

**Desarrollo de un sistema de diagnóstico genómico fetal accesible
para determinación de sexo en el primer trimestre de gestación**

Tesis para obtener el grado de maestría que presenta

Biol. Mol. Tania Guadalupe Rojas Pérez

Codirectoras:

Dra. Claudia Haydée González de la Rosa, UAM-C

Dra. Esther López-Bayghen Patiño, CINVESTAV-Zacatenco

11 Enero 2022

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular Ingenes, y en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular del Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño y de la Dra. Claudia Haydée González de la Rosa.

Este trabajo contó con el apoyo de CONACYT, proyecto 231793 otorgado a la Dra. Esther Ivonne López Bayghen Patiño.

Durante la realización de este trabajo, fui becaria del CONACYT (expediente no.792695).

Comité tutorial

Codirectora Dra. Claudia Haydeé González de la Rosa, UAM-C

Codirectora Dra. Esther López-Bayghen Patiño, CINVESTAV-Zacatenco

Agradecimientos

Durante la realización de este trabajo, fui becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, expediente no. 792695), que me permitió continuar con mi formación académica.

A mi codirectora, la Dra. Esther López-Bayghen Patiño por su apoyo y experiencia compartida para realizar este trabajo, por su confianza y por permitirme trabajar con ella. Sus consejos siempre fueron útiles me siguen haciendo crecer como persona, muchas gracias por creer en mí.

A mi codirectora, la Dra. Claudia Haydeé González de la Rosa por toda la paciencia que me tuvo y por el apoyo brindado en cada uno de los seminarios y cursos y por todas sus enseñanzas. Muchas gracias por su tiempo.

A Ángeles Hernández por su apoyo administrativo con los cursos externos que me permitieron tomar que forman parte del programa de posgrado de la Maestría en Endocrinología Ginecológica e Infertilidad del Instituto de Infertilidad y Genética México S.C. y la Universidad de Sonora.

A la Dra. Leticia Laboratorio 19 Toxicología por ayudarme y asesorarme durante este trabajo.

A Cecilia Laboratorio 19 Toxicología por asistencia técnica.

A mis revisoras por sus comentarios y aportaciones.

Al Instituto INGENES y al Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular (LIDMOL) por permitirme colaborar en su investigación.

Agradecimientos personales

A mis papás, por comprometerse conmigo en cada una de las decisiones que he tomado para crecer como persona y académicamente, por brindarme siempre su apoyo y motivarme para que logre mis objetivos, siempre serán mi mayor ejemplo.

A mis hermanas, por ayudarme a seguir creciendo y compartirme sus experiencias.

A mis sobrinos para los cuales espero ser un buen ejemplo a seguir y puedan tener una aportación con lo que hago en su vida.

Índice

Índice	6
Índice de figuras y tablas	8
Abreviaturas y acrónimos utilizados	10
Resumen	11
Abstract	12
Introducción	13
ADN fetal en sangre y tejidos maternos	13
Técnicas de diagnóstico fetal	15
Obtención de ácidos nucleicos para diagnóstico fetal	17
PCR en tiempo real para diagnóstico fetal	18
Análisis de datos obtenidos de la amplificación por PCR cuantitativa	21
Regiones génicas usadas para la determinación de sexo fetal	22
Posible diagnóstico de trisomías en ADN fetal usando PCR	23
Justificación	25
Pregunta de investigación	25
Hipótesis	25
Objetivo general	25
Objetivos específicos	26
Materiales y métodos	27
Estrategia experimental	27
Participantes en el estudio y aprobación del comité de ética	28
Obtención de la muestra	28
Extracción de ADN de plasma de sangre periférica	29
Amplificación por PCR en tiempo real	30
Condiciones de termociclado	31
Resultados	33
Estandarización de la amplificación por PCR en tiempo real	33
Análisis de correlación entre los resultados de determinación de sexo fetal por qPCR y los resultados obtenidos por ultrasonido	39
Análisis estadístico	43
Establecimiento de un servicio de diagnóstico molecular del sexo fetal a partir de la semana 10 del embarazo	44
Discusión	47
Conclusiones	54

Anexos _____	55
Anexo 1 _____	55
Consentimiento informado _____	55
Anexo 2: Diseño de reporte de resultados _____	59
Referencias _____	61

Índice de figuras y tablas

Tabla 1a. Comparación entre técnicas invasivas en el diagnóstico genético fetal	16
Tabla 1b. Comparación de técnicas no invasivas en el diagnóstico genético fetal	17
Figura 1. Pasos generales de amplificación por PCR.	19
Figura 2. Representación de la PCR en tiempo real	20
Figura 3. Representación gráfica de la curva de amplificación determinada por la fluorescencia detectada vs el número de ciclos de PCR.....	21
Tabla 2: Ventajas y desventajas de los marcadores genéticos empleados en genotipificación de sexo por qPCR	22
Tabla 3. Secuencias de los iniciadores utilizados	30
Figura 4: Electroforesis capilar de los productos de PCR obtenidos tras la amplificación de cada gen propuesto y usando muestras de ADN genómico.....	34
Figura 5: Electroforesis capilar de los productos de PCR obtenidos tras la amplificación de cada gen propuesto usando muestras de ADN fetal de sexo masculino: comparación de métodos de purificación del ADN molde.....	35
Tabla 4: Comparación de características de productos de PCR observados mediante electroforesis capilar, amplificando con ADN circulante como molde, extraído de 2 maneras	36
Figura 6. Curvas de amplificación de TTC3, RPL17	37
Figura 7. Amplificación de genes determinantes de sexo a partir de ADN fetal de dos muestras con sexo fetal determinado por ultrasonido	38
Tabla 5: Datos de temperatura <i>melting</i> o de fusión de cada amplicón, tanto teórica como experimental	39
Tabla 6. Diagnóstico de sexo fetal en embarazos espontáneos	40
Tabla 7. Comparación entre los resultados de diagnóstico del sexo fetal con el método molecular y la detección mediante ultrasonido.....	41
Tabla 8: Coincidencia en el diagnóstico de sexo fetal comparado con el método molecular y la ecografía para muestras que fueron sometidas a transporte	42
Tabla 9: Coincidencia de los resultados de diagnóstico del sexo fetal y por ecografía para embarazos múltiples	42

Tabla 10: Relación entre los resultados de la prueba diagnóstica (sexo molecular) y sexo por ultrasonido	43
Tabla 11: Resultados obtenidos de análisis estadístico para conocer los valores que representa nuestro diagnóstico	44
Tabla 12. Ventajas y limitaciones de la determinación de sexo embrionario reportada en este estudio	53

Abreviaturas y acrónimos utilizados

ADN	Ácido desoxirribonucleico
g	Gravedades
NHC	Número de historial clínico
rpm	Revoluciones por minuto
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
mL	Mililitros
min	Minutos
µL	Microlitros
mM	Milimolar
°C	Grados Celsius
s	Segundos
SDS	Dodecilsulfato sódico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
WGA	Amplificación de genoma completo (<i>Whole genome amplification</i>)
CVS	Vellosidades coriónicas
NIPS	Pruebas prenatales no invasivas (<i>Non invasive prenatal screening</i>)
FF	Fracción fetal

Resumen

Determinar el sexo fetal durante el primer trimestre del embarazo puede ser necesario en condiciones de herencia de enfermedades mendelianas ligadas al sexo, pero también por razones personales. Nuestro objetivo fue establecer un sistema de diagnóstico genómico del sexo fetal no invasivo, económico y confiable utilizando el ADN fetal circulante en el plasma materno durante el primer trimestre de gestación, es decir, aplicable entre la semana 7 y 16 del embarazo. Se analizaron 155 muestras de sangre periférica de mujeres embarazadas que fueron procesadas por el método fenol:cloroformo:isoamílico, obteniendo suficiente ADN circulante libre para hacer el diagnóstico. La detección del cromosoma Y se hizo a partir de la amplificación por qPCR de los genes SRY y DYS14 y de las regiones únicas TTC3 y RPL17 de los cromosomas 21 y 18 respectivamente.

Encontramos que este método diagnóstico puede alcanzar una eficiencia a partir de la semana 11 mayor al 96.46%. En cambio, en otras edades gestacionales el diagnóstico para 10 semanas es de 91.67 %, en las 9 semanas, 83.33 %. En las semanas 8 y 7, 68.75 % y 63.63 %, respectivamente. La sensibilidad global en este estudio fue del 91.95 % y la especificidad del 87.00 %.

En conclusión, 90 % de los casos fue diagnosticado de manera correcta. Se estableció un sistema de diagnóstico molecular del sexo fetal a partir de la semana 10 de gestación, usando plasma materno.

Abstract

Determining fetal sex during the first trimester of pregnancy may be necessary under conditions of inheritance of sex-linked Mendelian diseases, but also for personal reasons. Our goal was to establish a non-invasive, inexpensive, and reliable genomic fetal sex diagnosis system using fetal DNA circulating in maternal plasma during the first trimester of gestation, that is, applicable between weeks 7 and 16 of pregnancy. We analyzed 155 peripheral blood samples from pregnant women processed by the phenol:chloroform:isoamyl method obtaining enough free circulating DNA to diagnose. Detection of the Y chromosome was made from the amplification of the SRY and DYS14 genes. As controls, the unique regions of TTC3 and RPL17 genes, from chromosomes 21 and 18, were chosen. All were amplified and identified by qPCR. We found that this diagnostic method can achieve an efficiency of 96.43% in pregnant women over 14 weeks.

On the other hand, in other gestational ages, the diagnosis has less efficiency: between 11 to 13 weeks, we find 98%, for ten weeks 91.67%, in the nine weeks, 83.33%. At weeks 8 and 7, 68.75% and 63.63%, respectively. The overall sensitivity in this study was 91.95%, and the specificity was 87.00%.

In conclusion, 90% of the cases were diagnosed correctly. A molecular diagnosis system of fetal sex was established from the 10th week of gestation using maternal plasma.

Introducción

La determinación embrionaria del sexo fetal es un proceso que se lleva a cabo en dos pasos regidos por los cromosomas sexuales y la producción de hormonas (1). En primer lugar, el contenido de los cromosomas sexuales impulsa la diferenciación de las crestas gonadales en testículo u ovario. Posteriormente, las hormonas sexuales producidas por las gónadas impulsan el establecimiento de diferentes características anatómicas y fisiológicas conocidas como sexo fenotípico. Los cromosomas sexuales evolucionaron por la ganancia de genes específicos del sexo a partir de autosomas ancestrales. En los humanos el desarrollo gonadal ocurre entre la cuarta y la quinta semana después de la concepción (2). La principal diferencia genética entre los sexos después de la inactivación del cromosoma X en las mujeres, es la presencia del cromosoma Y en los hombres. El desarrollo fetal masculino depende de la presencia de genes en una región determinante del cromosoma Y, genes que se expresan cuando se desarrollan las gónadas (3).

Conocer el sexo de un bebé en la etapa prenatal es necesario en mujeres con riesgo de tener descendencia con un trastorno genético, en particular, cuando son mujeres portadoras de trastornos genéticos ligados al cromosoma X (4). Asimismo, resulta deseable para muchas parejas saber el sexo del futuro bebé (5).

La ecografía ha sido la técnica más utilizada para determinar el sexo fetal y se lleva a cabo durante el segundo y tercer trimestre del embarazo, momento en el que ya se considera precisa en un 99% de los casos, detectando la presencia de genitales normales (6). Sin embargo, existe la necesidad real de conocer con precisión y tempranamente en el embarazo, el sexo fetal, para poder tomar las medidas diagnósticas confirmatorias necesarias en caso de presentarse una anomalía genómica o genética.

ADN fetal en sangre y tejidos maternos

La placenta forma una barrera permeable entre la madre y el feto y se ha demostrado que tanto células fetales intactas como ácidos nucleicos libres de células procedentes del feto circulan en la sangre materna (7, 8). En 1997, Lo y

colaboradores demostraron la presencia de ADN fetal libre en sangre materna. Los fragmentos de ADN fetal libre son detectables en sangre materna desde la semana cinco de gestación hasta el nacimiento, cuando aparentemente desaparecen rápidamente y llegan a ser indetectables después de dos horas (7). Hay una cantidad significativamente mayor de ADN fetal libre de células en el plasma de mujeres embarazadas en comparación con el ADN fetal extraído de la fracción celular de la sangre materna (5).

Aunque se desconoce realmente el origen del ADN fetal, es decir, su fuente tisular, se proponen dos posibilidades: la primera, es que proviene de células hematopoyéticas fetales; en 1997 se demostró que las células fetales sufrían apoptosis y se reconoció que el ADN fetal libre de células puede resultar de la interacción entre células fetales apoptóticas y el sistema inmunológico materno. Otra propuesta es que su origen sea en la placenta, siendo la fuente más lógica debido a la circulación que existe de la madre al feto (9).

En la sangre materna el ADN libre que proviene del feto es conocido como fracción fetal (FF). Se sabe que la fracción fetal aumenta su concentración conforme avanza la edad gestacional, con el índice de masa corporal materno y con la edad materna; también influye el método de extracción (4). Se requiere al menos el 4% de ADN fetal en el plasma materno para que los análisis genéticos sean confiables (10).

Invernizzi y colaboradores sugieren que el ADN fetal libre de células puede seguir presente durante meses o años después del parto, ya que demostraron que el ADN fetal puede ser detectado a partir de células maternas o leucocitos que circulan durante muchos años después de la concepción (11). La transferencia directa feto-materna de moléculas de ADN se ha sustentado en la detección de ADN fetal en varios líquidos corporales maternos, incluido el líquido amniótico, la orina, el líquido cefalorraquídeo y el líquido peritoneal, generando la posibilidad de un gradiente de concentración que conduzca a la transferencia directa de moléculas de ADN a través de la placenta (12), pero su concentración después del parto es mínima.

El uso del ADN fetal libre de células para diagnóstico de alteraciones fetales inició su comercialización desde el 2011 como una técnica novedosa no invasiva, que

inicia al coleccionar una muestra de sangre periférica y separar el suero materno, del cual se aíslan fragmentos de ADN fetal libre (5).

La vida media del ADN fetal se estima en 13.3 min con un rango de 4 a 30 min después del parto. Debido al hecho de que la cinética de la PCR en tiempo real da como resultado una amplificación más eficiente de amplicones pequeños, existe evidencia indirecta que sugiere que los fragmentos de ADN fetal circulantes son pequeños (<450 bp). Debido a que el ADN fetal no se metaboliza inmediatamente y se amplifica con tanta facilidad a partir de plasma, resulta una fuente de material fetal para usos diagnósticos (11). En términos de su longitud, el ADN fetal exhibe una distribución diferente en comparación con el ADN materno, con una proporción reducida de moléculas de menos de 155 pb y una proporción aumentada de moléculas de más de 150 pb en el plasma materno, posiblemente causada por empaquetamiento nucleosómico diferencial durante la apoptosis, o por diferencias en la fuerza de unión del nucleosoma (13).

Técnicas de diagnóstico fetal

Durante los últimos 20 años se ha utilizado el diagnóstico prenatal en las parejas embarazadas buscando anomalías genéticas principalmente por dos motivos: la edad de los padres y la búsqueda de bebés sanos. Se ofertan diferentes diagnósticos con la finalidad de lograr un futuro bebé sano (4).

