

Trabajos Originales

DETERMINACIÓN DEL SEXO FETAL MEDIANTE ADN LIBRE FETAL EN PLASMA MATERNO

Sebastián Illanes L.¹, Paola Searovic V.¹, Karla Pino L.¹, Juan Trebilcock G.^a, Horacio Figueroa D.¹, Cristián Kottman G.¹, Juan Antonio Arraztoa V.¹

¹Departamento de Gineco-Obstetricia y Biología de la Reproducción, Universidad de los Andes.

^a Interno de Medicina, Universidad de los Andes

RESUMEN

Objetivo: Establecer la validez diagnóstica de la identificación del sexo fetal en plasma de mujeres embarazadas durante la primera mitad del embarazo mediante medición de ADN libre fetal (ffDNA) en sangre materna. *Método:* Se extrajo 20 ml de sangre periférica a 25 pacientes entre las 5 y 15 semanas de gestación, previo consentimiento informado. Se separó el plasma mediante centrifugación obteniéndose ADN genómico total (materno y fetal), y se analizó por triplicado mediante PCR en tiempo real (q-PCR), con partidores específicos para secuencia del cromosoma Y (DYS14). El sexo fetal se confirmó mediante ecografía realizada entre las 20 y 25 semanas. *Resultados:* 12 pacientes presentaron amplificación para DYS14, siendo diagnosticados como fetos masculinos. La menor edad gestacional de diagnóstico fue 6+4 semanas. En 9 pacientes no se generó señal, estableciéndose el sexo fetal como femenino. Hubo 4 casos en donde no se cumplieron los criterios para definir el sexo fetal, estableciéndose estos como indeterminados (todos ellos antes de las 8+3 semanas). La probabilidad de diagnosticar el sexo a partir del test fue de 84% (21 de 25 pacientes). Considerando solo los 21 casos donde se pudo realizar un diagnóstico, la ecografía confirmó el sexo en todos ellos, obteniéndose una correlación del 100%. *Conclusión:* Es posible diagnosticar el sexo fetal en sangre materna utilizando ffDNA durante la primera mitad del embarazo.

PALABRAS CLAVE: *ADN libre fetal, PCR en tiempo real, diagnóstico prenatal no invasivo*

SUMMARY

Objective: To validate the use of cell free fetal DNA (ffDNA) in maternal plasma to predict fetal sex in the first half of pregnancy. *Method:* A prospective observational cohort study of 25 pregnancies between 5 and 15 weeks of gestation was studied (median gestational age of 9+1 weeks). Maternal blood was taken and q-PCR was carried out to detect the multi-copy Y chromosome associated DSY14 gene. The end point was gender as assessed by ultrasound at 20-25 weeks. *Results:* A Y signal was obtained in 12 patients, so a male fetus was predicted. The earliest signal was at 6+4 weeks. In 9 patients we didn't have any signal, so a female fetus was diagnosed. There were 4 cases where the criterion to define fetal sex was not fulfilled and were classified as equivocal (all of them before 8+3 weeks). The probability to predict fetal sex from the test was 84% (21 of 25 patients). However, when the diagnosis of fetal sex is made, there is a 100% correlation between the ultrasound and Q-PCR. *Conclusion:* Free fetal DNA in maternal plasma allows prediction of fetal sex in the first half of pregnancy.

KEY WORDS: *Free fetal DNA, real time PCR, noninvasive prenatal diagnostic*

INTRODUCCIÓN

Desde la descripción por parte de Lo y cols (1) de la presencia de ADN libre fetal en la circulación materna, se han multiplicado las publicaciones demostrando la factibilidad del uso de este material genético para diagnóstico prenatal (2). La identificación del sexo o grupo sanguíneo fetal mediante la identificación del cromosoma Y o de los exones para el gen D respectivamente, en el plasma de mujeres embarazadas, son ejemplos de las aplicaciones clínicas de esta técnica (2-4).

