGTACATGTGTCTGGGAAGG	40nM	21q21.1
D21S1437 Rev	A	TTCTCTACATATTTACTGCCAACA	40nM	21q21.1
DXYS218 Fwd	A	VIC -TGTGTTTGGGTTTCTCTGTC	70nM	Xp22.32 Yp11.3
DXYS218 Rev	A	AGCGAAACTCCGCTCAAAAATA	70nM	Xp22.32 Yp11.3
DXS 6803 Fwd	A	VIC -GAAATGTGCTTTGACAGGAA	70nM	Xq12-Xp21.33
DXS 6803 Rev	A	CAAAAAGGGACATATGCTACTT	70nM	Xq12-Xp21.33
X22 Fwd	A	VIC -TCTGTTTAAATGAGAGTTGAAAGAAA	70nM	Xq28 Yq
X22 Rev	A	ATTGTTGCTACTTGAGACTTGGTG	70nM	Xq28 Yq
SRY Fwd	B	VIC -AGTAAAGGCAACGTCCAGGAT	55nM	Yp11.31
SRY Rev	B	TTCCGACGAGGTCGATACTTA	55nM	Yp11.31
D13S305 Fwd	B	VIC -GCCTGTTTGAGGACCTGTCGTTA	55nM	13q12.1-13q14.1
D13S305 Rev	B	TGGTTATAGAGCATTAAGGCAC	55nM	13q12.1-13q14.1
D13S634 Fwd	B	NED -TCCAGATAGGCAGATTCAAT	170nM	13q14.3
D13S634 Rev	B	CCTTCTTCTTCCATTGATA	170nM	13q14.3
D18S1002 Fwd	B	FAM -CAAAGAGTGAATGCTGTACAACAGC	70nM	18q11.2
D18S1002 Rev	B	CAAGATGTGAGTGTGCTTTTCAAGGAG	70nM	18q11.2
D18S386 Fwd	B	PET -TCAGGAGAAATCACTTGGAAC	90nM	18q22.1
D18S386 Rev	B	TCCATGAAGTAGCTAAGCAG	90nM	18q22.1
D21S1414 Fwd	B	FAM -CAATTCGCCAAGTGAATTGCCTTC	70nM	21q21
D21S1414 Rev	B	AAATTAGTGTCTGGACCCAGTA	70nM	21q21
D21S1809 Fwd	B	NED -TACCCAAGGTGACAGACACC	40nM	21q21.1
D21S1809 Rev	B	GAGCAGGTTGTCCTACCTCA	40nM	21q21.1
D21S1412 Fwd	B	VIC -CGGAGGTTGAGTGAGTTG	40nM	21q22.2
D21S1412 Rev	B	GGGAAAGCTATGGAGGAGA	40nM	21q22.2
D21S1411 Fwd	B	PET -AATGTGTGTCCTTCCAGGC	90nM	21q22.3
D21S1411 Rev	B	GTAGATACATACATATGATGAATGC	90nM	21q22.3

Fwd = Forward (cebador 5') Rev = Reverse (cebador 3'). En color aparecen los marcadores fluorescentes.

Tabla 1.- Cont. Secuencia de los cebadores, concentración de éstos y posición en el cromosoma en cada mezcla de reacción multiplex (A, B y C).

NOMBRE	MEZCLA	SECUENCIA CEBADORES	CONCENTRACIÓN	LOCALIZACIÓN
D21S1446 Fwd	B	FAM-ATGTACGATACGTAATACTTGACAA	90nM	21q22.3-ter
D21S1446 Rev	B	GTCCCAAAGGACCTGCTC	90nM	21q22.3-ter
DXYS 6809 Fwd	B	FAM-TGAACCTTCCTAGCTCAGGA	55nM	Xp
DXYS 6809 Rev	B	TCTGGAGAATCCAATTTTGC	55nM	Xp
AMXY Fwd	B	NED-CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG	40nM	Xp22.1-22.3
AMXY Rev	B	ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG	40nM	Xp22.1-22.3
SBMA Fwd	B	FAM-GCTGTGAAGGTTGCTGTTCTCAT	55nM	Xq11.2-Xq12
SBMA Rev	B	TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC	55nM	Xq11.2-Xq12
HPRT Fwd	B	VIC-ATGCCACAGATAATACACATCCCC	35nM	Xq26.1
HPRT Rev	B	CTCTCCAGAATAGTTAGATGTFAGG	35nM	Xq26.1
D15S1050 Fwd	C	FAM-TGGAACATCTGTCATAGTGG	150nM	15q
D15S1050 Rev	C	TCCCTGTTTAATCATCTTCA	150nM	15q
D15S818 Fwd	C	VIC-TGTGCATCCTCTATGTCCCT	20nM	15q22
D15S818 Rev	C	GCTAAGATGGCGCCATTG	20nM	15q22
D15S123 Fwd	C	VIC-AGCTGAACCCAATGGACT	40nM	15q22.33
D15S123 Rev	C	TTTCATGCCACCAACAAA	40nM	15q22.33
D15S816 Fwd	C	FAM-AATAGAAACACAGGAGATCTCTTT	40nM	15q25
D15S816 Rev	C	GTCAGGCGAGTTTTTGAAGA	40nM	15q25
D16S764 Fwd	C	VIC-TTGTAAAGTGAGGCATGATG	80nM	16p13.1
D16S764 Rev	C	CTGTGCTTGGACCTGAAGAT	80nM	16p13.1
D16S490 Fwd	C	FAM-TGACAGGCACATAGATTATTATGC	70nM	16p13.3
D16S490 Rev	C	CGTACCCGGCTGATTATTTTAGAT	70nM	16p13.3
D16S2624 Fwd	C	VIC-TGAGGCAATTTGTTACAGAGC	40nM	16q22.3
D16S2624 Rev	C	TAATGTACCTGGTACCAAAAACA	40nM	16q22.3
D16S2621 Fwd	C	VIC-GTCATATGGGCCAATCCC	35nM	16q24.2
D16S2621 Rev	C	TACCGCGTAGTGAGACTGTG	35nM	16q24.2
D22S685 Fwd	C	FAM-TTCTTAGTGGGGAAGGATC	80nM	22q11
D22S685 Rev	C	TGAGITTTGATGTTTTTGATAGACA	80nM	22q11
D22S444 Fwd	C	FAM-TTTGAACTAAGCCTTAAAAATGC	20nM	22q12
D22S444 Rev	C	TGTTTGGCTTGAAGAAGGAG	20nM	22q12
D22S684 Fwd	C	FAM-CCCTCTCCCTCTCTTACAGG	20nM	22q12
D22S684 Rev	C	TTCTTAGTGGGGAAGGATC	20nM	22q12
D22S280 Fwd	C	VIC-GCTCCAGCCTATCAGGATG	40nM	22q13
D22S280 Rev	C	GATTCCAGATCACA AAACTGGT	40nM	22q13

Fwd = Forward (cebador 5') Rev = Reverse (cebador 3'). En color aparecen los marcadores fluorescentes.

Tabla 2. Condiciones de amplificación de las 3 mezclas de reacción en cadena de la polimerasa multiplex.

Reacción	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización y activación Taq	94°C	10min	1
Amplificación	94°C	1min	32
	58°C	1min	
	72°C	1min	
Extensión final y adición adenina	72°C	15min	1

3.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Para calcular la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas y el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) de cada polimorfismo entre casos y controles se utilizó el test **chi² de Pearson**.

Para el estudio de asociación entre polimorfismos y AE se realizó un **modelo de regresión logística**.

Para escoger el modelo de herencia en cada genotipo (codominante, dominante, recesivo, sobredominante) se utilizó el **Criterio de Información de Akaike (AIC)** y el **criterio de Información Bayesiano (BIC)**.

Para calcular la odd ratio (OR) con un 95% de intervalo de confianza de cada genotipo y de las interacciones entre ellos se utilizó el **test de Cochran's-Haenzel**.

El método utilizado para realizar la estimación estadística de frecuencias haplotípicas fue el **algoritmo esperanza-maximización (EM)** y el análisis de asociación con la enfermedad se llevó a cabo mediante **modelos de regresión logística**.

Para estimar diferencias en la aparición de los AEs en los genotipos de riesgo significativo se usó el **método de Kapla-Meier** y el **test de Mantel-Cox**.

Todo esto fue calculado mediante los paquetes estadísticos **SNPStats** («SNPStats: your web tool for SNP analysis», s. f.) y **SPSS 22.0.2**.

Los resultados obtenidos en los distintos grupos se han expresado como frecuencias o como porcentajes y los datos que corresponden a parámetros de las características de los individuos estudiados se han expresado como la media \pm la desviación típica.

3.6.1. Análisis descriptivo de polimorfismos

Un polimorfismo se caracteriza porque diferentes individuos presentan distintos nucleótidos o variantes en una posición concreta del genoma, que se denomina locus. A cada posible variante se le denomina alelo. La pareja de alelos observada en un individuo se denomina genotipo. Los individuos con los 2 alelos idénticos se denominan homocigotos y los que tienen diferentes alelos heterocigotos. En general se considera variante al alelo menos frecuente, pero esto puede diferir de una población a otra.

La descripción estadística de un polimorfismo consiste, en primer lugar, en estimar la prevalencia en la población de cada alelo y de cada genotipo posible, lo que en nomenclatura genética se denomina estimar las **frecuencias alélicas y genotípicas**, respectivamente. Las técnicas de laboratorio permiten determinar el genotipo de cada individuo. Las frecuencias genotípicas, por tanto, se estiman directamente calculando la proporción de individuos con cada genotipo. Para estimar las frecuencias alélicas simplemente se duplica la muestra tomando como unidad de observación el cromosoma (cada individuo contribuye con 2 cromosomas) y se calcula la proporción de cada alelo.

3.6.2. Equilibrio de Hardy-Weinberg

El principio de equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) determina qué frecuencias deben observarse en la población para cada genotipo (homocigoto salvaje, heterocigoto u homocigoto mutado) en función de las frecuencias de los alelos. En condiciones habituales, si la transmisión de los alelos de los progenitores a los descendientes es independiente y no ocurren fenómenos distorsionadores, como la aparición frecuente de nuevas mutaciones o la selección de alelos, la probabilidad de observar una combinación de alelos concreta (un genotipo) depende del producto de las probabilidades (frecuencias) de cada alelo. Estas

frecuencias esperadas (E) se pueden comparar con las observadas (O) utilizando el **test de la χ^2** :

$$EHW = \Sigma(O-E)^2/E, \text{ con 1 grado de libertad.}$$

En el caso más sencillo, con un locus con dos alelos A y a, con frecuencias alélicas de p y q respectivamente, el EHW predice que la frecuencia genotípica para el homocigoto salvaje AA es p^2 , la del heterocigoto Aa es $2pq$ y la del homocigoto mutado aa, es q^2 . El principio de Hardy-Weinberg es una expresión de la noción de una población que está en "equilibrio genético", y es un principio básico de la genética de poblaciones.

Antes de realizar un análisis de asociación se debe comprobar si se cumple el principio de EHW en la muestra de controles (como representantes de la población general). En el caso de que se observara una desviación del equilibrio se debería revisar el método de genotipificación, pues en ocasiones se producen sesgos al interpretar los resultados por ser más fácil de detectar un genotipo que otros. Otras posibilidades son que los individuos no sean independientes (p. ej., por consanguinidad) o que se dé una selección de un alelo (p. ej., por estar asociado con la longevidad). Tampoco debe olvidarse que si empleamos un nivel de significación del 5%, por azar puede observarse falta de ajuste al esperado, aunque la condición de transmisión de alelos con independencia sea correcta en la población del estudio. En la muestra de casos es posible que no se cumpla el EHW; ello puede ser indicativo de que el polimorfismo pueda estar asociado con la enfermedad.

3.6.3. Análisis de asociación de polimorfismos con la enfermedad

Desde el punto de vista estadístico, un polimorfismo constituye una variable categórica con varios genotipos posibles y se suele considerar como categoría de referencia al grupo de individuos homocigotos para el alelo más frecuente. Para evaluar la asociación

de un polimorfismo con la enfermedad se construye la **tabla de contingencia** correspondiente y se puede contrastar la hipótesis de asociación mediante un **test de la χ^2** . También se pueden calcular las odds ratios (OR) de cada genotipo respecto de la referencia para cuantificar la magnitud de la asociación.

Si es necesario ajustar los análisis por posibles variables de confusión, entonces es preferible emplear **modelos de regresión logística** por su versatilidad. Además, estos modelos permiten evaluar fácilmente si hay interacciones entre el polimorfismo y otros factores.

Llamaremos ahora p a la probabilidad de ser caso, G al polimorfismo (que codificará los diferentes genotipos) y Z a una o más variables por las que se desea ajustar el modelo. El modelo logístico se define por la ecuación:

$$\log[p/(1-p)] = \alpha + \beta G + \gamma Z$$

donde α , β y γ son parámetros estimados.

Supongamos que el polimorfismo G es un SNP en el que el alelo variante C modifica el riesgo de la enfermedad de interés. Ya que cada individuo posee una pareja de alelos, el riesgo asociado con cada genotipo puede depender del número de copias de C , lo que permite definir cinco modelos de herencia posibles cuya verosimilitud se puede explorar mediante una adecuada codificación de los genotipos.

Los 5 modelos principales de herencia posibles, son:

- **Modelo codominante:** Es el más general. Cada genotipo proporciona un riesgo de enfermedad diferente y no aditivo. Se comparan heterocigotos (H_e) y homocigotos variantes (V_a) por separado respecto a los homocigotos del alelo más frecuente. Este modelo emplea 2 coeficientes (grados de libertad) y estima dos ORs, una para H_e y otra para V_a .

$$\log[p/(1-p)] = \alpha + \beta_1He + \beta_2Va + \gamma Z$$

He=Heterocigotos; Va=Homocigotos mutados

- **Modelo dominante:** Supone que una única copia de C es suficiente para modificar el riesgo y que ser portador de 2 copias lo modifica en igual magnitud; es decir, heterocigotos y homocigotos tienen el mismo riesgo.

$$\log[p/(1-p)] = \alpha + \beta Do + \gamma Z$$

Do= Heterocigotos + Homocigotos Mutados

- **Modelo recesivo:** Supone que son necesarias 2 copias de C para modificar el riesgo; por tanto, heterocigotos y homocigotos del alelo más frecuente tienen el mismo riesgo. Se compara la combinación de ellos respecto a los homocigotos del alelo variante:

$$\log[p/(1-p)] = \alpha + \beta Re + \gamma Z$$

Re=Heterocigotos + Homocigotos salvajes

- **Modelo sobredominante:** El heterocigoto se compara con el conjunto de homocigotos salvajes y mutados.

$$\log[p/(1-p)] = \alpha + \beta He + \gamma Z$$

He=Heterocigotos

- **Modelo aditivo:** Supone que cada copia de C modifica el riesgo en una cantidad aditiva (en escala logit); por tanto, los homocigotos CC tienen el doble de riesgo

que los heterocigotos. Se compara la combinación ponderada, donde se da peso 1 a los heterocigotos y peso 2 a los homocigotos CC:

$$\log[p/(1-p)] = \alpha + \beta Ad + \gamma Z$$

3.6.3.1. Elección de modelos de herencia

No es fácil hallar un criterio para establecer el modelo de herencia más adecuado para los 8 polimorfismos estudiados en este trabajo. Habitualmente se suele comparar el ajuste del modelo codominante, que es el más general (2 parámetros), con los demás modelos (1 parámetro). Estas comparaciones pueden realizarse mediante el test de la razón de verosimilitudes. Aun así, a menudo no es posible diferenciar entre varios modelos y se elige el que tenga menor valor del **criterio de información de Akaike** ($AIC = -2\log[L] + \#\text{parámetros}$), donde L es la verosimilitud del modelo. Este criterio pondera el ajuste del modelo ($-2\log L$) con la complejidad (número de parámetros) (Iniesta, Guinó & Moreno, 2005). Los resultados obtenidos al aplicar este criterio, puramente estadístico, deben ser reconsiderados en cada caso particular.

3.6.4. Estudio del desequilibrio de ligamiento

Con frecuencia son varios los polimorfismos que se analizan simultáneamente en un gen o región candidata de un gen. El motivo es que el polimorfismo realmente responsable de influir o modificar el riesgo de la enfermedad puede ser desconocido; por ello se analizan varios polimorfismos para intentar identificarlo. Entre diferentes polimorfismos localizados en el mismo cromosoma y relativamente próximos entre sí suele observarse cierto grado de correlación o asociación estadística denominada **desequilibrio de ligamiento** (linkage disequilibrium). Esta asociación tiene su origen en la meiosis, el proceso de la división

celular que ocurre en la maduración de las células sexuales. Al final del proceso habrá dos gametos, cada gameto con una copia de cada par de cromosomas. Estos cromosomas no son idénticos a los cromosomas de los padres debido al proceso de recombinación (proceso por el que se intercambian fragmentos de diferentes ejemplares de un mismo par de cromosomas). De esta manera, los cromosomas heredados por los hijos son una combinación entre los cromosomas del padre y la madre. La frecuencia de entrecruzamiento por cromosoma es pequeña, de 1 a 4, y depende de su tamaño. La probabilidad de que entre dos loci cercanos se dé una recombinación es baja y, por ello, se observa el desequilibrio de ligamiento, que tiende a disminuir en sucesivas generaciones hasta llegar al equilibrio (independencia estadística).

Así que, los polimorfismos próximos al agente causal de la enfermedad estudio estarán asociados con la enfermedad también, y el análisis completo del locus podría ser muy útil para localizar el polimorfismo causal que está directamente relacionado con la enfermedad.

Para determinar el desequilibrio de ligamiento se calcula la D estadística, es la desviación entre la frecuencia del haplotipo esperado (bajo el supuesto de no asociación) y la frecuencia observada. Si tenemos en cuenta un caso con dos tipos de alelos, el cálculo de D es el producto de las probabilidades de los dos alelos, y la probabilidad observada de la pareja:

$$D = p_1p_2 - p_{12}$$

El valor de D ' es igual a D en escala [-1,1].

El coeficiente de correlación entre los alelos (r) y su nivel de significación (p) se proporciona también.

3.6.5. Estudio de asociación haplotípica

La estimación de las frecuencias para cada haplotipo sería sencilla si no se dieran casos de incertidumbre, es decir, casos en que no es posible determinar la pareja de haplotipos que lleva el individuo debido a que éste tenga 2 o más loci heterocigotos. Si, además, hay valores perdidos en la determinación de alguno de los genotipos, la incertidumbre aumenta.

El método utilizado para realizar la estimación estadística de frecuencias haplotípicas ha sido el **algoritmo esperanza-maximización (EM)** (Excoffier & Slatkin, 1995).

El algoritmo itera repetidamente entre 2 pasos hasta conseguir convergencia. En primer lugar, se usan unas frecuencias iniciales, no necesariamente correctas, para cada posible haplotipo. En el supuesto de que esas frecuencias fuesen correctas, y asumiendo que hay EHW, se podría calcular la frecuencia esperada de cada combinación de genotipos con incertidumbre (paso E). Con las frecuencias de cada combinación de genotipos se pueden obtener las frecuencias de cada haplotipo maximizando la función de verosimilitud de los haplotipos (paso M). Este paso consiste en contar los haplotipos compatibles con cada combinación de genotipos. El algoritmo converge a valores estables de frecuencia de combinaciones de genotipos con incertidumbre y de frecuencia de haplotipos, que es el objetivo. Para los individuos con incertidumbre, a cada pareja de haplotipos posible se le puede calcular una probabilidad. Una limitación de este método es que no proporciona directamente varianzas de las estimaciones y, si se analizan simultáneamente muchos polimorfismos (más de 20) con un alto grado de incertidumbre, pueden obtenerse soluciones incorrectas, pues el algoritmo puede tender hacia un máximo local. En estas situaciones es importante repetir el algoritmo empleando diferentes valores iniciales de las frecuencias de haplotipos. No obstante, para el análisis simultáneo de menos de 10 polimorfismos, como es nuestro caso, este método proporciona soluciones coherentes.

Este algoritmo permite por tanto identificar o estimar, para cada individuo, la pareja de haplotipos que posee en función de los genotipos. Los haplotipos obtenidos se pueden analizar en relación con la enfermedad mediante **modelos de regresión logística**. Normalmente se realiza un análisis de cromosomas y no de individuos, es decir, se duplica la muestra, de manera que cada individuo contribuye con 2 observaciones, una para cada haplotipo, y se compara el riesgo asociado con los diversos haplotipos entre sí, tomando como referencia el más frecuente. Este análisis es más sencillo de analizar e interpretar que el de parejas de haplotipos y no parece que requiera la realización ajustes, pues los haplotipos se heredan de manera independiente; no obstante, este aspecto no está completamente estudiado.

En caso de incertidumbre por múltiples heterocigotos o valores perdidos, el método basado en el algoritmo EM proporciona una lista de parejas de haplotipos compatibles, cada una con una probabilidad de aparición asociada. Entonces, estos individuos contribuyen en los datos con más de 2 observaciones y se emplean las probabilidades de aparición de cada haplotipo como pesos en el modelo de regresión logística. El análisis combinado de genotipos y haplotipos suele ser más informativo que cualquiera de los 2 aislados, aunque hay cierta discusión sobre qué análisis es preferible en cada situación (Clayton, Chapman & Cooper, 2004; Cordell, & Clayton, 2002).

3.6.6. Estudio de interacciones génicas

Los modelos de interacción gen-gen añaden el producto de 2 genotipos a la ecuación:

$$\log[p/(1-p)] = \alpha + \beta_1 G_1 + \beta_2 G_2 + \gamma Z + \delta G_1 \times G_2$$

A partir de los coeficientes β y δ de los modelos se puede calcular las OR de asociación entre cada genotipo y la enfermedad y los correspondientes intervalos de confianza del 95%.

3.6.7. Estimación de la función de supervivencia

3.6.7.1. Método de Kaplan-Meier

Los datos proporcionados por los estudios clínicos se expresan en múltiples ocasiones en términos de supervivencia. Esta medida no queda limitada a los términos de vida o muerte, sino a situaciones en las que se mide el tiempo que transcurre hasta que sucede un evento de interés, como puede ser tiempo de recurrencia, tiempo que dura la eficacia de una intervención, tiempo de un aprendizaje determinado, o como en el presente caso tiempo en que se produce la muerte fetal. Por tanto, la supervivencia es una medida de tiempo a una respuesta, fallo, muerte, recaída o desarrollo de una determinada enfermedad o evento. El término supervivencia se debe a que en las primeras aplicaciones de este método de análisis se utilizaba como evento la muerte de un paciente.