Usando sólo la ecografía, se ha propuesto un método de dos pasos, en el que la prueba combinada del primer trimestre, basada en la medición de la translucidez nucal, la proteína plasmática A asociada al embarazo, la gonadotropina coriónica humana β libre y la edad materna, va seguida de una prueba prenatal no invasiva (NIPS); si la estimación del riesgo de la prueba combinada está por encima de un nivel especificado, que corresponde al 80% de riesgo (14).

De los procedimientos más conocidos para diagnóstico fetal (Tabla 1a), está la citogenética prenatal realizada a mujeres de más de 35 años. Consiste en obtener células nucleadas fetales mediante una técnica invasiva de muestreo de vellosidades coriónicas (CVS) o la amniocentesis (Tabla 1a). La edad de 35 años

se estableció como el umbral para estos procedimientos porque a partir de esta edad aumenta la incidencia de bebés nacidos con aneuploidía autosómica más común, la trisomía 21, siendo aproximadamente 2%, y también la posibilidad de un aborto espontáneo secundario (4).

Tabla 1a. Comparación entre técnicas invasivas en el diagnóstico genético fetal

Pruebas prenatales invasivas clasificadas de acuerdo al tipo de muestra			
Muestra requerida	Análisis molecular	Descripción	Referencia
Vellosidades coriónicas (CVS)	FISH (hibridación fluorescente <i>in situ</i>) o por q-PCR	Toma de muestra de tejido de la placenta para examinar anomalías cromosómicas y problemas genéticos; se extrae bajo la guía de una ecografía por el método transcervical o transabdominal.	(15)
Líquido intrauterino para aislar células amnióticas. Amniocentesis	FISH (hibridación fluorescente <i>in situ</i>) o por q-PCR	Consiste en extraer una muestra de líquido amniótico a través de una aguja fina que se inserta a través del abdomen materno y dentro del saco gestacional con el fin de detectar anomalías cromosómicas.	(16)

Las NIPS se utilizan para el diagnóstico de aneuploidías fetales comunes (Tabla1b). Basadas en el análisis del ADN fetal en el plasma materno, éstas ayudan a identificar la anormalidad genética de manera no invasiva; considerando que 1 de cada 100 abortos espontáneos puede ser causado por la amniocentesis, siempre es deseable tener pruebas no invasivas (4). Las actuales NIPS consisten en utilizar ADN fetal que ha sido aislado de sangre materna y llevar a cabo una secuenciación masiva de nueva generación con la finalidad de determinar el sexo y las posibles trisomías. Son primordialmente un método de cribado, y reportan una falla técnica del 2%; el análisis es complejo y de alto costo, por lo que no puede ser ofrecido como un método de cribado primario (14).

Tabla 1b. Comparación de técnicas no invasivas en el diagnóstico genético fetal

Pruebas prenatales no invasivas clasificadas de acuerdo al tipo de técnica empleada para el diagnóstico				
Nombre de la técnica	Tipo de análisis molecular	Muestra requerida	Descripción	Referencia
Prueba prenatal no invasiva (NIPT: <i>non invasive prenatal test</i>)	Secuenciación	Sangre materna (ADN fetal)	Utilizado para estimar posible riesgo a trisomías y determinación de sexo.	(14)
	Microarreglos de cromosomas	Sangre materna (ADN fetal)	Análisis cromosómico, detecta ganancias (microduplicaciones) o pérdidas (microdeleciones) cromosómicas.	(17)
	Secuenciación del exoma	Sangre materna (ADN fetal)	Es la secuenciación de exomas para identificar variantes que alteran la secuencia, así como el sexo fetal.	(14)
	PCR anidada (<i>Nested PCR</i>)	Sangre materna (ADN fetal)	Amplificación en dos etapas, utilizando juegos de oligonucleótidos diferentes, para detectar anomalías cromosómicas y sexo fetal.	(18)
Ecografía	No aplica	Detección por ultrasonido	La demostración del pene y escroto en el feto varón o los labios mayores y menores en el feto mujer se usan para detectar sexo fetal. La detección de la translucencia nuchal se usa para detectar posible Síndrome de Down.	(19)

Obtención de ácidos nucleicos para diagnóstico fetal

Existen diferentes métodos de extracción de ADN. La primera vez que se extrajo ADN fue en 1869 por Friedrich Miescher. Cuando realizó la extracción lo nombró “núcleos” y más tarde uno de sus estudiantes le dio el nombre de ácido nucleico (20). En 1958 Meseson y Stahi, desarrollaron un protocolo de centrifugación por gradiente en donde se aisló ADN de la bacteria *E. coli*. En 1991 se dio a conocer el método de obtención de ADN con la enzima proteinasa K, pero el método más

conocido y utilizado fue con fenol-cloroformo isoamílico desarrollado por Joseph Sambrook y David W. Russell (20).

Para extraer ADN de la célula, es decir aislar el ADN mediante ruptura de la pared celular o membrana celular, los métodos de extracción se pueden clasificar en dos grupos: de base química y de fase sólida. El método de extracción químico consiste en utilizar diferentes soluciones orgánicas e inorgánicas, por ejemplo, SDS, fenol, cloroformo, alcohol isoamílico, EDTA, Tritón X100. En cambio, el método sólido se basa en la extracción de ADN en fase sólida/líquida; la sílice es la sustancia sólida que se une al ADN durante la purificación. Existen otros métodos como es el caso de la extracción de ADN utilizando resinas aniónicas, o bien el método de extracción de ADN con perlas magnéticas (21, 22). Un proceso simplificado y confiable de extracción del ADN puede permitir el planteamiento del uso de ADN fetal y PCR en tiempo real, como dos auxiliares importantes en el diagnóstico fetal más importante: las cromosopatías más frecuentes en nuestra población, como el Síndrome de Down y el Síndrome de Edwards, así como la oportunidad de diagnosticar de manera confiable, rápida y menos costosa, el sexo fetal (18).

PCR en tiempo real para diagnóstico fetal

Se conoce como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a la técnica que permite detectar y cuantificar cantidades pequeñas de secuencias de ácidos nucleicos. Entre las principales aplicaciones que tiene este tipo de tecnología se encuentran diagnóstico de patología, clonación de fragmentos de ADN específicos, identificación de genes en diagnóstico y ciencia forense (21).

El principio de PCR se basa en la replicación del ADN que consta en ciclos repetidos de desnaturalización (Figura 1) del mismo, mediante la fusión a una temperatura elevada para pasar de ADN bicatenario a monocatenario. La hibridación de dos oligonucleótidos que son utilizados como cebadores para el ADN diana. Y finalmente la extensión de la cadena de ADN por adición de nucleótidos de los cebadores usando ADN polimerasa (23).

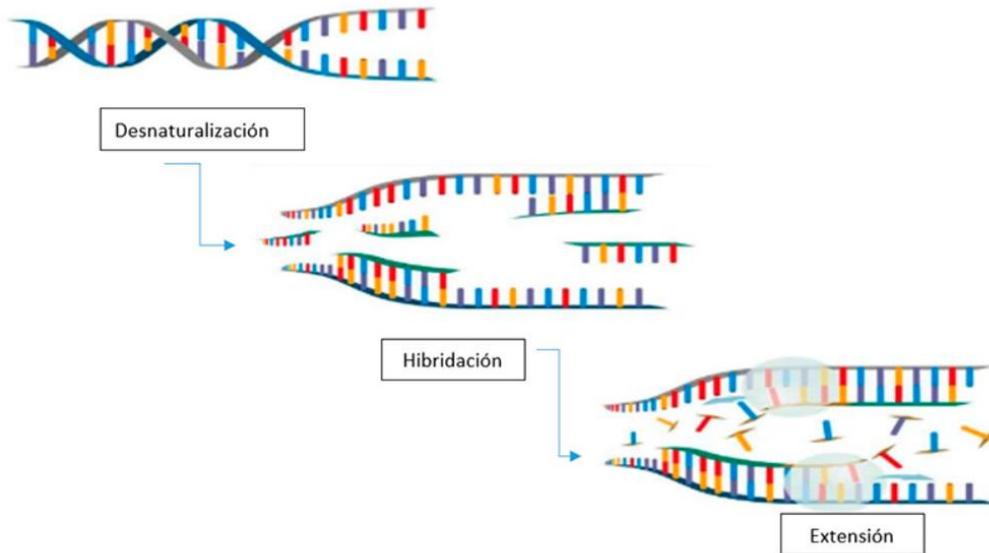


Figura 1. Pasos generales de amplificación por PCR (24). En donde ocurre la desnaturalización de ADN, hibridación y finalmente la extensión.

El paso más importante en una reacción de PCR en tiempo real es la amplificación con indicadores fluorescentes (fluoróforos) para detectar genes específicos. La detección de la amplificación se realiza con un marcaje fluorescente y existen dos tipos SYBR Green o sondas Taqman.

La Figura 2 describe de manera general los pasos de PCR en tiempo real de los dos tipos de fluoróforos cumpliendo el mismo fundamento. La PCR en tiempo real consiste en realizar varias rondas de PCR para amplificar y detectar los genes de interés. Los productos se pueden detectar en "tiempo real" utilizando sondas SYBR-green o Taqman, el análisis resulta en una curva de amplificación, traducida en el número de copias detectadas por fluorescencia.

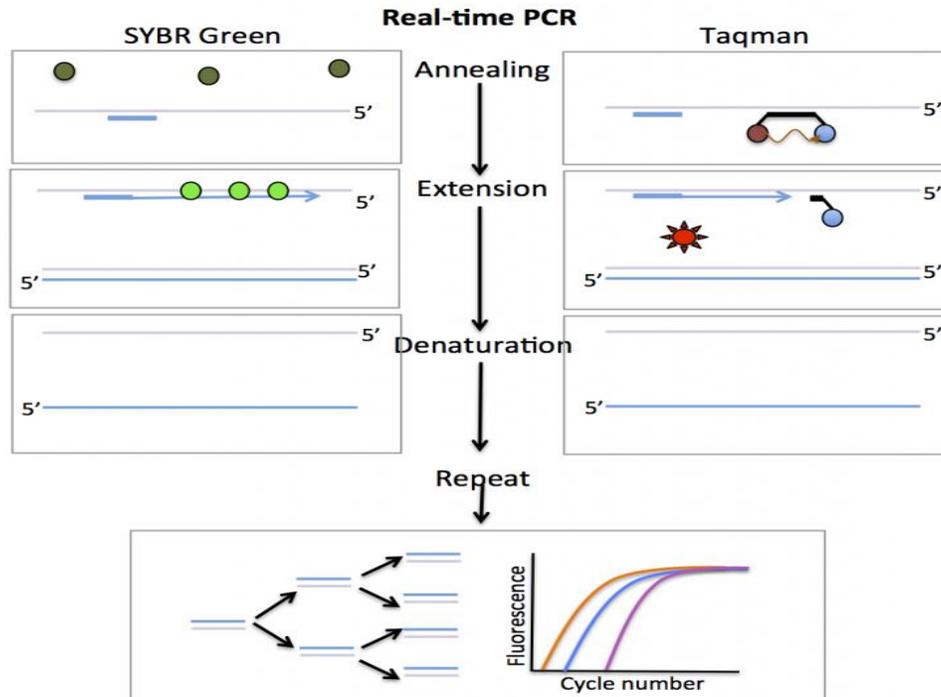


Figura 2. Representación de los pasos de la PCR en tiempo real.

SYBR green es un agente intercalante que emite fluorescencia cuando se ha unido a ADN de doble cadena (25). En cambio, las sondas Taqman son sondas específicas de un gen, unidas a moléculas informadoras y extintoras, la sonda se une al ADN entre el cebador sentido y cebador antisentido, mientras que el indicador y el extintor están unidos a la sonda, el extintor absorbe la fluorescencia emitida por el informador, pero al liberarse el informador al medio, se puede detectar la fluorescencia. Al utilizar sondas Taqman se tiene la ventaja de que hay indicadores de diferentes colores y por lo tanto se pueden combinar en diversos ensayos (26). Como se observa en la Figura 2 la cantidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de producto de PCR, el momento en el que la fluorescencia alcanza un umbral definido es relativo al nivel de expresión génica (23). Se hace referencia a ciclo umbral o número de ciclos (Ct) a la fase exponencial de la PCR que es inversamente proporcional al número de copias del blanco, entonces cuando sea mayor el número de copias iniciales de los ácidos nucleicos a amplificar se verá de

manera pronta un aumento significativo en la fluorescencia y el valor obtenido de Ct será bajo (25).

Análisis de datos obtenidos de la amplificación por PCR cuantitativa

Al realizar un análisis cuantitativo, los datos se traducen en curvas de amplificación, la sensibilidad de éste está determinada por el ciclo al cual la fluorescencia emitida se incrementa por encima del ruido de fondo, el número de copias del templado puede ser determinado a partir del número de ciclos (23) (Figura 3).

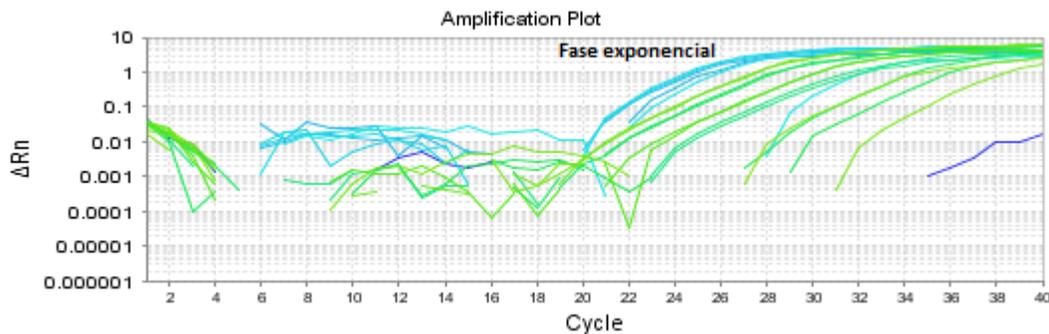


Figura 3. Representación gráfica de la curva de amplificación. Determinada por la fluorescencia detectada vs el número de ciclos de PCR, donde ΔRn corresponde a la densidad de emisión de la PCR con molde y sin molde entre la intensidad de emisión de la referencia pasiva.

Se conoce como referencia pasiva al ácido nucleico idéntico a la muestra que estamos analizando, pero sin la secuencia que corresponde al templado, para tener un control negativo fiable.

Las curvas de amplificación constan de tres partes diferentes: 1) La fase inicial donde no se puede medir la acumulación del producto de PCR pues hay pocos cambios en la señal de fluorescencia, lo que define la línea basal. 2) La fase exponencial, donde la fluorescencia cambia a medida que se forman más productos 3) La fase de meseta, donde no se distinguen cambios en la fluorescencia a pesar de que se siguen acumulando productos (25).

Una PCR fue exitosa y es cuantitativa si cumple la característica de mostrar rangos dinámicos de la muestra y del control endógeno que deben ser similares, un método

sensible para evaluar si esta regla se cumple es calcular el ΔCt para diferentes diluciones de la muestra y del gen normalizador.

$\Delta Ct = Ct \text{ (muestra)} - Ct \text{ (normalizador)}$, donde $Ct \text{ (muestra)}$ y $Ct \text{ (normalizador)}$ es el ciclo al cual la muestra y el normalizador respectivamente, alcanzan el nivel umbral de fluorescencia en el ensayo de PCR. El valor de ΔCt se realiza en diferentes diluciones del templado y de la referencia, con el propósito de determinar la eficiencia de amplificación (27).