Desde la primera identificación de secuencias del cromosoma Y en plasma materno la técnica ha probado ser reproducible en muchos laboratorios (5-7). Cuando la sangre materna es usada para determinar el sexo fetal, la tasa de éxito en el reconocimiento es cercana al 100% y el diagnóstico puede ser realizado tan precozmente como a las 4 semanas de gestación (5). Sin embargo, estas altas tasas de predicción solo se alcanzan cuando hay una mayor concentración del ADN fetal, lo que ocurre hacia el final del primer trimestre del embarazo (5).

Más allá de determinar en estadios más tempranos el sexo fetal de lo que se hace en la actualidad, el diagnóstico del sexo fetal está teniendo un gran impacto en el manejo de los desordenes genéticos ligados al cromosoma X (3) o para guiar la terapia prenatal en los casos de riesgo para hiperplasia suprarrenal congénita, en donde el déficit completo de 21-alfa-hidroxilasa, puede producir masculinización de genitales femeninos fetales (8). Otros tests diagnósticos que utilizan esta tecnología están actualmente en desarrollo para su uso en clínica, por ejemplo, la identificación del tipo de plaquetas en la trombocitopenia aloinmune y la detección de mutaciones paternas en enfermedad recesiva como la fibrosis quística, talasemias o en enfermedades autosómicas dominantes de origen paterno (9).

El objetivo de este estudio es determinar la validez del diagnóstico de sexo fetal mediante la identificación de fDNA en plasma de embarazadas durante la primera mitad del embarazo y determinar la edad gestacional que esto es posible.

MATERIAL Y MÉTODOS

Recolección de las muestras. Pacientes que acudieron a la Unidad de Medicina Fetal de la Universidad de los Andes para la realización de ecografía de primer trimestre, en las que se diagnosticó embrión único, viable, menor a 15 semanas. Fueron invitadas a participar del protocolo previa firma de consentimiento informado. Ingresaron 25 pacientes al estudio, a las que se les extrajo 20 ml de sangre

venosa periférica, que fue trasladada al laboratorio a temperatura ambiente en un plazo no mayor a 8 horas. Las pacientes acudieron posteriormente a control ecográfico entre las 20 y 25 semanas para diagnóstico de sexo fetal mediante ecografía, el que fue determinado por dos operadores en forma independiente y ciega. Como control positivo se utilizó ADN genómico humano de hombre y para control negativo ADN genómico humano de mujer no embarazada.

Procesamiento de las muestras. Las muestras transportadas al laboratorio fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a tubos libres de nucleasas y estériles, centrifugándolos durante 10 minutos a 7000 rpm. Posteriormente 800 µl de plasma fueron llevados a tubos limpios y almacenados a -20° C para su posterior utilización. El ADN fue extraído desde 800 µl de plasma mediante el uso de QIAmp Blood DNA Mini Kit (Qiagen, West Sussex, UK).

El ADN libre fetal en el plasma materno, se detectó mediante la técnica de PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos para la secuencia DYS14, (DYS14-sentido: 5' CAT CCA GAG CGT CCC TGG 3'; DYS14-antisentido: 5' GCC CAT CGG TCA CTT ACA CTT 3'). Se eligió este gen porque a diferencia de SRY, el DYS14 es una secuencia multi-copia lo que ayuda a mejorar la sensibilidad de la técnica(7). El medio de reacción contó con H₂O libre de nucleasas, tampón de PCR, MgCl₂ 3,5 mM, dNTPs 3 mM, Taq 2U (kit Go Taq Flexi, Promega), partidor DYS14-sentido 2,5 uM, partidor DYS14-antisentido 2,5 uM; SYBR Green 1/20000 (Molecular Probes) y 5 µl de templado para las muestras.

En la reacción de amplificación de *DYS14* se utilizó SYBR Green II, un intercalante del ADN, que se incorpora en el producto generado, lo cual permite medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado.

El PCR en tiempo real fue realizado en un termociclador CHROMO 4 (MJ Research) y el análisis de datos se realizó mediante el uso del software OPTICON 111. El programa consistió en un ciclo de denaturación inicial a 96° C por 2 minutos, luego se realizaron 45 ciclos de amplificación que consistieron en denaturación a 92° C por 20 segundos, apareamiento a 54° C por 20 segundos, y extensión a 72° C por 20 segundos. La fluorescencia fue entonces adquirida al final de la fase de extensión y la lectura se realizó a 80,5° C por 5 segundos al final de cada ciclo. Posteriormente se realizó una curva de temperatura desde 78° C hasta 90° C donde se realizó la lectura de fluorescencia, dejando las

muestras a una temperatura final de 4° C.