La observación de cada paciente se inicia al inicio del proceso (tiempo = 0) y continua hasta la muerte o hasta que el tiempo de seguimiento se interrumpe. Cuando el tiempo de seguimiento termina antes de producirse la muerte o, más ampliamente, antes de completar el período de observación, lo que suele ocurrir en estudios clínicos por abandono del proceso por parte del paciente, se habla de paciente “censurado”. En el caso de los AEs, el tiempo cero correspondería al comienzo de la gestación y no existirán individuos censurados ya que todos terminan el estudio (es decir, los individuos abortan en una semana determinada).

El **tiempo de supervivencia** se define como el tiempo transcurrido desde el acontecimiento o estado inicial hasta el estado final. El estado inicial debe ser definido de manera que la fecha en que se produjo el evento pueda ser conocida exactamente (fecha de

diagnóstico, fecha de la intervención quirúrgica, fecha de inicio de la radioterapia o quimioterapia, etc.). Como previamente se señaló las fechas correspondientes al estado inicial son diferentes para cada sujeto. El acontecimiento o suceso estudiado también debe estar perfectamente definido para poder determinar exactamente la fecha del mismo. Este evento está casi siempre asociado a la muerte del paciente pero no tiene por qué ser así, ya que puede hacer referencia también a la fecha de alta, la fecha de remisión de la enfermedad, la fecha de recidiva, la fecha de recaída o fallo, etc.

Los métodos estadísticos más utilizados son los no paramétricos. Así, las curvas de supervivencia por lo general se producen usando uno de dos métodos: el análisis actuarial o el método del límite de producto de Kaplan-Meier (Collet, 1994).

El método Kaplan-Meier calcula la supervivencia cada vez que un paciente “muere”. El análisis actuarial divide el tiempo en intervalos y calcula la supervivencia en cada intervalo. El procedimiento Kaplan-Meier da proporciones exactas de supervivencia debido a que utiliza tiempos de supervivencia precisos; en cambio, el análisis actuarial da aproximaciones, debido a que agrupa los tiempos de supervivencia en intervalos.

En este estudio se ha seguido el **método de Kaplan-Meier**, conocido también como del “límite del producto”. La característica distintiva del análisis con este método es que la proporción acumulada que sobrevive se calcula para el tiempo de supervivencia individual de cada paciente y **no se agrupan los tiempos de supervivencia en intervalos**. Por esta razón es especialmente útil para estudios que utilizan un número pequeño de pacientes. El método de Kaplan-Meier incorpora la **idea del tiempo al que ocurren los eventos**.

La validez de este método descansa en dos suposiciones:

1. Las personas que se retiran del estudio tienen un destino parecido a las que quedan.

2. El período de tiempo durante el cual una persona entra en el estudio no tiene efecto independiente en la respuesta.

La mejor manera de analizar el método de Kaplan-Meier es mediante un ejemplo: supongamos que disponemos de los datos de supervivencia de 10 pacientes que han sido aleatoriamente asignados a los tratamientos A y B (datos hipotéticos).

Tratamiento:

A: 3, 5, 7, 9+, 18

B: 12, 19, 20, 20+, 33+

“+” indica dato censurado y, por tanto, no ha presentado el evento (en este caso morir de cáncer). Con estos datos se construye una tabla como la representada en la **Figura 22** para calcular la proporción acumulativa que sobreviven hasta el tiempo t , o **tasa de supervivencia acumulativa**, de la misma forma que se indicó en el ejemplo previo.

Una vez calculada la probabilidad de supervivencia, ésta puede representarse gráficamente, tal como se observa en la **Figura 23**. Si la última observación es censurada, el estimador no llega a cero, como se ve en la figura en el caso del tratamiento B. Los peldaños de la escalera que desciende se deben a los tiempos no censurados.

Columna 1	Columna 2	Columna 3	Columna 4	Columna 5
Tiempo de supervivencia en meses	Nº de orden	Orden de las observaciones no censuradas (r)	$(n-r)/(n-r+1)$	
Tratamiento A				
3	1	1	4/5=0,80	0,8
5	2	3	3/4=0,75	0,6
7	3	3	2/3=0,67	0,4
9+	4	--	--	--
18	5	5	0	0,0
Tratamiento B				
12	1	1	4/5=0,80	0,80
19	2	2	3/4=0,75	0,60
20	3	3	2/3=0,67	0,40
20+	4	--	--	--
30+	5	--	--	--

Figura 22. Tabla para el cálculo de la tasa de supervivencia acumulativa.

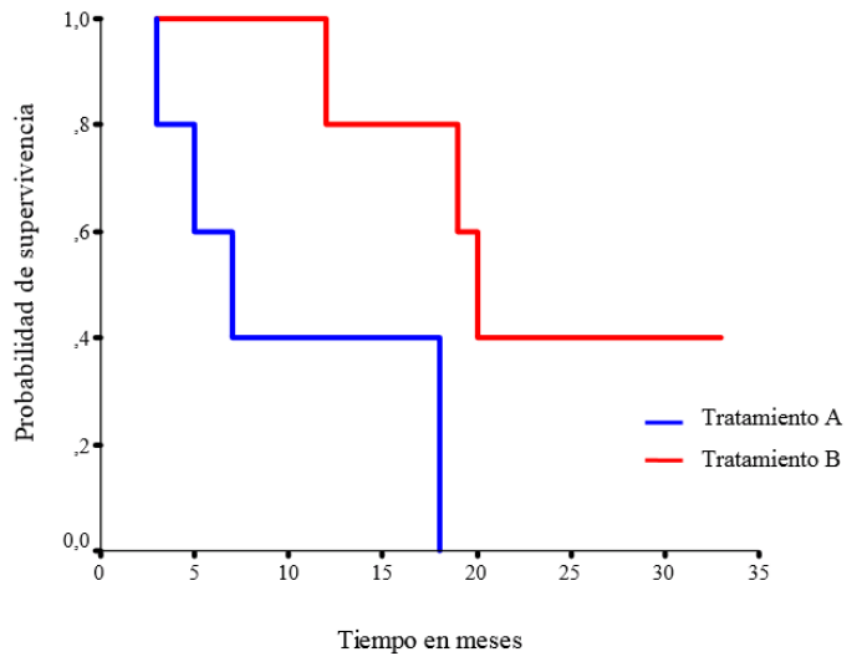


Figura 23. Curva de Kaplan-Meier.

3.6.7.2. Prueba de Mantel-Cox

Para contrastar las funciones de supervivencia de varias poblaciones se suele utilizar un test no paramétrico, la prueba de Mantel-Cox (Lee & Wang, 2003). Es un **estimador χ^2** que compara las estimaciones de la función de riesgo de dos o más grupos en cada unidad de tiempo en que ocurre un evento. Se construye comparando el número observado y esperado de sucesos en uno de los grupos en cada uno de esos momentos y agrupando los resultados para obtener un valor global. De esta forma se calcula si existen diferencias significativas entre los diversos grupos sometidos al análisis de supervivencia ($p < 0.05$)

En el presente estudio hemos analizado estos métodos para estimar diferencias en la aparición de los AEs en los genotipos de riesgo significativo utilizando para ello el paquete estadístico SPSS 22.0.2.

4. RESULTADOS

RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LAS POBLACIONES ESTUDIADAS

4.1.1. Grupo Fetal

4.1.1.1. Edad gestacional

La edad media gestacional del grupo fetal fue de 13 semanas más 5 días con un rango comprendido entre 3 y 26 semanas y una desviación típica de 5 semanas más 2 días. El 44 % de éstos fueron AE de primer trimestre y el 56% del segundo, considerando la semana 12 el límite entre los dos trimestres.

La distribución por edades gestacionales del grupo fetal en primer y segundo trimestre se muestra en las **Figura 24 y Figura 25**. El 47,5% de los abortos del primer trimestre presentan una edad gestacional entre las 10 y 12 semanas.

4.1.1.2. Edad materna

La edad media materna fue de 31,58 con un rango comprendido entre 15 a 44 y una desviación típica de 6,17 años.

La distribución por frecuencias de edad materna se muestra en la **Figura 26**. El 8,63% de las madres del grupo fetal tienen edades comprendidas entre 40 y 44 años y el resto entre 15 y 39.

RESULTADOS

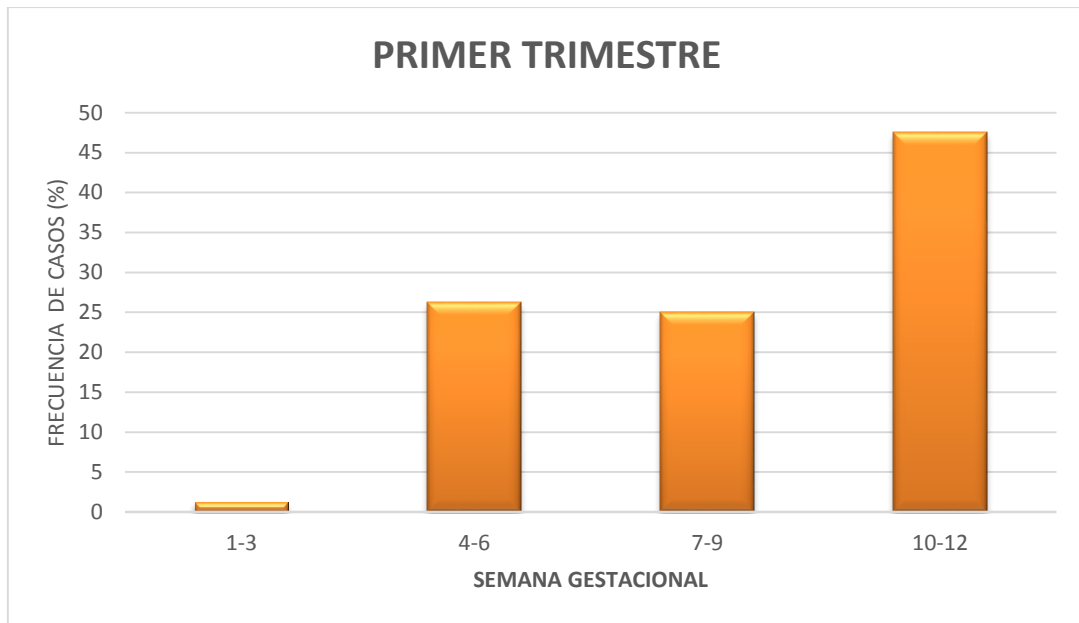


Figura 24. Distribución por edades gestacionales del grupo fetal en el primer trimestre.

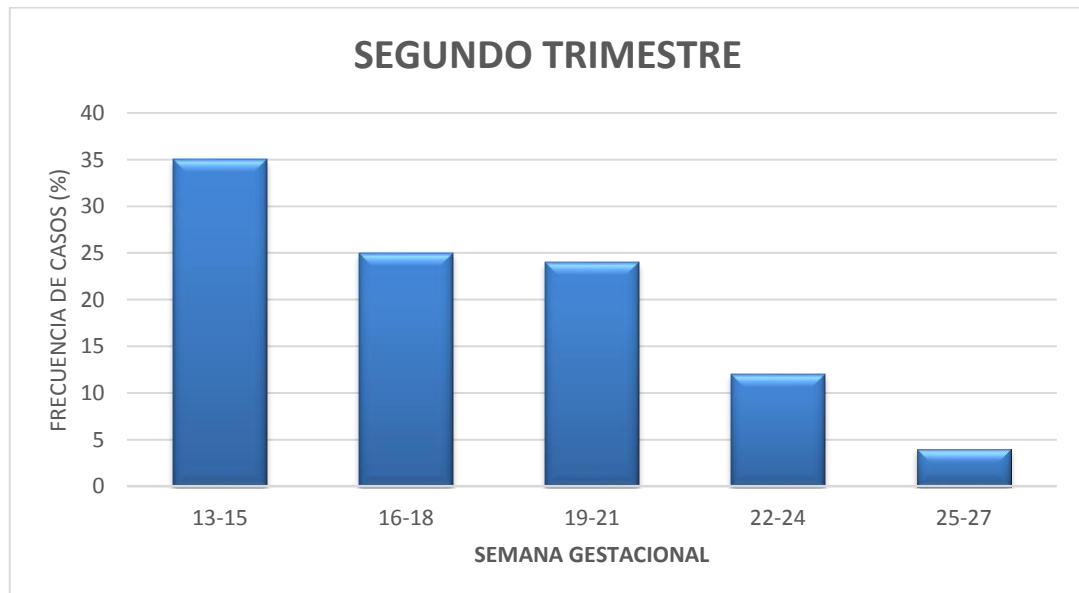


Figura 25. Distribución por edades gestacionales del grupo fetal en el segundo trimestre.

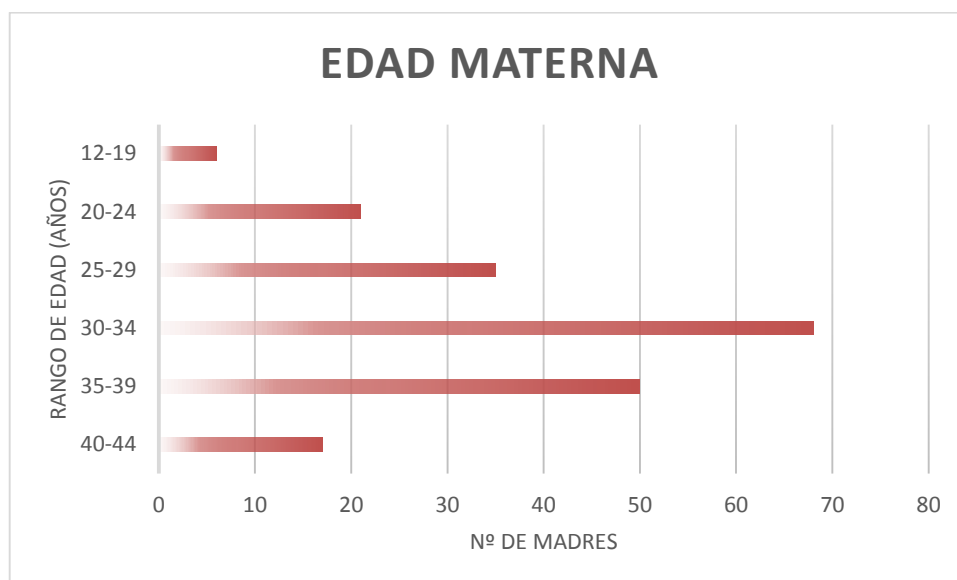


Figura 26. Distribución por edad materna.

4.1.1.3. Tipo de aborto

Según la edad gestacional en que se produce el aborto, podemos diferenciar los **abortos precoces**, los cuales ocurren durante el primer trimestre (hasta las 12 semanas), **o tardíos**, que corresponden a los que se producen en el segundo trimestre. Los abortos precoces (80-85%) predominan sobre los tardíos, por ser más frecuentes las causas que actúan de forma más precoz en la gestación. En la **Figura 27** se puede observar que el grupo fetal de nuestro estudio cuenta con un mayor porcentaje de abortos tardíos (55,56%).

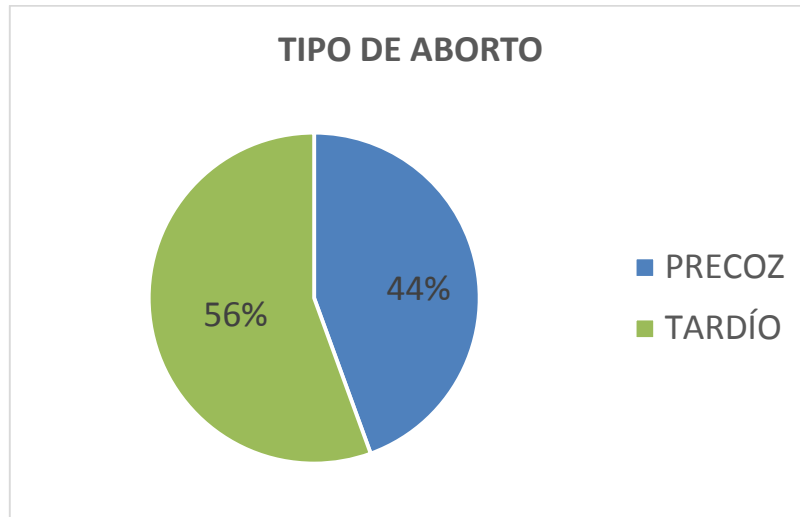


Figura 27. Tipo de aborto.

4.1.2. Grupo Control

La edad media de los 331 estudiantes universitarios voluntarios, de raza blanca, sanos y europeos fue de 20,73 con una desviación típica de 2,69 años.

En cuanto a la distribución de sexos dentro del grupo control, el 42% eran varones y el 58% mujeres.

4.2. FRECUENCIAS ALÉLICAS Y FRECUENCIAS GENOTÍPICAS

En la **Tabla 3** se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas en el grupo casos y en el grupo control de los 8 polimorfismos genéticos objeto de estudio: SRD5A2 (rs523349, rs9282858), CYP19A1 (rs4646, rs10046, rs2236722) y ESR1 (rs9340799, rs2234693, rs6932902).

RESULTADOS

Tabla 3. Frecuencias alélicas y genotípicas

Gen	Referencia	Genotipo	C [n (%)]	AE [n (%)]
SRD5A2	rs523349	C	460 (0.75)	116 (0.54)
		G	154 (0.25)	98 (0.46)
		C/C	173 (56.4)	28 (26.2)
		C/G	114 (37.1)	60 (56.1)
		G/G	20 (6.5)	19 (17.8)
	rs9282858	G	639 (0.98)	282 (0.98)
		A	15 (0.02)	6 (0.02)
		G/G	312 (95.4)	139 (96.5)
		A/G	15 (4.6)	4 (2.8)
		A/A	0 (0)	1 (0.7)
CYP19A1	rs4646	C	476 (0.73)	199 (0.72)
		A	174 (0.27)	79 (0.28)
		C/C	179 (55.1)	67 (48.2)
		A/C	118 (36.3)	65 (46.8)
		A/A	28 (8.6)	7 (5)
	rs10046	G	320 (0.5)	122 (0.56)
		A	322 (0.5)	96 (0.44)
		G/G	86 (26.8)	29 (26.6)
		A/G	148 (46.1)	64 (58.7)
		A/A	87 (27.1)	16 (14.7)
rs2236722	A	649 (1)	239 (0.98)	
	G	1 (0)	5 (0.02)	
	A/A	324 (99.7)	117 (95.9)	
	A/G	1 (0.3)	5 (4.1)	
ESR1	rs9340799	A	396 (0.65)	88 (0.53)
		G	210 (0.35)	78 (0.47)
		A/A	137 (45.2)	33 (39.8)
		A/G	122 (40.3)	22 (26.5)
		G/G	44 (14.5)	28 (33.7)
	rs2234693	T	368 (0.56)	137 (0.52)
		C	284 (0.44)	127 (0.48)
		T/T	107 (32.8)	32 (24.2)
		C/T	154 (47.2)	73 (55.3)
		C/C	65 (19.9)	27 (20.4)
rs6932902	G	575 (0.9)	232 (0.89)	
	A	65 (0.1)	28 (0.11)	
	G/G	256 (80)	104 (80)	
	A/G	63 (19.7)	24 (18.5)	
		A/A	1 (0.3)	2 (1.5)

C: Controles, AE: Abortos espontáneos



4.3. EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG

En las **Tabla 4**, **Tabla 5** y **Tabla 6** se observan los resultados del análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) para cada SNP teniendo en cuenta los casos, los controles y la muestra completa. Cada tabla recoge los resultados de un gen.

Tabla 4. Equilibrio de Hardy-Weinberg para los SNPS del gen SRD5A2 estudiados.

rs523349						
	C/C	C/G	G/G	C	G	p-valor
TODOS	201	174	39	576	252	0.91
CONTROLES	173	114	20	460	154	0.88
CASOS	28	60	19	116	98	0.24

rs9282858						
	G/G	A/G	A/A	G	A	p-valor
TODOS	451	19	1	921	21	0.2
CONTROLES	312	15	0	639	15	1
CASOS	139	4	1	282	6	0.052

RESULTADOS

Tabla 5. Equilibrio de Hardy-Weinberg para los SNPS del gen CYP19A1 estudiados.

rs4646						
	C/C	A/C	A/A	C	A	p-valor
TODOS	246	183	35	675	253	0.91
CONTROLES	179	118	28	476	174	0.2
CASOS	67	65	7	199	79	0.097
rs10046						
	C/C	T/C	T/T	C	T	p-valor
TODOS	115	212	103	442	418	0.77
CONTROLES	86	148	87	320	322	0.18
CASOS	29	64	16	122	96	0.055
rs2236722						
	T/T	T/C	C/C	T	C	p-valor
TODOS	441	6	0	888	6	1
CONTROLES	324	1	0	649	1	1
CASOS	117	5	0	239	5	1

Tabla 6. Equilibrio de Hardy-Weinberg para los SNPS del gen ESR1 estudiados.

rs9340799						
	A/A	A/G	G/G	A	G	p-valor
TODOS	170	144	72	484	288	*<0.0001
CONTROLES	137	122	44	396	210	0.057
CASOS	33	22	28	88	78	*<0.0001
rs2234693						
	T/T	C/T	C/C	T	C	p-valor
TODOS	139	227	92	505	411	1
CONTROLES	107	154	65	368	284	0.5
CASOS	32	73	27	137	127	0.29
rs6932902						
	G/G	A/G	A/A	G	A	p-valor
TODOS	360	87	3	807	93	0.61
CONTROLES	256	63	1	575	65	0.22
CASOS	104	24	2	232	28	0.64

RESULTADOS

Como se observa en las **Tabla 4** y **Tabla 5**, todos los SNPs de los genes SRD5A2 y CYP19A1 se encuentran en EHW, es decir, se puede aceptar que las frecuencias genotípicas observadas para cada SNP son compatibles con EHW. En cambio, para el rs9340799 del ESR1 (**Tabla 6**) se observan valores de p significativos para el grupo de AE y la población completa, lo que indica que ambas muestras se encuentran en desequilibrio de HW. La población de controles para todos los polimorfismos analizados se encuentra en EHW.

4.4. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN DE GENOTIPOS INDIVIDUALES Y MODELOS DE HERENCIA

En primer lugar se presentan las tablas donde vienen expresados los valores de p obtenidos de las **pruebas de asociación alélicas** con la enfermedad utilizando un modelo de regresión logística (**Tabla 7, Tabla 8 y Tabla 9**). Además se incluye el valor de OR con un 95% de intervalo de confianza para cada genotipo (test Cochran's-Haenzel). Cada tabla se recoge los resultados de un gen.

Los polimorfismos rs523349 (SRD5A2), rs2236722 (CYP19A1) y rs9340799 (ESR1) presentaron diferencias significativas en sus frecuencias alélicas entre grupo control y los AEs. Se considera significativo un valor de $p < 0,05$ con un 95% de intervalo de confianza.

Tabla 7. Análisis de asociación alélica de los SNPs del gen SRD5A2 con AE.