Regiones génicas usadas para la determinación de sexo fetal

Estas regiones se encuentran en el cromosoma Y y han sido ampliamente descritas y utilizadas para la determinación del sexo fetal. Cabe mencionar que existen diversos genes que pueden ser utilizados para la determinación de sexo, pero en este trabajo se centra en los descritos a continuación, con ventajas y desventajas según la técnica utilizada (Tabla 2).

Tabla 2. Ventajas y desventajas de los marcadores genéticos empleados en genotipificación de sexo por qPCR

Gen	Ventajas	Desventajas
Amelogenina	-Se utiliza solo un par de iniciadores para la detección de ambas cromosomas	-Para observar la diferencia de 6 pb entre los dos amplicones es necesario un método de alta resolución -Dificultad para amplificar AMELY a partir de WGA
SRY	-Fragmento grande, fácilmente amplificable tomando como molde inicial WGA	-Es un gen de copia única -Puede dar falsos negativos por la falta de material genético para amplificarlo
DYS14	-Múltiples copias en el cromosoma (aprox. 40 copias en cromosoma Y)	- Puede dar falsos positivos por contaminación durante la extracción

Tomada de (22).

SRY (región determinante del sexo-Y): es un gen de copia única que codifica para un factor de transcripción específico de los testículos que influye en el desarrollo

sexual diferencial en los mamíferos y se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma Y (8).

DYS14 (proteína específica de testículo ligada a Y): este gen está involucrado en la espermatogénesis. La región genómica amplificable se localiza en el intrón 1 del gen multicopia TSPY en el brazo corto del cromosoma Y; un solo cromosoma Y contiene en promedio más de 50 copias del gen TSPY, y cada copia contiene al marcador DYS14, por lo que es más fácilmente amplificable aún en condiciones de poca cantidad de ADN inicial debido a su gran cantidad de copias (28).

Amelogenina: Es una proteína producida por los ameloblastos que contribuye en la organización de la estructura del esmalte durante el desarrollo dental, regula la iniciación y crecimiento de los cristales de hidroxapatita durante la mineralización del esmalte dental, y ayuda a dirigir a las células que forman el cemento hacia la superficie del diente. Es un gen de copia única, ubicado en el brazo corto de los cromosomas sexuales X y Y. Si se amplifica el intrón 1, en el cromosoma X el gen (AMELX) da lugar a un producto de amplificación de 106 pb, y en el cromosoma Y el gen (AMELY) da lugar a un amplicón de 112 pb, de tal forma que el gen en el cromosoma Y posee 6 pb más que en el cromosoma X, por lo que puede ser usado en la determinación del sexo (29).

Además de las regiones génicas para la determinación del sexo también se deben considerar genes que funcionan como referencia para saber si realmente tenemos ADN después de realizar la extracción del mismo, los utilizados en este trabajo son TTC3 y RPL17.

TTC3 (gen del dominio de repetición tetra péptido 3) es un gen que se encuentra dentro de la región crítica del síndrome de Down (SD) ya que puede conducir a 24 características fenotípicas de SD, se encuentra en 21q22.2 (30). Su mecanismo de control de calidad específico se divide en tres funciones: 1. actúa como cochaperona para ayudar a las proteínas a plegarse correctamente; 2. actúa como una ubiquitina ligasa E3 (E3s) involucrada en procesos de degradación de proteínas a través del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS); y 3. eventualmente también puede causar autofagia al afectar la función mitocondrial (30).

RPL17 es un gen codificador de proteínas y se encuentra en el tejido testicular y se dice que puede estar involucrado en la espermatogénesis (31).

Posible diagnóstico de trisomías en ADN fetal usando PCR

Dos anomalías genéticas comunes y con alta prevalencia durante los procedimientos de fecundación *in vitro* (FIV) son la trisomía 21 (Síndrome de Down) y la trisomía 18 (Síndrome de Edwards) (4). Para la trisomía 21, los métodos actuales incluyen el análisis de la región crítica del síndrome de Down, localizada en el brazo largo del cromosoma 21, la cual contiene varios genes cuya duplicación está directamente involucrada en características fenotípicas del síndrome de Down, como el gen TTC3 (Dominio Tetratricopéptido Repetido 3) el cual se expresa en células neuronales, y se ha visto que su sobreexpresión en síndrome de Down está relacionada con el retraso mental en estos pacientes (30, 31). Recientemente la amplificación cuantitativa del gen TTC3 demostró que puede discriminar entre sujetos con síndrome de Down y sujetos sanos. Este y algunos otros estudios similares se centran en diagnóstico prenatal y neonatal (31).

Para la trisomía 18, se ha examinado el gen RPL17 (proteína ribosomal 17), localizado en el brazo "q" del cromosoma 18, el cual es un inhibidor del crecimiento del músculo liso vascular (32), y su sobreexpresión en síndrome de Edwards podría estar relacionada con los problemas cardiovasculares que presentan los pacientes con esta condición, sin embargo la asociación entre RPL17 y la detección de trisomía 18 aún no ha sido investigada. Eventualmente y con el desarrollo de mejores reactivos y técnicas de PCR, es deseable analizar la posibilidad de poder utilizarlos como parte del diagnóstico genético fetal. El reto técnico para resolver es la cuantificación del número de copias detectadas, considerando que en una trisomía se detectaría una copia más, pero también las copias maternas.

Justificación

Una forma de diagnosticar anomalías genéticas y conocer el sexo con menos riesgos y que está disponible en forma comercial es la utilización del ADN fetal presente en sangre materna con el uso de secuenciación masiva en paralelo; sin embargo, esta es una prueba con costos elevados y que garantiza buenos resultados sólo después de la semana 13 de gestación. Debido a que existe la necesidad de conocer el sexo fetal de manera temprana (desde el primer trimestre del embarazo) evitando el uso de técnicas invasivas, una tercera opción que disminuya o anule los riesgos implícitos en la amniocentesis y los costos elevados del NIPT, ofreciendo una buena especificidad y sensibilidad de diagnóstico desde la semana 7 de embarazo, resulta atractiva y necesaria. En este trabajo proponemos el uso de la PCR en tiempo real y el establecimiento de un sistema de extracción de ADN fetal circulante de costo accesible que permita la detección específica, sensible del sexo fetal detectando la presencia de los genes SRY y DYS14, con costo razonable y en estadios tempranos del embarazo (semanas 7 a 12).

Pregunta de investigación

¿Se puede diagnosticar el sexo fetal de manera temprana (antes de semana 12), efectiva, confiable y con un costo razonable?

Hipótesis

El sexo fetal puede ser detectado durante el primer trimestre de gestación (entre la semana 7 y 12) de manera no invasiva, con alta especificidad y sensibilidad, y sin afectar el desarrollo fetal, estableciendo un sistema de amplificación de ADN fetal circulante en sangre materna.

Objetivo general

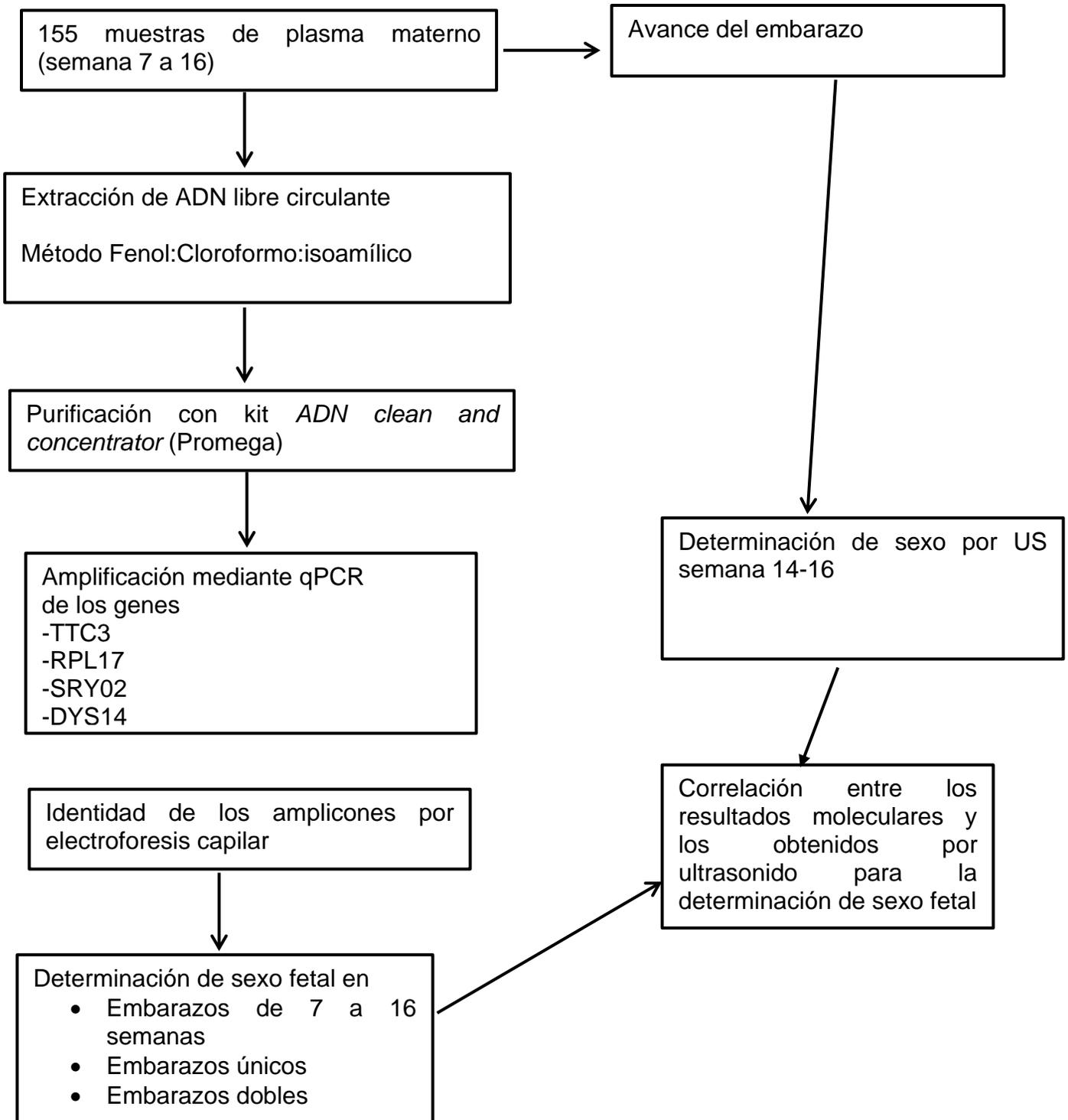
Establecer un sistema de diagnóstico genómico del sexo fetal utilizando el ADN fetal circulante proveniente de plasma de sangre de mujeres embarazadas en el primer trimestre de embarazo (de la semana 7 a la semana 12).

Objetivos específicos

1. Estandarizar un sistema de extracción de ADN fetal económico, confiable y reproducible, basado en extracción fenol-cloroformo y columnas de filtración, que permita la amplificación de diversas regiones cromosómicas.
2. Con el ADN fetal circulante, estandarizar la amplificación de las regiones cromosómicas únicas, TTC3 y RPL17 en los cromosomas 21 y 18, respectivamente, usando PCR en tiempo real, para poner de manifiesto la calidad y representatividad de diversas secuencias genómicas en la fracción de ADN circulante que proviene del plasma materno.
3. Con el ADN fetal circulante, estandarizar la detección del cromosoma Y a través de la amplificación de los genes SRY y DYS14 usando PCR en tiempo real.
4. Determinar el sexo fetal (presencia de cromosoma Y) en muestras de ADN circulante en embarazos de 7 a 16 semanas, únicos y múltiples y determinar la efectividad de este método, comparando con los resultados de la detección de genitales masculinos mediante ultrasonido.

Materiales y métodos

Estrategia experimental



Participantes en el estudio y aprobación del comité de ética

Las muestras de este estudio provienen de pajaras interesadas en conocer el sexo de su futuro bebé. Los criterios de inclusión son: pacientes infértiles que se sometieron a un tratamiento de reproducción asistida en el Instituto Ingenes en la Ciudad de México. Las pacientes fueron evaluadas clínicamente de acuerdo con un protocolo estandarizado que incluye historial clínico familiar y personal. Asimismo, se incluyeron muestras tomadas de voluntarias embarazadas de manera espontánea, quienes llenaron un cuestionario con datos relevantes para el estudio. En todos los casos las madres leyeron y firmaron el consentimiento informado (ver anexo 1).

Los criterios de exclusión fueron mujeres que durante la gestación sufrieron aborto después de la toma de muestra, así como mujeres que tuvieron reducción embrionaria o bien que hubieran recibido una transfusión sanguínea en el último año antes del embarazo.

Se eliminaron todas aquellas muestras que tuvieron alguna falla técnica durante el procedimiento de extracción, muestras hemolizadas o que no contenían suficiente suero para realizar el proceso.

La propuesta del presente proyecto de investigación se sometió a revisión por parte del comité de Ética del Instituto Ingenes, en donde se expuso la estrategia experimental a emplear y el formato de consentimiento informado que deberían firmar las mujeres embarazadas que deseen conocer el sexo de su bebé.

Obtención de la muestra

La muestra de sangre de cada mujer embarazada que participó en el estudio fue colectada en 2 tubos BD Vacutainer® con EDTA K2 y centrifugados a 3500 rpm durante 10 min. Posteriormente, se recuperó el plasma de los dos tubos (aproximadamente 4 mL en total) y se pasó a un microtubo de 5 mL, se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones mencionadas con la finalidad de evitar residuos sanguíneos, se recuperó el plasma y se transfirió a otro microtubo para almacenarlo a -70° C hasta su procesamiento.

Extracción de ADN de plasma de sangre periférica

En tubos nuevos de 5 mL, se agregaron 2 mL de plasma y 2 mL de *buffer* de extracción (Tris 10 mM pH 8, EDTA 20 mM, SDS 0.5%), se mezcló la solución por inversión y se etiquetaron con el NHC de la paciente. En 8 microtubos de 1.5 mL se repartieron 1 mL de la mezcla previamente realizada y 400 μ L de fenol, en seguida se mezcló por vórtex durante 15 s aproximadamente y se incubó a 65°C a baño maría durante 5 min, luego los microtubos se centrifugaron a 15 000 g por 10 min (todas las centrifugaciones se realizaron a 4°C), se recuperó la fase acuosa en 8 microtubos nuevos etiquetados con el NHC. Posteriormente, se adicionaron 300 μ L de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y se mezcló por vórtex durante 15 s, después se centrifugaron a 15 000 g por 10 min. Se recuperó la fase acuosa superior y se colocó en 8 microtubos nuevos de 1.5 mL y se agregaron 500 μ L de cloroformo:isoamílico (24:1) y mezcló por vórtex 15 s. Nuevamente se recuperó la fase acuosa y se colocó en 8 microtubos nuevos, se agregaron 50 μ L de acetato de sodio 3 M y 800 μ L de isopropanol frío, y se mezclaron por inversión, posteriormente se dejaron incubando a -20°C toda la noche.