Valores de corte para asignación de sexo fetal.

El feto fue diagnosticado como masculino si al menos 2 de las 3 replicas para DYS14 alcanzaban valores de ciclo umbral (Ct) (número de ciclos al cual un nivel perceptible de fluorescencia es alcanzado) menores de 41. El feto fue considerado femenino si las 3 replicas alcanzaban valores de Ct de 45 o mayores, indicando que no había amplificación de la secuencia. En el caso de que solo un replicado para DYS14 tuviera Ct menor a 41 o los 3 se encontrarán con Ct entre 41 y 45 se consideró sexo indeterminado para la técnica (Tabla I)

Tabla I

CT UTILIZADO PARA LA DEFINICIÓN DE SEXO POR PCR DE TIEMPO REAL

Sexo fetal	Criterios
Masculino	2 de 3 replicados para DYS14 tienen un Ct < 41
Femenino	Los 3 replicados para DYS14 tienen un Ct > 45
Indeterminado	Si solo 1 replicado para DYS14 es < 41 o los 3 están entre 41 y 45

Ct: Ciclo umbral

RESULTADOS

Se analizó el plasma de 25 mujeres cursando embarazos con una edad gestacional media de 9+1 semanas (rango: 5+5 a 14+3 sem). Del total de casos, 12 pacientes presentaron amplificación para DYS14, diagnosticándose feto de sexo masculino. La menor edad gestacional a la cual se pudo identificar la señal del cromosoma Y fue 6+4 semanas. En otras 9 muestras no se generó señal, determinándose el sexo fetal como femenino. Hubo 4 casos donde no se cumplieron los criterios para definir el sexo fetal estableciéndose estos como indeterminado (Tabla II). La edad gestacional media de este último grupo fue de 6+3 semanas y todas ellas fueron menores a 8+3 semanas.

La confirmación diagnóstica se realizó según protocolo a una edad gestacional promedio de 21+3 semanas con rango entre las 20 a 25 semanas, existiendo coincidencia plena con el diagnóstico realizado mediante q-PCR (Tabla III). De los 4 casos indeterminado 2 resultaron ser masculino y 2 femeninos.

La probabilidad de diagnosticar el sexo a partir del test fue de 84% (21 de 25 pacientes). Considerando los 21 casos donde se pudo realizar un diagnóstico, la sensibilidad y especificidad de la técnica alcanzó el 100%. El resumen de los resultados de

las pruebas diagnósticas se presenta en la Tabla IV.

Tabla II

DETERMINACIÓN DE SEXO PRENATAL SEGUN AMPLIFICACIÓN DE DYS14 MEDIANTE Q-PCR

Sexo fetal	Femenino: 11	Masculino: 14
Femenino	9	-
Masculino	-	12
Indeterminado	2	2

Tabla III

COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR Q-PCR Y ECOGRAFÍA

		ECOGRAFÍA	
		Masculino	Femenino
q-PCR	Masculino	12	0
	Femenino	0	9

Tabla IV

VALOR DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DEL SEXO FETAL MEDIANTE Q-PCR EN 21 CASOS

	Masculino	Femenino
Sensibilidad	100	100
Especificidad	100	100
Valor predictivo positivo	100	100
Valor predictivo negativo	100	100

DISCUSIÓN

Existen diversas hipótesis para explicar el origen del ADN libre fetal en el plasma materno, diversos estudios sugieren que la principal fuente de ffDNA es la placenta producto de la apoptosis de células trofoblásticas (2), en desmedro de un tráfico de células fetales desde el feto a la madre. El hecho de que se pueda detectar ADN libre fetal desde los 14 días postconcepción, y por lo tanto previo al establecimiento de la circulación feto placentaria (5), asociado al hecho de encontrar ADN libre fetal en huevos anembrionados apoyan aun más un origen prácticamente exclusivo de la placenta (10).