Referencia	Alelo	Estadística	
		OR (95% CI)	p-Valor
rs523349	C	1	* <0.0001
	G	2.52 (1.82-3.49)	
rs9282858	G	1	0.8405
	A	1.10 (0.42-2.87)	

El polimorfismo **rs523349** del gen **SRD5A2** mostró un patrón claro de relación con el AE observándose una correlación de riesgo con el alelo G (OR=2.52, 95% IC=1.82-3.49, p<0.0001).

Tabla 8. Análisis de asociación alélica de los SNPs del gen CYP19A1 con AE.

Referencia	Alelo	Estadística	
		OR (95% CI)	p-Valor
rs4646	C	1	0.6056
	A	1.09 (0.79-1.48)	
rs10046	G	1	0.1187
	A	1.28 (0.94-1.74)	
rs2236722	A	1	*0.0175
	G	13.58 (1.58-116.81)	

En cuanto al gen **CYP19A1**, los polimorfismo **rs4646** y **rs10046** no mostraron diferencias significativas en sus frecuencias alélicas, mientras que en el mismo gen, el alelo G del polimorfismo **rs2236722** presentó un alto riesgo (OR=13.58, 95% IC=1.58-116.81, p=0.0175).

Tabla 9. Análisis de asociación alélica de los SNPs del gen ESR1 con AE.

Referencia	Alelo	Estadística	
		OR (95% CI)	p-Valor
rs9340799	A	1	*0.0038
	G	1.67 (1.18-2.37)	
rs2234693	T	1	0.2103
	C	1.20 (0.90-1.60)	
rs6932902	G	1	0.7843
	A	1.07 (0.67-1.70)	

El polimorfismo **rs9340799** del gen **ESR1**, definido por la enzima de restricción *XbaI*, presentó diferencias significativas para el alelo G (OR=1.67, 95% IC=1.18-2.37, p=0.0038).

4.4.1. Modelos de herencia

Para estudiar la asociación con la enfermedad y establecer el modelo de herencia más adecuado para cada uno de los 8 polimorfismos analizados, se hizo otro estudio de regresión logística para el cálculo de odds ratio (OR) en función de los 5 modelos de herencia (codominante, dominante, recesivo, sobredominante y aditivo) y se aplicó el Criterio de Información de Akaike (AIC) y el Criterio de Información Bayesiano (BIC). Estos resultados están expresados en la **Tabla 10-17** y el modelo seleccionado se encuentra sombreado en cada caso.

RESULTADOS

El polimorfismo **rs523349** del gen **SRD5A2**, mostró un patrón claro de relación con el AE observándose una correlación de riesgo que pormenorizada en sus genotipos se expresa como una OR de 3.25, 95% IC=1.96-5.40, $p<0.0001$ para el heterocigótico CG y OR de 5.87, 95% IC=2.79-12.35, $p<0.0001$ para el homocigótico GG (**Tabla 10**). Se puede observar que cada copia de G modifica el riesgo en una cantidad aditiva, lo homocigotos GG tienen aproximadamente el doble de riesgo que los heterocigotos CG. Se ajusta a un modelo aditivo.

En cuanto al gen **CYP19A1**, el polimorfismo **rs4646** (**Tabla 12**) mostró diferencias significativas en heterocigocia, AC (OR de 1.54, 95% IC=1.03-2.30, $p=0.036$), siendo el modelo que mejor se ajusta el sobredominante. Sin embargo, aunque el SNP **rs10046** (**Tabla 13**) que mostró un riesgo significativo en el heterocigótico AG (OR de 1.66, 95% IC=1.07-2.58, $p=0.023$), su modelo de herencia se ajusta a un modelo recesivo donde se observa una alta protección para el homocigótico AA (OR de 0.46, 95% IC=0.26-0.83, $p=0.0064$). En el mismo gen **CYP19A1**, el **rs2236722** (**Tabla 14**) mostró un alto riesgo en su genotipo heterocigótico que se evidenció a pesar de su poco impacto poblacional AG (OR de 13.85, 95% IC=1.60-119.76, $p=0.0039$).

Por último, el polimorfismo **rs9340799** del gen **ESR1** (**Tabla 15**), definido por la enzima de restricción *Xba*I, presentó diferencias significativas para el homocigoto GG (OR=3.00, 95% IC=1.72-5.23, $p=0.0002$), ajustándose a un modelo de herencia recesivo, mientras que los otros dos SNPs estudiados en el mismo gen, **rs2234693** y **rs6932902**, no mostraron asociación con la enfermedad (**Tabla 16** y **Tabla 17**).

Tabla 10. Asociación genotípica del polimorfismo rs523349 del gen SRD5A2 con AE de causa desconocida en función del modelo de herencia.

Modelo	Genotipo	C [n (%)]	AE [n (%)]	OR (95% CI)	P-valor	AIC	BIC
Co	C/C	173 (56.4)	28 (26.2)	1.00	* <0.0001	446.5	458.6
	C/G	114 (37.1)	60 (56.1)	3.25 (1.96-5.40)			
	G/G	20 (6.5)	19 (17.8)	5.87 (2.79-12.35)			
Do	C/C	173 (56.4)	28 (26.2)	1.00	* <0.0001	447.2	455.3
	CG-GG	134 (43.6)	79 (73.8)	3.64 (2.24-5.93)			
Re	C/C-C/G	287 (93.5)	88 (82.2)	1.00	* 0.0012	466.7	474.7
	G/G	20 (6.5)	19 (17.8)	3.10 (1.58-6.07)			
S-Do	C/C-G/G	193 (62.9)	47 (43.9)	1.00	* 0.0007	465.6	473.6
	C/G	114 (37.1)	60 (56.1)	2.16 (1.38-3.38)			
Ad	---	---	---	2.61 (1.85-3.69)	* <0.0001	445.9	454

Co: Codominante, Do: Dominante, Re: Recessivo, S-Do: Sobredominante, Ad: Aditivo, C: Controles, AE: Abortos espontáneos, OR: Odds Ratio, AIC: Criterio de Información de Akaike, BIC: Criterio de Información Bayesiano

Tabla 11. Asociación genotípica del polimorfismo rs9282858 del gen SRD5A2 con AE de causa desconocida en función del modelo de herencia.

Modelo	Genotipo	C [n (%)]	AE [n (%)]	OR (95% CI)	P-valor	AIC	BIC
---	G/G	312 (95.4%)	139 (96.5%)	1.00	0.57	583.6	591.9
	A/G	15 (4.6%)	5 (3.5%)	0.75 (0.27-2.10)			

C: Controles, AE: Abortos espontáneos, OR: Odds Ratio, AIC: Criterio de Información de Akaike, BIC: Criterio de Información Bayesiano

Tabla 12. Asociación genotípica del polimorfismo rs4646 del gen CYP19A1 con AE de causa desconocida en función del modelo de herencia.

Modelo	Genotipo	C [n (%)]	AE [n (%)]	OR (95% CI)	P-valor	AIC	BIC
Co	C/C	179 (55.1)	67 (48.2)	1.00	0.071	567.3	579.7
	A/C	118 (36.3)	65 (46.8)	1.47 (0.97-2.22)			
	A/A	28 (8.6)	7 (5)	0.67 (0.28-1.60)			
Do	C/C	179 (55.1)	67 (48.2)	1.00	0.17	568.7	577
	A/C-A/A	146 (44.9)	72 (51.8)	1.32 (0.88-1.96)			
Re	C/C-A/C	297 (91.4)	132 (95)	1.00	0.17	568.6	576.9
	A/A	28 (8.6)	7 (5)	0.56 (0.24-1.32)			
S-Do	C/C-A/A	207 (63.7)	74 (53.2)	1.00	*0.036	566.1	574.4
	A/C	118 (36.3)	65 (46.8)	1.54 (1.03-2.30)			
Ad	---	---	---	1.09 (0.79-1.48)	0.61	570.3	578.6

Co: Codominante, Do: Dominante, Re: Recesivo, S-Do: Sobredominante, Ad: Aditivo, C: Controles, AE: Abortos espontáneos, OR: Odds Ratio, AIC: Criterio de Información de Akaike, BIC: Criterio de Información Bayesiano

Tabla 13. Asociación genotípica del polimorfismo rs10046 del gen CYP19A1 con AE de causa desconocida en función del modelo de herencia.

Modelo	Genotipo	C [n (%)]	AE [n (%)]	OR (95% CI)	P-valor	AIC	BIC
Co	G/G	86 (26.8)	29 (26.6)	1.00	*0.015	484.5	496.7
	A/G	148 (46.1)	64 (58.7)	1.28 (0.77-2.14)			
	A/A	87 (27.1)	16 (14.7)	0.55 (0.28-1.08)			
Do	G/G	86 (26.8)	29 (26.6)	1.00	0.97	490.9	499
	A/G-A/A	235 (73.2)	80 (73.4)	1.01 (0.62-1.65)			
Re	G/G-A/G	234 (72.9)	93 (85.3)	1.00	*0.0064	483.4	491.6
	A/A	87 (27.1)	16 (14.7)	0.46 (0.26-0.83)			
S-Do	G/G-A/A	173 (53.9)	45 (41.3)	1.00	*0.023	485.7	493.8
	A/G	148 (46.1)	64 (58.7)	1.66 (1.07-2.58)			
Ad	---	---	---	0.78 (0.58-1.07)	0.12	488.5	496.6

Co: Codominante, Do: Dominante, Re: Recesivo, S-Do: Sobredominante, Ad: Aditivo, C: Controles, AE: Abortos espontáneos, OR: Odds Ratio, AIC: Criterio de Información de Akaike, BIC: Criterio de Información Bayesiano

Tabla 14. Asociación genotípica del polimorfismo rs2236722 del gen CYP19A1 con AE de causa desconocida en función del modelo de herencia.

Modelo	Genotipo	C [n (%)]	AE [n (%)]	OR (95% CI)	P-valor	AIC	BIC
---	A/A	324 (99.7)	117 (95.9)	1.00	*0.0039	519.7	527.9
	A/G	1 (0.3)	5 (4.1)	13.85 (1.60-119.76)			

C: Controles, AE: Abortos espontáneos, OR: Odds Ratio, AIC: Criterio de Información de Akaike, BIC: Criterio de Información Bayesiano

Tabla 15. Asociación genotípica del polimorfismo rs9340799 del gen ESR1 con AE de causa desconocida en función del modelo de herencia.

Modelo	Genotipo	C [n (%)]	AE [n (%)]	OR (95% CI)	P-valor	AIC	BIC
Co	A/A	137 (45.2)	33 (39.8)	1.00	*0.0005	392.7	404.5
	A/G	122 (40.3)	22 (26.5)	0.75 (0.41-1.35)			
	G/G	44 (14.5)	28 (33.7)	2.64 (1.44-4.85)			
Do	A/A	137 (45.2)	33 (39.8)	1.00	0.37	405.1	413
	A/G-G/G	166 (54.8)	50 (60.2)	1.25 (0.76-2.05)			
Re	A/A-A/G	259 (85.5)	55 (66.3)	1.00	*0.0002	391.6	399.5
	G/G	44 (14.5)	28 (33.7)	3.00 (1.72-5.23)			
S-Do	A/A-G/G	181 (59.7)	61 (73.5)	1.00	*0.019	400.4	408.3
	A/G	122 (40.3)	22 (26.5)	0.54 (0.31-0.92)			
Ad	---	---	---	1.54 (1.12-2.11)	*0.0085	398.9	406.8

Co: Codominante, Do: Dominante, Re: Recessivo, S-Do: Sobredominante, Ad: Aditivo, C: Controles, AE: Abortos espontáneos, OR: Odds Ratio, AIC: Criterio de Información de Akaike, BIC: Criterio de Información Bayesiano

Tabla 16. Asociación genotípica del polimorfismo rs2234693 del gen ESR1 con AE de causa desconocida en función del modelo de herencia.

Modelo	Genotipo	C [n (%)]	AE [n (%)]	OR (95% CI)	P-valor	AIC	BIC
Co	T/T	107 (32.8)	32 (24.2)	1.00	0.17	552.5	564.9
	C/T	154 (47.2)	73 (55.3)	1.59 (0.98-2.57)			
	C/C	65 (19.9)	27 (20.4)	1.39 (0.76-2.53)			
Do	T/T	107 (32.8)	32 (24.2)	1.00	0.067	550.7	559
	C/T-C/C	219 (67.2)	100 (75.8)	1.53 (0.96-2.42)			
Re	T/T-C/T	261 (80.1)	105 (79.5)	1.00	0.9	554.1	562.3
	C/C	65 (19.9)	27 (20.4)	1.03 (0.62-1.71)			
S-Do	T/T-C/C	172 (52.8)	59 (44.7)	1.00	0.12	551.6	559.9
	C/T	154 (47.2)	73 (55.3)	1.38 (0.92-2.07)			
Ad	---	---	---	1.20 (0.90-1.60)	0.21	552.5	560.8

Co: Codominante, Do: Dominante, Re: Recesivo, S-Do: Sobredominante, Ad: Aditivo, C: Controles, AE: Abortos espontáneos, OR: Odds Ratio, AIC: Criterio de Información de Akaike, BIC: Criterio de Información Bayesiano

Tabla 17. Asociación genotípica del polimorfismo rs6932902 del gen ESR1 con AE de causa desconocida en función del modelo de herencia.

Modelo	Genotipo	C [n (%)]	AE [n (%)]	OR (95% CI)	P-valor	AIC	BIC
Co	G/G	256 (80)	104 (80)	1.00	0.39	545.1	557.5
	A/G	63 (19.7)	24 (18.5)	0.94 (0.56-1.58)			
	A/A	1 (0.3)	2 (1.5)	4.92 (0.44-54.88)			
Do	G/G	256 (80)	104 (80)	1.00	1	545	553.3
	A/G-A/A	64 (20)	26 (20)	1.00 (0.60-1.66)			
Re	G/G-A/G	319 (99.7)	128 (98.5)	1.00	0.17	543.2	551.4
	A/A	1 (0.3)	2 (1.5)	4.98 (0.45-55.45)			
S-Do	G/G-A/A	257 (80.3)	106 (81.5)	1.00	0.76	544.9	553.2
	A/G	63 (19.7)	24 (18.5)	0.92 (0.55-1.56)			
Ad	---	---	---	1.07 (0.66-1.73)	0.78	545	553.2

Co: Codominante, Do: Dominante, Re: Recesivo, S-Do: Sobredominante, Ad: Aditivo, C: Controles, AE: Abortos espontáneos, OR: Odds Ratio, AIC: Criterio de Información de Akaike, BIC: Criterio de Información Bayesiano

4.4.2. Genotipos individuales divididos por trimestres gestacionales

A continuación se muestra en las **Tabla 18, Tabla 19 y Tabla 20** los datos analizados por trimestres gestacionales según los modelos de herencia propuestos en el análisis general de asociación. En general los patrones de frecuencias para los genotipos estudiados son similares en ambos grupos, aunque en algunos casos se perdieron las significaciones en el primer trimestre. Cada tabla muestra los resultados de un gen.

Resultó remarcable el hecho de que aun conservando los mismos patrones, la potencia de los resultados estadísticos en los conceptos de riesgo y protección se incrementaron en el segundo trimestre comparándolos con los resultados obtenidos en el primer trimestre: OR 3.77 ($p < 0.0001$) frente a 1.72 ($p = 0.028$) en modelo aditivo de rs523349, OR 2.07 ($p = 0.0098$) frente a 1.82 ($p = 0.039$) en modelo sobredominante de rs4646, OR 0.32 ($p = 0.0085$) frente a 0.63 ($p = 0.25$) en modelo recesivo de rs10046, OR 20.25 ($p = 0.0049$) frente a 6.75 ($p = 0.21$) en modelo dominante de rs2236722. Tan solo el rs9340799 mostró un mayor riesgo en el primer trimestre (OR 2.40, $p = 0.034$, frente a 3.33, $p = 0.0028$).

En cambio, el polimorfismo rs2234693 que en el análisis de la población total no mostraba diferencias significativas (OR=1.53, $p = 0.067$), mostró asociación una gran potencia estadística en el segundo trimestre (OR=4.89, $p = 0.0001$).

Tabla 18. Asociación genotípica de los polimorfismos del gen SRD5A2 con AE de causa desconocida divididos por trimestres gestacionales.

Referencia	Modelo	Genotipo	rs523349			rs9282858	
			C/C	C/G	G/G	-	A/G
PRIMER TRIMESTRE	Frecuencias genotípicas	C [n (%)]	173 (56.4)	114 (37.1)	20 (6.5)	312 (95.4)	15 (4.6)
		EA [n (%)]	18 (42.9)	17 (40.5)	7 (16.7)	54 (96.4)	2 (3.6)
	Estadística	OR (95% CI)		1.72 (1.07-2.76)		1.00	0.77 (0.17-3.46)
		p		*0.028			0.73
	SEGUNDO TRIMESTRE	Frecuencias genotípicas	C [n (%)]	173 (56.4)	114 (37.1)	20 (6.5)	312 (95.4)
EA [n (%)]			5 (10.6)	34 (72.3)	8 (17)	63 (98.4)	1 (1.6)
Estadística		OR (95% CI)		3.77 (2.29-6.19)		1.00	0.33 (0.04-2.54)
		p		*<0.0001			0.21

C: Controles, AE: Abortos espontáneos, OR: Odds Ratio

RESULTADOS

Tabla 19. Asociación genotípica de los polimorfismos del gen CYP19A1 con AE de causa desconocida divididos por trimestres gestacionales.

	Referencia	rs4646		rs10046		rs2236722		
	Modelo	Sobredominante		Recesivo		-		
	Genotipo	C/C-A/A	A/C	G/G-A/G	A/A	A/A	A/G	
PRIMER TRIMESTRE	Frecuencias genotípicas	C [n (%)]	207 (63.7)	118 (36.3)	234 (72.9)	87 (27.1)	324 (99.7)	1 (0.3)
		EA [n (%)]	28 (49.1)	29 (50.9)	34 (81)	8 (19.1)	48 (98)	1 (2)
	Estadística	OR (95% CI)	1.00	1.82 (1.03-3.20)	1.00	0.63 (0.28-1.42)	1.00	6.75 (0.42-109.72)
		p		*0.039		0.25		0.21
SEGUNDO TRIMESTRE	Frecuencias genotípicas	C [n (%)]	207 (63.7)	118 (36.3)	234 (72.9)	87 (27.1)	324 (99.7)	1 (0.3)
		EA [n (%)]	28 (45.9)	33 (54.1)	42 (89.4)	5 (10.6)	48 (94.1)	3 (5.9)
	Estadística	OR (95% CI)	1.00	2.07 (1.19-3.59)	1.00	0.32 (0.12-0.84)	1.00	20.25 (2.06-198.66)
		p		*0.0098		*0.0085		* 0.0049

C: Controles, AE: Abortos espontáneos, OR: Odds Ratio

RESULTADOS

Tabla 20. Asociación genotípica de los polimorfismos del gen ESR1 con AE de causa desconocida divididos por trimestres gestacionales.

	Referencia	rs9340799		rs2234693		rs6932902		
	Modelo	Recesivo		Dominante		Recesivo		
	Genotipo	A/A-A/G	G/G	T/T	C/T-C/C	G/G-A/G	A/A	
PRIMER TRIMESTRE	Frecuencias genotípicas	C [n (%)]	259 (85.5)	44 (14.5)	107 (32.8)	219 (67.2)	319 (99.7)	1 (0.3)
		EA [n (%)]	23 (63.9)	13 (36.1)	21 (38.9)	33 (61.1)	47 (95.9)	2 (4.1)
	Estadística	OR (95% CI)	1.00	3.33 (1.57-7.05)	1.00	0.77 (0.42-1.39)	1.00	13.57 (1.21-152.65)
		p		*0.0028		0.39		0.032
SEGUNDO TRIMESTRE	Frecuencias genotípicas	C [n (%)]	259 (85.5)	44 (14.5)	107 (32.8)	219 (67.2)	319 (99.7)	1 (0.3)
		EA [n (%)]	27 (71)	11 (28.9)	5 (9.1)	50 (90.9)	57 (100)	0 (0)
	Estadística	OR (95% CI)	1.00	2.40 (1.11-5.18)	1.00	4.89 (1.89-12.61)	1.00	0.00 (0.00-NA)
		p		*0.034		*0.0001		0.57

C: Controles, AE: Abortos espontáneos, OR: Odds Ratio

4.5. ESTUDIO DEL DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO

A continuación se muestra la medida de DL (D, D', r y p-valor) para los polimorfismos de los tres genes estudiados: SRD5A2 (**Tabla 21**), CYP19A1 (**Tabla 22**) y ESR1 (**Tabla 23**). En algunas parejas de polimorfismos analizados se obtienen valores de p superiores a 0.05, lo que indica la independencia de estos marcadores en las poblaciones de estudio, por el contrario, aquellas parejas que muestran valores cercanos a 1 de D' y una $p < 0.05$ consideramos que se encuentran en desequilibrio de ligamiento.

4.5.1. Gen SRD5A2

Según los resultados obtenidos en la **Tabla 21** se puede deducir que los polimorfismos rs523349 y rs9282858 del gen SRD5A2 no se encuentran en desequilibrio de ligamiento.

Tabla 21. Desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos estudiados en el gen SRD5A2

D		
	rs523349	rs9282858
rs523349	.	-0.0021
rs9282858	.	.
D'		
	rs523349	rs9282858
rs523349	.	0.3065
rs9282858	.	.
r		
	rs523349	rs9282858
rs523349	.	-0.0306
rs9282858	.	.
p-Valor		
	rs523349	rs9282858
rs523349	.	0.3795
rs9282858	.	.

4.5.2. Gen CYP19A1

Los 3 polimorfismos estudiados del gen CYP19A1 (rs4646, rs10046 y rs2236722), presentaron valores de D' muy próximos a 1 y un valores de $p < 0.05$ en el estudio de ligamiento, lo que indica que se encuentran en desequilibrio de ligamiento (**Tabla 22**).

Tabla 22. Desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos estudiados en el gen CYP19A1

D			
	rs4646	rs10046	rs2236722
rs4646	.	-0.1238	0.0048
rs10046	.	.	0.0034
rs2236722	.	.	.

D'			
	rs4646	rs10046	rs2236722
rs4646	.	0.9342	0.9903
rs10046	.	.	0.9862
rs2236722	.	.	.

r			
	rs4646	rs10046	rs2236722
rs4646	.	-0.5562	0.133
rs10046	.	.	0.0834
rs2236722	.	.	.

p-Valor			
	rs4646	rs10046	rs2236722
rs4646	.	<0.0001	0.0001
rs10046	.	.	0.0156
rs2236722	.	.	.

4.5.3. Gen ESR1

De los resultados obtenidos en la **Tabla 23** se puede concluir que los SNPs rs9340799 y rs2234693 del gen ESR1 se encuentran en desequilibrio de ligamiento con un valor de D' igual a 0.8805. Por el contrario, el rs6932902 del mismo gen no presenta una p significativa cuando se combina con rs9340799 o rs2234693.