Al siguiente día, los tubos fueron retirados del congelador y centrifugados a 14,000 g por 15 min, se decantó el sobrenadante y se agregaron 500 μ L de etanol frío al 70%, se mezcló por vórtex para que se desprendiera la pastilla, y se repitieron los lavados con etanol al 70% dos veces más bajo las mismas condiciones. Se decantó el sobrenadante y se eliminó el exceso de etanol con pipeta (teniendo cuidado de no tocar el *pellet* formado en el fondo del tubo), se secó la pastilla a 55°C en el baño de calor seco durante 5 min aproximadamente y se agregaron 10 μ L de H₂O inyectable a cada uno de los tubos con la pastilla, y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 min para que se hidratara. Finalmente, se juntaron todas las muestras en un solo tubo (con un total de 80 μ L de ADN) y se cuantificó por absorbancia a 260/280 nm en el Nanodrop (Thermoscientific).

Para eliminar residuos orgánicos, se utilizó el kit *ADN clean and concentrator* (Zymo Research, D4033) siguiendo las instrucciones sugeridas por el proveedor. Brevemente, al tubo que contenía el ADN, se le agregaron 400 μ L de *buffer* de

unión, se mezcló con vórtex y la mezcla se pasó a la columna de filtración y ésta se colocó sobre el tubo de recolección, la mezcla se centrifugó a 14 000 g por 30 s, se eliminaron los residuos del tubo de recolección y se volvió a colocar la columna, en donde se añadieron 200 µL de *buffer* de lavado y se centrifugó (14 000 g por 30 s), se repitió el lavado y se volvió a centrifugar (14 000 g por 30 s). Se eliminaron los residuos del tubo de recolección y se volvió a centrifugar (14 000 g por 30 s) para eliminar los residuos de etanol. Se colocó la columna en un tubo nuevo y se añadieron 45 µL de *buffer* de elución (previamente calentado a 60°C) dentro de la columna, se dejó incubar por 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó (14 000 g por 30 s). La muestra fue re-eluída en el mismo tubo y por último, la cantidad de ADN cuantificada utilizando el Nanodrop.

Amplificación por PCR en tiempo real

Para realizar el análisis de amplificación que permite identificar el sexo, se amplificaron las regiones genómicas de dos genes determinantes del sexo (SRY y DYS14) y de dos genes considerados como representativos de dos cromosomas independientes (RPL17 y TTC3); las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla 3; se ajustaron a una concentración de 20 pmol/µL.

Tabla 3. Secuencias de los iniciadores utilizados.

Gen	Oligonucleótidos usados como iniciadores; secuencia 5'-3'	Tamaño (pb)	Referencia
SRY	FW- 5' GCTGGGATACCACTGGAAAA 3' RV- 5' TCTTGAGTGTGTGGCTTTTCG 3'	247	(18)
DYS14	FW- 5' CATCCAGAGCGTCCCTGG 3' RV- 5' TTCCCCTTTGTTCCCAAA 3'	147	(33)
TTC3	FW- 5' GAATACTTTGATGATTGCCAACAG 3' RV- 5' TCACTAGAATACTGCTTCGAGAC 3'	141	(34)
RPL17	FW- 5' CCCCACTTAGATGTACATAGCC 3' RV- 5' TGGAGGACTTCAGCTTATTCTG 3'	236	(34)
SRY02	SECUENCIA PROTEGIDA EN PROCESO DE PATENTE	146	Diseño propio, este trabajo

pb: pares de bases

El material genético (ADN) fue amplificado por la técnica de qPCR con el kit SYBR® FAST qPCR (ThermoFisher Scientific, 4385610) con las siguientes concentraciones de reactivos y condiciones de termociclador (para la detección de todos los genes):

Reactivos	Concentración
SYBR® FAST qPCR	5 X
Iniciador sentido	20 pM
Iniciador anti sentido	20 pM
ADN (templado)	1 µL (alrededor de 3 ng)
H ₂ O libre de nucleasas	Hasta completar 10 µL de reacción

Condiciones de termociclado

Etapas	Ciclos	Condición
Inicio	1	42°C - 5min 95°C – 5 min
Desnaturalización	30	95°C - 15 seg
Alineamiento		Depende del cebador °C - 30 seg*
Elongación		72°C - 1 min (lectura)
Melting (fusión)	1	95° - 15 seg 60°C - 1min 95°C - 15seg
Holding	1	4° C ∞

SRY, TTC3 y RPL17 T° alineamiento fue de 58°C; para DYS14 fue de 62°C.

Electroforesis capilar

Para evaluar la calidad de nuestra amplificación por PCR se realizó una electroforesis capilar, primero atemperar los reactivos y el chip (Kit Reorder P/N 760435), se preparó el gel agregando 13 µL de DNA Dye Concentrate, agitando y transfiriendo la mezcla a los filtros, centrifugar a 9200 rpm durante 5 min, asegurando que todo el gel haya pasado por el filtro. Utilizando pipeteo inverso agregar el gel y tinte a los pocillos del chip, una vez que tenemos listo el chip se preparó la muestra de ADN (productos de PCR), el marcador de peso molecular y el tampón. A un tubo nuevo se le agregaron 12 µL de marcador de peso molecular de ADN a 108 µL del tampón 1X. Los volúmenes de muestra recomendados son 25

μL para una placa de 384 pocillos o 40 μL para una placa de 96 pocillos. Una vez obtenida la mezcla se agregó al chip y este se colocó en el equipo para iniciar el análisis.

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado utilizando el software SigmaPlot, analizando los datos mediante una prueba dicotómica para determinar especificidad y sensibilidad en las pruebas de determinación de sexo, se utilizó para determinar el grado de predictibilidad de la prueba.

Resultados

La población de estudio estuvo formada por pacientes que cumplieran los criterios de inclusión propuestos; clasificando a las mujeres de acuerdo con su edad gestacional al momento de la toma de la muestra. En este estudio la recolección de muestras se llevó a cabo de enero 2020 a noviembre 2020. El rango de edades de las pacientes participantes en este estudio fue amplio (23-53 años) con un promedio de 36 años; las pacientes se distribuyen en los siguientes grupos: 20-29 7.74%; 30-39 57.41%; 40-49 33.54%; 50 1.29% y un 48% de la población de más de 40 años. Del total de mujeres de este estudio, el 60.15% son primigestas, es decir que es su primer embarazo.

El “estándar de oro” para confirmación del resultado fue el diagnóstico por ultrasonido que se llevó a cabo en el 100% de las muestras después de la semana 16 de gestación en todos los casos.

Estandarización de la amplificación por PCR en tiempo real

Para estandarizar el proceso de amplificación de los genes SRY y DYS14, exclusivos del cromosoma Y y la amplificación de los genes TTC3 y RPL17, utilizados como controles de amplificación genómica, se utilizó ADN genómico masculino y femenino como molde de amplificación bajo las condiciones descritas en materiales y métodos.

Para determinar la identidad de los amplicones producidos tras la qPCR, éstos se analizaron mediante electroforesis capilar usando el sistema LABCHIP GX®, para determinar que el amplicón generado correspondiera al tamaño teórico, en pares de bases, haciendo este análisis para cada uno de los genes. La electroforesis capilar permite conocer la pureza del amplicón, la cual debería ser de al menos un 85% para ser considerada una pureza que indique que la amplificación mayoritaria en la reacción se da para el fragmento correcto (Tabla 4, ver más adelante) y así evitar amplicones inespecíficos. En la Figura 4 podemos observar que todos los amplicones son del tamaño esperado. Para cada gen se muestra primero el amplificado usando ADN genómico femenino y enseguida el masculino.

Observamos la amplificación esperada de TTC3 y RPL17 tanto en ADN masculino (Y) como en el ADN femenino (X). Es claro que solo el ADN genómico masculino fue amplificado en las regiones de los genes SRY y DYS14. Sólo en los controles masculinos se observan los amplificados de SRY02, SRY y DYS14, cuya presencia es diagnóstica del cromosoma Y. Hay algunas bandas inespecíficas, pero como se puede observar en la Figura 4, son amplificados que representan menos del 15% de la amplificación total y no demeritan la calidad de la amplificación (Tabla 4).

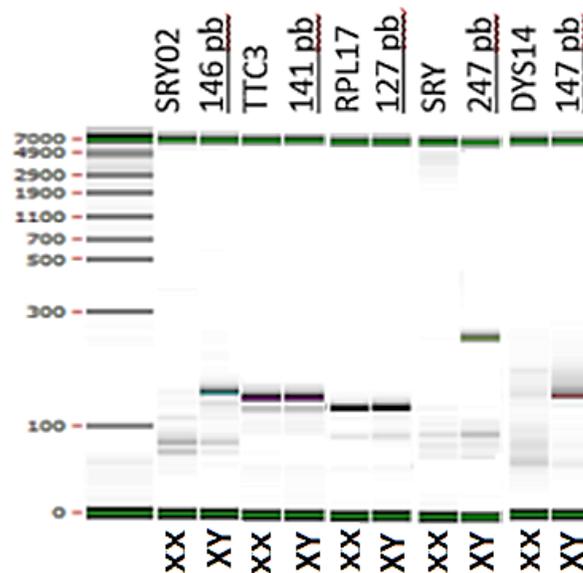


Figura 4. Electroforesis capilar de productos de PCR de muestras de ADN genómico. Los productos obtenidos tras la amplificación de cada gen propuesto de muestra femenina (XX) y otra masculina (XY), con el tamaño esperado en pares de bases (pb) indicado junto al nombre de cada amplicón.

Se muestra primero el amplificado usando ADN femenino y enseguida el masculino. Sólo al usar ADN masculino se observan los amplificados SRY02, SRY y DYS14. Para mostrar la consistencia en los resultados se ilustran dos amplificaciones independientes.

Con la finalidad de conocer si realmente teníamos que realizar una limpieza extra para tener un mejor resultado y conociendo que si teníamos las pares de bases esperadas, se realizó una nueva corrida de electroforesis capilar poniendo e

contraste una muestra haciendo solo la extracción fenol:cloroformo:isoamílico y otra con la misma extracción más la limpieza con el kit DNA cleaner (Figura 5), de los productos de PCR obtenidos, encontrando que realmente tenemos un ADN más puro, todos los amplicones corresponden al tamaño esperado (pb).

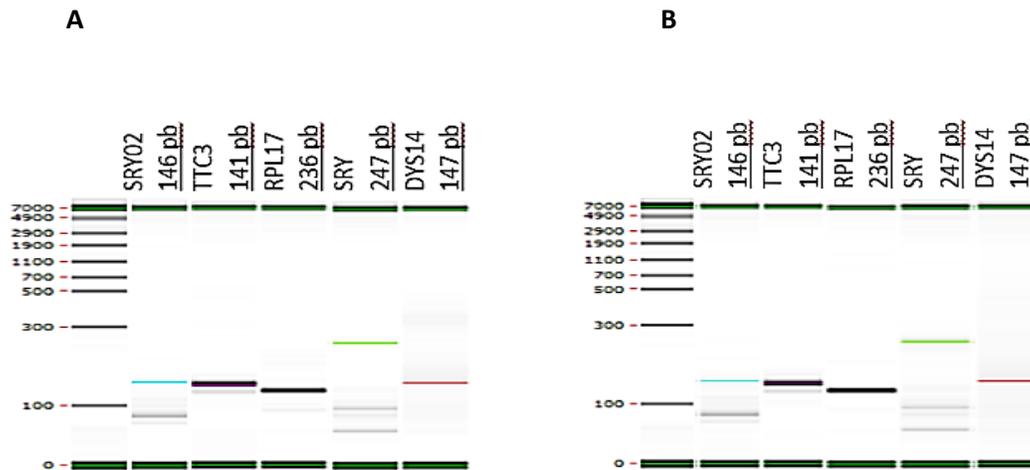


Figura 5. Resultado de electroforesis capilar de los productos de PCR. Comparación de métodos de purificación del ADN molde. A) El ADN fetal molde utilizado fue purificado con fenol:cloroformo:isoamílico y con el kit ADN cleaner. B) El ADN circulante fue extraído únicamente con fenol:cloroformo:isoamílico.

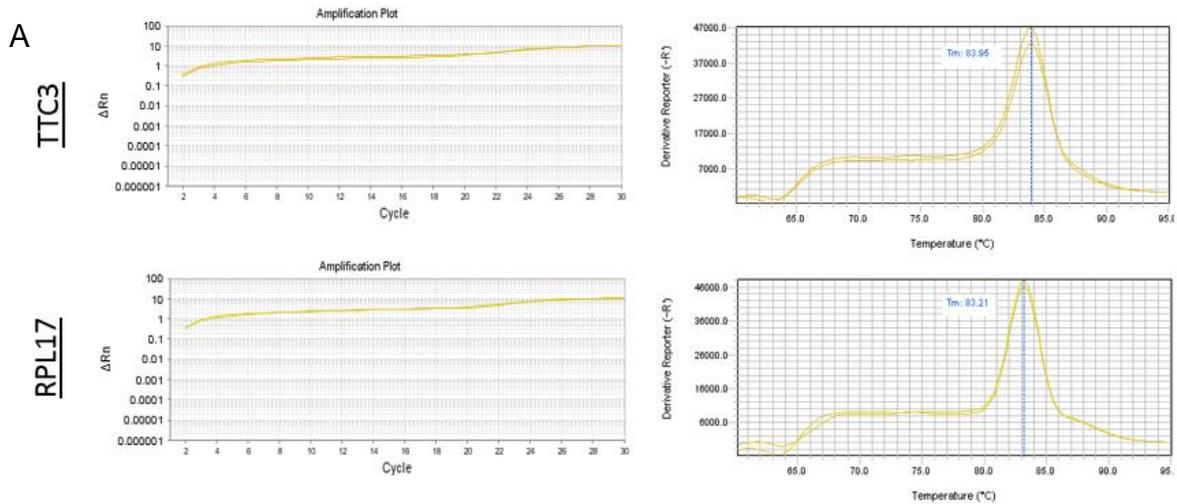
La Tabla 4 describe las características de cada amplicón obtenidas después de hacer el análisis por electroforesis capilar y la comparación de los métodos de purificación del ADN circulante de plasma materno; este análisis reporta los valores de pureza y las concentraciones que se obtienen de cada amplicón cuando el molde de ADN fue purificado por uno solo o por los dos métodos analizados. Puede apreciarse que, al realizar una limpieza adicional después del método de extracción inicial, obtenemos una mejor pureza en la amplificación de cada uno de los genes.

Tabla 4. Comparación de características de productos de PCR observados mediante electroforesis capilar, amplificando con ADN circulante como molde, extraído de 2 maneras.

Gen	Fenol:cloroformo:isoamílico		Fenol:cloroformo:isoamílico más kit de limpieza (<i>ADN cleaner</i>)	
	Concentración (ng/μL)	Pureza (%)	Concentración (ng/μL)	Pureza (%)
SRY02	1.45	68.18	1.06	84.44
TTC3	8.08	91.92	6.75	96.98
RPL17	7.65	96.15	6.88	100
SRY	0.42	19.86	1.18	96.08
DYS14	0.56	90.31	0.37	98.9

Es especialmente evidente para los dos amplicones que detectan la presencia de SRY, por lo tanto, todas las extracciones de ADN materno circulante se llevaron a cabo usando los dos métodos de purificación.

Para poder utilizar la qPCR de manera diagnóstica en un análisis rutinario de laboratorio, es necesario caracterizar las curvas de amplificación de cada amplicón. Estas curvas se muestran en la Figura 6, y puede notarse el pico claro y bien definido que indica la temperatura de amplificación (T_m) obtenida para cada amplicón. De acuerdo con sus características fisicoquímicas y de secuencia, cada amplicón debe mostrar T_m s muy semejantes cuando se compara el valor teórico esperado y el valor experimental.



B

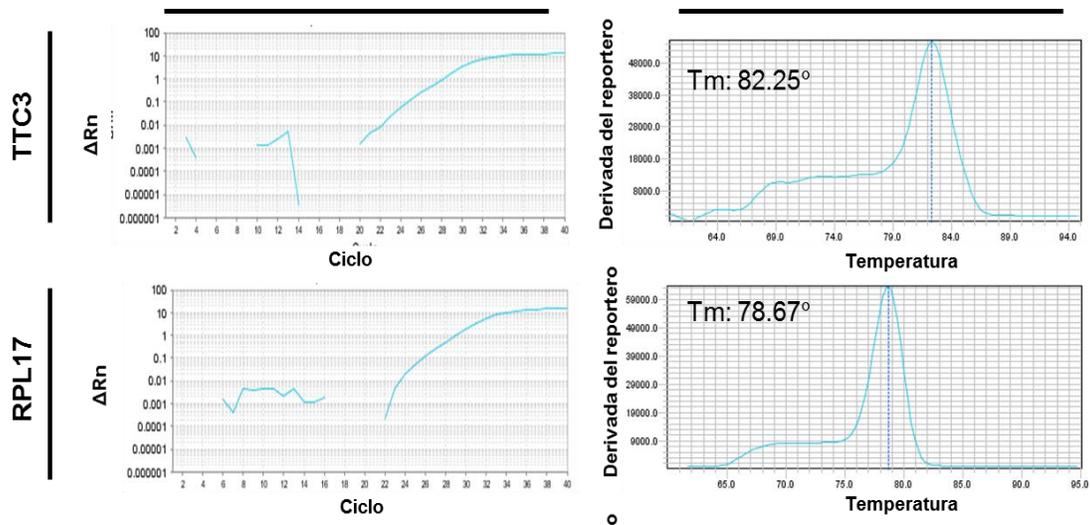


Figura 6. Curvas de amplificación de los genes TTC3, RPL17. Amplificación de los genes en el ADN genómico (A) y ADN libre en plasma materno (B) considerados como controles endógenos mediante qPCR. En cada caso el panel izquierdo muestra la curva de amplificación y el panel derecho la curva de fusión de ambos amplicones, así como la temperatura de fusión.

Una vez obtenida la estandarización de amplificación de controles positivos con genes endógenos se procedió con la amplificación de los genes del cromosoma Y determinantes del sexo fetal. Para diagnosticar por medio de amplificación o no amplificación la presencia del cromosoma Y en las muestras de ADN fetal, se realizó la amplificación de muestras control de dos mujeres embarazadas de un feto masculino y un feto femenino (Figura 7) cuyo sexo fue corroborado por ecografía (embarazo avanzado). En el panel izquierdo de la Figura 7, para cada amplicón se observa una curva bien definida que indica el sexo masculino y en el caso del panel derecho observamos que no hay una curva lo que indicaría que no hay presencia del cromosoma Y dando como resultado un sexo femenino. Con esto determinamos que los sistemas de extracción y de amplificación son efectivos y podemos utilizar el sistema para un diagnóstico confiable, es decir la presencia del pico de amplificación en la temperatura correcta y con un CT menor a 30, es diagnóstico del sexo masculino siempre y cuando tengamos la amplificación de al menos dos de

tres amplicones, ya que eso permitirá tener un control de amplificación con al menos corroboración de ausencia o presencia de cromosoma Y.

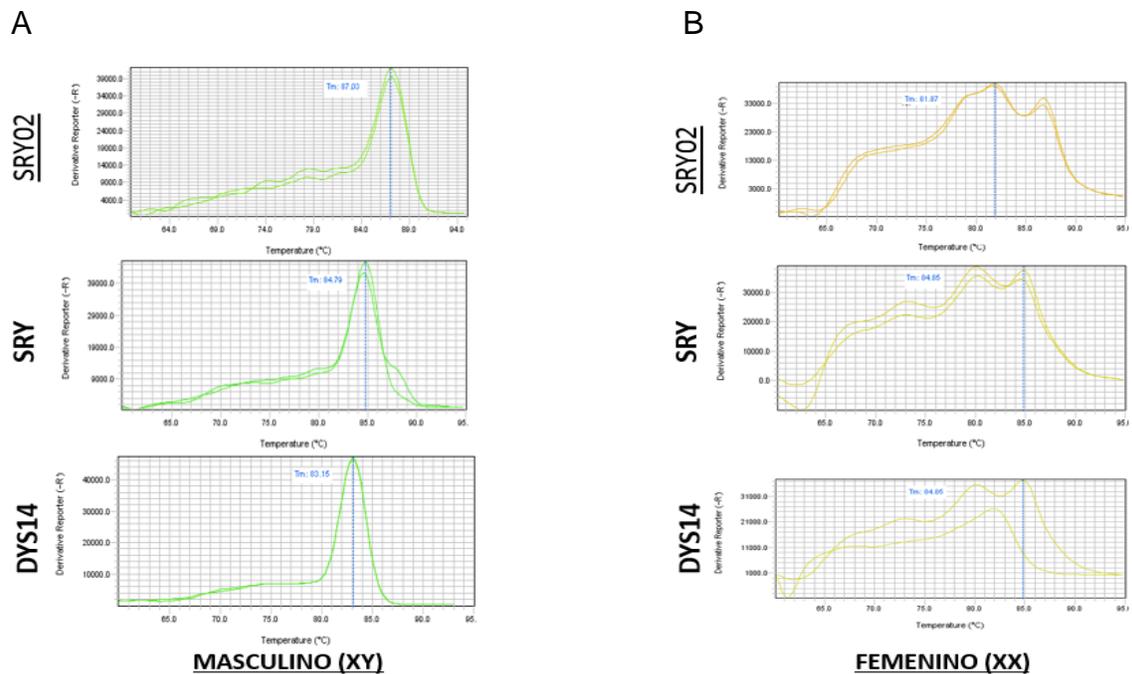


Figura 7. Resultado de amplificación por PCR de genes determinantes de sexo. Muestras control de ADN extraído y purificado de dos muestras de mujeres embarazadas de un feto masculino (A) y un feto femenino (B), considerando la curva de fusión.

El valor de ciclo umbral (CT) es el valor de fluorescencia umbral o "*threshold*", por arriba del cual se considera que una reacción de PCR en tiempo real es positiva. Este dato puede ser utilizado para valorar los niveles de expresión genética que deben evaluarse en los oligonucleótidos diseñados como iniciadores y que se usarán en la reacción de qPCR: eficiencia de la amplificación.

La diferencia en la temperatura de fusión (Tm) entre los amplicones, así como la formación de estructuras secundarias en el producto de la amplificación, reduce la eficiencia de la amplificación. La temperatura de fusión (Tm) de una secuencia de ADN se refiere a la temperatura a la cual 50 % de las copias de esa secuencia presentes en una reacción se encuentra en forma monocatenaria y 50 % en forma bicatenaria. La Tabla 5 muestra que los amplicones diseñados y utilizados en este trabajo muestran Tm's correctas, en el caso de los genes SRY y DYS14 la Tm esperada es de 85° C. Para considerar una amplificación buena, la Tm debe ser

0.5° por debajo o por arriba de la Tm teórica, lo que indica que corresponde al producto esperado.

Tabla 5. Datos de temperatura *melting* o de fusión de cada amplicón, tanto teórica como experimental.

Gen	CT	Tm teórica (°C)	Tm obtenida en la curva de fusión (°C)
SRY02	30.5	83.0°	83.05°
TTC3	29.4	82.9°	82.25°
RPL17	25.5	78.0°	78.67°
SRY	28.5	85.0°	85.45°
DYS14	32.89	85.0°	85.54°

Análisis de correlación entre los resultados de determinación de sexo fetal por qPCR y los resultados obtenidos por ultrasonido

Para determinar la eficiencia del sistema de diagnóstico de sexo fetal en ADN fetal circulante, se tomaron muestras de plasma de madres con embarazos que fueron espontáneos, es decir no sometidas a procedimiento de reproducción asistida; se analizaron 10 casos con edades gestacionales entre 7 y 14 semanas. Los resultados se muestran en la Tabla 6. Aunque la muestra es pequeña, todos los casos presentaron coincidencia entre ambos métodos de detección del sexo. Podemos decir que nuestro método es confiable para determinar sexo en embarazos espontáneos, aunque sería deseable continuar colectando muestras de sangre para obtener un número considerable de muestras procesadas y ampliar nuestra eficacia, hasta un total de 30 muestras por cada grupo de semana de gestación.

Tabla 6. Diagnóstico de sexo fetal en embarazos espontáneos

Semanas de gestación	Total de muestras	Coincidencia US-molecular	No coincide	% eficiencia
14 o más	5	5	0	100
11 a 13	2	2	0	100
10	1	1	0	100
9	1	1	0	100
8	0	0	0	100
7	1	1	0	100
Total	10			

Para determinar si el diagnóstico del sexo fetal en muestras de plasma materno de mujeres que fueron tratadas con FIV, obtenido a través de nuestro método de amplificación, genera el resultado del sexo correcto, se obtuvieron los resultados de sexo mediante US en la semana 16 y se estableció la comparación entre ambos sistemas. En la Tabla 7 puede observarse que el sistema molecular de diagnóstico genera el mismo resultado del sexo fetal entre las semanas gestacionales 10 y 14. Para la semana 9, sólo el 83.33% de las muestras mostraron el resultado coincidente con US. Desafortunadamente, la eficiencia de detección del sexo fetal correcto muestra una baja correlación cuando el diagnóstico se hizo en las semanas 7 y 8. Si se considera de la semana 10 en adelante, la eficiencia global es del 95.36% Esto indica que solo es posible diagnosticar el sexo fetal con un grado aceptable de certeza desde la semana 10 gestacional, es decir dentro del primer trimestre de embarazo.

Tabla 7. Comparación entre los resultados de diagnóstico del sexo fetal con el método molecular y la detección mediante ultrasonido

Semanas de gestación	Número total de muestras	Número de muestras con amplificación correcta y diagnóstica	Muestras con resultado de ultrasonido en semana 16 de gestación		Muestras sin resultado de US	% eficiencia	
			Coincide	No coincide		Porcentaje	Eficiencia
14 o más	30	28	27	1	0	96.43	excelente
11 a 13	52	50	49	1	0	98.00	excelente
10	27	24	22	2	0	91.67	aceptable
9	19	18	15	3	0	83.33	Límite aceptable para diagnóstico
8	16	16	11	5	0	68.75	no aceptable
7	11	11	7	4	0	63.63	no aceptable
Total	155	(todas las muestras analizadas en este estudio)					

Para conocer cuál era la eficiencia de nuestro método cuando se tiene la necesidad de transportar las muestras desde otras localidades, se analizaron varios lotes de muestras que se consideran foráneas, es decir que su recolección fue en Guadalajara y transportadas a la Ciudad de México. Esto permitió evaluar el tiempo de duración de la sangre en los tubos de colección reportados en la sección de materiales y métodos y a su vez determinar la capacidad de procesamiento para obtener ADN de calidad para amplificar, a pesar de que la muestra tuviera varios días de almacenamiento.

La eficiencia reportada para embarazos entre la semana 9 y 14 es del 88.8% (Tabla 8) debido a que existe una no coincidencia en resultados en semana 9 de gestación. Considerando que el análisis general de la coincidencia entre el sexo determinado por el método molecular y el US se alcanza de manera satisfactoria solo desde la semana 10 de gestación. Sin embargo, se requiere un mayor número de muestras para conocer la eficiencia del método y poder corregir problemas técnicos de envío, en caso de existir. Cabe destacar que el tiempo de traslado y almacenamiento fue de 5 días para todas las muestras.

Tabla 8. Coincidencia en el diagnóstico de sexo fetal comparado el método molecular con la ecografía para muestras que fueron sometidas a transporte.

Edad gestacional (semanas)	Analizados	Coincide con US	No coincide con US	% eficiencia
14 o más	0	0	0	0
11 a 13	1	1	0	100
10	6	6	0	100
9	1	0	1	0
8	1	1	0	100
7	0	0	0	0
Total	9			
Eficiencia general	88.88%			
Eficiencia semana 10 o más	100%			

Con la finalidad de determinar cuál es la eficiencia que tenemos para poder diagnosticar el sexo en embarazos múltiples (Tabla 9), se analizaron muestras en diferentes edades gestacionales. La eficiencia reportada general para estos embarazos múltiples fue de 90%, con 10 o más semanas de gestación la eficiencia es del 100%. Cabe mencionar que de 40 gestaciones consideradas gemelares, 6 de ellas sufrieron alguna pérdida de un feto.

Tabla 9. Coincidencia de los resultados de diagnóstico del sexo fetal y ecografía para embarazos múltiples

Edad gestacional (semanas)	Número de muestras con embarazo múltiple	Corroboración semana 20 embarazo múltiple			Eficiencia
		Un saco	Número de coincidencias entre sexos	Dos Sacos	
14 o más	3	1	3	2	100
11 a 13	16	1	16	15	100
10	10	1	10	9	100
9	7	1	4	6	57.14
8	3	2	3	1	100
7	1	0	0	1	0
	Total 40	6	36	34	
Eficiencia general			90%		
Eficiencia semana 10 o más			100%		

Análisis estadístico

Nuestro estudio resulta en una prueba dicotómica, que clasifica a las muestras como femenino y masculino en función del resultado reportado, es decir, ausencia o presencia del cromosoma Y. Por lo tanto, podemos clasificar a nuestras muestras en una tabla de 2 x 2 (Tabla 10).

Tabla 10. Relación entre los resultados de la prueba diagnóstica (sexo molecular) y sexo por ultrasonido.

Resultados de la prueba	Verdadero diagnóstico	
	Masculino (al nacimiento o ecografía)	Femenino (al nacimiento o ecografía)
Masculino por PCR	80	9
No masculino (femenino por PCR)	7	59

En las filas se muestra el resultado de prueba diagnóstica por PCR y en las columnas la prueba de referencia, es decir el resultado por ultrasonido.

El resultado de la prueba molecular puede ser correcto (verdadero positivo y verdadero negativo) o incorrecto (falso positivo y falso negativo), para calcular la sensibilidad y especificidad.

La sensibilidad permite clasificar a nuestras pacientes con un feto masculino, es decir que su resultado sea positivo, ya que esto indica la capacidad que tiene nuestra prueba de detectar el cromosoma Y.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

Mientras que la especificidad de la prueba diagnóstica se define como la probabilidad de que el resultado de la prueba sea negativo, es decir un bebé femenino, que representa la fracción de verdaderos negativos y esta se estima con la siguiente ecuación.

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

Se obtuvieron los siguientes valores:

Tabla 11. Resultados obtenidos de análisis estadístico para conocer los valores que representa nuestro diagnóstico

		95 % I.C.	
		Límite inferior	Límite superior
Sexo fetal correctamente diagnosticado	90.00%	83.51%	93.80%
Sensibilidad	91.95%	83.60%	96.43%
Especificidad	87.00%	75.86%	93.40%
Valor predictivo positivo	90.00%	81.21%	94.98%
Valor predictivo negativo	89.39%	78.77%	95.27%

Los resultados de la Tabla 11 indican que en 90.0 % de los casos, se puede diagnosticar correctamente el sexo fetal, con una sensibilidad del 91.95 % y una especificidad de 88 %, es decir de manera confiable logramos detectar el cromosoma Y en más de 90 % de los casos.

El valor predictivo positivo indica la probabilidad de que el feto visualizado por ultrasonido o al nacer sea masculino, si se obtiene un resultado positivo en la prueba. El valor predictivo positivo puede estimarse, por tanto, a partir de la proporción de pacientes con un resultado positivo en la prueba. En este estudio el valor es de 90 %. Y el valor predictivo negativo indica la posibilidad de diagnosticar fetos femeninos.

Establecimiento de un servicio de diagnóstico molecular del sexo fetal a partir de la semana 10 del embarazo

Considerando que el diagnóstico del sexo fetal presentado en este trabajo tiene un porcentaje muy alto de efectividad, se propuso el uso de esta prueba con fines de diagnóstico de la semana 10 en adelante. Se llevó a cabo el diseño inicial de los materiales de capacitación para personal médico y de uso en comunicaciones internas, de Ingenes, que contienen y describen las características del sistema diagnóstico. A continuación describe esta propuesta para su uso comercial.

Nombre del Servicio: PRENATA (Diagnóstico Genómico Fetal para la determinación del sexo durante el primer trimestre de gestación)

Qué es: Es una técnica de biología molecular no invasiva que permitirá conocer el sexo del futuro bebé a partir de la semana 10 de gestación. (Normalmente mediante ultrasonido, el médico Ginecobstetra puede conocer o predecir el sexo del bebé en la semana 16).

- Para llevar a cabo la técnica PRENATA, partimos de una muestra de sangre periférica materna y utilizamos marcadores genéticos localizados específicamente en el cromosoma Y para determinar así el sexo. La presencia del cromosoma Y indicará si el bebé es niño, y la ausencia que es niña.
- Ésta es una técnica desarrollada 100% por el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular Ingenes que complementa a los tratamientos de reproducción asistida en nuestro Instituto.
- Este análisis es una herramienta de biología molecular que Ingenes pone a disposición de sus pacientes para determinar el sexo del bebé en una etapa temprana de gestación con 95% de certeza en el diagnóstico.

A quién va dirigido

Mujeres embarazadas que lograron la concepción de forma espontánea o por medio de un tratamiento de reproducción asistida (baja y alta complejidad).

Cómo se hace el estudio:

Una vez que es confirmado el embarazo al detectar por ultrasonido el saco gestacional con latido, la paciente es apta para la prueba de diagnóstico de sexo fetal. Cuando la paciente haya cumplido al menos 10 semanas de gestación, se toma muestra de sangre 6 mL recolectados en dos tubos con EDTA – agente anticoagulante - que es utilizada para la extracción y purificación de ADN fetal libre de células.

Posteriormente se realiza el análisis detectando los marcadores localizados en el cromosoma Y que permitirán conocer el sexo del bebé. La presencia del cromosoma Y indicará si el bebé es niño, y la ausencia que es niña.

Cómo se reporta el RESULTADO de la prueba:

Ver anexo dos: Formato para reporte de resultados.

CONSIDERACIONES importantes

- No existe un rango de edad que limite la realización de la prueba
- Se puede realizar esta prueba en embarazos múltiples en donde únicamente somos capaces de determinar si los bebés son niñas o al menos hay un niño.
- Es necesario reportar cuando se realiza una reducción embrionaria o la presencia de un gemelo evanescente (que se perdió en el embarazo) ya que esto puede alterar los resultados de la prueba (presencia de falsos positivos porque los resultados pueden indicar la presencia de material genético del(los) fetos perdidos)
- Excepcionalmente puede ocurrir que el material genético de la muestra no pueda ser leído, debido a fallos en alguna fase del procedimiento (obtención de la muestra, extracción y purificación o amplificación); esta incidencia es muy poco común (menos del 1% de los casos).
- Excepcionalmente puede ocurrir que embarazos previos de bebé del sexo masculino generen la presencia de falsos positivos que limiten la eficiencia de la prueba.

Esta prueba es una técnica únicamente de diagnóstico de sexo fetal y no determina ningún tipo de anormalidad cromosómica (trisomías o monosomías) ni enfermedades genéticas. En caso de indicación médica, la paciente debe realizarse pruebas de diagnóstico prenatal más especializadas como amniocentesis o biopsia de corión.

Discusión

En este trabajo logramos estandarizar la extracción de ADN fetal y la amplificación del cromosoma Y para diagnosticar el sexo fetal con una técnica reproducible, de costo aceptable para la población mexicana, cuyo resultado se puede obtener en 48-72 h. En el 90% de los casos fuimos capaces de dar un diagnóstico certero en la determinación de sexo fetal comparado con el sexo dado por la ecografía o su verificación al nacimiento. Al determinar la sensibilidad y especificidad, confirmamos que nuestro método es confiable. Tenemos seguridad en los resultados porque los valores predictivos indican que cuando diagnosticamos masculino el 91.95% serán masculinos, mientras que el negativo es 87% para el diagnóstico femenino.

Para generar un método de extracción factible y de costo razonable, utilizamos fenol-cloroformo-isoamílico (PCI). El primer paso para la extracción es la lisis celular en la cual se utiliza un tampón en el que el Tris se encarga de mantener el pH de la solución, además de interactuar con los lipopolisacáridos de la membrana celular y ayudar en la lisis (23). El EDTA es un quelante utilizado para bloquear la actividad de la ADNasa. El SDS es un detergente que se encarga de romper la membrana celular, provocando la desnaturalización del ADN cromosómico y altera la conformación de una proteína, que pierde su estructura y se desestabiliza (25). La mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico elimina las proteínas. Cuando se realiza una centrifugación después de la adición de estos compuestos, y recuperar la fase acuosa, el ácido nucleico recolectado se precipita con la ayuda de alcohol isoamílico frío (23) y dentro de esta fracción tenemos el ADN circulante pequeño del plasma sanguíneo, formado por fragmentos degradados, liberados al plasma, el cual proviene de apoptosis o necrosis de células nucleadas normales del organismo, principalmente células hematopoyéticas y el ADN que proviene del feto y circula en el torrente sanguíneo de la madre (7). Se ha encontrado que el tamaño de los fragmentos del ADN fetal libre es considerablemente más corto (<200 pb) que el de origen materno, por lo que no se necesita más fragmentación del ADN extraído del plasma para poderlo amplificar eficientemente (35).

Al inicio de este estudio, se empleó como referencia una muestra de sangre de una mujer embarazada con un feto masculino y otra de un feto femenino, dichos sexos fetales fueron comprobados por ultrasonido. Se sabe que realmente hay ADN circulante debido a que en el control masculino existen secuencias de cromosoma Y los cuales fueron detectados durante el análisis. Si en la extracción existe ADN fetal circulante dentro del global de ADN fetal y materno (9), el de origen fetal será reconocido por los oligonucleótidos que amplifican secuencias presentes en el cromosoma masculino. La manera de conocer que tenemos presencia de ADN fetal es a través de la amplificación por PCR en tiempo real de la muestra con marcadores específicos del cromosoma Y, en este caso SRY y DYS14, indicativo de la presencia del cromosoma Y en muestras con feto masculino, que daría pauta para saber que tenemos ADN fetal. Una posible limitación de este sistema se da en el caso de muestras con ADN fetal de sexo femenino ya que no hacemos una detección específica de este ADN.

Con el método propuesto ampliamos el potencial de obtener resultados más tempranos, es decir completamente en el primer trimestre, sin la necesidad de múltiples extracciones de sangre, y puede resultar en la disminución de los procedimientos de diagnóstico invasivos, que están asociados con un riesgo de pérdida del embarazo (36). Cuando se realiza secuenciación para la determinación de sexo, la muestra no es suficientemente buena antes de la semana 13 y es frecuente que se requieran diversas tomas y lecturas, lo que aumenta los costos de manera significativa (37). Nuestro método es confiable y se puede considerar tener un costo accesible debido a la simplicidad del método de extracción y amplificación, comparativamente con otras pruebas diagnósticas como es el caso de los NIPT.

En este estudio determinamos que el diagnóstico del sexo fetal en las semanas 7 a 8 de embarazo no es suficientemente efectivo para satisfacer las necesidades de las pacientes. El ADN fetal en sangre materna aumenta conforme avanza la edad gestacional (38) y esto se debe tener en cuenta al momento de realizar la extracción, ya que en semanas tempranas del embarazo, como son la 7 y 8, hay un 65% de casos en los que podemos detectar el cromosoma Y, mientras que en un 35% de

los casos es tan escaso el ADN fetal que no podemos ver claramente la amplificación de los dos genes, DYS14 y SRY. Si bien es cierto que el método descrito en este trabajo depende de una buena toma de muestra (suficiente plasma) para que en el proceso de extracción se logre obtener suficiente cantidad de ADN fetal amplificable (se requieren entre 3 y 10 ng/mL de ADN fetal purificado para una buena amplificación), especialmente cuando se trata de un gen de copia única como SRY (39). Para contrarrestar este problema, nuestro método para asignar la presencia del cromosoma Y depende de que se puedan amplificar y detectar claramente 2 de 3 amplicones; uno de ellos debe ser SRY o DYS14. A pesar de este esfuerzo, en la tabla 7 se puede ver que 4 muestras de semana 7 no pudieron ser diagnosticadas correctamente (son las no coincidencias). Una alternativa futura puede ser un enriquecimiento de ADN fetal que puede ser posible adicionando formaldehído al plasma; este químico estabiliza a las células e inhibe la liberación de ADN, con lo que se reduce la presencia de ADN materno (36).

No hay un rango de edad limitante para las mujeres que deseen conocer el sexo de su futuro bebé, debido a que no se ha reportado que exista alguna condición que pueda interferir en la determinación del sexo, sólo se puede asociar el factor edad con un riesgo a aneuploidías cromosómicas; Lewis y col. (4) describen que existe un rendimiento deficiente cuando existe una edad avanzada materna en la determinación del sexo, pero en este estudio no observamos este fenómeno, aun considerando que un 48% de la población analizada fue de más de 40 años.

Esta prueba de diagnóstico de sexo fetal se aplicó en embarazos múltiples donde únicamente somos capaces de determinar si los bebés son niñas o al menos hay un niño. En la determinación de sexo fetal por PCR en tiempo real se realiza un recuento de lecturas referentes al cromosoma Y, en donde se ha demostrado la presencia de éste. Villela y col. describen que existe un mejor rendimiento de detección en embarazos únicos comparado con gestaciones múltiples. La incidencia de gemelos monocigóticos es de aproximadamente 3-5 por 1000 nacimientos, la tasa de gemelos dicigóticos varía con la edad materna, la gravidez, el origen étnico, los antecedentes familiares y el uso de técnicas de reproducción

asistida (40). La proporción relativa de ADN fetal por gemelo podría ser diferente, lo que podría conducir a un resultado erróneo en la determinación de ambos sexos o aneuploidía porque uno de los gemelos podría contribuir a una fracción fetal insatisfactoria (40). Se debe tomar en cuenta que, aunque la determinación de sexo por PCR es factible, la precisión de esta dependerá de la proporción de ADN fetal libre que circula en el plasma materno, es decir la cantidad de ADN extraído.

De acuerdo con la literatura y nuestra experiencia, podemos decir que desarrollamos una técnica que permite determinar el sexo fetal en embarazos múltiples (ver Tabla 9), pero solo se reportan fetos femeninos cuando en el ADN no se observa presencia de cromosoma Y y un feto masculino cuando existe amplificación en cromosoma Y. Obtuvimos una sensibilidad de 72.2% y una especificidad de 78.57% para los casos de embarazos gemelares. Se eligieron SRY y DYS14 debido a que nunca será detectado en mujeres que no se encuentren embarazadas, pero será detectable en todas las mujeres embarazadas que tengan un feto masculino, desde la semana 7 de gestación. Lo y col. no detectaron ninguna evidencia de SRY cuando un hijo anterior había sido varón, pero el feto actual era mujer (40). Pero se debe tener en consideración el embarazo previo, sobre todo cuando el feto resultó masculino; de la misma forma cuando la futura madre haya recibido una transfusión sanguínea o bien ante una reducción embrionaria, con la finalidad de que, al dar a conocer el resultado, no existan variables que generen falsos positivos. Cabe mencionar que el reporte corresponde solo a un feto masculino porque se sabe que el ADN fetal es de origen placentario, proveniente de los trofoblastos apoptóticos, y la representación de la fracción fetal podría verse afectada dependiendo de si los gemelos comparten la misma bolsa placentaria o no. Villela y col. reportaron que debido a regiones homólogas entre los cromosomas X y Y, las lecturas de embarazos masculinos se asocian sistemáticamente al cromosoma Y.

Excepcionalmente puede ocurrir que embarazos previos de bebé del sexo masculino generen la presencia de falsos positivos que limiten la eficiencia de la prueba. Una reducción embrionaria es la intervención quirúrgica realizada al tener

de dos a tres fetos en el útero y es la eliminación de uno de ellos cuando existe algún riesgo para la supervivencia de los demás (41). Es necesario conocer cuando se realiza una reducción embrionaria o si hubo la presencia de un gemelo evanescente (que se perdió en el embarazo) ya que esto puede generar falsos positivos porque el método es suficientemente sensible para que los resultados puedan indicar la presencia de material genético del cromosoma Y del o los fetos perdidos. Además, las células fetales circulan en la sangre de mujeres embarazadas: cuando se tiene una gestación normal dichas células se encuentran en baja cantidad, pero cuando existe un riesgo de aborto durante el embarazo, éstas aumentan. En el contexto del estudio de células fetales en sangre materna, se descubrió que también se podían detectar células progenitoras fetales originadas en un embarazo anterior. Esto llevó a la apreciación de que, a diferencia del ADN fetal en plasma, que se elimina casi inmediatamente después del parto, las células fetales persisten durante décadas después del parto (42).

Invernizzi y col. (2002) describieron que prevalece el ADN fetal en sangre materna después del parto, lo cual se conoce como microquimerismo fetal que hace referencia a la presencia de células fetales en tejido materno, es decir, coexistencia de dos poblaciones celulares diferentes originadas en dos individuos genéticamente distintos pero presentes en un mismo individuo, en este caso la madre (43). En sangre materna la presencia de células fetales circulantes de un embarazo anterior es una fuente de error en el diagnóstico fetal, así como la persistencia de células semi-alogénicas se dice que es probable que tenga implicaciones biológicas y patológicas a largo plazo. Además del ADN derivado del feto en mujeres embarazadas, también se ha demostrado que el material genético libre de células, como el ADN de tejidos neoplásicos o agentes infecciosos, puede circular en la sangre humana. Invernizzi y col (2002) en su estudio realizaron amplificaciones de secuencias del cromosoma Y de diferentes muestras maternas de mujeres años después de haber tenido hijos y encontraron ADN fetal masculino libre de células en el plasma materno del 22% de las mujeres sanas, hasta por varias décadas después de momento del parto (43). En 1997 Lo y col. describieron por primera vez la presencia de ADN fetal y concluyeron que este desaparecía de manera rápida los

primeros días después del parto (9). Sin embargo, estos dos estudios no pueden ser comparados debido a que la toma de muestras se hace en diferentes tiempos después de concluir la gestación. Lo importante es tener precaución y toda la información pertinente al realizar el diagnóstico.

Se sabe que los protocolos de NIPT tienen un porcentaje de falsos positivos del 1% debido principalmente a variantes en el número de copias de la madre, mosaicos fetales o la desaparición de un gemelo (tasa de gemelos evanescentes del 0.42 a 0.6%) (44). La edad gestacional al momento de un aborto y la persistencia del tejido fetal pueden influir en la fracción fetal del ADN circulante atribuible al gemelo fallecido y durante cuánto tiempo es detectable mediante pruebas convencionales (44). También influye el aumento de ADN fetal libre en el plasma materno desde los citotroblastos necróticos, que pueden permanecer en la sangre y plasma al menos 15 semanas después de la muerte fetal (45). Por lo tanto, para este análisis existe la posibilidad de resultados discordantes.

En la tabla 10 se reportaron 40 embarazos múltiples y una eficiencia del 92.5 % para la detección correcta, por lo tanto, el presente método permite determinar el sexo si alguno de los dos fetos es varón, aún en presencia de una gestación doble, siempre y cuando reportemos exclusivamente la posibilidad de un masculino o fetos gemelares femeninos en caso de que no se detecte la presencia del cromosoma Y. Tomaiuolo y col. (2007) describen que el ADN de células fetales puede persistir en la circulación materna de un embarazo al siguiente, con lo que se dificulta obtener un resultado exitoso en el diagnóstico fetal (46).

Cuando existe una enfermedad genética ligada al sexo (cromosoma X) este análisis en sangre materna puede ayudar en toma de decisiones de manera muy temprana. Si el feto resulta femenino se considera que no sufrirá la enfermedad, pero si el resultado es un feto masculino existe una probabilidad del 50% que la desarrolle. Cuando existe duda se debe recurrir a una prueba invasiva para descartar problemas genéticos en el feto. La tabla 12 resume las ventajas y limitaciones del método descrito en este trabajo.

Tabla 12. Ventajas y limitaciones de la determinación de sexo embrionario reportada en este estudio

Sexo fetal en plasma materno	
Ventajas	Limitaciones
Método no invasivo sin afectación del feto al ser un análisis de sangre periférica materna.	No se puede determinar que fracción de ADN extraído pertenece al feto.
Es posible realizar el diagnóstico en mujeres que realizan un tratamiento de fecundación <i>in vitro</i> o embarazo espontáneo.	Para evitar contaminación, solo se puede realizar el proceso de extracción y análisis de 3 pacientes a la vez.
Los resultados pueden darse a conocer en menos de 5 días, tiempo corto comparado con métodos como secuenciación, que toman semanas.	La metodología debe realizarse en dos días continuos para garantizar la calidad del resultado (procesamiento continuo).
Al existir presencia de ADN fetal en sangre materna desde la semana 7 de gestación y con la sensibilidad de la técnica de PCR, el diagnóstico se considera confiable desde la semana 9.	El resultado puede ser incorrecto cuando existe una reducción embrionaria, ya que puede perdurar ADN fetal libre del feto extraído.
La cantidad de ADN libre del feto aumenta a medida que avanza la gestación, por lo que la confiabilidad del diagnóstico es mayor cuanto mayor sea la edad gestacional.	Se sabe que cuando el IMC materno es mayor, el ADN fetal será menor, debido a que hay mayor dilución del volumen plasmático materno.
La sangre materna puede ser trasladada a temperatura ambiente sin existir afectaciones en el diagnóstico.	Cuando existe sangre hemolizada no es posible dar un diagnóstico y se requiere una segunda toma de muestra. La calidad de la muestra se puede ver afectada por mal almacenamiento ya que la degradación de glóbulos blancos de la sangre materna aumenta y disminuye la fracción del ADN fetal libre.
	Este análisis no permite discriminar entre gestaciones con múltiples fetos.

Este trabajo abre otra posibilidad muy importante: el uso de ADN fetal circulante para diagnóstico específico, rápido y de costo menor de Síndrome de Down y Síndrome de Patau, los más frecuentes en población mexicana (31). El síndrome de Down es la causa genética más frecuente de retraso mental que ocurre en los recién nacidos, resultado de la presencia de tres copias del cromosoma 21 (trisomía

21) (47). Si se quisiera realizar la amplificación de TTC3 y RPL17 para el diagnóstico de estos síndromes, se debe considerar que el dominio de repetición tetratricopéptido humano 3 (TTC3) es un gen en el cromosoma 21q22.2 de la región crítica del síndrome de Down (48). Para la determinación de trisomías 18 y 21, se podría utilizar el método de dosis génica que consiste en restar los Cts de dos genes (gen problema-gen de referencia) y la diferencia (ΔCt), generando un valor que permita discriminar entre las muestras con alteraciones y las muestras normales (49).

Conclusiones

Se describió y validó un sistema de detección del sexo fetal tras la extracción de ADN pequeño circulante a partir de plasma materno, al amplificar dos genes del cromosoma Y, que fueron detectables a partir de la semana 7 de gestación. Es posible realizar un diagnóstico genético prenatal en ADN fetal libre en plasma materno, mediante técnicas de PCR en tiempo real, y de bajo costo.

Anexos

Anexo 1

Consentimiento informado

INSTITUTO DE INFERTILIDAD Y GENÉTICA MÉXICO S. C.

INGENES


INSTITUTO
ingenés
FERTILIDAD Y GENÉTICA

NHC: _____

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA
DIAGNÓSTICO DEL SEXO FETAL**

Nosotros los abajo firmantes de este consentimiento y desde ahora denominados PACIENTES nos identificamos como:

Sra.: _____ de _____ años de edad
(Nombre (s), Apellido Paterno y Apellido Materno de la PACIENTE)

Con domicilio en: _____
(Calle, Número, Colonia, Ciudad o Estado)

Teléfono: (_____) _____ Correo: _____
(Lada) teléfono

Identificación: _____ No: _____

Sr.: _____ de _____ años de edad
(Nombre (s), Apellido Paterno y Apellido Materno del PACIENTE)

Con domicilio en: _____
(Calle, Número, Colonia, Ciudad o Estado)

Teléfono: (_____) _____ Correo: _____
(Lada) teléfono

Identificación: _____ No: _____

Con este documento certifico que he sido informada de las alternativas de tratamiento que me han sido expuestas por:

Dr(a): _____
(Nombre (s), Apellido Paterno y Apellido Materno del Médico Tratante, Representante de INGENES)

Con domicilio en: Carretera México-Toluca No. 5420 Piso 5 Col. El Yaqui
(Calle, Número, Colonia, Ciudad o Estado)

Cédula Profesional No: _____ Cédula Especialidad No: _____

Nos ha sido explicada la posibilidad de realizar el Diagnóstico de sexo fetal del bebé que se genere como consecuencia del tratamiento de reproducción Asistida que se lleve a cabo.

I. ¿En qué consiste?

El Diagnóstico de sexo fetal es una técnica de diagnóstico registrada por INGENES que consiste en conocer el sexo del bebé una vez que se logró el embarazo, con la ventaja de que este diagnóstico puede ser llevado a cabo a partir de la semana 7 de gestación. La técnica de determinación de sexo fetal es el resultado de:

- 1) Embarazo logrado mediante un Tratamiento de reproducción asistida de alta complejidad o un embarazo logrado mediante concepción natural
- 2) La obtención de sangre materna
- 3) El análisis de DNA fetal libre en muestra de plasma materno mediante técnicas de diagnóstico molecular con las cuales se puede identificar entre un feto de sexo masculino y uno de sexo femenino

II. ¿Cuándo está indicado?

Las indicaciones más frecuentes son:

- Cuando los padres desean saber con anticipación el sexo de su bebé (a partir de la semana 7 de gestación), es decir, antes de que pueda ser detectado mediante ultrasonografía (semanas 14-16 de gestación)

En nuestro caso particular este procedimiento permitirá determinar el sexo del futuro bebé

III. Beneficios

El Diagnóstico de sexo fetal está desarrollado para analizar el DNA fetal libre en plasma materno con la suficiente eficiencia para detectar mínimas cantidades de moléculas de DNA fetal que se encuentran en el plasma materno. Además, todo el proceso se realiza en INGENES bajo un sistema estandarizado de amplificación

Firma Médico: _____

Firma B PACIENTE: _____

Firma La PACIENTE: _____

genómica, por lo que el resultado está listo tres días después de la toma de muestra, con una gran especificidad y confiabilidad.

IV. Procedimiento

La técnica de DIAGNÓSTICO DE SEXO FETAL consiste en cuatro fases: 1) Embarazo logrado con frecuencia cardíaca detectada, 2) Obtención de muestra de sangre materna, 3) Extracción de DNA de plasma y 4) Análisis de sexo fetal.

1) Embarazo logrado con frecuencia cardíaca detectada

Para realizar el DIAGNÓSTICO DE SEXO FETAL se necesita primero haber logrado un embarazo, ya sea mediante técnicas de reproducción asistida de alta complejidad o mediante concepción natural, una vez que pueda ser detectada la presencia de un solo saco gestacional con latido, la paciente es apta para la prueba de diagnóstico de sexo.

2) Obtención de muestra de sangre materna

Cuando la paciente haya cumplido mínimo 7 semanas de gestación es citada al Instituto para una toma de muestra de sangre, la toma de muestra consiste en obtener mediante venopunción, una muestra de 5ml de sangre que será colectada en dos tubos con EDTA, etiquetados y enviados al laboratorio de investigación.

3) Extracción de DNA de plasma

Tras obtener la muestra, se inicia la extracción de DNA libre en plasma materno, este procedimiento dura 2 días en completarse, posteriormente se realiza una purificación de DNA y se procede al análisis de sexo.

4) Selección de los embriones

El análisis de sexo se realiza mediante la implementación de técnicas de biología molecular, se analizan marcadores del cromosoma Y cuya amplificación indica la presencia de DNA fetal y por consiguiente un bebé del sexo masculino, la no amplificación de estos marcadores indican la presencia de un bebé de sexo femenino.

Firma Médica:

Firma Médico:

V. Resultados

Hemos podido establecer un sistema que diagnostica el sexo del bebé con una especificidad del 95%, es decir que en la mayoría de los casos el sexo del bebé es determinado correctamente y corresponde al sexo determinado mediante ultrasonografía.

VI. Riesgos y limitaciones

- Imposibilidad de realizar la detección de sexo en embarazos múltiples ya que la técnica no puede diferenciar entre DNAs de individuos diferentes.
- Puede ocurrir, excepcionalmente, que no pueda ser leído el material genético de la muestra, ni sus marcadores de identificación del sexo, debido a que, puede haber fallos en alguna parte del procedimiento (desde obtención de la muestra, extracción y purificación o amplificación), esta incidencia es muy poco común (sucede en menos del 1% de los casos).
- La prueba de detección de sexo es una técnica únicamente de diagnóstico de sexo fetal, no determina ningún tipo de anomalía cromosómica (trisomías o monosomías) ni enfermedades genéticas.

En caso de ser necesario (por indicación médica), la paciente debe realizarse pruebas de diagnóstico prenatal, amniocentesis o biopsia de corión.

Firma B PACIENTE:

Firma EIPACIENTE:

VII. Información económica

El costo total de la técnica de DETERMINACIÓN DE SEXO FETAL no genera costo durante la fase inicial de este estudio piloto.

VIII. Aspectos particulares sobre el procedimiento de DETERMINACIÓN DE SEXO FETAL

- a) Que la pareja o mujer sola, hayan sido rigurosamente informados sobre los procedimientos, investigaciones diagnósticas, posibilidades y riesgos de la terapéutica propuesta y las hayan aceptado previamente.
- b) Que se trate de enfermedades con un diagnóstico muy preciso, de pronóstico grave o muy grave, y cuando ofrezcan garantías, al menos razonables, de la mejoría o solución del problema.
- c) Que se disponga de una lista de enfermedades en las que la terapéutica sea posible con criterios estrictamente científicos.
- d) Que no se influya en los caracteres hereditarios no patológicos.

IX. Alternativas a la técnica de DETERMINACIÓN DE SEXO FETAL

- Diagnóstico prenatal no invasivo para detección de aneuploidías.
- Diagnóstico prenatal invasivo
- Ultrasonografía en edades gestacionales más tardías

Firma La PACIENTE:

Firma La PACIENTE:

X. Disponibilidad de volver a preguntar

Los PACIENTES tienen derecho a recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca del procedimiento, riesgos, beneficios y

XI. Posibilidad de modificar o retirar el consentimiento otorgado

La firma de este documento no compromete a los PACIENTES de forma definitiva, son totalmente libres de retirar su consentimiento por cualquier motivo, para lo cual deberá informarlo de manera formal y anticipada al Médico Tratante.

XII. Confidencialidad

Aseguramos mantener la confidencialidad de la información que proporcione a INGENES, cuidando en todo momento su identidad y respetando su privacidad.

XIII. Aspectos éticos de la Investigación

Con el compromiso constante de INGENES en la generación de nuevas y mejores opciones de tratamiento para nuestras pacientes, es posible que se utilice la información generada de la técnica aplicada para fines de investigación documental retrospectiva sin intervención o modificación intencionada en las variables biológicas o para estudios prospectivos con la posibilidad de modificar la técnica utilizada buscando la implementación de nuevas técnicas vanguardistas, así como de mejorar los resultados.

Considerando que:

- a) Bajo ninguna circunstancia se realizarán procedimientos o medidas sin beneficio terapéutico, ni se pondrá en riesgo mayor al existente a la mujer, embrión o feto.
- b) En ningún momento se identificará al sujeto de Investigación, teniendo la seguridad de que se respetará la privacidad y confidencialidad de los PACIENTES.

Una vez leído el presente consentimiento y comprendido lo anterior, declaro que:

- Toda la información que se nos ha preguntado para la técnica de DETERMINACIÓN DE SEXO FETAL que se llevará a cabo, es veraz.
- Hemos comprendido toda la información que nos ha sido proporcionada, la cual consideramos adecuada y suficiente, teniendo oportunidad de aclarar nuestras dudas al respecto, por lo que manifestamos estar satisfechos con la información recibida, y comprendemos el alcance y los riesgos de dicha aplicación.
- La información nos ha sido facilitada con antelación suficiente para poder reflexionar con calma y decidir libre y responsablemente.
- Conocemos la disposición del personal sanitario de INGENES para ampliar cualquier aspecto de la información que no haya quedado suficientemente claro.
- Hemos sido informados de la posibilidad de revocar este consentimiento, revocación que deberá solicitarse, anticipadamente y de manera formal.
- Existe la posibilidad de usar la información del procedimiento, técnica utilizada, resultados y demás datos necesarios para realizar investigación de tipo documental o prospectiva.

Autorización

En este acto, de manera libre, consciente, en pleno uso de nuestras facultades mentales y en nuestra condición de PACIENTES y con fundamento en los artículos 80, 81, 82 y 83 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de prestación de Servicios de Atención Médica y del Artículo 56 del mismo reglamento en Materia de Investigación para la Salud, autorizamos a INGENES y a su personal para que lleve a cabo la técnica de DETERMINACIÓN DE SEXO FETAL para conocer el sexo de nuestra bebé.

_____	Nombre LA PACIENTE	_____	Firma
NHC			
_____	Nombre EL PACIENTE	_____	Firma

Certifico que antes de la realización de la técnica, y previa a que los PACIENTES firmen este documento:

1. Alguno de los miembros del equipo de INGENES, ha entregado información necesaria y suficiente para que los PACIENTES tomen su decisión.
2. Me he reunido con los PACIENTES para discutir la información, les he dado la oportunidad de preguntar, y pienso que he respondido satisfactoriamente a todas sus dudas.

Creo que los PACIENTES han entendido suficientemente lo que se les ha explicado y han consentido aplicar a los embriones la técnica ELIGENDER propuesta.

_____	_____
Nombre Médico Tratante	Firma
_____	_____
Nombre Testigo 1	Firma
_____	_____
Nombre Testigo 2	Firma

Ciudad de México a los _____ días del mes de _____ del año _____.

Anexo 2: Diseño de reporte de resultados



Diagnóstico de Sexo Fetal
Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular
Instituto Ingenes



Página -1-

Información de la paciente

NHC:

Nombre paciente:

Médico Tratante:

Edad de la paciente:

Edad gestacional: 10. 6

Fecha del análisis:

Metodología

El diagnóstico de sexo fetal es una técnica no invasiva, que consiste en conocer el sexo del bebé una vez que se logró el embarazo, con la ventaja de que puede dar resultados a partir de la semana 7 de gestación. Tras un embarazo logrado a partir de un tratamiento de reproducción asistida o a partir de una concepción natural, se obtiene sangre de la madre y el DNA fetal libre que circula en el plasma materno es analizado para determinar el sexo del futuro bebé; el análisis determina la presencia de los cromosomas sexuales mediante técnicas de biología molecular avanzada.

¿En qué consiste la técnica de diagnóstico de sexo fetal?

Una vez que es confirmado el embarazo al detectar por ultrasonido el saco gestacional con latido, la paciente es apta para la prueba de diagnóstico de sexo fetal. Cuando la paciente haya cumplido al menos 7 semanas de gestación, se toma de muestra de sangre mediante venopunción (6 ml colectada en dos tubos con EDTA) que es enviada al laboratorio de investigación donde se inicia la extracción de DNA libre fetal. Este procedimiento dura 2 días en completarse, posteriormente se realiza una purificación de DNA y se procede al análisis de sexo del feto mediante la implementación de técnicas de biología molecular que analizan marcadores localizados en el cromosoma Y cuya amplificación indica la presencia de DNA fetal, y por consiguiente un bebé del sexo masculino; la no amplificación de estos marcadores indica la presencia de un bebé de sexo femenino.

Consideraciones en términos de eficacia y limitaciones de la identificación del sexo pre-implantación por qPCR (técnica de Biología Molecular)

1. Imposibilidad de realizar la detección de sexo en embarazos múltiples ya que la técnica no puede diferenciar entre DNAs de individuos diferentes.
2. Puede ocurrir, excepcionalmente, que el material genético de la muestra no pueda ser leído, debido a que, puede haber fallos en alguna fase del procedimiento (desde obtención de la muestra, extracción y purificación o amplificación), esta incidencia es muy poco común (sucede en menos del 1% de los casos).
3. La prueba de detección de sexo es una técnica únicamente de diagnóstico de sexo fetal y no determina ningún tipo de anomalía cromosómica (trisomías o monosomías) ni enfermedades genéticas.
4. En caso de ser necesario (por indicación médica), la paciente debe realizarse pruebas de diagnóstico prenatal más especializadas como amniocentesis o biopsia de corión.

Carretera México – Toluca No 5420 Piso 5
Col. El Yaquí. Del. Cuajimalpa de Morelos, México D.F.
C.P. 05320 - Tel. (55) 27 89 98 26
www.ingen.es



Información de la paciente

NHC:

Nombre paciente:

Médico Tratante:

Edad de la paciente: _____

Edad gestacional: 10. 6

Fecha del análisis: _____

Resultados:

Semanas de Gestación	Amplificación del Material Genético	Sexo del feto	Observaciones
10. 6	Positivo para controles	MASCULINO (XY)	Ninguna

Análisis y reporte elaborados por:

Biol. Mol. Tania G. Rojas Pérez
Laboratorio de Investigación y
Diagnóstico Molecular
Instituto Ingenes

Revisó:

Laboratorio de Investigación y
Diagnóstico Molecular
Instituto Ingenes

Bibliografía:

- 1.- Blagodatskih, E.G., Nikitin, A.G., Seregin Iu, A., Blagodatskih, K.A., and Nosikov, V.V. (2010). [The use of DYS14 marker for sex determination]. Molekuliarnaia biologiya 44, 646-649.
- 2.- Cui, K.H., Warnes, G.M., Jeffrey, R., and Matthews, C.D. (1994). Sex determination of preimplantation embryos by human testis-determining-gene amplification. Lancet 343, 79-82.
- 3.- Lo, Y.M., Corbetta, N., Chamberlain, P.F., Rai, V., Sargent, I.L., Redman, C.W., and Wainscoat, J.S. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet 350, 485-487.
- 4.- Tsujie, T., Takemura, M., Kimura, T., Shimoya, K., Tsutsui, T., Ogita, K., Ozaki, M., and Murata, Y. (2006). Rapid detection of trisomy 21 by gene dosage analysis using quantitative real-time polymerase chain reaction. The journal of obstetrics and gynaecology research 32, 368-372.

Referencias

1. Rodolfo RN, Josso. Chrystele Racine. Sexual Differentiation Endotext. 2020.
2. Stévant I NS. Genetic Control of Gonadal Sex Determination and Development. *Trends Genet.* 2019;5(35):346-58.
3. Berta P, J. Ross Hawkins, Andrew H. Sinclair, Anne Taylor, Beatrice L. Griffiths, Peter N. Goodfellow, Marc Fellous. Genetic Evidence Equating SRY and the Testis-Determining Factor. *Nature* 2013;348.
4. Lewis C, Hill M, Skirton H, Chitty LS. Non-invasive prenatal diagnosis for fetal sex determination: benefits and disadvantages from the service users' perspective. *Eur J Hum Genet.* 2012;20(11):1127-33.
5. Carlson LM, Vora NL. Prenatal Diagnosis: Screening and Diagnostic Tools. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2017;44(2):245-56.
6. Igbinedion BO, Akhigbe TO. The accuracy of 2D ultrasound prenatal sex determination. *Niger Med J.* 2012;53(2):71-5.
7. Lo YM, Patel P, Wainscoat JS, Sampietro M, Gillmer MD, Fleming KA. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *Lancet.* 1989;2(8676):1363-5.
8. Cui KH, Warnes GM, Jeffrey R, Matthews CD. Sex determination of preimplantation embryos by human testis-determining-gene amplification. *Lancet.* 1994;343(8889):79-82.
9. 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(9076):485-7.
10. Bianchi DW. Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *Br J Haematol.* 1999;105(3):574-83.
11. Matthew R. Grace M, Clinical Fellow, Emily Hardisty, MS, CGC, Clinical Instructor and Certified Genetic Counselor, Prenatal Diagnosis Program, Sarah K. Dotters-Katz, MD, Clinical Fellow, Neeta L. Vora, MD. Cell-Free DNA Screening: Complexities and Challenges of Clinical Implementation. *Obstet Gynecol Surv.* 2016;8(8):477–87.
12. Hui L, Bianchi DW. Fetal fraction and noninvasive prenatal testing: What clinicians need to know. *Prenat Diagn.* 2020;40(2):155-63.
13. Min Pan PC, Jiafeng Lu, Zhiyu Liu, Erteng Jia, Qinyu Ge. The fragmentation patterns of maternal plasma cell-free DNA and its applications in non-invasive prenatal testing. *Prenatal Diagnosis* 2020;40(8):911-7.
14. Allyse M, Minear MA, Berson E, Sridhar S, Rote M, Hung A, et al. Non-invasive prenatal testing: a review of international implementation and challenges. *Int J Womens Health.* 2015;7:113-26.
15. Colleen G, Mythily G, Brynn L. Prenatal Diagnosis of Chromosome Abnormalities. Elsevier. 2020 3:233-46.e3.
16. Anthony O, Ganesh A. Invasive Diagnostic Procedures. Elsevier. 2020 3:225-32.e5.
17. Paige B. Larrabee KLJ, Ekaterina Pestova, Madhuri Lucas, Kim Wilber, Erik S. LeShane, Umadevi Tantravahi, Janet M. Cowan, and Diana W. Bianchi. Microarray Analysis of Cell-Free Fetal DNA in Amniotic Fluid: a Prenatal Molecular Karyotype. *Am J Hum Genet.* 2004;3(75).

18. Zargari M, Sadeghi MR, Shahhosseiny MH, Kamali K, Saliminejad K, Esmaeilzadeh A, et al. Fetal Sex Determination using Non-Invasive Method of Cell-free Fetal DNA in Maternal Plasma of Pregnant Women During 6(th)- 10(th) Weeks of Gestation. *Avicenna journal of medical biotechnology*. 2011;3(4):201-6.
19. Efrat Z, Perri T, Ramati E, Tugendreich D, Meizner I. Fetal gender assignment by first-trimester ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2006;27(6):619-21.
20. M Ghaheeri DK, K Yari, A Babaie, R S Suthar, E Kazemi A comparative evaluation of four DNA extraction protocols from whole blood sample. *Cell Mol Biol* 2016;3(63).
21. Kelly E, editor. *Forensic DNA Biology: Biology*, Elsevier. Academic Press; 2012.
22. Schaeffer E. Nuevas alternativas de diagnóstico genético preimplantacional basado en la identificación y genotipificación de DNA embrionario. CDMX: Cinvestav-IPN; 20018.
23. Hernández AG. *Principios de bioquímica clínica y patología molecular* 2009.
24. genomics li. ¿Cómo se realiza la prueba diagnóstica PCR en tiempo real para detección de COVID-19? 2020 [
25. Stanek L. [Polymerase chain reaction: basic principles and applications in molecular pathology]. *Ceskoslovenska patologie*. 2013;49(3):119-21.
26. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature*. 1989;339(6221):237-8.
27. De Alba Aguayo DR, Rueda A. Determinación del ciclo umbral y la eficiencia para la PCR cuantitativa en tiempo real." *REB Revista de educación bioquímica*. 2013;1.
28. Blagodatskikh EG. The use of DYS14 marker for sex determination. *Molekuliarnaia biologiiia*. 2010;44:646-9.
29. Iguaz Pascual F, Fernandez de Miguel MA, de Larrea LB. Valoración de una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa y fluorescente (QF-PCR) para el diagnóstico rápido de aneuploidías. *Revista del Laboratorio Clínico*. 2009;2(4):169–77.
30. Kong XD, Liu N, Xu XJ, Zhao ZH, Jiang M. Screening of human chromosome 21 genes in the dorsolateral prefrontal cortex of individuals with Down syndrome. *Mol Med Rep*. 2015;11(2):1235-9.
31. Tsujie T, Takemura M, Kimura T, Shimoya K, Tsutsui T, Ogita K, et al. Rapid detection of trisomy 21 by gene dosage analysis using quantitative real-time polymerase chain reaction. *J Obstet Gynaecol Res*. 2006;32(4):368-72.
32. Smolock EM, Korshunov VA, Glazko G, Qiu X, Gerloff J, Berk BC. Ribosomal protein L17, RpL17, is an inhibitor of vascular smooth muscle growth and carotid intima formation. *Circulation*. 2012;126(20):2418-27.
33. Blagodatskikh EG, Nikitin AG, Seregin Iu A, Blagodatskikh KA, Nosikov VV. [The use of DYS14 marker for sex determination]. *Mol Biol (Mosk)*. 2010;44(4):646-9.
34. Schaeffer E, Lopez-Bayghen B, Neumann A, Porchia LM, Camacho R, Garrido E, et al. Whole Genome Amplification of Day 3 or Day 5 Human Embryos Biopsies Provides a Suitable DNA Template for PCR-Based Techniques for

Genotyping, a Complement of Preimplantation Genetic Testing. *Biomed Res Int.* 2017;2017:1209158.

35. Kotsopoulou I, Tsoplou P, Mavrommatis K, Kroupis C. Non-invasive prenatal testing (NIPT): limitations on the way to become diagnosis. *Diagnosis (Berl).* 2015;2(3):141-58.

36. Bowman-Smart H, Savulescu J, Gyngell C, Mand C, Delatycki MB. Sex selection and non-invasive prenatal testing: A review of current practices, evidence, and ethical issues. *Prenat Diagn.* 2020;40(4):398-407.

37. Motevasselian M, Saleh Gargari S, Younesi S, Pooransari P, Saadati P, Mirzamoradi M, et al. Non-invasive prenatal test to screen common trisomies in twin pregnancies. *Mol Cytogenet.* 2020;13:5.

38. Vincze B, Gaspardy A, Biacsi A, Papp EA, Garamvolgyi L, Sos E, et al. Sex determination using circulating cell-free fetal DNA in small volume of maternal plasma in elephants. *Sci Rep.* 2019;9(1):15254.

39. Kazachkova N, Gontar J, Verlinsky O, Ilyin I. Successful early fetal sex determination using cell-free fetal DNA isolated from maternal capillary blood: A pilot study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol X.* 2019;3:100038.

40. Villela D, Che H, Van Ghelue M, Dehaspe L, Brison N, Van Den Bogaert K, et al. Fetal sex determination in twin pregnancies using non-invasive prenatal testing. *NPJ Genom Med.* 2019;4:15.

41. Ivan Madrazo GMO, Karla Y. Santiago, Yolanda Piña, Milton D. Flores, Esther López-Bayghen. Early Multifetal Pregnancy Reduction Outcomes: NonChemical-Based Method Yield Improved Pregnancy Rates and Minimized Risks. *Gynecology and women s health* 2021.

42. Bianchi DW. Fetal cells in the mother: from genetic diagnosis to diseases associated with fetal cell microchimerism. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2000;92(1):103-8.

43. Invernizzi P, Biondi ML, Battezzati PM, Perego F, Selmi C, Cecchini F, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma decades after pregnancy. *Hum Genet.* 2002;110(6):587-91.

44. Niles KM, Murji A, Chitayat D. Prolonged duration of persistent cell-free fetal DNA from vanishing twin. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2018;52(4):547-8.

45. Chaveeva P, Wright A, Syngelaki A, Konstantinidou L, Wright D, Nicolaidis KH. First-trimester screening for trisomies in pregnancies with vanishing twin. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2020;55(3):326-31.

46. Tomaiuolo M, Greco P, Grandone E. Early identification in maternal blood of fetal sex in the presence of fetal DNA from previous pregnancies. *Int J Gynaecol Obstet.* 2007;96(3):202-3.

47. Kong XD, Liu N, Xu XJ. Bioinformatics analysis of biomarkers and transcriptional factor motifs in Down syndrome. *Braz J Med Biol Res.* 2014;47(10):834-41.

48. Gong Y, Wang K, Xiao SP, Mi P, Li W, Shang Y, et al. Overexpressed TTC3 Protein Tends to be Cleaved into Fragments and Form Aggregates in the Nucleus. *Neuromolecular Med.* 2019;21(1):85-96.

49. De Alba Aguayo DR RA. Determinación del ciclo umbral y la eficiencia para la PCR cuantitativa en tiempo real. *REB Revista de educación bioquímica.* 2013;1.