En nuestro estudio obtuvimos 4 casos en los cuales no se cumplieron los criterios para diagnosticar el sexo fetal, siendo considerados como inde-

terminados. Cuando se reviso la edad gestacional en que se obtuvo las muestras, encontramos que todos ellos eran embarazos menores de 8+3 semanas de gestación. Cabe destacar que en estas 4 pacientes no hubo error en la identificación del sexo, más bien, producto de lo precoz del embarazo la amplificación de la secuencia fue insuficiente para realizar el diagnóstico. No se realizó un posterior seguimiento a estas pacientes, a manera de comprobar que en las semanas siguientes del embarazo se hubiese logrado el diagnóstico del sexo fetal. Se sabe que la cantidad de ADN libre fetal va en aumento durante el embarazo (2), por lo cual, la falta de amplificación de la secuencia DYS14 se debería a que la cantidad de ffDNA son mínimas en el comienzo del embarazo imposibilitando su identificación. Esta sería la principal limitación para mejorar la eficiencia del test, ya que a menor edad gestacional habrá necesariamente una mayor cantidad de casos en los cuales no se puede determinar el sexo fetal.

En un 84% de los casos se logro un diagnóstico del sexo fetal, en estos casos la sensibilidad y especificidad alcanzaron el 100%, con un valor predictivo positivo y negativo también de 100%. Esto va en línea con las numerosas publicaciones que demuestran la alta sensibilidad y especificidad de esta técnica, lo que ha motivado reproducirla en numerosos laboratorios alrededor del mundo, llevando la implementación de esta técnica a un nivel clínico (3,7,11,12). El diagnóstico precoz del sexo fetal en el primer trimestre puede reducir la ansiedad de los padres portadores de enfermedades ligadas al cromosoma X o evitar la exposición innecesaria a los esteroides en embarazos en riesgo de déficit de 21 hidroxilasa (8).

Sin duda, que el acceso precoz y no invasivo al material genético del feto esta cambiando la forma de enfrentar el diagnóstico prenatal. El desarrollo de esta técnica nos hará contar con elementos de juicio altamente confiables, que permitirán mejorar el diagnóstico prenatal y tener acceso al material genético del feto de manera no invasiva.

BIBLIOGRAFÍA

- Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, *et al.* Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485-7.
- Illanes S, Avent N, Soothill PW. Cell-free fetal DNA in maternal plasma: an important advance to link fetal genetics to obstetric ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2005;25:317-22.
- Costa JM, Benachi A, Gautier E. New strategy for prenatal diagnosis of X-linked disorders. *N Engl J Med* 2002;346:1502.
- Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion* 2002;42:1079-85.
- Illanes S, Denbow M, Kailasam C, Finning K, Soothill PW. Early detection of cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Early Hum Dev* 2007;83(9):563-6.
- Costa JM, Benachi A, Gautier E, Jouannic JM, Ernault P, Dumez Y. First trimester fetal sex determination in maternal serum using real-time PCR. *Gynecol Obstet Fertil* 2002;30:953-7.
- Rijnders RJ, van der Schoot CE, Bossers B, de Vroede MA, Christiaens GC. Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia. *Obstet Gynecol* 2001;98:374-8.
- Bartha JL, Finning K, Soothill PW. Fetal sex determination from maternal blood at 6 weeks of gestation when at risk for 21-hydroxylase deficiency. *Obstet Gynecol* 2003;101:1135-6.
- Lambert NC, Lo YM, Erickson TD, Tylee TS, Guthrie KA, Furst DE, *et al.* Male microchimerism in healthy women and women with scleroderma: cells or circulating DNA? A quantitative answer. *Blood* 2002;100:2845-51.
- Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel HM, Abdel-Fattah S, Avent N, *et al.* Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn* 2007;27:415-8.
- Finning K, Martin P, Daniels G. A clinical service in the UK to predict fetal Rh (Rhesus) D blood group using free fetal DNA in maternal plasma. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1022:119-23.
- Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, *et al.* Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998;62:768-75.