Tabla 23. Desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos estudiados en el gen ESR1

D			
	rs9340799	rs2234693	rs6932902
rs9340799	.	0.1811	0.0127
rs2234693	.	.	0.0032
rs6932902	.	.	.

D'			
	rs9340799	rs2234693	rs6932902
rs9340799	.	0.8805	0.1963
rs2234693	.	.	0.0563
rs6932902	.	.	.

r			
	rs9340799	rs2234693	rs6932902
rs9340799	.	0.7528	0.0864
rs2234693	.	.	0.0212
rs6932902	.	.	.

p-Valor			
	rs9340799	rs2234693	rs6932902
rs9340799	.	<0.0001	0.0176
rs2234693	.	.	0.5277
rs6932902	.	.	.

4.6. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN HAPLOTÍPICA

En las **Tablas 24-26** se observan los resultados del análisis de asociación para los haplotipos formados por dos o tres SNPs a la vez, de un único gen.

4.6.1. Gen SRD5A2

Analizando los haplotipos formados por los dos SNPs del gen SRD5A2 (**Tabla 24**) observamos que el haplotipo asociado de manera significativa con el AE de causa desconocida es el formado por el alelo G de rs523349 y el alelo G de rs9282858 ($p < 0.0001$).

Tabla 24. Prueba de asociación haplotípica para SNPs de SRD5A2.

Haplotipo rs523349/rs9282858	Frecuencias haplotípicas			Estadística	
	C	AE	Freq	OR (IC 95%)	p-Valor
C/G	0.7263	0.5411	0.6696	1.00	---
G/G	0.2508	0.4379	0.3081	2.38 (1.67 - 3.38)	*<0.0001
C/A	0.0229	0	0.0159	0.00 (-Inf - Inf)	1

C: Controles, AE: Abortos Espontáneos, Freq: Frecuencia, OR: Odds ratio

4.6.2. Gen CYP19A1

En cuanto al gen CYP19A1 ningún haplotipo formado por los 3 polimorfismos analizados arrojó resultados significativos (**Tabla 25**).

Tabla 25. Prueba de asociación haplotípica para SNPs de CYP19A1.

Haplotipo	Frecuencias haplotípicas			Estadística	
	C	AE	Freq	OR (IC 95%)	p-Valor
rs4646/rs10046					
C/A	0.4964	0.4372	0.4781	1.00	---
A/G	0.2618	0.2655	0.2631	1.17 (0.83 - 1.66)	0.37
C/G	0.2359	0.2779	0.2489	1.36 (0.91 - 2.04)	0.13
rs4646/rs2236722	C	AE	Freq	OR (IC 95%)	p-Valor
C/A	0.7323	0.7087	0.725	1.00	---
A/A	0.2661	0.2713	0.2677	1.07 (0.78 - 1.46)	0.69
rs10046/rs2236722	C	AE	Freq	OR (IC 95%)	p-Valor
G/A	0.497	0.5619	0.5162	1.00	---
A/A	0.5015	0.418	0.477	0.78 (0.57 - 1.06)	0.11
rs4646/rs10046/rs2236722	C	AE	Freq	OR (IC 95%)	p-Valor
C/A/A	0.4964	0.439	0.4777	1.00	---
A/G/A	0.2603	0.2508	0.2572	1.15 (0.81 - 1.64)	0.43
C/G/A	0.2359	0.271	0.2477	1.40 (0.93 - 2.11)	0.11

C: Controles, AE: Abortos Espontáneos, Freq: Frecuencia ,OR: Odds ratio

4.6.3. Gen ESR1

En la **Tabla 26** se puede observar que el haplotipo formado por el alelo A del rs9340799 (XbaI) y el alelo C del rs2234693 (PvuII) del gen ESR1 está asociado estadísticamente con la enfermedad (OR=1.85, p=0.023). Con mayor potencia estadística y un riesgo mucho superior está asociado el haplotipo formado por el alelo G de XbaI y el alelo T de PvuII (OR=30.84, p<0.0001). Los haplotipos dobles con el rs6932902 no mostraron diferencias significativas, sin embargo, cuando se asocian los haplotipos anteriormente mencionados (AC y GT de XbaI/PvuII) con el alelo G de este polimorfismo los riesgos aumentan considerablemente (2.00 y 50.31 respectivamente).

RESULTADOS

Tabla 26. Prueba de asociación haplotípica para SNPs de ESR1.

Haplotipo	Frecuencias haplotípicas			Estadística	
	C	AE	Freq	OR (IC 95%)	p-Valor
rs9340799/rs2234693					
A/T	0.5607	0.412	0.5185	1.00	---
G/C	0.334	0.3489	0.3383	1.25 (0.89 - 1.75)	0.2
A/C	0.1016	0.1391	0.113	1.85 (1.09 - 3.13)	*0.023
G/T	0.0037	0.1	0.0303	30.84 (6.56 - 144.99)	*<0.0001
rs9340799/rs6932902					
A/G	0.5936	0.5042	0.5695	1.00	---
G/G	0.305	0.3881	0.3272	1.36 (0.95 - 1.94)	0.093
A/A	0.0602	0.0342	0.0527	0.67 (0.27 - 1.64)	0.38
G/A	0.0413	0.0735	0.0505	1.92 (0.97 - 3.81)	0.063
rs2234693/rs6932902					
T/G	0.5107	0.4652	0.4973	1.00	---
C/G	0.3877	0.4272	0.3993	1.21 (0.88 - 1.67)	0.24
T/A	0.0537	0.0536	0.0536	1.10 (0.49 - 2.49)	0.81
C/A	0.0478	0.054	0.0497	1.24 (0.56 - 2.71)	0.59
rs9340799/rs2234693/rs6932902					
A/T/G	0.5077	0.3744	0.4687	1.00	---
G/C/G	0.2948	0.2902	0.2917	1.18 (0.80 - 1.73)	0.41
A/C/G	0.094	0.1449	0.1104	2.00 (1.13 - 3.51)	*0.017
A/T/A	0.0531	0.0391	0.05	0.97 (0.39 - 2.44)	0.95
G/C/A	0.0391	0.0524	0.0447	1.73 (0.74 - 4.07)	0.21
G/T/G	0.0022	0.0828	0.026	50.31 (6.05 - 417.99)	*0.0003

C: Controles, AE: Abortos Espontáneos, Freq: frecuencia, OR: Odds ratio

4.7. ESTUDIO DE INTERACCIONES GÉNICAS

Se estudiaron las interacciones génicas de los polimorfismos de diferentes genes manteniendo los modelos de herencia seleccionados en cada caso. En primer lugar se enfrentó el rs523349 y rs9282858 del gen SRD5A2 a los polimorfismos rs4646 (sobredominante), rs10046 (recesivo) y rs2236722 del gen CYP19A1 y al rs9340799 (recesivo), rs2234693 (dominante) y rs6932902 (recesivo) del ESR1. En segundo lugar, se analizó la interacción de éstos últimos SNPs del gen ESR1 con los polimorfismos del gen CYP19A1 (rs4646, 10046 y rs2236722).

Se observaron múltiples asociaciones con un posible efecto epistático entre los distintos polimorfismos estudiados, la mayoría de ellas no superaban las ORs halladas en los genotipos individuales, sin embargo, en algunos casos como en las interacciones GG/AC (rs523349/rs4646) y CG/AG (rs523349/rs2236722) (**Tabla 27, Tabla 28, Tabla 29, Tabla 30 y Tabla 31**) las OR de las mencionadas interacciones superaban las OR de los genotipos individuales, lo que nos lleva a plantearnos posibles sinergias sobre el efecto abortivo.

RESULTADOS

Tabla 27. Interacciones génicas del polimorfismo rs523349 del gen SRD5A2 con el resto de SNPs estudiados.

Referencia	Modelo	C/C				C/G				G/G			
		C (n)	EA (n)	OR (95% CI)	p	C (n)	EA (n)	OR (95% CI)	p	C (n)	EA (n)	OR (95% CI)	p
rs4646	C/C A/A	100	14	1.00	-	78	23	2.11 (1.02-4.36)	* 0.0447	18	12	4.76 (1.90-11.95)	*0.0009
	A/C	73	14	1.37 (0.62-3.05)	0.4406	36	33	6.55 (3.15-13.61)	*< .0001	2	4	14.28 (2.39-85.32)	*0.0035
rs10046	G/G A/G	125	18	1.00	-	83	49	4.10 (2.23-7.52)	*< .0001	16	12	5.21 (2.12-12.77)	*0.0003
	A/A	45	7	1.08 (0.42-2.76)	0.8718	31	4	0.90 (0.28-2.84)	0.8519	3	3	6.94 (1.30-37.07)	*0.0233
rs2236722	A/A	172	27	1.00	-	113	49	2.76 (1.63-4.68)	*0.0002	20	18	5.73 (2.69-12.20)	*< .0001
	A/G	1	0	2.09 (0.08-52.64)	0.6540	0	5	69 (3.71-1283.13)	*0.0045	0	0	-	-
rs9340799	A/A A/G	136	14	1.00	-	94	22	2.27 (1.11-4.67)	*0.0253	15	10	6.48 (2.45-17.10)	*0.0002
	G/G	24	8	3.24 (1.23-8.55)	* 0.0177	14	12	8.33 (3.23-21.47)	*< .0001	4	3	7.28 (1.48-35.90)	*0.0147
rs2234693	T/T	53	7	1.00	-	40	11	2.08 (0.74-5.85)	0.1640	5	1	1.51 (0.15-14.91)	0.7222
	C/T-C/C	120	18	1.13 (0.45-2.88)	0.7888	74	45	4.60 (1.93-11.00)	*0.0006	15	18	9.08 (3.20-25.82)	*< .0001
rs6932902	G/G-A/G	171	27	1.00	-	114	55	3.05 (1.82-5.13)	*< .0001	19	19	6.33 (2.98-13.47)	*< .0001
	A/A	1	1	6.33 (0.38-104.30)	0.1966	0	0	-	-	0	0	-	-

C: Controles, AE: Aborto Espontáneo, OR: Odds Ratio

RESULTADOS

Tabla 28. Interacciones génicas del polimorfismo rs9282858 del gen SRD5A2 con el resto de SNPs estudiados.

Referencia	Modelo	G/G				A/G			
		C (n)	EA (n)	OR (95% CI)	p	C (n)	EA (n)	OR (95% CI)	p
rs4646	C/C A/A	199	69	1.00	-	8	3	0.67 (0.17-2.62)	0.5666
	A/C	111	62	1.61 (1.06-2.44)	* 0.0241	7	2	0.51 (0.10-2.54)	0.4121
rs10046	G/G A/G	222	88	1.00	-	12	3	0.63 (0.17-2.29)	0.4834
	A/A	84	14	0.42 (0.23-0.78)	*0.0059	3	1	0.84 (0.09-8.19)	0.8814
rs2236722	A/A	309	111	1.00	-	15	5	0.93 (0.33-2.61)	0.8874
	A/G	1	5	13.92 (1.61-120.45)	*0.0168	0	0	-	-
rs9340799	A/A A/G	249	52	1.00	-	10	1	0.48 (0.06-3.82)	0.4872
	G/G	41	28	3.27 (1.86-5.76)	* < 0.0001	3	0	0.68 (0.03-13.34)	0.7988
rs2234693	T/T	99	28	1.00	-	8	1	0.28 (0.03-2.31)	0.2398
	C/T-C/C	212	93	0.64 (0.40-1.05)	0.0762	7	4	1.30 (0.37-4.56)	0.6791
rs6932902	G/G-A/G	304	120	1.00	-	15	5	0.84 (0.30-2.37)	0.7486
	A/A	1	2	5.07 (0.45-56.40)	0.1869	0	0	-	-

C: Controles, AE: Aborto Espontáneo, OR: Odds Ratio

RESULTADOS

Tabla 29. Interacciones génicas del polimorfismo rs4646 del gen CYP19A1 con los polimorfismos estudiados del gen ESR1.

Referencia	Modelo	C/C-A/A				A/C			
		C (n)	EA (n)	OR (95% CI)	p	C (n)	EA (n)	OR (95% CI)	p
rs9340799	A/A-A/G	163	29	1.00	-	96	21	1.23 (0.66-2.27)	0.5106
	G/G	26	10	2.16 (0.94-4.95)	0.0685	17	18	5.95 (2.75-12.87)	*< 0.0001
rs2234693	T/T	69	14	1.00	-	38	15	1.94 (0.85-4.46)	0.1156
	C/T-C/C	138	42	1.50 (0.77-2.93)	0.2358	80	45	2.77 (1.40-5.48)	*0.0033
rs6932902	G/G-A/G	202	146	1.00	-	97	42	0.60 (0.39-0.91)	*0.0168
	A/A	0	0	--	--	1	2	2.7671 (0.25-30.81)	0.4078

C: Controles, AE: Aborto Espontáneo, OR: Odds Ratio

RESULTADOS

Tabla 30. Interacciones génicas del polimorfismo rs10046 del gen CYP19A1 con los polimorfismos estudiados del gen ESR1.

Referencia	Modelo	G/G-A/G				A/A			
		C (n)	EA (n)	OR (95% CI)	p	C (n)	EA (n)	OR (95% CI)	p
rs9340799	A/A-A/G	190	36	1.00	-	65	9	0.73 (0.33-1.60)	0.4323
	G/G	33	23	3.68 (1.94-6.98)	*0.0001	11	3	1.44 (0.38-5.42)	0.5902
rs2234693	T/T	79	14	1.00	-	26	4	0.87 (0.26-2.87)	0.8168
	C/T-C/C	155	74	2.69 (1.43-5.07)	*0.0021	61	9	0.83 (0.34-2.05)	0.6903
rs6932902	G/G-A/G	229	84	1.00	-	84	16	0.52 (0.29-0.94)	*0.0295
	A/A	1	1	2.73 (0.17-44.08)	0.4800	0	0	--	--

C: Controles, AE: Aborto Espontáneo, OR: Odds Ratio

RESULTADOS

Tabla 31. Interacciones génicas del polimorfismo rs2236722 del gen CYP19A1 con los polimorfismos estudiados del gen ESR1.

Referencia	Modelo	A/A				A/G			
		C (n)	EA (n)	OR (95% CI)	p	C (n)	EA (n)	OR (95% CI)	p
rs9340799	A/A-A/G	257	52	1.00	-	1	1	4.94 (0.30-80.29)	0.2613
	G/G	44	24	2.70 (1.51-4.81)	*0.0008	0	1	14.71 (0.59-366.21)	0.1011
rs2234693	T/T	106	24	1.00	-	1	1	4.4167 (0.27-73.14)	0.2997
	C/T-C/C	218	89	1.80 (1.09-2.99)	* 0.0227	0	0	-	-
rs6932902	G/G-A/G	316	115	1.00	-	1	1	2.75 (0.17-44.29)	0.4761
	A/A	1	1	2.75 (0.17-44.29)	0.4761	0	0	-	-

C: Controles, AE: Aborto Espontáneo, OR: Odds Ratio

4.8. ESTUDIO DE CROMOSOMOPATÍAS Y SEXO FETAL

Los resultados obtenidos del análisis de cromosomopatías (13, 15, 16, 18, 21, 22, X e Y) de una subpoblación de 94 AEs se muestran en la **Tabla 32**. El 83.75% de los AE fueron euploides (n=67) y la cromosomopatía más frecuente fue la trisomía del cromosoma 21 (8,75%) seguida de la triploidía (6,25%). La mayoría de los AEs aneuploides tuvieron lugar durante el primer trimestre de gestación.

En cuanto al sexo, el subgrupo fetal estaba constituido por el 34% de sexo masculino y el 66% de sexo femenino.

Tabla 32. Análisis de cromosomopatías

	AE [n (%)]	1TRIM	2TRIM
TRISOMÍA 15	1 (1.25)	1	0
TRISOMÍA 21	7 (8.75)	6	1
TRIPLOIDE	5 (6.25)	4	1
EUPLOIDE	67 (83.75)	23	44
NA	14	-	-

AE: Aborto Espontáneo, 1TRIM: Primer trimestre, 2TRIM: Segundo trimestre

4.9. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS EN UNA SUBPOBLACIÓN EUPLOIDE DE ABORTOS ESPONTÁNEOS

Se seleccionaron los 67 casos de AEs que en el análisis de cromosomopatías clasificamos como “euploides” con la intención de reproducir el análisis de asociación de genotipos individuales. Además se estudió dicha asociación en relación a la edad del aborto y el sexo fetal.

4.9.1. Análisis de asociación de genotipos individuales en subpoblación euploide

Los 67 AEs euploides seleccionados del análisis de cromosomopatías fueron sometidos a un estudio de asociación entre los 8 polimorfismos [SRD5A2 (rs523349, rs9282858), CYP19A1 (rs4646, rs10046, rs2236722) y ESR1 (rs9340799, rs2234693, rs6932902)] y la enfermedad utilizando un modelo de regresión logística. En la **Tabla 33** vienen expresados los valores de p obtenidos y el valor de OR con un 95% de intervalo de confianza para cada genotipo (test Cochran’s-Haenzel). Dicho análisis se llevó a cabo con los modelos de herencia seleccionados para cada polimorfismo en apartados anteriores.

Los polimorfismos rs523349 (SRD5A2), rs10046 (CYP19A1), rs9340799 y rs2234693 (ESR1) presentaron diferencias significativas en sus frecuencias genotípicas entre grupo control y la subpoblación de AEs. Se considera significativo un valor de $p < 0,05$ con un 95% de intervalo de confianza.

RESULTADOS

Tabla 33. Asociación genotípica de los polimorfismos rs523349, rs9282858, rs4646, rs10046, rs2236722, rs9340799, rs2234693 y rs6932902 con una subpoblación euploide de AEs de causa desconocida.

Gen	Referencia	Modelo	Genotipo	Frecuencias genotípicas		Estadística	
				C [n (%)]	AE [n (%)]	OR (95% CI)	P-valor
SRD5A2	rs523349	Ad	C/C	173 (56.4)	10 (16.7)		
			C/G	114 (37.1)	37 (61.7)	3.49 (2.25-5.43)	*<0.0001
			G/G	20 (6.5)	13 (21.7)		
rs9282858	-		G/G	312 (95.4)	62 (95.4)	1.00	
			A/G	15 (4.6)	3 (4.6)	1.01 (0.28-3.58)	0.99
CYP19A1	rs4646	S-Do	C/C-A/A	207 (63.7)	36 (58.1)	1.00	
			A/C	118 (36.3)	26 (41.9)	1.27 (0.73-2.20)	0.4
	rs10046	Re	G/G-A/G	234 (72.9)	52 (92.9)	1.00	
			A/A	87 (27.1)	4 (7.1)	0.21 (0.07-0.59)	*0.0003
rs2236722	-		A/A	324 (99.7)	59 (98.3)	1.00	
			A/G	1 (0.3)	1 (1.7)	5.49 (0.34-89.02)	0.26
ESR1	rs9340799	Re	A/A-A/G	259 (85.5)	30 (69.8)	1.00	
			G/G	44 (14.5)	13 (30.2)	2.55 (1.24-5.27)	*0.016
	rs2234693	Do	T/T	107 (32.8)	9 (14.1)	1.00	
C/T-C/C			219 (67.2)	55 (85.9)	2.99 (1.42-6.27)	*0.0015	
rs6932902	Re		G/G-A/G	257 (80.3)	58 (87.9)	1.00	
			A/A	63 (19.7)	8 (12.1)	0.56 (0.26-1.24)	0.13

Ad: Aditivo, S-Do: Sobredominante, Re: Recesivo, Do: Dominante, C: Controles, AE: Abortos espontáneos, OR: Odds Ratio

Por otro lado, quisimos ver qué relación existía de manera cuantitativa entre los polimorfismos que en el análisis de asociación anterior fueron estadísticamente significativos (rs523349, rs10046, rs9340799 y rs2234693) y la edad del aborto. Es decir, quisimos incorporar la idea del tiempo al que ocurren los eventos (el aborto). Como se trataba



RESULTADOS

de una subpoblación con un tamaño reducido ($n=67$) el recurso estadístico que mejor se ajustó a este fin fue una representación de datos en una **curva de Kaplan-Meier** mediante la aplicación de un análisis de supervivencia. En la **Figura 28** se incluyen los resultados relativos al polimorfismo rs523349 del gen SRD5A2 que presentó una diferencia estadísticamente significativa ($p= 0.024$) en relación al tiempo. El 50% de las muestras con genotipo C/C del polimorfismo rs523349 desembocaron en AEs en la semana 10 ± 0.58 (media + desviación estándar), a diferencia de los abortos con genotipo C/G y G/G que presentaron una supervivencia del 50% a la semana 16 ± 1.09 y semana 14 ± 2.37 , respectivamente.

El resto de polimorfismos analizados en el estudio de supervivencia (rs10046, rs9340799 y rs2234693) no se muestran al no presentar resultados estadísticamente significativos.

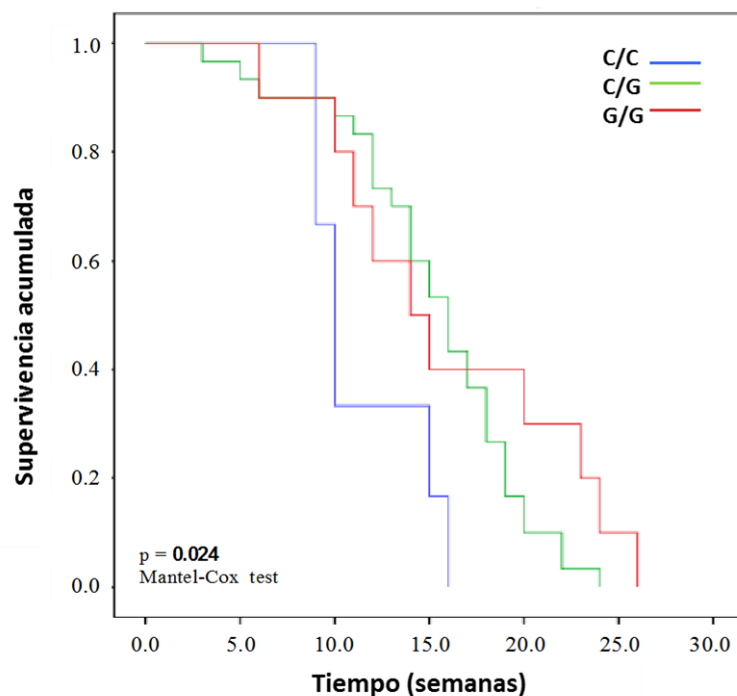


Figura 28. Curva de Kaplan-Meier del polimorfismo rs523349 del gen SRD5A2 en una subpoblación euploide de AEs.

4.9.2. Genotipos individuales divididos por sexo fetal

En la **Tabla 34** se muestran las frecuencias genotípicas en el grupo de AE de sexo genético femenino y en el grupo de AE de sexo genético masculino de los 8 polimorfismos genéticos objeto de estudio: SRD5A2 (rs523349, rs9282858), CYP19A1 (rs4646, rs10046, rs2236722) y ESR1 (rs9340799, rs2234693, rs6932902).

Además, se hizo un análisis de regresión logística por sexo para el cálculo de OR del que se deduce que ninguno de los polimorfismos estudiados presenta diferencias estadísticamente significativas en sus frecuencias genotípicas entre los grupos de sexo femenino y masculino fetales. Dicho análisis se llevó a cabo con los modelos de herencia seleccionados para cada polimorfismo en apartados anteriores y partiendo de la subpoblación escogida al azar de $n=94$.

RESULTADOS

Tabla 34. Frecuencias genotípicas divididas por sexo fetal.

Gen	Referencia	Modelo	Genotipo	Frecuencias genotípicas		Estadística	
				F [n (%)]	M [n (%)]	OR (95% CI)	p-Valor
SRD5A2	rs523349	Ad	C/C	16 (30.2)	4 (12.9)	1.85 (0.90-3.80)	0.086
			C/G	29 (54.7)	20 (64.5)		
			G/G	8 (15.1)	7 (22.6)		
	rs9282858	-	G/G	57 (96.6)	33 (100)	1.00	0.18
A/G			2 (3.4)	0 (0)	0.00 (0.00-NA)		
CYP19A1	rs4646	S-Do	C/C-A/A	30 (51.7)	14 (46.7)	1.00	0.65
			A/C	28 (48.3)	16 (53.3)	1.22 (0.51-2.96)	
	rs10046	Re	G/G-A/G	52 (94.5)	22 (84.6)	1.00	0.15
			A/A	3 (5.5)	4 (15.4)	3.15 (0.65-15.27)	
	rs2236722	-	A/A	56 (96.5)	28 (96.5)	1.00	1
			A/G	2 (3.5)	1 (3.5)	1.00 (0.09-11.51)	
ESR1	rs9340799	Re	A/A-A/G	32 (80)	10 (55.6)	1.00	0.059
			G/G	8 (20)	8 (44.4)	3.20 (0.95-10.73)	
	rs2234693	Do	T/T	12 (19.7)	7 (22.6)	1.00	0.75
			C/T-C/C	49 (80.3)	24 (77.4)	0.84 (0.29-2.41)	
rs6932902	Re	G/G-A/G	59 (98.3)	31 (100)	1.00	0.36	
		A/A	1 (1.7)	0 (0)	0.00 (0.00-NA)		

Ad: Aditivo, S-Do: Sobredominante, Re: Recesivo, Do: Dominante, F: Femenino, M: Masculino, OR: Odds ratio

5. DISCUSIÓN

5.1. SOBRE CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LAS POBLACIONES ESTUDIADAS

5.1.1. Grupo Fetal

Aunque aparentemente haya una distribución homogénea entre trimestres gestacionales y aproximadamente la mitad de los casos del grupo fetal sean del primer trimestre y la otra mitad del segundo, la mayoría de ellos se sitúan entre la semana 10 a 15 de gestación. A partir de la semana 9 el embrión pasa a denominarse feto y comienza la maduración de los esbozos embrionarios, su ubicación topográfica definitiva y el inicio de su función para cubrir parte de las necesidades biológicas (Larsen & Larsen, 2002). Además, el contexto hormonal va fluctuando a lo largo del desarrollo embrionario. A modo de ejemplo, se sabe que las máximas concentraciones de testosterona en fetos del sexo masculino (200-600 ng/dl) se alcanzan a las 16 semanas de gestación, y son comparables a las del adulto. Sin embargo, entre las semanas 16^a y la 20^a la testosterona cae a 100 ng/dl, y tras la 24^a semana, la concentración es mínima y similar a la de la fase prepuberal (Yen, Jaffe, & Barbieri, 2001). Todo esto nos hace enfocar el análisis estadístico de los polimorfismos funcionales de manera individual y/o interaccionados, en la totalidad de la población fetal y dividida por trimestres gestacionales ya que los posibles desbalances hormonales afectarán en menor o mayor medida según el momento preciso del desarrollo.

Un estudio publicado en la revista *British Medical Journal* demostró que el riesgo de AE suponía un: 13,3% para las mujeres de entre 12 y 19 años; 11,1% en el grupo de 20 a 24; 11,9% en el de 25 a 29; un 15% para las de entre 30 y 34; un 24,6% en aquellas que tienen

entre 35 y 39; 51,0% para las de 40 a 44 y 93,4% para las de 45 años o más» (Nybo et al., 2000). El 8,63% de las madres del grupo fetal de nuestro trabajo tienen edades comprendidas entre 40 y 44 años, lo que supone, tal y como anteriormente se expuso un riesgo de AE de un 51,0%. Por tanto, la gran mayoría de las madres (entre 15 y 39 años) presentan un riesgo base de AE asequible para el estudio.

Por otro lado, los abortos precoces predominan sobre los tardíos (80-85%), por ser más frecuentes las causas que actúan de forma más precoz en la gestación. Sin embargo, el grupo fetal de nuestro estudio cuenta con un mayor porcentaje de abortos tardíos (55,56%), posiblemente porque los abortos muy tempranos pasan frecuentemente desapercibidos por la propia gestante y no se tiene registro de ello en las unidades de Ginecología ni, por tanto, en los archivos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital.

5.1.2. Grupo Control

La población escogida para este estudio es un grupo control de una generación coetánea a la de la extracción de la muestra del grupo fetal.

5.2. SOBRE CRITERIOS DE CALIDAD DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

5.2.1. Comparación de frecuencias alélicas y genotípicas con bases de datos científicas

Se compararon las frecuencias alélicas y genotípicas de nuestro grupo control con las frecuencias publicadas en la base de datos científica “1000 Genomes” de las poblaciones EUR (European) e IBS (Iberian Population in Spain). No se observaron diferencias significativas entre las frecuencias poblaciones, lo que avala en primera instancia la selección de la población y el análisis molecular (ver **Anexo II**).

5.2.2. Equilibrio de Hardy-Weinberg

Una vez obtenidas las frecuencias alélicas y genotípicas de los 8 SNPs en la población de casos y controles de nuestro estudio y antes de analizar la asociación entre éstos y la enfermedad, se debe comprobar si se cumple el EHW en la población de controles. Este principio determina qué frecuencias debemos observar asumiendo que los alelos se transmiten de forma independiente entre generaciones y siempre que no haya selección entre ellos (Iniesta et al., 2005).

Los 8 polimorfismos estudiados en nuestra población de controles están en EHW, es decir, podemos aceptar que las frecuencias genotípicas observadas para cada uno de los SNPs son compatibles con el EHW. En la muestra de AEs es posible que no se cumpla el EHW, ya que esperamos que en estos casos algunas de las frecuencias genotípicas observadas sean

distintas a las esperadas debido a que ese polimorfismo puede ser responsable, en cierta forma, de la aparición de la patología. Un ejemplo de esto pudiera ser en nuestro estudio el rs9340799 del gen ESR1 que se desvía del equilibrio en la población de casos.

Las razones para que un SNP no cumpla EHW en un grupo control pueden ser varias:

- Tamaño muestral pequeño.
- Fallo en el método de genotipado. En ocasiones se producen sesgos al interpretar los resultados por ser más fácil de detectar un genotipo que otro.
- Que los individuos no sean independientes (p. ej., por consanguinidad) o que se dé una selección de un alelo (p. ej., por estar asociado con la longevidad).
- Nivel de significación del 5% empleado. Por azar puede observarse falta de ajuste al esperado, aunque la condición de transmisión de alelos con independencia sea correcta en la población del estudio.

En conclusión, este estudio nos ha permitido aplicar un segundo control de calidad a nuestras muestras y nos ha llevado a la decisión de seguir estudiando los 8 SNPs previamente seleccionados.

5.3. SOBRE EL ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN DE GENOTIPOS INDIVIDUALES Y MODELOS DE HERENCIA

El papel del sistema hormonal en el desarrollo embrionario y viabilidad fetal se presupone clave, ya que el orden epigenético del correcto desarrollo fetal está en parte determinado por el sistema hormonal desde el principio (Moog et al., 2015). Existen polimorfismos genéticos que están implicados directamente en el funcionamiento de las hormonas sexuales y cuya expresión individual e interacción puede dar balances hormonales variables cuya repercusión en el desarrollo y viabilidad fetal puede ser importante.

En el presente estudio hemos encontrado una asociación en muestras fetales con el riesgo de AE de causa desconocida en los polimorfismos genéticos rs523349 del gen **SRD5A2**; rs4646, rs10046 y rs2236722 del gen **CYP19A1** y el rs9340799 del gen **ESR1** implicados en el metabolismo de hormonas sexuales. Por el contrario, los polimorfismos rs9282858 del gen **SRD5A2** y rs2234693 y rs6932902 del gen **ESR1** no mostraron asociación estadísticamente significativa.

La enzima 3-oxo-5-alfa-esteroide 4-deshidrogenasa 1 es codificada por el gen **SRD5A2**, y cataliza la conversión de testosterona en el andrógeno biológicamente más activo, la dihidrotestosterona (DHT). El SNP rs523349 es una variante C/G y corresponde a una mutación de sentido equivocado con un cambio de valina por leucina, conocido también por V89L. Se sabe que la variante leucina (G) disminuye la tasa de conversión de testosterona en DHT (Beesley et al., 2007). En nuestros resultados se observa una alta asociación del alelo G con el riesgo de abortar. Esta asociación se muestra significativa tanto en el genotipo heterocigótico como en el homocigótico, proporcionando cada copia de G una modificación

del riesgo en una cantidad aditiva. Los homocigotos GG presentaron el doble de riesgo (OR=5.87, IC=2.79-12.35, $p<0.0001$) que los heterocigotos CG (OR=3.25, IC=1.96-5.40, $p<0.0001$). Como se ha mencionado este alelo está asociado a una disminución de la tasa de conversión de testosterona por lo que existe la posibilidad de un aumento de testosterona como sustrato y una disminución de DHT. Nuestros datos no coinciden con otros autores (Huber et al., 2006) que no observaron relación de este polimorfismo en madres con abortos de repetición. Sin embargo, nuestros resultados se hallan en muestras fetales de AEs de causa desconocida, por lo que ambos trabajos no son comparables. Por otro lado, estudios en modelos animales mutados en el gen SRD5A1 encuentran asociación entre la deficiencia de la enzima 5α -reductasa y pérdida fetal (Mahendroo et al., 1997).

El gen **CYP19A1** codifica la enzima aromatasa. Esta enzima se encuentra en el retículo endoplasmático de la célula y cataliza los últimos pasos de la biosíntesis de los estrógenos. Los polimorfismos seleccionados del gen CYP19A1 representan tres espectros funcionales de la aromatasa en su paso a estradiol: el rs4646 (A/C) muestra un aumento del paso a estradiol del alelo C (Raskin et al., 2009), el rs10046 (G/A) un aumento del paso a estradiol en el alelo A (Haiman et al., 2007; Fasching et al., 2008) y el rs2236722 G/A es un polimorfismo que presenta una casi total inactividad de la aromatasa (alelo G) en el paso de testosterona a estradiol (Nativelle-Serpentini et al., 2002).

En relación a este último SNP, rs2236722 G/A, solo se pueden observar individuos heterocigóticos, ya que no existen sujetos homocigóticos para esta variante en las poblaciones estudiadas. Este hecho poco usual a nivel poblacional (polimorfismo solo representado en los heterocigóticos AG y tan solo en el 1% de determinadas poblaciones) puede ser interpretado como una haploinsuficiencia de la aromatasa que compromete el desarrollo fetal y que por tanto su actividad incompleta o variaciones de la misma pueden

ser decisivas en la viabilidad fetal. No obstante, debido a su baja frecuencia, estos resultados deben ser reproducidos y contrastados en estudio posteriores.

Con respecto al rs10046 del CYP19A1, el alelo A que está asociado a una mayor tasa de actividad de la aromatasa (Fasching et al., 2008) presenta un efector protector sobre el AE. Por el contrario, el alelo G (o C) de dicho SNP presenta un efecto de riesgo sobre el AE (Cupisti et al., 2009). Nuestros resultados muestran un efecto protector del genotipo AA y por tanto, un mayor riesgo de AE en genotipos A/G-G/G, lo cual se afirma en el estudio de Cupisti y cols (2009). En cuanto al rs4646 del mismo gen, observamos que los individuos heterocigotos presentan riesgo comparados con ambos grupos de homocigotos. Este efecto observado es de difícil explicación ya que cada variante tiene consecuencias opuestas sobre la actividad de la aromatasa.

En resumen, podríamos decir que nuestros resultados sobre los polimorfismos relacionados con el CYP19A1 muestran unas asociaciones funcionales coherentes entre la viabilidad fetal y una adecuada capacidad de conversión de testosterona en estradiol.

Es de tener en cuenta la influencia conocida de los estrógenos para el éxito reproductivo, ya que influyen en el desarrollo del endometrio, así como la función placentaria, la maduración y la perfusión (Albrecht et al., 2000; Guibourdenche et al., 2009). No existen referencias del posible efecto de una disminución de estradiol fetal sobre su viabilidad, dada la alta impregnación estrogénica del feto durante el embarazo (Gerhardt et al., 2006) aunque pudiera darse, y podría estar coadyuvado por una disminución de la actividad del receptor estrogénico **ESR1**; tal es el caso del polimorfismo analizado en este trabajo. En estudios recientes sobre los polimorfismos rs9340799 (XbaI) y rs2234693 (PvuII) del ESR1 se ha evidenciado resultados de asociación entre estos polimorfismos y el AE, en mujeres abortadoras (Pineda et al., 2010) y en tejidos de abortos (Anousha et al.,

2013) similares a los obtenidos en este trabajo. Recientemente, Pan et al. (2014) hallaron diferencias significativas entre el alelo G y el genotipo GG del polimorfismo rs9340799 (XbaI) y mujeres abortadoras de repetición de causa desconocida. En nuestro caso, tanto el alelo G como el genotipo GG se asoció de igual modo al AE, con la salvedad de que nuestra población a estudiar es el propio tejido fetal.

Modelos de herencia

Dado que cada individuo posee una pareja de alelos, el riesgo asociado con cada genotipo calculado puede depender o no del número de copias de un alelo variante, lo que nos permite definir varios modelos de herencia posibles cuya verosimilitud se puede explorar mediante una adecuada codificación de los genotipos.

No es fácil hallar un criterio para establecer el modelo de herencia que mejor se ajusta para un polimorfismo concreto, y lo adecuado es obtener una validación en el laboratorio y/o ser replicado en otros estudios epidemiológicos.

A continuación se explican los modelos de herencia que mejor se ajustan a los polimorfismos tomando como criterio para su elección el menor valor de AIC y BIC obtenido:

El modelo seleccionado para el polimorfismo **rs523349** del gen SRD5A2 fue el **aditivo**. Este modelo supone que cada copia de G modifica el riesgo en una cantidad aditiva (en escala logit); por tanto los homocigotos GG tienen el doble de riesgo (aproximadamente 6 de OR) que los heterocigotos CG (aproximadamente 3 de OR). Por otro lado, en el caso del polimorfismo **rs9282858** del mismo gen, no hubo representación del genotipo AA ni en la población control ni en la de casos, por lo que no ha lugar a la selección de modelo de herencia.

En cuanto al polimorfismo **rs4646** del gen CYP19A1, encontramos que los individuos homocigotos para el genotipo más frecuente (CC) y el genotipo variante (AA) tienen prácticamente el mismo riesgo, por lo que el modelo que se ajusta mejor a esta circunstancia es el **sobredominante**. Este modelo es de difícil explicación biológica dado que solo se expresa riesgo en heterocigocia (AC en rs4646), posiblemente porque la frecuencia del genotipo mutado es muy baja.

En el caso del SNP **rs10046** del gen CYP19A1, hace falta dos copias de la variante A para modificar el riesgo: los heterocigotos AG y los homocigotos del alelo de mayor frecuencia GG tienen aproximadamente el mismo riesgo, de tal forma que en este modelo **recesivo** el genotipo AA se compara con GG y AG. Se puede interpretar en el rs10046 que son necesarias dos copias de A para obtener un efecto protector.

Al igual que para el caso del rs9282858, no existe representación ni en la población control ni en la de casos de individuos con genotipo GG en el **rs2236722** del gen CYP19A1.

Los SNPs **rs9340799** y **rs6932902** del gen ESR1 se ajustan a un modelo **recesivo**. En el primer polimorfismo, hace falta dos copias de la variante G para modificar el riesgo: los heterocigotos AG y los homocigotos del alelo de mayor frecuencia AA tienen aproximadamente el mismo riesgo, de tal forma que en este modelo el genotipo GG se compara con AA y AG. En este caso 2 alelos G contribuye a un aumento del riesgo asociado a la enfermedad. Sin embargo, para el rs6932902, aunque estadísticamente el modelo seleccionado sería recesivo, existe una representación tan baja del genotipo AA en las poblaciones estudiadas que no se puede definir un modelo de herencia.

Por último, el modelo de herencia seleccionado para el polimorfismo **rs2234693** supone que una única copia de C sería suficiente para modificar el riesgo y ser portador de 2 copias lo modifica en igual magnitud. A este modelo se le denomina “**dominante**”.

5.3.1. Genotipos individuales divididos por trimestres gestacionales

Las asociaciones arriba mencionadas se hacen más fuerte estadísticamente cuando la población se divide por trimestres gestacionales, hecho que es aún más remarcable si tenemos en cuenta el tamaño de la población al dividir por trimestres.

Se debe destacar el caso del **rs523349** de la enzima α -5-reductasa, donde se **duplica el riesgo en el segundo trimestre**, así como el polimorfismo **rs2236722** de la enzima aromatasa, donde los AEs con genotipo AG (muy infrecuente) se sitúan en el segundo trimestre de gestación. En cuanto al rs10046 del CYP19A1 se observó un aumento de protección para el alelo A en este mismo periodo. Además, el SNP **rs2234693** del gen ESR1, que en el análisis previo con la población completa no mostró significancia, presentó un riesgo de 4.89 (IC=1.89-12.61, p=0.0001) en el segundo trimestre de gestación. Resultó que cerca del 91% de los AEs de este segundo trimestre presentaban como mínimo un alelo C del rs2234693.

Estos resultados nos llevan a plantear la posible interrelación de estos polimorfismos con variaciones de balances hormonales en un momento clave de contexto hormonal-fetal: el comienzo del segundo trimestre del embarazo. Las variantes implicadas provocarían un desequilibrio endocrino motivado por una disminución de DHT y estradiol, y/o una disminución de la actividad del ESR1, frente un aumento de testosterona.

Es sabido que el feto en la etapa inicial de la gestación tiene un aumento de testosterona cuyo mayor nivel se alcanza alrededor de la 10^a-16^a semanas (230 ng/dl). Posteriormente por retroalimentación negativa a la pituitaria, causada por el aumento de los estrógenos maternos, la testosterona fetal disminuye a 75-100 ng/dl (Kiesewetter, Kalayoglu

& Sachs, 1973). Por tanto, un embarazo con éxito sólo puede lograrse a través del diálogo equilibrado entre la madre y el feto mediado a través de la placenta.

Por otro lado, el aumento de la significación durante el segundo trimestre de embarazo podría tener relación con la circunstancia conocida de que la frecuencia de anomalías cromosómicas en AE del primer trimestre de embarazo es de 50-60%, y en el segundo trimestre de gestación las anomalías cromosómicas son mucho menos frecuentes, representando un 15% de los AEs (Simpson, 2007). Es decir, analizando la población del segundo trimestre de gestación nos aseguramos de que aproximadamente el 85% de los casos analizados son euploides.

5.4. SOBRE EL DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO Y ASOCIACIONES HAPLOTÍPICAS

La mayoría de las enfermedades complejas (determinadas por varios genes y por factores ambientales) no siguen un patrón hereditario mendeliano típico, por lo que los estudios clásicos de ligamiento no se pueden aplicar. En estos casos hay que acudir a métodos de ligamiento que no requieren ajuste de la muestra a un modelo concreto de herencia, llamados **métodos no-paramétricos o independientes de modelo**.

Los genes se transmiten en cromosomas con estructura fija y la posición de cada locus en el cromosoma no se altera excepto en el caso de translocaciones y reorganizaciones cromosómicas. Dos loci están ligados si se encuentran próximos en un cromosoma. La asociación estadística entre alelos de loci cercanos de un cromosoma se denomina “Desequilibrio de Ligamiento” (DL) y se genera por mutación y selección. Es una “violación” de la segunda ley de Mendel. Cuando los alelos de diferentes marcadores se encuentran próximos entre sí, no existe una segregación independiente de los mismos, lo cual trae consigo que a nivel poblacional se observen genotipos comunes entre individuos. El valor de LD se estima a partir de las frecuencias alélicas y haplotípicas observadas en la población, y este valor va a medir la desviación de estas frecuencias observadas, con respecto a las esperadas, cuando los loci segregan de manera aleatoria.

Los estudios de genes candidatos generalmente incluyen varios SNPs dentro de un mismo gen. En nuestro caso, 2 polimorfismos del gen SRD5A2, 3 del gen CYP19A1 y 3 del gen ESR1. En general, los SNPs bajo investigación capturan información sobre la variabilidad genética subyacente del gen en consideración, aunque el SNP pueda no servir

como una variante causal de la enfermedad. Esto es, los SNPs bajo estudio no son necesariamente funcionales (Foulkes, 2009).

5.4.1. Gen SRD5A2

Los polimorfismos rs523349 y rs9282858 del gen SRD5A2 no se encuentran en desequilibrio de ligamiento, y por lo tanto no parecen heredarse en bloque. Los resultados del análisis de haplotipos muestran una asociación del alelo G del rs523349 cuando se combina con el alelo G del rs9282858 con el riesgo de AE. Si bien es cierto, el riesgo obtenido mediante el **haplotipo GG** (OR=2.38) es menor al resultante del análisis de asociación de genotipos individuales para el rs523349 (OR=2.61). Dado que de forma individual el rs9282858 no estaba asociado a la enfermedad, podemos pensar que el riesgo resultante del análisis de haplotipos se debe al peso que ejerce el alelo G del rs523349 y no tanto por el haplotipo en sí mismo.

Como se ha mencionado, el alelo G del rs523349 está asociado a una disminución de la tasa de conversión de testosterona y de manera estadísticamente significativa a los AE (Mahendroo et al., 1997) por lo que existe la posibilidad de un aumento de testosterona como sustrato y una disminución de DHT.

5.4.2. Gen CYP19A1

Los 3 polimorfismos estudiados del gen CYP19A1 (rs4646, rs10046 y rs2236722), presentaron valores de D' muy próximos a 1 y un valores de $p < 0.05$ en el estudio de ligamiento, lo que indica que se encuentran en **desequilibrio**. Son SNPs que se localizan

físicamente muy cerca y probablemente se heredan juntos en pequeños bloques, lo que hace necesario su estudio de asociación haplotípica.

Del análisis de asociación de **haplotipos doble y triples** se deduce que **no existe asociación** entre éstos y el AE de causa desconocida. Es interesante observar que en el estudio preliminar de asociación con genotipos individuales, el alelo G del rs2236722 mostraba un riesgo de 13,83, y al realizar las posteriores combinaciones haplotípicas dicho alelo desaparece. Esto es debido a que existe muy poca representación poblacional de la variante mutada, y estadísticamente no se dan combinaciones haplotípicas con suficiente frecuencia con el alelo G del rs2236722.

5.4.3. Gen ESR1

Los SNPs rs9340799 (XbaI) y rs2234693 (PvuII) del gen ESR1 se encuentran en un fuerte **desequilibrio de ligamiento** a consecuencia de la corta distancia física entre ellos (46 nt). Por el contrario, el rs6932902 del mismo gen no presenta una p significativa cuando se combina con rs9340799 o rs2234693.

Las frecuencias haplotípicas inferidas de nuestro estudio en el grupo control son muy similares a las obtenidas en el trabajo de Pineda et al. (2010) (AT: 0.56 vs. 0.54; GC: 0.33 vs. 0.37; AC: 0.10 vs. 0.08; GT: 0.004 vs. 0.002). Sin embargo, nos llamó especialmente la atención que el 10% del grupo de AE presentaran el haplotipo GT el cual es muy poco frecuente en la mayoría de la población viva (0.37% de nuestro grupo control). Por lo tanto, en el estudio de asociación, el haplotipo GT mostró una fuerte asociación con la enfermedad (OR=30.84, $p < 0.001$). Una posible explicación a nivel molecular reside en que el alelo C del SNP rs2234693, definido por la enzima de restricción PvuII, contiene un sitio de unión funcional para el factor de transcripción B-myb que incrementa el ratio de transcripción del

gen ESR1 (Herrington et al., 2002). Sin embargo, el alelo T, no presenta dicho sitio de unión y podría representar una menor expresión del gen ESR1.

Por otro lado, a pesar de que el rs6932902 del gen ESR1 no estaba asociado a la enfermedad en el estudio preliminar de genotipos individuales, cuando se asocia el alelo G de éste al haplotipo GT de los polimorfismos rs9340799 y rs2234693, respectivamente, el riesgo aumenta considerablemente (OR=30.84 vs. OR=50.31, GT vs. GTG).

Aunque todos estos resultados del análisis de haplotipos deben manejarse con cuidado y ser reproducidos en otros trabajos con un mayor tamaño muestral, se pueden dar tres tipos de explicaciones a estos hechos:

1. Error de genotipado. En nuestro caso las frecuencias genotípicas obtenidas en cada uno de los polimorfismos fueron contrastadas con bases de datos científicas publicadas (ver apartado 5.2.1.).
2. Aumento de la frecuencia de entrecruzamiento. Hecho muy improbable por tratarse de SNPs que se encuentran en desequilibrio de ligamiento.
3. Segregación de la población hacia abortos de haplotipo GTG por desarrollo inviable.

5.5. SOBRE EL ESTUDIO DE INTERACCIONES GÉNICAS

Hasta el momento hemos realizado diferentes análisis de asociación de un polimorfismo individual con la enfermedad y análisis simultáneos de múltiples loci en regiones candidatas de un gen concreto (en particular, regiones del gen SRD5A2, del gen CYP19A1 y del gen ESR1). Dado que dichos genes se traducen en enzimas implicadas en una ruta bioquímica relacionada con el metabolismo de hormonas sexuales, es interesante hacer estudios de asociación gen a gen.

Cuando se analizan las interacciones genotípicas de los distintos polimorfismos de los 3 genes a estudio, hay casos en los que se observa una sinergia que incrementa la razón de riesgo. En nuestro caso hemos seleccionado el **incremento triple de la razón de riesgo de las estimaciones individuales** como criterio de seguridad. Bajo este criterio cumplen las siguientes interacciones:

- a) Genotipo GG del rs523349 del gen SRD5A2 y genotipo AC del rs4646 del gen CYP19A1, la cual nos lleva a una OR de 14.28 (2.39-85.32).
- b) Genotipo CG del rs523349 del gen SRD5A2 y genotipo AG del rs2236722 del gen CYP19A1, la cual nos lleva a una OR de 69 (3.71-1283.13).
- c) Genotipo AC del rs4646 del gen CYP19A1 y genotipo GG del rs9340799 del gen ESR1, la cual nos lleva a una OR de 5.95 (2.75-12.87).

Todo lo anteriormente expuesto nos hace plantearnos tres posibles interpretaciones derivadas del equilibrio hormonal entre estrógenos, testosterona y DHT:

➤ **Aumento de testosterona**

Teniendo en cuenta que los polimorfismos de SRD5A2 y CYP19A1 confluyen en la posibilidad de un efecto común, cual es, un aumento de la testosterona, descrito como teratógeno de categoría X [según la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA)], tendríamos que considerar que este aumento de dicha hormona en la encrucijada enzimática puede estar relacionado con la viabilidad fetal.

➤ **Disminución de estradiol y efecto estrogénico**

Al igual que Cupisti et al. (2009), observamos una asociación entre polimorfismos del gen que codifica la enzima aromatasa, implicada en la conversión de testosterona a estradiol, y AE. Los estrógenos son importantes para el éxito reproductivo, ya que influyen desde el punto de vista materno en el desarrollo del endometrio, así como la función placentaria, la maduración y la perfusión (Albrecht et al., 2000 y Guibourdenche et al., 2009). No existen referencias del posible efecto de una disminución de estradiol sobre la viabilidad fetal, y aunque pudiera darse, estaría ligado a su vez a un aumento de testosterona.

➤ **Desbalance hormonal: DHT-Testosterona-Estradiol**

Como anteriormente hemos descrito, el feto en la etapa inicial de la gestación tiene un aumento de testosterona cuyo mayor nivel se alcanza alrededor de la 10^a-16^a semanas (230 ng/dl). Posteriormente por retroalimentación negativa a la pituitaria, causada por el aumento de los estrógenos maternos, la testosterona fetal disminuye a 75-100 ng/dl (Kiesewetter et al., 1973). Por tanto, un embarazo con éxito sólo puede lograrse a través del diálogo equilibrado entre la madre y el feto mediado a través de la placenta.

5.6. SOBRE EL ESTUDIO DE CROMOSOMOPATÍAS Y POLIMORFISMOS EN LA SUBPOBLACIÓN EUPLOIDE

La denominación de “**subpoblación euploide de AEs**” no es del todo correcta porque no se ha realizado un estudio del cariotipo completo en ella. Sin embargo, podemos decir que dicha subpoblación tiene elevada probabilidad de serlo dado que han sido testadas las cromosomopatías más frecuentes descritas en AEs: cromosomas 13, 15, 16, 18, 21, 22, X e Y (Quiroga de Michelena et al., 2007; Fritz et al., 2001). Además, de los 67 AEs normales para las cromosomopatías analizadas, 44 (65%) eran abortos correspondientes al segundo trimestre de gestación, donde la aparición de una anomalía cromosómica se reduce al 15% de los AEs (Simpson, 2007).

En el estudio de asociación de genotipos individuales en la subpoblación euploide **se confirman los resultados obtenidos en la población completa** para el rs523349 del gen SRD5A2, aunque con un ligero aumento de riesgo pero manteniendo la misma potencia estadística. La mencionada asociación se distribuye claramente por genotipos cuando la población es analizada cuantitativamente por la edad gestacional del aborto en el análisis de supervivencia. Se observó que los AEs con uno o dos alelos G del rs523349 presentan una mayor frecuencia de aborto en el segundo trimestre gestacional. Se sabe que la variante G (leucina) disminuye la tasa de conversión de testosterona en DHT (Beesley et al., 2007). Este efecto puede ser importante en el segundo trimestre de gestación en el que se presupone clave la biodisponibilidad de DHT o la adecuada disminución de los niveles de testosterona fetales a partir de la semana 16 (Kiesewetter et al., 1973).



Los resultados obtenidos para los SNPs estudiados de los genes CYP19A1 y ESR1 confirman igualmente las tendencias halladas pero de manera menos contundente desde el punto de vista estadístico que en el caso del polimorfismo rs523349. El riesgo se pierde en el caso del rs4646 en modelo sobredominante y del rs2236722 del gen CYP19A1. Ambos, como se explicó en apartados anteriores, dieron resultados para la población fetal completa de difícil explicación, uno por lo que significa el propio modelo sobredominante (rs4646) y otro por los elevados riesgos obtenidos y la poca representación del genotipo mutado en la población (rs2236722). Por tanto, insistimos en que esos resultados deben reproducirse en futuras investigaciones para confirmarlos.

Por otro lado, en nuestra población observamos que el número de **AE femeninos duplica al masculino**. Se ha publicado que la tasa de aborto masculina es mayor en los primeros meses del embarazo, siendo, por tanto, más alto el número de abortos de embriones de sexo masculino que femenino. Esta tendencia se invierte a medida que avanza la gestación (Botella y Clavero, 1993).

En el estudio de los polimorfismos seleccionados no observamos diferencias estadísticamente significativas en sus frecuencias genotípicas entre los grupos fetales de sexo femenino y masculino. Si bien es destacable, en el polimorfismo rs9340799 observamos una asociación casi significativa ($p=0.059$) del genotipo GG en el cual se duplica la población de AE masculinos respecto a la femenina. Este hecho es destacable porque hay una inversión de la ratio femenino-masculino con respecto a la población de estudio.

DISCUSIÓN

Este es el primer estudio que describe una asociación entre los polimorfismos rs523349, rs10046, rs2236722, rs9340799 y rs2234693 en muestras de tejido fetal de AE de causa desconocida. Los polimorfismos asociados se relacionan con una mayor disponibilidad de la testosterona, descrita como teratógeno de categoría X (según la FDA), una disminución de DHT y estradiol y una disminución de la actividad mediada por el receptor de estrógenos tipo 1, todo ello clave en el desarrollo del feto en el segundo trimestre de gestación. Por todo lo mencionado, se debería tener en cuenta que estos desequilibrios hormonales puedan estar relacionados con la viabilidad fetal. Los resultados obtenidos en este estudio, como todos los estudios de población reducida, necesitan reproducirse.

Varias preguntas surgen a partir de nuestros resultados: ¿Hay un desequilibrio hormonal crítico para la viabilidad fetal?, ¿los cambios en el riesgo asociado a distribuciones de variantes genéticas en el segundo trimestre podrían ser factores de influencia determinante en el desarrollo fetal?, ¿pueden los cambios hormonales en la mujer afectar al desarrollo fetal durante el segundo trimestre dependiendo del genotipo de éste?

5.7. LIMITACIONES

- Pequeño tamaño muestral.
- Caracterización del grupo fetal pobre, análisis de cromosomopatías y sexo fetal incompleto.
- Contribución de variedad de estilos de vida y factores ambientales durante el embarazo que no son controlables.
- Las vías secundarias que afectan a la traducción y metabolismo de proteínas no están contempladas en este trabajo.

5.8. PERSPECTIVAS FUTURAS

El diseño de los estudios genéticos para la identificación de genes y mecanismos biológicos implicados en la patogénesis de los AE de causa desconocida tiene desafíos, ya que hay varias opciones en la definición de los sujetos de estudio y controles. Un modelo de estudio ideal trataría de analizar a los casos abortados, la pareja y los hijos vivos de la misma pareja como control interno.

La aplicación de estudios de asociación genética centrados en genes candidatos pre-seleccionados con posible efecto patológico (como ocurre en nuestro caso) muestra sus limitaciones. Polimorfismos de aproximadamente 100 genes han sido investigados y asociados con AE (de repetición) y frecuentemente han dado resultados inconsistentes o negativos. Las direcciones futuras en investigación de factores de riesgo genéticos predictivos y biomarcadores de AE de causa desconocida se basarán en la integración de enfoques alternativos en los estudios de genes individuales (SNP, variaciones de número de copia, expresión de gen-proteína, regulación epigenética), así como en el análisis de todo el genoma. Todo esto se vería reforzado por la red de colaboración entre centros de investigación y clínicas de reproducción asistida (Rull, Nagirnaja & Laan, 2012).

En nuestro caso particular, sería muy interesante llevar a cabo una serie de mejoras:

- Incremento del tamaño muestral para aumentar el poder estadístico y comprobar si se repiten las tendencias descritas tras dividir la muestra por trimestres.

- Estudio completo de cromosomopatías y sexo fetal.

- Trabajar con el producto de gestaciones no evolutivas conservadas en alcohol sin posterior parafinización para obtener una mejor calidad de extracción de ADN.

- Estudio de asociación entre niveles hormonales de estradiol y testosterona y genotipos de las enzimas SRD5A2, CYP19A1 y ESR1 para verificar los efectos biológicos de los polimorfismos.

6. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La variante G del polimorfismo rs523349 del gen SRD5A2, relacionado con una disminución de la actividad α 5-reductasa, y por tanto, con una acumulación de testosterona, se asocia a un fuerte aumento del riesgo de aborto. Este aumento se duplica en función del número de alelos de riesgo G implicados y se incrementa cuando se llega al segundo trimestre de embarazo, periodo en el que el papel de la testosterona adquiere mayor relevancia, sobretodo en fetos masculinos. No se hallaron haplotipos reseñables para el gen SRD5A2.
2. De los tres polimorfismos funcionales estudiados sobre la aromatasa (CYP19A1), enzima que cataliza el paso de testosterona a estradiol, dos de ellos, en concreto el rs10046 y el rs2236722, ambos relacionados con una disminución de la conversión de testosterona en estrógenos, presentan variaciones de riesgo de aborto, que se ve aumentado en el segundo trimestre de gestación. La mayor expresión del riesgo se observa en el genotipo A/G del rs2236722 del CYP19A1. Este genotipo, cuyo alelo G es muy escaso, está sobrerrepresentado en la población de AEs y asociado a una funcionalidad nula. Debido a limitaciones poblacionales, no se hallaron haplotipos reseñables para los polimorfismos estudiados del CYP19A1.
3. De los tres polimorfismos estudiados del ESR1, el genotipo GG del rs9340799, relacionado con una mayor actividad del receptor, presentó unos niveles de riesgo significativos comparados con los controles, siendo ligeramente mayor este riesgo en el primer trimestre de gestación.
4. Tras estudiar los polimorfismos del ESR1 en asociación haplotípica, se halló una fuerte asociación con el AE de haplotipo GT de los rs9340799 y rs2234693. Ambos SNPs se encuentran en un fuerte desequilibrio de ligamiento, y el

CONCLUSIONES

haplotipo GT no se presenta en la población control, por lo que este resultado nos lleva a plantear futuros estudios de confirmación.

5. En la valoración de las interacciones genotípicas de los distintos genes se encuentran fuertes incrementos de OR entre el rs523349 del SRD5A2 cuando se asocia con el rs4646 o el rs2236722 del CYP19A1. También entre el rs4646 del CYP19A1 y el rs9340799 del ESR1. Todas estas interacciones proponen una tendencia funcional, cual es, el aumento de testosterona, en detrimento de la actividad estrogénica y de dihidrotestosterona.
6. La distribución de AEs según el periodo gestacional en que se producen, en los polimorfismos que se asocian a los mismos, se agrupa significativamente en el comienzo del segundo trimestre, periodo en el que se produce un incremento de la producción testosterona en fetos masculinos.
7. En general, los resultados obtenidos nos permiten concluir que un desequilibrio hormonal entre la vía de formación de DHT y la vía de formación de estradiol a partir de la testosterona juega un papel importante en el correcto desarrollo fetal; que este desequilibrio posiblemente afecta más a los fetos masculinos; y que se observa mayoritariamente en el comienzo del segundo trimestre de embarazo.

7. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Amado, J. A. & Flórez, J. (2003). Hormonas sexuales: estrógenos, gestágenos, andrógenos y anticonceptivos hormonales. *Farmacología humana*, 4ª edición. Editorial Masson, Barcelona. Sección IX, cap. 50.
- A, R., & Gloria, C. (2000). Testículo no descendido. *Revista chilena de pediatría*, 71(3), 246-250. <http://doi.org/10.4067/S0370-41062000000300012>
- Adelberg, A. M., & Kuller, J. A. (2002). Thrombophilias and recurrent miscarriage. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 57(10), 703-709. <http://doi.org/10.1097/01.OGX.0000031756.64791.25>
- Albrecht, E. D., Aberdeen, G. W., & Pepe, G. J. (2000). The role of estrogen in the maintenance of primate pregnancy. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 182(2), 432-438. [http://doi.org/10.1016/S0002-9378\(00\)70235-3](http://doi.org/10.1016/S0002-9378(00)70235-3)
- Alonso, R.M., Cejas, A., Rodríguez, A., & Serrat, I. (1987). Posibles efectos teratogénicos de la medicación materna sobre el feto. *Rev Cubana Med Gen Integr*; 3(3): 21-6.
- Altmäe, S., Haller, K., Peters, M., Hovatta, O., Stavreus-Evers, A., Karro, H., ... Salumets, A. (2007). Allelic estrogen receptor 1 (ESR1) gene variants predict the outcome of ovarian stimulation in in vitro fertilization. *Molecular Human Reproduction*, 13(8), 521-526. <http://doi.org/10.1093/molehr/gam035>
- Anousha, N., Hossein-Nezhad, A., Biramijamal, F., Rahmani, A., Maghbooli, Z., Aghababaei, E., & Nemati, S. (2013). Association study of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with spontaneous abortion: is this a possible reason for unexplained spontaneous abortion? *BioMed Research International*, 2013, 256470. <http://doi.org/10.1155/2013/256470>
- Anwar, A., McTernan, P. G., Anderson, L. A., Askaa, J., Moody, C. G., Barnett, A. H., ... Kumar, S. (2001). Site-specific regulation of oestrogen receptor-alpha and -beta by oestradiol in human adipose tissue. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 3(5), 338-349.

- Armijo, J.A., & Benitez, J.(1997). Factores fisiológicos que condicionan la respuesta a los fármacos. *Farmacología humana 3º ed.* Barcelona: Editorial Masson. p.107-29.
- Armstrong, B. G., McDonald, A. D., & Sloan, M. (1992). Cigarette, alcohol, and coffee consumption and spontaneous abortion. *American Journal of Public Health*, 82(1), 85-87.
- Aruna, M., Nagaraja, T., Andal, S., Tarakeswari, S., Sirisha, P. V. S., Reddy, A. G., ... Reddy, B. M. (2010). Role of progesterone receptor polymorphisms in the recurrent spontaneous abortions: Indian case. *PloS One*, 5(1), e8712. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0008712>
- Ayvaz, O. U., Ekmekçi, A., Baltacı, V., Onen, H. I., & Unsal, E. (2009). Evaluation of in vitro fertilization parameters and estrogen receptor alpha gene polymorphisms for women with unexplained infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 26(9-10), 503-510. <http://doi.org/10.1007/s10815-009-9354-2>
- Babiker, F. A., De Windt, L. J., van Eickels, M., Grohe, C., Meyer, R., & Doevendans, P. A. (2002). Estrogenic hormone action in the heart: regulatory network and function. *Cardiovascular Research*, 53(3), 709-719.
- Bajo JM, Fabre E, Álvarez P, et al. (2009). *Amenaza de aborto y aborto. Signos ecográficos de mala evolución de la gestación*, cap. 17. En: *Ultrasonografía en infertilidad*. Editorial Marbán; 298-324
- Barrionuevo, F. J., Burgos, M., Scherer, G., & Jiménez, R. (2012). Genes promoting and disturbing testis development. *Histology and Histopathology*, 27(11), 1361-1383.
- Beesley, J., Jordan, S. J., Spurdle, A. B., Song, H., Ramus, S. J., Kjaer, S. K., ... Australian Breast Cancer Family Study. (2007). Association between single-nucleotide polymorphisms in hormone metabolism and DNA repair genes and epithelial ovarian cancer: results from two Australian studies and an additional validation set. *Cancer*

- Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 16(12), 2557-2565. <http://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0542>
- Beever, C. L., Stephenson, M. D., Peñaherrera, M. S., Jiang, R. H., Kalousek, D. K., Hayden, M., ... Robinson, W. P. (2003). Skewed X-chromosome inactivation is associated with trisomy in women ascertained on the basis of recurrent spontaneous abortion or chromosomally abnormal pregnancies. *American Journal of Human Genetics*, 72(2), 399-407. <http://doi.org/10.1086/346119>
- Bellver, J., Meseguer, M., Muriel, L., García-Herrero, S., Barreto, M. a. M., Garda, A. L., ... Garrido, N. (2010). Y chromosome microdeletions, sperm DNA fragmentation and sperm oxidative stress as causes of recurrent spontaneous abortion of unknown etiology. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 25(7), 1713-1721. <http://doi.org/10.1093/humrep/deq098>
- Bijlsma, J.W., Duursma, S., Thijssen, J.H., & Huber, O. (1982). Influence of nandorlondecanoate on the pituitary-gonadal axis in males. *Acta Endocrinol (Copen)* Sept 101(1). 108-12.
- Blumenthal, P. D. (1992). Abortion: epidemiology, safety, and technique. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 4(4), 506-512.
- Bocca, S. M., Billiar, R. B., Albrecht, E. D., & Pepe, G. J. (2008). Oocytes of baboon fetal primordial ovarian follicles express estrogen receptor beta mRNA. *Endocrine*, 33(3), 254-260. <http://doi.org/10.1007/s12020-008-9081-y>
- Bonkhoff, H., & Berges, R. (2009). The evolving role of oestrogens and their receptors in the development and progression of prostate cancer. *European Urology*, 55(3), 533-542. <http://doi.org/10.1016/j.eururo.2008.10.035>



- Bord, S., Horner, A., Beavan, S., & Compston, J. (2001). Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(5), 2309-2314.
<http://doi.org/10.1210/jcem.86.5.7513>
- Botella, J., & Clavero, J. A. (1993). *Tratado de ginecología*. Ediciones Díaz de Santos.
- Boué, J., Boué, A., & Lazar, P. (2013). Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions. 1975. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, 97(7), 471-486.
<http://doi.org/10.1002/bdra.23174>
- Branch, D. W., Silver, R., Pierangeli, S., van Leeuwen, I., & Harris, E. N. (1997). Antiphospholipid antibodies other than lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in women with recurrent pregnancy loss, fertile controls, and antiphospholipid syndrome. *Obstetrics and Gynecology*, 89(4), 549-555.
- Bronet, F., Martínez, E., Gaytán, M., Liñán, A., Cernuda, D., Ariza, M., ... Garcia-Velasco, J. A. (2012). Sperm DNA fragmentation index does not correlate with the sperm or embryo aneuploidy rate in recurrent miscarriage or implantation failure patients. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 27(7), 1922-1929.
<http://doi.org/10.1093/humrep/des148>
- Brook, C. G. (1999). Mechanism of puberty. *Hormone Research*, 51 Suppl 3, 52-54.
<http://doi.org/53162>
- Carp, H., Feldman, B., Oelsner, G., & Schiff, E. (2004). Parental karyotype and subsequent live births in recurrent miscarriage. *Fertility and Sterility*, 81(5), 1296-1301.
<http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.09.059>

- Carranza-Lira, S., & Celis-Rico, G. J. (2011). [Differences in spermatid morphology between couples with repeated pregnancy loss and infertility]. *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 49(5), 523-526.
- Carrell, D. T., Liu, L., Peterson, C. M., Jones, K. P., Hatasaka, H. H., Erickson, L., & Campbell, B. (2003). Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Archives of Andrology*, 49(1), 49-55.
- Chamley, L. W. (2002). Antiphospholipid antibodies: biological basis and prospects for treatment. *Journal of Reproductive Immunology*, 57(1-2), 185-202.
- Chesney, R.W., Mazess, R.B., & Rose, P. (1978). Single-photon absorptiometry and dualphoton absorptiometry in children” In: Genant H (eds). *Osteoporosis update* University of California Printing Services, San Francisco. pp; 241-246.
- Christiansen, O. B. (2006). Evidence-based investigations and treatments of recurrent pregnancy loss. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 18(3), 304-312. <http://doi.org/10.1097/01.gco.0000193011.73405.07>
- Clarkson, M. J., & Harley, V. R. (2002). Sex with two SOX on: SRY and SOX9 in testis development. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 13(3), 106-111.
- Clayton, D., Chapman, J., & Cooper, J. (2004). Use of unphased multilocus genotype data in indirect association studies. *Genetic Epidemiology*, 27(4), 415-428. <http://doi.org/10.1002/gepi.20032>
- Collett, D. (1994), *Modeling Survival Data in Medical Research*. London: Chapman & Hall.
- Collodel, G., Giannerini, V., Antonio Pascarelli, N., Federico, M. G., Comodo, F., & Moretti, E. (2009). TEM and FISH studies in sperm from men of couples with recurrent pregnancy loss. *Andrologia*, 41(6), 352-360. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2009.00936.x>



- Copland, J. A., Sheffield-Moore, M., Koldzic-Zivanovic, N., Gentry, S., Lamprou, G., Tzortzatou-Stathopoulou, F., ... Vlahopoulos, S. A. (2009). Sex steroid receptors in skeletal differentiation and epithelial neoplasia: is tissue-specific intervention possible? *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 31(6), 629-641. <http://doi.org/10.1002/bies.200800138>
- Cordell, H. J., & Clayton, D. G. (2002). A unified stepwise regression procedure for evaluating the relative effects of polymorphisms within a gene using case/control or family data: application to HLA in type 1 diabetes. *American Journal of Human Genetics*, 70(1), 124-141. <http://doi.org/10.1086/338007>
- Coulam, C. B. (1991). Epidemiology of recurrent spontaneous abortion. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 26(1), 23-27.
- Coulam, C. B., & Stern, J. J. (1994). Endocrine factors associated with recurrent spontaneous abortion. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 37(3), 730-744.
- Coura, R., Prolla, J. C., Meurer, L., & Ashton-Prolla, P. (2005). An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. *Journal of Clinical Pathology*, 58(8), 894-895. <http://doi.org/10.1136/jcp.2004.021352>
- Couse, J. F., Lindzey, J., Grandien, K., Gustafsson, J. A., & Korach, K. S. (1997). Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology*, 138(11), 4613-4621. <http://doi.org/10.1210/endo.138.11.5496>
- Crist, D.M., Peake, G.T., & Stackpole, P.J. (1986). Lipemic and lipoproteinemic effects of natural and synthetic androgens in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* Jul; 13(7). 513-8.

- Cupisti, S., Fasching, P. A., Ekici, A. B., Strissel, P. L., Loehberg, C. R., Strick, R., ... Goecke, T. W. (2009). Polymorphisms in estrogen metabolism and estrogen pathway genes and the risk of miscarriage. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 280(3), 395-400. <http://doi.org/10.1007/s00404-009-0927-1>
- Daher, S., Mattar, R., Gueuvoghlian-Silva, B. Y., & Torloni, M. R. (2012). Genetic polymorphisms and recurrent spontaneous abortions: an overview of current knowledge. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 67(4), 341-347. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2012.01123.x>
- Daniely, M., Aviram-Goldring, A., Barkai, G., & Goldman, B. (1998). Detection of chromosomal aberration in fetuses arising from recurrent spontaneous abortion by comparative genomic hybridization. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 13(4), 805-809.
- De Braekeleer, M., & Dao, T. N. (1990). Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 5(5), 519-528.
- De la Rochebrochard, E., & Thonneau, P. (2002). Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage; results of a multicentre European study. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 17(6), 1649-1656.
- De la Rochebrochard, E., & Thonneau, P. (2003). Paternal age ≥ 40 years: an important risk factor for infertility. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 189(4), 901-905.
- De la Rochebrochard, E., & Thonneau, P. (2005). Paternal age: are the risks of infecundity and miscarriage higher when the man is aged 40 years or over? *Revue D'épidémiologie Et De Santé Publique*, 53 Spec No 2, 2S47-55.

- Dewan, S., Puscheck, E. E., Coulam, C. B., Wilcox, A. J., & Jeyendran, R. S. (2006). Y-chromosome microdeletions and recurrent pregnancy loss. *Fertility and Sterility*, *85*(2), 441-445. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.08.035>
- Dominguez, V., Calls, E., Ortega, P., Astasio, P., Bernabè, J. V. D., & Calero, J. R. (1991). Adjusting risk factors in spontaneous abortion by multiple logistic regression. *European Journal of Epidemiology*, *7*(2), 171-174. <http://doi.org/10.1007/BF00237362>
- Driesche, S. van den, Smith, V. M., Myers, M., & Duncan, W. C. (2008). Expression and regulation of oestrogen receptors in the human corpus luteum. *Reproduction*, *135*(4), 509-517. <http://doi.org/10.1530/REP-07-0427>
- Drummond, A. E., Baillie, A. J., & Findlay, J. K. (1999). Ovarian estrogen receptor alpha and beta mRNA expression: impact of development and estrogen. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *149*(1-2), 153-161.
- Drummond, A. E., & Fuller, P. J. (2010). The importance of ER β signalling in the ovary. *Journal of Endocrinology*, *205*(1), 15-23. <http://doi.org/10.1677/JOE-09-0379>
- Dunning, A. M., Dowsett, M., Healey, C. S., Tee, L., Luben, R. N., Folkard, E., ... Ponder, B. A. J. (2004). Polymorphisms associated with circulating sex hormone levels in postmenopausal women. *Journal of the National Cancer Institute*, *96*(12), 936-945.
- Edwards, R. G. (1986). Causes of early embryonic loss in human pregnancy. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *1*(3), 185-198.
- ElAttar, T. M. A., & Hugoson, A. (1974). Comparative metabolism of female sex steroids in normal and chronically inflamed gingiva of the dog. *Journal of Periodontal Research*, *9*(5), 284-289. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1974.tb00683.x>
- Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., ... Gustafsson, J. A. (1997). Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal



- localization, and expression pattern. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(12), 4258-4265. <http://doi.org/10.1210/jcem.82.12.4470>
- Excoffier, L., & Slatkin, M. (1995). Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Molecular Biology and Evolution*, 12(5), 921-927.
- Fasching, P. A., Loehberg, C. R., Strissel, P. L., Lux, M. P., Bani, M. R., Schrauder, M., ... Strick, R. (2008). Single nucleotide polymorphisms of the aromatase gene (CYP19A1), HER2/neu status, and prognosis in breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 112(1), 89-98. <http://doi.org/10.1007/s10549-007-9822-2>
- Fedele, L., Dorta, M., Brioschi, D., Giudici, M. N., & Candiani, G. B. (1989). Pregnancies in septate uteri: outcome in relation to site of uterine implantation as determined by sonography. *AJR. American Journal of Roentgenology*, 152(4), 781-784. <http://doi.org/10.2214/ajr.152.4.781>
- Foulkes, A. S. (2009). *Applied Statistical Genetics with R: For Population-based Association Studies*. Springer Science & Business Media.
- Fritz, B., Hallermann, C., Olert, J., Fuchs, B., Bruns, M., Aslan, M., ... Rehder, H. (2001). Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridisation (CGH)-Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 9(7), 539-547. <http://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200669>
- García-Enguádanos, A., Calle, M. E., Valero, J., Luna, S., & Domínguez-Rojas, V. (2002). Risk factors in miscarriage: a review. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 102(2), 111-119.
- General Assembly of the World Medical Association. (2014). World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *The Journal of the American College of Dentists*, 81(3), 14-18.

- Georgiou, I., Konstantelli, M., Syrrou, M., Messinis, I. E., & Lolis, D. E. (1997). Oestrogen receptor gene polymorphisms and ovarian stimulation for in-vitro fertilization. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *12*(7), 1430-1433.
- Gerhardt, A., Scharf, R. E., Mikat-Drozdzyński, B., Krüssel, J. S., Bender, H.-G., & Zotz, R. B. (2006). Maternal IVS1-401 T allele of the estrogen receptor alpha is an independent predictor of late fetal loss. *Fertility and Sterility*, *86*(2), 448-453. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.12.051>
- Ghimenti, C., Mello-Grand, M., Grosso, E., Scatolini, M., Regolo, L., Zambelli, A., & Chiorino, G. (2013). Regulation of aromatase expression in breast cancer treated with anastrozole neoadjuvant therapy. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *5*(3), 902-906. <http://doi.org/10.3892/etm.2012.878>
- Giorlandino, C., Calugi, G., Iaconianni, L., Santoro, M. L., & Lippa, A. (1998). Spermatozoa with chromosomal abnormalities may result in a higher rate of recurrent abortion. *Fertility and Sterility*, *70*(3), 576-577.
- Goldstein, S. R. (1994). Embryonic death in early pregnancy: a new look at the first trimester. *Obstetrics and Gynecology*, *84*(2), 294-297.
- Gosden, R. G. (1985). Maternal age: a major factor affecting the prospects and outcome of pregnancy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *442*, 45-57.
- Graupp, M., Wehr, E., Schweighofer, N., Pieber, T. R., & Obermayer-Pietsch, B. (2011). Association of genetic variants in the two isoforms of 5 α -reductase, SRD5A1 and SRD5A2, in lean patients with polycystic ovary syndrome. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, *157*(2), 175-179. <http://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2011.03.026>
- Gray, R. H., & Wu, L. Y. (2000). Subfertility and risk of spontaneous abortion. *American Journal of Public Health*, *90*(9), 1452-1454.

- Griffin, D. K., Abruzzo, M. A., Millie, E. A., Sheean, L. A., Feingold, E., Sherman, S. L., & Hassold, T. J. (1995). Non-disjunction in human sperm: evidence for an effect of increasing paternal age. *Human Molecular Genetics*, 4(12), 2227-2232.
- Grohé, C., Kahlert, S., Löbbert, K., Stimpel, M., Karas, R. H., Vetter, H., & Neyses, L. (1997). Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Letters*, 416(1), 107-112.
- Guerriero, G. (2009). Vertebrate sex steroid receptors: evolution, ligands, and neurodistribution. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1163, 154-168. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04460.x>
- Guibourdenche, J., Fournier, T., Malassiné, A., & Evain-Brion, D. (2009). Development and hormonal functions of the human placenta. *Folia Histochemica Et Cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*, 47(5), S35-40. <http://doi.org/10.2478/v10042-009-0110-3>
- Gundogan, F., Bianchi, D. W., Scherjon, S. A., & Roberts, D. J. (2010). Placental pathology in egg donor pregnancies. *Fertility and Sterility*, 93(2), 397-404. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.12.144>
- Haiman, C. A., Dossus, L., Setiawan, V. W., Stram, D. O., Dunning, A. M., Thomas, G., ... Ziegler, R. G. (2007). Genetic variation at the CYP19A1 locus predicts circulating estrogen levels but not breast cancer risk in postmenopausal women. *Cancer Research*, 67(5), 1893-1897. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4123>
- Hamaguchi, M., Nishio, M., Toyama, T., Sugiura, H., Kondo, N., Fujii, Y., & Yamashita, H. (2008). Possible difference in frequencies of genetic polymorphisms of estrogen receptor alpha, estrogen metabolism and P53 genes between estrogen receptor-positive and -negative breast cancers. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 38(11), 734-742. <http://doi.org/10.1093/jjco/hyn097>

- Hanna, C. W., Bretherick, K. L., Liu, C.-C., Stephenson, M. D., & Robinson, W. P. (2010). Genetic variation within the hypothalamus-pituitary-ovarian axis in women with recurrent miscarriage. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 25(10), 2664-2671. <http://doi.org/10.1093/humrep/deq211>
- Harlap, S., & Shiono, P. H. (1980). Alcohol, smoking, and incidence of spontaneous abortions in the first and second trimester. *Lancet (London, England)*, 2(8187), 173-176.
- Hassold, T. J. (1980). A cytogenetic study of repeated spontaneous abortions. *American Journal of Human Genetics*, 32(5), 723-730.
- Health Quality Ontario. (2006). In vitro fertilization and multiple pregnancies: an evidence-based analysis. *Ontario Health Technology Assessment Series*, 6(18), 1-63.
- Heilmann, L., von Tempelhoff, G.-F., & Pollow, K. (2003). Antiphospholipid syndrome in obstetrics. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis: Official Journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 9(2), 143-150.
- Hemat, R. A. S. (2004). *Principles of Orthomolecularism*. Urotext.
- Herrington, D. M., Howard, T. D., Brosnihan, K. B., McDonnell, D. P., Li, X., Hawkins, G. A., ... Bleecker, E. R. (2002). Common estrogen receptor polymorphism augments effects of hormone replacement therapy on E-selectin but not C-reactive protein. *Circulation*, 105(16), 1879-1882.
- Hess, R. A., Bunick, D., Lee, K. H., Bahr, J., Taylor, J. A., Korach, K. S., & Lubahn, D. B. (1997). A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature*, 390(6659), 509-512. <http://doi.org/10.1038/37352>
- Homer, H. A., Li, T. C., & Cooke, I. D. (2000). The septate uterus: a review of management and reproductive outcome. *Fertility and Sterility*, 73(1), 1-14.



- Hsieh, Y.-Y., Wang, Y.-K., Chang, C.-C., & Lin, C.-S. (2007). Estrogen receptor alpha-351 XbaI*G and -397 PvuII*C-related genotypes and alleles are associated with higher susceptibilities of endometriosis and leiomyoma. *Molecular Human Reproduction*, 13(2), 117-122. <http://doi.org/10.1093/molehr/gal099>
- Htun, H., Holth, L. T., Walker, D., Davie, J. R., & Hager, G. L. (1999). Direct visualization of the human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor. *Molecular Biology of the Cell*, 10(2), 471-486.
- Huber, A., Grimm, C., Huber, J. C., Schneeberger, C., Leodolter, S., Reinthaller, A., ... Hefler, L. A. (2006). A common polymorphism within the steroid 5-alpha-reductase type 2 gene and timing of menopause in Caucasian women. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 125(2), 221-225. <http://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2005.10.012>
- Iniesta, R., Guinó, E., & Moreno, V. (2005). [Statistical analysis of genetic polymorphisms in epidemiological studies]. *Gaceta Sanitaria / S.E.S.P.A.S*, 19(4), 333-341.
- Johansen, K.L., Mulligan, K., & Schambelan, M. (1999). Anabolic effects of nandrolone decanoate in patines receiving dialysis: a randomised controlled trail. *JAMA*, Apr 14 281 (14). 1275-81.
- Kalousek, D. K., Pantzar, T., Tsai, M., & Paradice, B. (1993). Early spontaneous abortion: morphologic and karyotypic findings in 3,912 cases. *Birth Defects Original Article Series*, 29(1), 53-61.
- Kalter, H. (1987). Diabetes and spontaneous abortion: a historical review. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 156(5), 1243-1253.
- Kiesewetter, W. B., Kalayoglu, M., & Sachs, B. (1973). The effect of abnormal position, scrotal repositioning, and human gonadotropic hormone on the developing puppy testis. *Journal of Pediatric Surgery*, 8(5), 739-746.

- King, J. C., & Fabro, S. (1983). Alcohol consumption and cigarette smoking: effect on pregnancy. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 26(2), 437-448.
- Koren, G., Pastuszak, A., & Ito, S. (1998). Drugs in Pregnancy. *New England Journal of Medicine*, 338(16), 1128-1137. <http://doi.org/10.1056/NEJM199804163381607>
- Kuiper, G. G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Häggblad, J., Nilsson, S., & Gustafsson, J. A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 138(3), 863-870. <http://doi.org/10.1210/endo.138.3.4979>
- Kukuvitis, A., Georgiou, I., Bouba, I., Tsirka, A., Giannouli, C. H., Yapijakis, C., ... Papadimas, J. (2002). Association of oestrogen receptor alpha polymorphisms and androgen receptor CAG trinucleotide repeats with male infertility: a study in 109 Greek infertile men. *International Journal of Andrology*, 25(3), 149-152.
- Kutteh, W. H. (1996). Antiphospholipid antibody-associated recurrent pregnancy loss: treatment with heparin and low-dose aspirin is superior to low-dose aspirin alone. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 174(5), 1584-1589.
- Lanasa, M. C., Hogge, W. A., Kubik, C. J., Ness, R. B., Harger, J., Nagel, T., ... Hoffman, E. P. (2001). A novel X chromosome-linked genetic cause of recurrent spontaneous abortion. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 185(3), 563-568. <http://doi.org/10.1067/mob.2001.117670>
- Larsen, W. D., & Larsen, W. J. (2002). *Embriología humana*. Elsevier España.
- Lauritsen, J. G. (1975). The significance of oral contraceptives in causing chromosome anomalies in spontaneous abortions. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica*, 54(3), 261-264.
- Lee, E.T., & Wang, J.W. (2003). *Statistical Methods for survival data analysis*. 3rd. ed. Belmont, CA: Lifetime learning Publications



- Levi, C. S., Lyons, E. A., Zheng, X. H., Lindsay, D. J., & Holt, S. C. (1990). Endovaginal US: demonstration of cardiac activity in embryos of less than 5.0 mm in crown-rump length. *Radiology*, *176*(1), 71-74. <http://doi.org/10.1148/radiology.176.1.2191372>
- Levine, J. S., Branch, D. W., & Rauch, J. (2002). The antiphospholipid syndrome. *The New England Journal of Medicine*, *346*(10), 752-763. <http://doi.org/10.1056/NEJMra002974>
- Li, T. C., Makris, M., Tomsu, M., Tuckerman, E., & Laird, S. (2002). Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis. *Human Reproduction Update*, *8*(5), 463-481.
- Li, T. C., Tuckerman, E. M., & Laird, S. M. (2002). Endometrial factors in recurrent miscarriage. *Human Reproduction Update*, *8*(1), 43-52.
- Li, X., Huang, J., Yi, P., Bambara, R. A., Hilf, R., & Muyan, M. (2004). Single-Chain Estrogen Receptors (ERs) Reveal that the ER α / β Heterodimer Emulates Functions of the ER α Dimer in Genomic Estrogen Signaling Pathways. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(17), 7681-7694. <http://doi.org/10.1128/MCB.24.17.7681-7694.2004>
- Mahendroo, M. S., Cala, K. M., Landrum, D. P., & Russell, D. W. (1997). Fetal death in mice lacking 5 α -reductase type 1 caused by estrogen excess. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *11*(7), 917-927. <http://doi.org/10.1210/mend.11.7.9933>
- Makridakis, N. M., di Salle, E., & Reichardt, J. K. (2000). Biochemical and pharmacogenetic dissection of human steroid 5 α -reductase type II. *Pharmacogenetics*, *10*(5), 407-413.
- Makridakis, N., Ross, R. K., Pike, M. C., Chang, L., Stanczyk, F. Z., Kolonel, L. N., ... Reichardt, J. K. (1997). A prevalent missense substitution that modulates activity of prostatic steroid 5 α -reductase. *Cancer Research*, *57*(6), 1020-1022.

- Martin, D. H., Koutsky, L., Eschenbach, D. A., Daling, J. R., Alexander, E. R., Benedetti, J. K., & Holmes, K. K. (1982). Prematurity and perinatal mortality in pregnancies complicated by maternal *Chlamydia trachomatis* infections. *JAMA*, *247*(11), 1585-1588.
- Maruyama, H., Toji, H., Harrington, C. R., Sasaki, K., Izumi, Y., Ohnuma, T., ... Kawakami, H. (2000). Lack of an association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms and transcriptional activity with Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, *57*(2), 236-240.
- Marx, J. (1995). Snaring the genes that divide the sexes for mammals. *Science (New York, N.Y.)*, *269*(5232), 1824-1825.
- Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, *16*(3), 1215.
- Mitchell, A. A. (2003). Systematic identification of drugs that cause birth defects--a new opportunity. *The New England Journal of Medicine*, *349*(26), 2556-2559. <http://doi.org/10.1056/NEJMSb031395>
- Moog, N. K., Entringer, S., Heim, C., Wadhwa, P. D., Kathmann, N., & Buss, C. (2015). Influence of maternal thyroid hormones during gestation on fetal brain development. *Neuroscience*. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.09.070>
- Morani, A., Warner, M., & Gustafsson, J.-A. (2008). Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alfa and beta in epithelial tissues. *Journal of Internal Medicine*, *264*(2), 128-142. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2008.01976.x>
- Nativelle-Serpentini, C., Lambard, S., Seralini, G. E., & Sourdain, P. (2002). Aromatase and breast cancer: W39R, an inactive protein. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, *146*(4), 583-589.
- Negri-Cesi, P., Poletti, A., & Celotti, F. (1996). Metabolism of steroids in the brain: a new insight into the role of 5alpha-reductase and aromatase in brain differentiation and

- functions. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 58(5-6), 455-466.
- Nelson, D. B., Grisso, J. A., Joffe, M. M., Brensinger, C., Shaw, L., & Datner, E. (2003). Does stress influence early pregnancy loss? *Annals of Epidemiology*, 13(4), 223-229.
- Norsker, F. N., Espenhain, L., A Rogvi, S., Morgen, C. S., Andersen, P. K., & Nybo Andersen, A.-M. (2012). Socioeconomic position and the risk of spontaneous abortion: a study within the Danish National Birth Cohort. *BMJ Open*, 2(3). <http://doi.org/10.1136/bmjopen-2012-001077>
- Nybo Andersen, A. M., Wohlfahrt, J., Christens, P., Olsen, J., & Melbye, M. (2000). Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 320(7251), 1708-1712.
- Ogasawara, M., Aoki, K., Okada, S., & Suzumori, K. (2000). Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertility and Sterility*, 73(2), 300-304.
- Osborn, J. F., Cattaruzza, M. S., & Spinelli, A. (2000). Risk of spontaneous abortion in Italy, 1978-1995, and the effect of maternal age, gravidity, marital status, and education. *American Journal of Epidemiology*, 151(1), 98-105.
- Palacios, A., Campfield, L.A., Mclure, R.D., Steiner, B., & Swerdloff, R.S. (1983). Effect of testosterone enanthete on hematopoiesis in normal men. *Fertil Steril* 40. 100-104
- Pan, H., Suo, P., Liu, C., Wang, J., Zhou, S., Ma, X., & Wang, B. (2014). The ESR1 gene in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 60(3), 161-164. <http://doi.org/10.3109/19396368.2013.877540>
- Pandey, M. K., Rani, R., & Agrawal, S. (2005). An update in recurrent spontaneous abortion. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 272(2), 95-108. <http://doi.org/10.1007/s00404-004-0706-y>

- Pandya, P. P., Snijders, R. J., Psara, N., Hilbert, L., & Nicolaidis, K. H. (1996). The prevalence of non-viable pregnancy at 10-13 weeks of gestation. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 7(3), 170-173.
<http://doi.org/10.1046/j.1469-0705.1996.07030170.x>
- Parazzini, F., Tozzi, L., Chatenoud, L., Restelli, S., Luchini, L., & Vecchia, C. L. (1994). Pregnancy: Alcohol and risk of spontaneous abortion. *Human Reproduction*, 9(10), 1950-1953.
- Patricia García, M., Felipe Benavente, M., Angélica Melo, A., Iván Roa, E., & Juan Carlos Roa, S. (2006). Efecto de la fijación en la calidad del ADN: estudio controlado con cinco fijadores. *Revista Española de Patología*, 39(3), 175-179.
[http://doi.org/10.1016/S1699-8855\(06\)70034-4](http://doi.org/10.1016/S1699-8855(06)70034-4)
- Pelletier, G., & El-Alfy, M. (2000). Immunocytochemical localization of estrogen receptors alpha and beta in the human reproductive organs. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(12), 4835-4840.
<http://doi.org/10.1210/jcem.85.12.7029>
- Pérez-Landeiro, A., Allende-Bandrés, M. A., Fernández, A., J, M., & Palomo Palomo, P. (2002). Teratogénesis: clasificaciones. *Farmacia Hospitalaria*, 26(3), 171-177.
- Peters, M., Saare, M., Kaart, T., Haller-Kikkatalo, K., Lend, A. K., Punab, M., ... Salumets, A. (2010). Analysis of polymorphisms in the SRD5A2 gene and semen parameters in Estonian men. *Journal of Andrology*, 31(4), 372-378.
<http://doi.org/10.2164/jandrol.109.008714>
- Pineda, B., Hermenegildo, C., Tarín, J. J., Laporta, P., Cano, A., & García-Pérez, M. A. (2010). Alleles and haplotypes of the estrogen receptor alpha gene are associated with

- an increased risk of spontaneous abortion. *Fertility and Sterility*, 93(6), 1809-1815.
<http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.12.086>
- Propst, A. M., & Hill, J. A. (2000). Anatomic factors associated with recurrent pregnancy loss. *Seminars in Reproductive Medicine*, 18(4), 341-350. <http://doi.org/10.1055/s-2000-13723>
- Quiroga de Michelena, M. I., Díaz, A., Paredes, D., Rodríguez, O., Quispe, E., & Klein de Zigelboim, E. (2007). Estudio cromosómico en el aborto espontáneo y su aplicación clínica. *Rev Per Ginecol Obstet*; 53 (2): 124-129.
<http://google.redalyc.org/articulo.oa?id=323428184010>
- Rachootin, P., & Olsen, J. (1982). Prevalence and socioeconomic correlates of subfecundity and spontaneous abortion in Denmark. *International Journal of Epidemiology*, 11(3), 245-249.
- Rai, R., & Regan, L. (2006). Recurrent miscarriage. *Lancet (London, England)*, 368(9535), 601-611. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69204-0](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69204-0)
- Rasch, V. (2003). Cigarette, alcohol, and caffeine consumption: risk factors for spontaneous abortion. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica*, 82(2), 182-188.
- Raskin, L., Lejbkowitz, F., Barnett-Griness, O., Dishon, S., Almog, R., & Rennert, G. (2009). BRCA1 breast cancer risk is modified by CYP19 polymorphisms in Ashkenazi Jews. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 18(5), 1617-1623. <http://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0060>
- Reindollar, R. H. (2000). Contemporary issues for spontaneous abortion. Does recurrent abortion exist? *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 27(3), 541-554.
- Rempen, A. (1993). [The incidence of abortions of viable pregnancies in the first trimester]. *Zentralblatt Für Gynäkologie*, 115(6), 249-257.

- Ricke, W. A., McPherson, S. J., Bianco, J. J., Cunha, G. R., Wang, Y., & Risbridger, G. P. (2008). Prostatic hormonal carcinogenesis is mediated by in situ estrogen production and estrogen receptor alpha signaling. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(5), 1512-1520. <http://doi.org/10.1096/fj.07-9526com>
- Rittmaster, R. S. (1994). Finasteride. *The New England Journal of Medicine*, 330(2), 120-125. <http://doi.org/10.1056/NEJM199401133300208>
- Rubio, C., Simón, C., Vidal, F., Rodrigo, L., Pehlivan, T., Remohí, J., & Pellicer, A. (2003). Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 18(1), 182-188.
- Rull, K., Nagirnaja, L., & Laan, M. (2012). Genetics of recurrent miscarriage: challenges, current knowledge, future directions. *Frontiers in Genetics*, 3, 34. <http://doi.org/10.3389/fgene.2012.00034>
- Rynekrova, J., Kasparova, D., Adamkova, V., Fait, T., & Hubacek, J. A. (2012). Analysis of the potential role of Apolipoprotein E polymorphism in genetic predisposition to spontaneous abortion. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 67(3), 179-183. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.01071.x>
- Salazar U., A., Álamos B., C., Arriagada A., M., & Selman C., E. (2011). Estudio citogenético en 677 casos de aborto espontáneo. *Rev. ANACEM (Impresa)*, 5(2), 74-77.
- Salvador A., Moya-Albiol L., Martínez-Sanchis S., & Simon V.M. (1999). *Lack of effects of anabolic-androgenic steroids on locomotor activity in intact male mice*. *Percept Mot Skills* Feb 88 (1). 319-28.
- Sandberg, A. A. (1980). Endocrine control and physiology of the prostate. *The Prostate*, 1(2), 169-184.

- Sartorelli, E. M., Mazzucatto, L. F., & de Pina-Neto, J. M. (2001). Effect of paternal age on human sperm chromosomes. *Fertility and Sterility*, 76(6), 1119-1123.
- Saunders, P. T., Maguire, S. M., Gaughan, J., & Millar, M. R. (1997). Expression of oestrogen receptor beta (ER beta) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry. *Journal of Endocrinology*, 154(3), R13-R16.
- Schweikert, A., Rau, T., Berkholz, A., Allera, A., Daufeldt, S., & Wildt, L. (2004). Association of progesterone receptor polymorphism with recurrent abortions. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 113(1), 67-72. <http://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2003.04.002>
- Sebire, N. J., Fox, H., Backos, M., Rai, R., Paterson, C., & Regan, L. (2002). Defective endovascular trophoblast invasion in primary antiphospholipid antibody syndrome-associated early pregnancy failure. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 17(4), 1067-1071.
- Sharpe, R. M. (1998). The roles of oestrogen in the male. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 9(9), 371-377.
- Sheffer-Mimouni, G., Mashiach, S., Dor, J., Levran, D., & Seidman, D. S. (2002). Factors influencing the obstetric and perinatal outcome after oocyte donation. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 17(10), 2636-2640.
- Sherwood, L. (2011). *Fisiología Humana, de las células a los sistemas*. México CENGAGE Learning. pp 971.
- Shimodaira, M., Nakayama, T., Sato, I., Sato, N., Izawa, N., Mizutani, Y., ... Yamamoto, T. (2012). Estrogen synthesis genes CYP19A1, HSD3B1, and HSD3B2 in hypertensive disorders of pregnancy. *Endocrine*, 42(3), 700-707. <http://doi.org/10.1007/s12020-012-9699-7>

- Simpson, J. L. (2007). Causes of fetal wastage. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 50(1), 10-30. <http://doi.org/10.1097/GRF.0b013e31802f11f6>
- SNPStats: your web tool for SNP analysis. (s. f.). Recuperado 1 de noviembre de 2015, a partir de <http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>
- Stern, J. J., Dorfmann, A. D., Gutiérrez-Najar, A. J., Cerrillo, M., & Coulam, C. B. (1996). Frequency of abnormal karyotypes among abortuses from women with and without a history of recurrent spontaneous abortion. *Fertility and Sterility*, 65(2), 250-253.
- Su, M.-T., Lee, I.-W., Chen, Y.-C., & Kuo, P.-L. (2011). Association of progesterone receptor polymorphism with idiopathic recurrent pregnancy loss in Taiwanese Han population. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(3), 239-243. <http://doi.org/10.1007/s10815-010-9510-8>
- Su, M.-T., Lin, S.-H., & Chen, Y.-C. (2011). Association of sex hormone receptor gene polymorphisms with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 96(6), 1435-1444.e1. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.09.030>
- Sugiura-Ogasawara, M., Furukawa, T. A., Nakano, Y., Hori, S., Aoki, K., & Kitamura, T. (2002). Depression as a potential causal factor in subsequent miscarriage in recurrent spontaneous aborters. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 17(10), 2580-2584.
- Sullivan, A. E., Silver, R. M., LaCoursiere, D. Y., Porter, T. F., & Branch, D. W. (2004). Recurrent fetal aneuploidy and recurrent miscarriage. *Obstetrics and Gynecology*, 104(4), 784-788. <http://doi.org/10.1097/01.AOG.0000137832.86727.e2>
- Sundarrajan, C., Liao, W., Roy, A. C., & Ng, S. C. (1999). Association of oestrogen receptor gene polymorphisms with outcome of ovarian stimulation in patients undergoing IVF. *Molecular Human Reproduction*, 5(9), 797-802.

- Suzumori, N., & Sugiura-Ogasawara, M. (2010). Genetic factors as a cause of miscarriage. *Current Medicinal Chemistry*, 17(29), 3431-3437.
- Swerdloff, R. S., & Wang, C. (1998). Dihydrotestosterone: A rationale for its use as a non-aromatizable androgen replacement therapeutic agent. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 12(3), 501-506. [http://doi.org/10.1016/S0950-351X\(98\)80267-X](http://doi.org/10.1016/S0950-351X(98)80267-X)
- Szekeres-Bartho, J., Wilczynski, J. R., Basta, P., & Kalinka, J. (2008). Role of progesterone and progestin therapy in threatened abortion and preterm labour. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 13, 1981-1990.
- Taboada Lugo, N., Lardoeyt Ferrer, R., Quintero Escobar, K., & Torres Sánchez, Y. (2004). Teratogenicidad embrio-fetal inducida por medicamentos. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 30(1), 0-0.
- TaqMan Search. (s. f.). Recuperado 1 de noviembre de 2015, a partir de <https://bioinfo.appliedbiosystems.com/genome-database/snp-genotyping.html>.
- Taylor, A. H., & Al-Azzawi, F. (2000). Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *Journal of Molecular Endocrinology*, 24(1), 145-155. <http://doi.org/10.1677/jme.0.0240145>
- Telleria, C. M., Zhong, L., Deb, S., Srivastava, R. K., Park, K. S., Sugino, N., ... Gibori, G. (1998). Differential expression of the estrogen receptors alpha and beta in the rat corpus luteum of pregnancy: regulation by prolactin and placental lactogens. *Endocrinology*, 139(5), 2432-2442. <http://doi.org/10.1210/endo.139.5.5974>
- Thakur, M. K., & Paramanik, V. (2009). Role of steroid hormone coregulators in health and disease. *Hormone Research*, 71(4), 194-200. <http://doi.org/10.1159/000201107>
- Toncheva, D., & Tzoneva, M. (1985). Prenatal selection and fetal development disturbances occurring in carriers of G6PD deficiency. *Human Genetics*, 69(1), 88.

- Traina, E., Daher, S., Moron, A. F., Sun, S. Y., Franchim, C. S., & Mattar, R. (2011). Polymorphisms in VEGF, progesterone receptor and IL-1 receptor genes in women with recurrent spontaneous abortion. *Journal of Reproductive Immunology*, 88(1), 53-57. <http://doi.org/10.1016/j.jri.2010.07.006>
- Tulppala, M., Stenman, U. H., Cacciatore, B., & Ylikorkala, O. (1993). Polycystic ovaries and levels of gonadotrophins and androgens in recurrent miscarriage: prospective study in 50 women. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 100(4), 348-352.
- van der Zanden, L. F. M., Galesloot, T. E., Feitz, W. F. J., Brouwers, M. M., Shi, M., Knoers, N. V. A. M., ... van Rooij, I. A. L. M. (2012). Exploration of gene-environment interactions, maternal effects and parent of origin effects in the etiology of hypospadias. *The Journal of Urology*, 188(6), 2354-2360. <http://doi.org/10.1016/j.juro.2012.08.033>
- Walters, K. A., Simanainen, U., & Handelsman, D. J. (2010). Molecular insights into androgen actions in male and female reproductive function from androgen receptor knockout models. *Human Reproduction Update*, 16(5), 543-558. <http://doi.org/10.1093/humupd/dmq003>
- Wang, J. Z., Deogan, M. S., Lewis, J. R., Chew, S., Mullin, B. H., McNab, T. J., ... Prince, R. L. (2011). A non-synonymous coding change in the CYP19A1 gene Arg264Cys (rs700519) does not affect circulating estradiol, bone structure or fracture. *BMC Medical Genetics*, 12, 165. <http://doi.org/10.1186/1471-2350-12-165>
- Wang, Y., Barthold, J., Figueroa, E., González, R., Noh, P. H., Wang, M., & Manson, J. (2008). Analysis of five single nucleotide polymorphisms in the ESR1 gene in cryptorchidism. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, 82(6), 482-485. <http://doi.org/10.1002/bdra.20458>

- Weiser, M. J., Foradori, C. D., & Handa, R. J. (2008). Estrogen receptor beta in the brain: from form to function. *Brain Research Reviews*, 57(2), 309-320. <http://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.05.013>
- Wettasinghe, T. K., Jayasekara, R. W., & Dissanayake, V. H. W. (2010). Y chromosome microdeletions are not associated with spontaneous recurrent pregnancy loss in a Sinhalese population in Sri Lanka. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 25(12), 3152-3156. <http://doi.org/10.1093/humrep/deq271>
- WHO: recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths. Modifications recommended by FIGO as amended October 14, 1976. (1977). *Acta Obstetricia Et Gynecologica Scandinavica*, 56(3), 247-253.
- Wilcox, A. J., Weinberg, C. R., O'Connor, J. F., Baird, D. D., Schlatterer, J. P., Canfield, R. E., ... Nisula, B. C. (1988). Incidence of early loss of pregnancy. *The New England Journal of Medicine*, 319(4), 189-194. <http://doi.org/10.1056/NEJM198807283190401>
- Wilson, J.D. (1988). Androgen abuse by athletes. *Endocrine Rev*, 9, 2-5.
- Wisborg, K., Kesmodel, U., Henriksen, T. B., Hedegaard, M., & Secher, N. J. (2003). A prospective study of maternal smoking and spontaneous abortion. *Acta Obstetricia Et Gynecologica Scandinavica*, 82(10), 936-941.
- Xu, X., Pergola, G., & Björntorp, P. (1990). The effects of androgens on the regulation of lipólisis in adipose precursor cells. *Endocrinology*. 126: 1229-1234.
- Yaghmaie, F., Saeed, O., Garan, S. A., Freitag, W., Timiras, P. S., & Sternberg, H. (2005). Caloric restriction reduces cell loss and maintains estrogen receptor-alpha immunoreactivity in the pre-optic hypothalamus of female B6D2F1 mice. *Neuro Endocrinology Letters*, 26(3), 197-203.

BIBLIOGRAFÍA

- Yen, S. S. C., Jaffe, R. B., & Barbieri, R. L. (2001). *Endocrinología de la reproducción: fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. Ed. Médica Panamericana.
- Zhao, D., Wu, W., Xu, B., Niu, X., Cui, H., Zhang, Y., ... Wang, X. (2012). Variants in the SRD5A2 gene are associated with quality of semen. *Molecular Medicine Reports*, 6(3), 639-644. <http://doi.org/10.3892/mmr.2012.965>
- Zinaman, M. J., Clegg, E. D., Brown, C. C., O'Connor, J., & Selevan, S. G. (1996). Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertility and Sterility*, 65(3), 503-509.
- 1000 Genomes browser: Homo sapiens - Population genetics - rs523349 (SNP). (s. f.). Recuperado 10 de enero de 2016, a partir de http://browser.1000genomes.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=2:31805206-31806206;v=rs523349;vdb=variation;vf=349706





ANEXO 1. CARACTERÍSTICAS DE LOS GENES Y POLIMORFISMOS ESTUDIADOS.

GEN	SRD5A2		CYP19A1			ESR1		
NOMBRE	3-oxo-5-alfa-esteroide delta 4-deshidrogenasa 2		Citocromo P450, familia 19, subfamilia A, polipéptido 1 (AROMATASA)			Receptor de estrógenos 1 (FORMA ALFA)		
LOCUS	2p23.1		15q21.1			6q25.1		
Nº EXONES	5		10			8		
LOCALIZACIÓN TISULAR	Estructuras andrógeno-dependiente, tales como la próstata, el epidídimo (especialmente en las células basales), y las vesículas seminales.		Gónadas, cerebro, tejido adiposo, placenta, vasos sanguíneos, piel, huesos, y endometrio, como también en los tejidos de la endometriosis, fibroides uterinos, cáncer de mama, y cáncer de endometrio.			Es expresado mayoritariamente en endometrio, células de cáncer de mama, células del estroma ovárico e hipotálamo.		
FUNCIÓN	Cataliza la conversión irreversible intracelular de testosterona en el más potente andrógeno, la DHT.		Cataliza los últimos pasos de la biosíntesis de los estrógenos.			La principal función del receptor de estrógeno es la de actuar como factor de transcripción que se une al ADN con el fin de regular la expresión génica.		
SNP	rs523349 (V89L)	rs9282858 (A49T)	rs4646	rs10046	rs2236722 (W39R)	rs9340799 [XbaI (A/G)]	rs2234693 [PvuII (T/C)]	rs6932902
POSICIÓN	chr2:31805706	chr2:31805826	chr15:51502844	chr15:51502986	chr15:51534995	chr6:152163381	chr6:152163335	chr6:152376524
VARIANTE	C>G Transversion	G>A Transición	A>C Transversion	G>A Transición	A>G Transición	A>G Transición	C>T Transición	G>A Transición
TIPO DE SNP	Missense	Missense	3 UTR	3 UTR	Missense	Intrón	Intrón	Intrón
CAMBIO DE AMINOÁCIDO	Val89Leu	Ala49Treo	-	-	Trp39Arg	-	-	-
FUNCIÓN	La variante G (leucina) disminuye la tasa de conversión de testosterona en dihidrotestosterona tanto in vitro como in vivo.	La variante G (treonina) incrementa la actividad SRD5A2 in vitro.	El alelo C ha sido asociado con aumento de niveles de estrógenos.	El alelo T (o A) ha sido relacionado con mayor actividad enzimática al parecer mediada por un aumento de los niveles de RNAm de CYP19A1. Además, se ha visto que es factor predictivo de diferentes niveles de estradiol, estrona, y ratio estradiol:testosterona en mujeres postmenopáusicas.	Según estudios in vitro, la variante mutada R codifica una proteína aromatasa inactiva.	Se ha demostrado que este SNP afectar a la expresión del receptor e incluso puede llegar a modificar el sitio de unión del factor de transcripción.	Haplotipo con XbaI (A / G).	-
REFERENCIA	Beesley J, 2007; Makridakis NM, 2000	Makridakis NM, 2000	Raskin L, 2009	Fasching PA, 2008; Dunning AM, 2004.	Nativelle-Serpentini C, 2002	Maruyama H, 2000; Herrington DM, 2002	Maruyama H, 2000	-

ANEXO 2. COMPARACIÓN DE FRECUENCIAS POBLACIONALES.

Gen	Referencia	Alelos y genotipos	1000 GENOMES		POBLACIÓN CONTROL	
			EUR	IBS		
SRD5A2	rs523349	C	0.721	0.766	0.749	
		G	0.279	0.234	0.251	
		C/C	0.519	0.579	0.564	
		C/G	0.404	0.374	0.371	
			G/G	0.078	0.047	0.065
	rs9282858	C	0.968	0.981	0.980	
		T	0.032	0.019	0.020	
		C/C	0.936	0.963	0.954	
C/T		0.064	0.037	0.046		
CYP19A1	rs4646	A	0.290	0.304	0.270	
		C	0.710	0.696	0.730	
		A/A	0.085	0.093	0.086	
		A/C	0.410	0.421	0.363	
		C/C	0.505	0.486	0.551	
	rs10046	A	0.488	0.477	0.500	
		G	0.512	0.523	0.500	
		A/A	0.249	0.252	0.268	
		A/G	0.479	0.449	0.461	
		G/G	0.272	0.299	0.271	
rs2236722	A	1.00	1.00	1.00		
	AA	1.00	1.00	0.997		
ESR1	rs9340799	A	0.692	0.659	0.650	
		G	0.308	0.341	0.350	
		A/A	0.473	0.421	0.452	
		A/G	0.437	0.477	0.403	
		G/G	0.089	0.103	0.145	
	rs2234693	C	0.422	0.453	0.440	
		T	0.578	0.547	0.560	
		C/C	0.175	0.215	0.199	
		C/T	0.495	0.477	0.472	
		T/T	0.330	0.308	0.328	
rs6932902	A	0.104	0.070	0.100		
	G	0.896	0.930	0.900		
	A/A	0.016	0.009	0.003		
	A/G	0.177	0.121	0.197		
	G/G	0.807	0.869	0.800		

EUR: European, IBS: Iberian Population in Spain



Dedicado también a todas esas madres que abordaron, abordan y abordarán la experiencia de la pérdida gestacional, una realidad poco visible e inmersa en infinidad de tabúes; y a esos padres en los que, aún hoy, casi nadie repara. Un asunto que la Ciencia en general y la Medicina en particular tienen pendiente desde el principio de los tiempos.

Y a todos esos niños a los que se llora, aunque no llegasen a venir.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA