



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DETERMINACIÓN DE SEXO FETAL A TRAVÉS DE SANGRE
PERIFÉRICA MATERNA A PARTIR DE LA OCTAVA SEMANA
DE GESTACIÓN EMPLEANDO PCR TIEMPO REAL “**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

BERTHA LIZZETH GODOY GARCÍA

DIRIGIDA POR

M. en C. ANNA BERENICE JUÁREZ ESPINOSA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2010.

**BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

No. Adq. H 73626

No. Título _____

Clas. TS

616.07543

9 589 d



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DETERMINACIÓN DE SEXO FETAL A TRAVÉS DE SANGRE
PERIFÉRICA MATERNA A PARTIR DE LA OCTAVA SEMANA
DE GESTACIÓN EMPLEANDO PCR TIEMPO REAL”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

BERTHA LIZZETH GODOY GARCÍA

DIRIGIDA POR

M. en C. Anna Berenice Juárez Espinosa

SINODALES

M. en C. ANNA BERENICE JUÁREZ ESPINOSA
DIRECTOR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA
SINODAL

Dra. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER
SINODAL

Q. B. SERGIO PACHECO HERNÁNDEZ
SINODAL

Agradecimientos.

Le doy gracias a Dios por permitirme seguir aquí y terminar con este ciclo de mi vida y llenarme de bendiciones cada día.

Agradezco de todo corazón a toda mi familia, sobretudo a mis papás y hermanos que me han apoyado y brindado su amor de forma incondicional, son mi fortaleza y mi refugio. Me han enseñado que cada caída supone un capítulo más en la historia de nuestra vida y una lección que nos ayuda a crecer, sólo hay que aprender de ellas y seguir adelante.

A la M. en C. Anna Berenice Juárez Espinosa y a la Dra. Laura Cristina Berumen, por creer en mí y brindarme siempre su valioso apoyo y conocimientos.

Dicen que la amistad es como la fosforescencia, que brilla más entre más oscuro esté, por lo que les doy las gracias a todas mis amigas que me brindaron su luz en los momentos más difíciles:

A mi prima Alia, que aunque lejos, su corazón siempre está cerca.

A las todas las chicas del laboratorio de Genética, Jazmín, Araceli, Janet, gracias por compartir conmigo este largo camino de la tesis y el trabajo; por sus ocurrencias, risas y apoyo.

A todos mis compañeros y amigos de la Facultad de Química, por que cada experiencia con ustedes fue única e inolvidable, pero en especial a mis amigas Julieta, Maru, Vianey y Edna; por tantas cosas que no cabrían en la lista, espero tenerlas siempre a mi lado.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	
II.1 DNA fetal	2
II.1.1 Origen	3
II.1.2 Mecanismo de liberación	5
II.1.3 Formas en las que circula	5
II.1.4 Concentración	6
II.1.5 Factores que modifican la concentración de DNA fetal	7
II.1.6 Longitud del DNA fetal	7
II.1.7 Tiempo de vida media	8
II.1.8 Aplicaciones clínicas	8
II.1.9 Ventajas y limitaciones	9
II.1.10 Métodos convencionales empleados para determinar el sexo fetal	11
II.1.11 Identificación de sexo fetal empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	12
II.1.12 Ventajas y desventajas entre PCR convencional y PCR tiempo real	14
II.2 Cromosoma Y	
II.2.1 Generalidades del cromosoma Y	15
III. HIPÓTESIS	18
IV. OBJETIVOS	
IV.1 General	19
IV.2 Específicos	19
V. METODOLOGÍA	
V.1.Materiales	20

Contenido	Página
V.1.1 Equipos y consumibles	20
V.1.2 Materiales	20
V.1.3 Material biológico	20
V.1.4 Reactivos	21
V.2 Métodos	
V.2.1 Selección de la población	22
V.2.2 Venopunción	22
V.2.3 Extracción de DNA genómico para los controles negativo y positivo	22
V.2.4 Optimización de la prueba	23
V.2.5 Límite mínimo de detección para el gen SRY y GAPDH	24
V.2.6 Sensibilidad de la prueba	25
V.2.7 Extracción de DNA libre de células (Fetal y Materno)	26
V.2.8 Mezcla de reacción para PCR tiempo real	26
V.2.9 PCR tiempo real	27
v.2.10 Interpretación de resultados	27
VI. RESULTADOS	
V.1.1.Descripción de la población	29
V.1.2.Optimización de la prueba	29
V.1.3. Límite mínimo de detección para el gen SRY y GAPDH	32
V.1.4. Sensibilidad de la prueba	32
V.1.5. Determinación de sexo	36
V.1.6 Estadística	42
VII. DISCUSIÓN	44
VIII. CONCLUSIONES	50
IX. BIBLIOGRAFÍA	51
X. ANEXOS	
ANEXO I. Consentimiento informado	56

Contenido

Página

ANEXO II. Solicitud de estudio para determinación de sexo fetal
a través de sangre periférica materna a partir de la
octava semana de gestación empleando PCR tiempo
real

58

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Oligonucleótidos dirigidos hacia los genes SRY y GAPDH empleados para la reacción de PCR tiempo real	21
2 Sondas Taqman dirigidas hacia los genes SRY y GAPDH empleadas para la reacción de PCR tiempo real	21
3 Matriz de cebadores para GAPDH y SRY	23
4 Componentes y concentraciones para la mezcla maestra	24
5 Condiciones para la optimización de oligonucleótidos	24
6 Diluciones del control positivo para la determinación de límite de detección	25
7 Concentraciones del control positivo y negativo, utilizadas en el ensayo de sensibilidad de la prueba	25
8 Cantidades y concentraciones para la mezcla de reacción de PCR	27
9 Relación de concentraciones de oligonucleótidos para GAPDH con sus respectivos Cp	30
10 Relación de concentraciones de oligonucleótidos para SRY con sus diferentes Cp	31
11 Relación de concentraciones de la muestra con su respectivo Cp para el gen GAPDH	32
12 Relación de concentraciones de la muestra con su respectivo Cp para el gen SRY	33
13 Concentraciones de DNA masculino y femenino empleadas en la determinación de sensibilidad de la prueba	34
14 Relación de casos con el resultado de PCR tiempo real y su confirmación por ultrasonografía	40
15 Resumen de los resultados obtenidos de la determinación de sexo fetal en sangre periférica materna (plasma)	42
16 Resumen de los resultados obtenidos de la determinación de sexo fetal en sangre periférica materna (suero)	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1 Células fetales identificadas a partir de sangre materna, empleando diferentes técnicas	3
2 Imagen de nucleosomas rodeados de vesículas	6
3 Identificación de células fetales en hígado materno mediante FISH	10
4 Representación de una curva típica de amplificación empleando PCR tiempo real	14
5 Cromosoma Y humano	16
6 Amplificación del gen GAPDH por PCR tiempo real para la optimización de cebadores	30
7 Amplificación del gen SRY por PCR tiempo real para la optimización de la concentración de oligonucleótidos para SRY	31
8 Amplificación del gen GAPDH por PCR tiempo real para el DNA de un varón a diferentes concentraciones de DNA	33
9 Amplificación de diluciones seriadas para el gen SRY mediante PCR tiempo real	34
10 Amplificación del gen GAPDH mediante PCR tiempo real en diluciones seriadas del control positivo con DNA femenino	35
11 Gráfica de PCR tiempo real de diluciones del control positivo para el gen SRY en presencia de DNA femenino	35
12 Determinación de sexo fetal empleando PCR tiempo real para el caso SF-030-08	37
13 Determinación de sexo fetal empleando PCR tiempo real para el caso SF-037-08	38
14 Proporción de niños o niñas determinadas mediante PCR tiempo real en sangre periférica materna entre la 8ª y la 38ª semana de gestación	39

RESUMEN

El diagnóstico prenatal es una práctica obstétrica común en varios países. Sin embargo, los métodos convencionales (aminocentesis y vellosidades coriónicas) para obtener tejido fetal para el análisis genético son invasivas y presentan algunos riesgos y complicaciones al embarazo, existen otras no invasivas como la ultrasonografía y los marcadores bioquímicos, pero no son concluyentes. Fue en 1997 cuando Lo y colaboradores demostraron por primera vez la presencia del DNA fetal libre de células en plasma y suero materno, lo que abrió la posibilidad de varias aplicaciones diagnósticas no invasivas, entre las que se encuentran: determinación de sexo, Rh y aneuploidías. Actualmente el método común para la detección de sexo del bebé es la ultrasonografía realizada a las 22 semanas de gestación, siendo ésta una técnica dependiente de la posición del bebé y la experiencia del profesional de quien la realiza. En el presente proyecto se estandarizó un estudio diagnóstico, para detectar el sexo fetal en mujeres embarazadas a partir de la octava semana de gestación, empleando sangre periférica de dichas mujeres, de las cuales se extrajo el DNA fetal. Posteriormente, mediante el uso de la técnica de PCR tiempo real, se realizó un análisis cualitativo de 2 genes, uno de los cuales está localizado en el cromosoma Y (SRY) y un gen constitutivo (GAPDH). Los resultados obtenidos de nuestro estudio demostraron una sensibilidad para detectar el gen SRY en plasma del 94%, y una especificidad del 100%; para el suero, la sensibilidad resultante fue del 12.5% y la especificidad del 100%, hallando recomendada como muestra para realizarla: el plasma. Se encontró también que la concentración requerida de DNA fue de apenas 0.01 ng / μ L. Haciendo posible una prueba confiable para identificar el género del futuro bebé, en las primeras semanas de embarazo siendo pioneros en México del diagnóstico prenatal "no invasivo" mediante DNA fetal libre de células.

I. INTRODUCCIÓN.

El descubrimiento del DNA fetal en plasma materno en etapas tempranas de la gestación, permitió conocer el sexo del futuro bebé y años después el Rh fetal; estos hallazgos abren la posibilidad a futuras aplicaciones en el diagnóstico prenatal no invasivo para la detección de enfermedades genéticas. Actualmente y desde hace cuatro décadas, para este tipo de alteraciones se emplean procedimientos invasivos para obtener células fetales para su análisis como lo son el líquido amniótico o las vellosidades coriónicas; pero con la probabilidad de pérdida fetal, traumatismo para la madre y/o el feto, entre otros; además de no estar indicadas únicamente para conocer el sexo del futuro bebé.

El laboratorio de Genética, cuenta con técnicas de citogenética que nos permiten conocer el sexo del bebé mediante líquido amniótico o vellosidades coriales, pero únicamente se solicitan para evidenciar anomalías cromosómicas, así que debido a la demanda de pacientes que solicitan saber el sexo de su próximo hijo en los comienzos del embarazo, así como la búsqueda de enfermedades ligadas al género, ambigüedades de genitales, conocer el factor Rh fetal en mujeres Rh negativas para evitar aloinmunización, entre otros se ha diseñado una metodología no invasiva utilizando Biología Molecular para conocer el sexo del bebé a partir de la octava semana de gestación, obteniendo el DNA fetal de sangre periférica materna y amplificando secuencias específicas mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, este es un procedimiento *in vitro* que permite amplificar secuencias específicas de DNA a pesar de estar en cantidades pequeñas. Esta metodología además de ser novedosa, ha sido puesta en práctica por primera vez en nuestro país, con la finalidad de que en un futuro próximo se aplique en el diagnóstico para determinar algunos patrones de herencia ligados al sexo, así como de enfermedades autosómicas dominantes y recesivas, teniendo la gran ventaja de ser un estudio no invasivo y que puede realizarse en etapas tempranas de la gestación.

II. ANTECEDENTES.

II.1 DNA fetal.

En contraste con la idea tradicional de que la placenta forma una barrera impermeable entre la mujer y su feto, existen múltiples estudios que han demostrado lo contrario, debido a la presencia de células fetales en sangre materna, estos estudios datan desde 1957 en donde mediante técnicas como inmunofluorescencia y la elución ácida de Kleihauer (método que está basado en el hecho de que los eritrocitos de adultos contienen Hemoglobina A, que se vuelve inestable en buffers ácidos, al contrario de la Hemoglobina F o hemoglobina fetal que es resistente a éste tratamiento y permanecen inalterables), fue posible detectar eritrocitos fetales en sangre materna durante el primer trimestre de embarazo. Posteriormente empleando FISH (siglas en inglés de hibridación in situ fluorescente), se identificaron regiones de DNA específico para el cromosoma X y el Y, evidenciando células de mujer y de varón, logrando observar la presencia de células portadoras de secuencias específicas pertenecientes a los cromosomas XY en sangre de mujeres embarazadas de fetos masculinos, como se puede observar en la Figura 1 (Schröder, 1975; Bianchi, 1990; Kolialexi, 2004).

El descubrimiento de ácidos nucleicos libres en la circulación fue reportado por primera vez en 1948 por Mandel y Metais, que fueron capaces de detectar ácidos nucleicos en plasma humano. La aplicación potencial fue en el diagnóstico y prognosis del cáncer, a partir de la identificación de grandes cantidades de DNA (ácido desoxirribonucleico) en plasma y suero libre de células en pacientes que padecían algún tipo de cáncer, al observar que los niveles de DNA decrecían cuando los pacientes respondían al tratamiento; estos hallazgos confirmaron que era posible aislar el DNA derivado de los tumores y dieron pie al descubrimiento del DNA fetal en plasma y suero materno, que fue posible por la exitosa demostración de la presencia del DNA fetal libre de células en plasma y suero en mujeres embarazadas de un feto masculino, al amplificar

secuencias específicas del cromosoma Y circulando en el torrente sanguíneo de la futura madre (Lo y col., 1997; Tong y Lo, 2006).

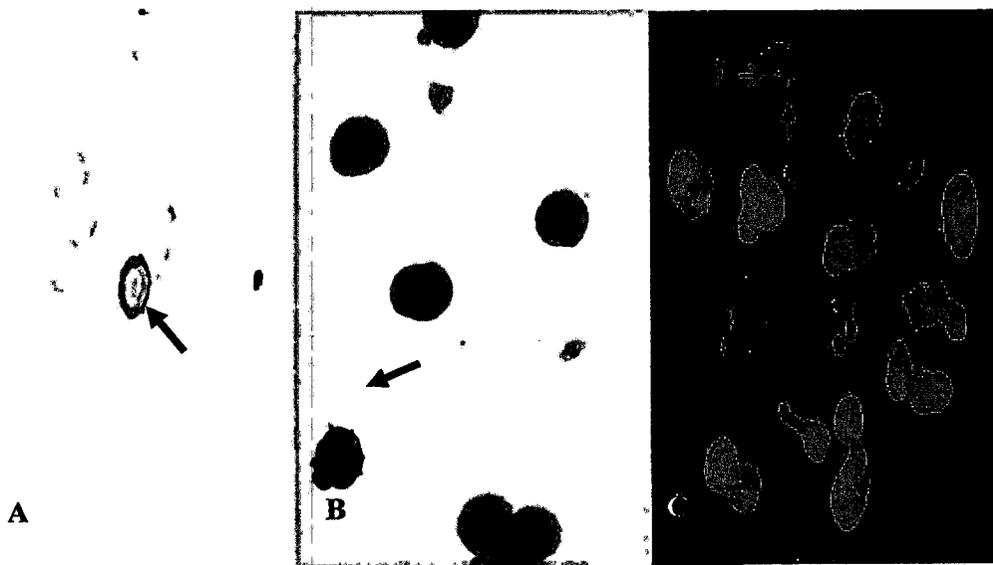


Figura 1. Células fetales identificadas a partir de sangre materna, empleando diferentes técnicas. A: Técnica de elusión ácida de Kleihauer (Schröder, 1975) B: Técnica de Kleihauer/Betke (Bianchi y col., 1990) C: Técnica de FISH (Kolialexi y col., 2004).

II.1.1 Origen.

Se han propuesto dos hipótesis que presentan los probables mecanismos por los cuales el DNA fetal puede detectarse en sangre periférica materna:

1. Células hematopoyéticas: En primera instancia, se detectaron varias células fetales circulando en sangre materna: eritroblastos, trofoblastos, linfocitos y granulocitos. Éstas se evidenciaron empleando diferentes técnicas como citometría de flujo, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), FISH (hibridación *in situ* fluorescente), entre otras; evidenciando que aproximadamente existen 19 células fetales nucleadas por cada 19 mililitros de sangre materna. De las células mencionadas, se sugirió que los eritroblastos

podrían ser la fuente de DNA fetal al encontrarse en mayor cantidad (Bianchi y col., 1990; Bianchi, 1998; Bianchi y Lo, 2001).

Al realizar un estudio para verificar si los eritroblastos eran la fuente de DNA fetal, estudiando a mujeres embarazadas con fetos masculinos, mediante FISH se emplearon sondas específicas que reconocían secuencias específicas del cromosoma "X" y "Y". También midiendo los niveles de DNA fetal, se encontró que no existe una correlación entre dichas células y la cantidad de DNA fetal. Por otra parte, en mujeres con un embarazo a pre-término se encontraron elevadas cantidades de DNA fetal y sin incremento de eritroblastos (Zhong y col., 2002).

2. Placenta: es el tejido que más se sugiere puede proveer el DNA fetal, debido a su gran actividad celular y a la relación tan estrecha que se da entre la madre y el feto a través de este órgano, apoyando este hallazgo al detectar que la cantidad de DNA fetal en la circulación materna se eleva entre más avanzado esté el embarazo (Lo y col., 1998). Un estudio en el cual se sometieron mujeres a una técnica de reproducción asistida con la finalidad de comenzar a contar con mayor exactitud el primer día de la concepción y determinar en que periodo comienza a aparecer DNA fetal en sangre materna; evidencia que a los 18 días después de la transferencia del embrión comienza a detectarse DNA fetal en sangre materna posteriormente para el día 28 después de la transferencia fue posible detectar el DNA fetal en el 80% de las mujeres estudiadas y a los 37 días se detectó en circulación materna en todas las mujeres estudiadas.

Posiblemente en la mayoría de los casos fue posible detectar el DNA fetal a los 28 días, debido a que la circulación feto – placenta se establece hasta el día 28-30 post-concepción. Y quizá la evidencia más convincente resulta del hecho de que moléculas de mRNA (ácido ribonucleico mensajero) provenientes de la placenta, son detectables en plasma materno; lo que permite pensar en un remodelación activa de la placenta y una liberación directa de DNA de trofoblastos placentarios (Ohashi y col., 2002; Maron y Bianchi, 2007).

II.1.2 Mecanismo de liberación.

Hasta el momento, el mecanismo sugerido mediante el cual, el DNA fetal es liberado en circulación materna, es por medio de la muerte celular programada (apoptosis); la cual además ocurre desde los primeros estados de la embriogénesis, hasta la muerte. Diariamente se dividen de 10^{11} - 10^{12} células y la misma cantidad debe perderse para mantener la homeostasis, sugiriendo que entre 1-10 g de DNA se degradan en el humano, por lo tanto, no es de sorprender que cierta cantidad de DNA se libere al torrente sanguíneo y se localice en el plasma. El marcador bioquímico de la apoptosis es la fragmentación del DNA genómico, mediante endonucleasas activadas por Ca^{2+} y Mg^{2+} endógeno, esta enzima fragmenta el DNA entre unidades nucleosomales, generando fragmentos mono y oligonucleosomales, dichos fragmentos de DNA con tamaños de aproximadamente 63,126,189,252 y 315 nm, correspondientes a múltiplos del largo de los nucleosomas han sido encontrados en una concentración más grande en pacientes con cáncer que en individuos sanos (Stroun y col., 2000; Bischoff y col., 2005).

Otra posibilidad es la liberación espontánea de DNA al torrente sanguíneo; ésta teoría esta basada en el comportamiento *in vitro* de cultivos celulares al observar que la misma cantidad de DNA era encontrada en el medio a diferentes tiempos de incubación y esta cantidad no aumentaba como era de esperarse si las células estuvieran muriendo y además cuando las células fueron resuspendidas varias veces en medios nuevos, volvió a encontrarse la misma cantidad de DNA extracelular aislada; aún cuando nuevamente fueron puestas en el medio original, no hubo un aumento en la cantidad de DNA en el sobrenadante, sugiriendo que existe un mecanismo homeostático independiente de efectos mecánicos, pero que aún no puede afirmarse que suceda *in vivo* (Stroun y col., 2000).

II.1.3 Formas en las que circula el DNA.

Se ha propuesto que la apoptosis es el mecanismo por el cual se libera el DNA

fetal, debido a la presencia de cuerpos apoptóticos. Una de las características importantes de la apoptosis es la disposición de los remanentes celulares. Dicha disposición tiene lugar en cuerpos apoptóticos luego de que el RNA y DNA son segregados y empaquetados en diferentes gránulos de cromatina, se forman los cuerpos apoptóticos, los cuales contienen RNA o DNA, pero no ambos. Debido a que se ha encontrado RNA circulante en pacientes con cáncer, ya que el plasma contiene RNAsas y el RNA es muy susceptible al ataque de estas enzimas, ha sido evidenciado que este ácido nucleico se encuentra protegido por vesículas o cuerpos apoptóticos (Halicka y col., 2000).

Mediante un análisis con microscopia electrónica se demostró por primera vez cantidades substanciales de nucleosomas en plasma de una mujer embarazada. Observándose pequeños cuerpos esféricos bastante simétricos entre otras estructuras parecidas a vesículas fragmentadas, como cuerpos apoptóticos, evidenciados en la Figura 2. Estas estructuras son nucleosomas que parecen estar dentro de dichos cuerpos (Bischoff y col., 2005).

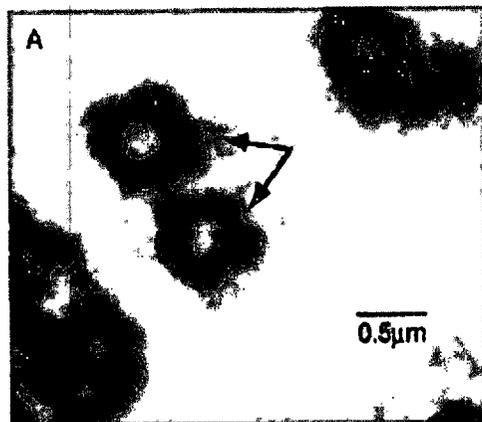


Figura 2. Imagen de nucleosomas rodeados de vesículas. Fotografía adquirida con microscopio electrónico de transmisión (Bischoff y col., 2005)

II.1.4 Concentración.

La concentración total de DNA en plasma en adultos sanos (no embarazadas) es de aproximadamente 10 ng o 1000 GEq/mL (equivalentes genómicos por

mililitro), presentándose un aumento significativo durante el embarazo y en las personas con cáncer; la explicación a este aumento en el DNA total aún no se explica claramente, ya que el DNA fetal comprende una pequeña parte del DNA circulante total. Como se observa en un estudio realizado en 20 mujeres que concibieron mediante FIV (Fecundación in vitro) fueron monitoreadas durante su embarazo, obteniéndose que la concentración de DNA fetal en plasma materno de 25.4 GEq/ mL, con un rango entre 3.3 a 69.4 GEq/mL (3.4% del total de DNA en plasma) y 292.2 GE/mL en períodos tardíos durante el embarazo, con un rango entre 76.9 a 769 (6.2% del total del DNA en plasma). La detección del DNA fetal en este estudio fue posible a las 7 semanas de gestación, observando un incremento en la concentración a medida que el embarazo avanzaba (Lo y col., 1998; Bischoff y col., 2005)

II.1.5 Factores que modifican la concentración de DNA fetal.

Han sido reportados diversos factores que modifican la concentración de los marcadores séricos (alfa-fetoproteína, estriol libre, gonadotropina coriónica humana), entre ellos se encuentra el grupo étnico, peso materno, edad gestacional y tabaquismo; los cuales han sido probados para ver su influencia en la concentración de DNA fetal. Los resultados obtenidos demuestran que en el primer trimestre el DNA fetal encontrado es de 11.2 GE/mL y aumenta un 21% en cada semana, lo cual demuestra una estrecha relación entre las semanas de gestación y la concentración de DNA fetal en circulación materna.

En cuanto al grupo étnico y antecedentes de tabaquismo no se encuentra ninguna correlación. El peso materno es influyente sólo a partir del segundo trimestre de embarazo, en donde fue posible demostrar una relación inversa entre el peso y la concentración de DNA fetal (Wataganara y col., 2004).

II.1.6 Longitud del DNA fetal.

En el plasma materno podemos identificar tanto DNA fetal como materno, pero se ha evidenciado que en cuanto a longitud, el DNA fetal es más pequeño.

Dicha aseveración fue comprobada al realizar un estudio con mujeres embarazadas, varias de las cuales se sabían eran portadoras de un feto masculino, en el cual se usaron dos pruebas de PCR cuantitativa con diferentes tamaños de cebadores para los genes de leptina y el SRY. El gen de la leptina está presente en todas las células humanas y al constituir el DNA fetal sólo el 6.2% del DNA en plasma materno en el tercer trimestre, el tamaño obtenido con la leptina representa el tamaño del DNA materno. En tanto que el gen SRY no se encuentra en mujeres y éste será representativo para el DNA fetal. Obteniendo a partir de dicho estudio que la longitud de DNA en plasma materno fue mayor a 201 bp (pares de bases), por otra parte la longitud del DNA fetal fue mayor a 193 bp, sin exceder las 313 bp (Chan y col., 2004).

II.1.7 Tiempo de vida media.

El tiempo de vida media del DNA fetal se estudió a partir de la destrucción de éste después del parto, encontrando que en la mayor parte de las mujeres examinadas no se encontraron niveles detectables de DNA fetal circulante después de 2 horas de dar a luz; con una curva típica con 2 fases: una inicial más rápida y una fase lenta. Se obtuvo que el tiempo de vida media del DNA fetal es de 16.3 minutos (con un rango de 4 a 30 minutos). Se tiene que el tiempo de vida media es de 2.24×10^4 copias/min. En un estado fijo, la tasa de liberación debe ser igual a la eliminación, por lo que ésta se sugiere es de 2.24×10^4 copias/min, lo contrario de la evidencia (Lo y col., 1999).

II.1.8 Aplicaciones clínicas.

El DNA fetal en plasma materno es una herramienta diagnóstica prenatal de gran importancia por ser no invasiva y que permite obtener información valiosa acerca del feto y del embarazo para llevar un control prenatal.

Las aplicaciones pueden dividirse en 2 grupos:

1. Pruebas cualitativas. La información que resulta de estas pruebas, es la presencia o ausencia de una enfermedad o una característica genética determinada.

Algunas de las aplicaciones para éste tipo de pruebas, es la detección de secuencias del cromosoma Y de fetos masculinos en plasma materno y emplearlas para diagnóstico prenatal de enfermedades ligadas al sexo como hemofilia A, hiperplasia adrenal congénita, detección del gen del antígeno D en el grupo sanguíneo Rhesus (Rh-D), cuando la madre es Rh-D negativo y así evitar la eritroblastosis fetal o como una herramienta para la determinación del género del bebé en casos de ambigüedad genital, sin tener que esperar a que éste nazca.

2. Pruebas cuantitativas. Elevados niveles de DNA fetal circulante sobrevienen en varios desórdenes asociados al embarazo como por ejemplo: la preeclampsia, parto prematuro y aneuploidías fetales, sobre todo en trisomías, las cuales mediante cuantificación relativa en PCR tiempo real puede obtenerse un valor que proporcionará la expresión génica (Lo y Chiu, 2007).

II.1.9 Ventajas y limitaciones.

Una de las principales aplicaciones del descubrimiento del DNA fetal es el diagnóstico prenatal no invasivo (Lo y col., 1997). Además, para propósitos de diagnóstico prenatal, la rápida eliminación de DNA fetal de la sangre materna permite que sea menos susceptible a resultados falsos positivos entre un embarazo y otro, a excepción de un reporte (Invernizzi y col., 2002), en ningún otro artículo publicado ha sido posible detectar la presencia de DNA masculino en mujeres que habían dado a luz a un hijo varón años antes y en él cual ha quedado claro que la diferencia entre éste y otros experimentos fue la falta de una segunda centrifugación que permitió la persistencia de células fetales de embarazos previos, ya que ha sido demostrado la persistencia de células fetales años después del parto, fenómeno conocido como microquimerismo (Figura 3), en ocasiones, las células transferidas parecen contribuir al desarrollo de

enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, escleroderma, entre otros y otras veces parecen beneficiar a mujeres que padecen una enfermedad autoinmunitaria (Bianchi, 2000; Benachi y col., 2003; Smid y col., 2003; Lee, 2008). Aunado a todo ello, el empleo de técnicas de biología molecular, permiten tener una alta sensibilidad para este tipo de diagnósticos, ya que reportes previos han evidenciado que éstas técnicas pueden detectar una célula masculina entre 300,000 células femeninas por lo que, las ventajas del análisis en DNA fetal es rápido, confiable, reproducible, sensible y específico (Lo y col., 1993; Bianchi, 2004).

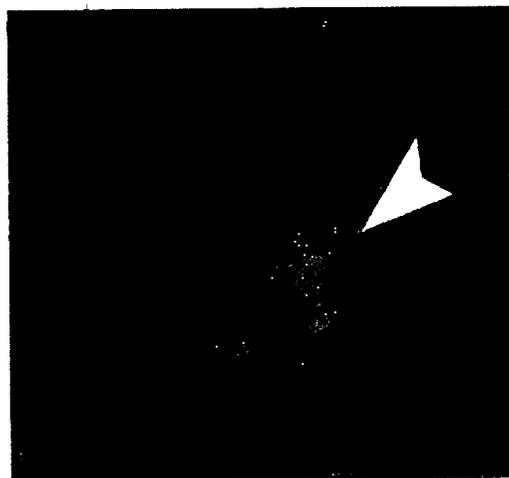


Figura 3. Identificación de células fetales en hígado materno mediante FISH. La flecha indica la célula fetal identificada por la presencia de un cromosoma Y (punto verde) y un cromosoma X (punto rojo), las otras células que se observan son de la madre mostrando sólo dos puntos rojos que corresponden a los dos cromosomas X (Lee, 2008)

La principal limitación hasta nuestros días parece ser la capacidad de distinguir el DNA fetal del materno, ya que la mayoría de los grupos de investigadores han usado diversos locus del cromosoma "Y", como marcadores del DNA fetal circulante, limitando los estudios a mujeres embarazadas de fetos masculinos (Bianchi, 2004).

Actualmente para diferenciar el DNA fetal se usan marcadores epigenéticos, de éstos, se ha reportado que SERPINB5 se encuentra hipometilada en la placenta e hipermetilada en células maternas sanguíneas, por lo que las secuencias hipometiladas de SERPINB5 pueden ser usadas como marcador universal para el DNA fetal en plasma materno; sin embargo la limitación de este marcador es que la metodología necesita de un tratamiento con bisulfito, el cual destruye una gran cantidad de DNA (Lo y Chiu, 2007).

II.1.10 Métodos convencionales empleados para determinar el sexo fetal.

La amniocentesis es la aspiración de líquido amniótico y surgió como posible tratamiento de polihidramnios y posteriormente se hizo posible el cultivo de células fetales obtenidas por amniocentesis en el segundo trimestre de la gestación. En 1967 Jacobson y Barts informaron el primer diagnóstico intrauterino de una anomalía cromosómica, mediante citogenética. Desde entonces se sigue utilizando esta técnica para el diagnóstico de anomalías cromosómicas y por añadidura identificar el sexo del feto. Por lo general, se realiza por vía transabdominal. Se lleva a cabo aproximadamente en la 16ª semana de gestación, pero siempre se tiene que tomar en cuenta que dicha técnica tiene un riesgo de aborto del 0.8% (Díaz y col., 1997; Mueller y Yong, 2001).

Por otro lado, Mohr en 1968, por medio de un endoscopio adaptado, fue el primero en extraer, por vía cervical, un fragmento del corión para estudios diagnósticos citogenéticos. La biopsia de vellosidades coriónicas se solicita para la detección de aneuploidías; puede detectar el sexo fetal. Actualmente se realiza entre las 8 y 12 semanas de gestación, los 5 a 8 g de tejido recuperado pueden emplearse la valoración preliminar directa, pero muchos estudios cromosómicos, de DNA o enzimáticos, requieren cultivo de células fetales y conlleva un riesgo de aborto del 2 % (Mueller y Yong, 2001; Pernoll, 2003).

La técnica de cordocentesis guiada por ecografía se introdujo en 1983 por Daffos y colaboradores y se ha modificado poco desde entonces. La técnica

consiste en la toma de muestra de sangre fetal del cordón umbilical, tiene una tasa de éxito superior al 95%, se demora 8 días en obtener el cariotipo fetal y la fiabilidad es muy alta. Sin embargo existen riesgos técnicos en donde puede contaminarse la muestra y solo se pueden obtener muestras de sangre fetal de manera inocua a partir de las 17 o 18 semanas de gestación. Las cordocentesis son transabdominales y guiadas sonográficamente. Cuando interviene un operador adecuadamente preparado, a mediados del segundo trimestre, el promedio de pérdidas fetales es del 1-2%. Está indicada para el diagnóstico de talasemia, toxoplasmosis, rubéola fetal, valoración y tratamiento de isoimmunización por Rh y obtención rápida de cariotipo fetal, por esta técnica también podemos conocer el sexo del bebé (Guízar, 2001; Castro, 2004).

El ultrasonido es una técnica no invasiva que se les realiza a la mayoría de las mujeres embarazadas en el segundo trimestre como examen rutinario para detectar anomalías en el feto y permite determinar el sexo fetal sin riesgo para la madre o el feto, pero solo se logra con certeza hasta la 22ª semana de gestación (Smith y col., 2001).

Una metodología que actualmente se propone como novedosa y específica es la utilización de técnicas de Biología Molecular, empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como se describe en el siguiente apartado, tomando la ventaja el descubrimiento del DNA fetal libre de células que puede localizarse en sangre periférica materna.

II.1.11 Identificación de sexo fetal empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La determinación de sexo fetal se puede realizar mediante la identificación de secuencias específicas que nos permiten conocer el sexo del bebé. La manera más fácil de evidenciar el sexo es mediante secuencias específicas localizadas en el cromosoma Y (Lo y col., 1997).

La PCR es un método *in vitro* de síntesis de DNA con el que un segmento particular de éste es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de cebadores, iniciadores o primers que lo flanquean. La reacción consta de numerosos ciclos conformados cada uno de tres pasos:

1. Desnaturalización en donde se exponen las bases nitrogenadas del DNA blanco.
2. Hibridación de las cadenas desnaturalizadas del DNA blanco con los denominados cebadores, los cuales deberán poseer una longitud de aproximadamente 15-30 bases, a una temperatura que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas conocidas como T_m (temperatura de fusión).
3. Polimerización, en donde la enzima DNA polimerasa extiende la porción de DNA flanqueado por los cebadores (Cha y Thilly, 1993; Rodríguez y Barrera, 2004).

La eficiencia de la PCR está influenciada por: Concentración de cloruro de magnesio, condiciones de la reacción (tiempo y temperatura), secuencias de los iniciadores, pureza, concentración y longitud del DNA blanco a amplificar (Heid y col., 1996).

Históricamente, los investigadores han usado la PCR punto final, en el cual los productos de PCR se observan en geles de agarosa, donde se hace una comparación de dichos productos contra un marcador el cual contiene fragmentos de DNA de longitud conocida.

En la PCR convencional o punto final los productos son observados hasta la fase plateau o estacionaria, donde la reacción tiene una baja eficiencia. Por lo tanto ahora es más común el uso de PCR tiempo real, en la cual los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de DNA

sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de DNA formado, a partir de un punto conocido como Ct o Cp (por sus siglas en inglés de Cross point) donde sobrepasa el ruido de fondo, como se ejemplifica en la Figura 4. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación (Arezi y col., 2003; Costa, 2004).

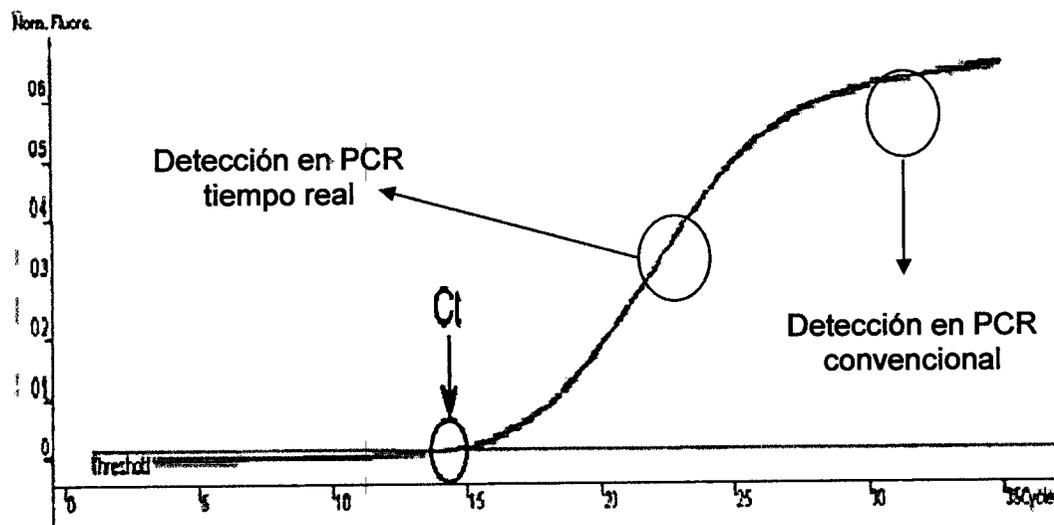


Figura 4. Representación de una curva típica de amplificación empleando PCR tiempo real. Se hace una comparación en cuanto a la detección entre una PCR convencional y una en tiempo real (Modificada de Dussault y Pouliot, 2006).

II.1.12 Ventajas y desventajas entre PCR convencional y PCR tiempo real.

La PCR tiempo real está basada en la detección de la fluorescencia de moléculas reportero, que se incrementa al acumularse cada ciclo de los productos de PCR. La tecnología de PCR tiempo real es muy flexible y se han desarrollado muchos instrumentos; así como diferentes sistemas fluorescentes que permiten adaptarse a las necesidades del estudio a realizar.

La detección de los productos amplificados es sumamente precisa comparada con el análisis en geles.

La PCR tiempo real ofrece diversas ventajas entre las que se encuentran:

- Amplificación y detección integradas en un mismo equipo
- Disminución del riesgo de contaminación al no necesitar un proceso post-amplificación
- Un aumento en la sensibilidad al ser capaz de detectar hasta 3 pg o 1 equivalente genómico de DNA.
- Capacidad de cuantificación de cantidades iniciales de ácidos nucleicos.
- Rapidez (se necesitan de 20 a 40 minutos para 35 ciclos).
- Reproducibilidad con un Coeficiente de variación <2.0%.

Entre las desventajas se encuentran:

- Capacidad limitada para PCR multiplex.
- Se necesita personal capacitado y con destreza.
- Mayor costo que la PCR punto final.
- El análisis es más complejo que observar o no la presencia de bandas.

(Dussault y Pouliot ,2006).

II.2 Cromosoma Y.

II.2.1 Generalidades del cromosoma Y.

La diferencia entre los 2 sexos existentes en la naturaleza está basada en la presencia de los cromosomas sexuales. En los humanos se presenta un par sexual, en el cual las mujeres presentan dos cromosomas X, en cambio los varones muestran un cromosoma X y un cromosoma Y (Lucchesi, 2005). Esto nos permite diferenciar genómicamente a cada género. Los cromosomas "X" y "Y" son muy diferentes en cuanto a su tamaño y los genes que contienen, a excepción de dos regiones, denominadas regiones pseudoautosómicas, localizadas en los extremos tanto del brazo corto como el largo, que permiten el apareamiento con regiones homólogas del cromosoma entre ellos durante la meiosis, ver la Figura 5 (Marshall, 2001).

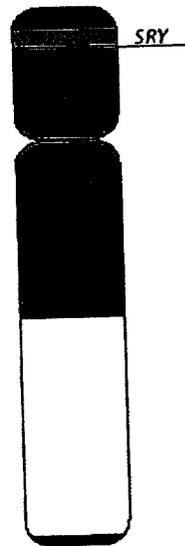


Figura 5. Cromosoma Y humano. Mostrando las regiones pseudoautosómicas en los extremos de los brazos corto y largo (de morado). Las secuencias repetitivas (en blanco), la región diferencial donde se encuentran alrededor de 20 genes, algunos de ellos en muchas copias (azul) y la ubicación del gen SRY en el brazo corto (verde). (Modificado de Marshall, 2001).

En particular, el cromosoma Y es un cromosoma pequeño que cuenta con sólo 50 megabases (Mb), representa alrededor del 1.6% del genoma humano, tiene un gran contenido de secuencias repetitivas concentradas en la parte final del brazo corto y se diferencia de los demás cromosomas somáticos por dos principales razones:

- a) Es el único cromosoma que se recombina entre sí, con excepción de algunas pequeñas regiones pseudoautosómicas mencionadas anteriormente.
- b) Se encuentra únicamente en varones (Affara y Sargent, 2005; Tyler, 2007).

El cromosoma Y porta un factor determinante del sexo, el cual establece la masculinidad, no importando cuántos cromosomas X se encuentren presentes. La diferencia entre formar testículos u ovarios en un embrión ocurre aproximadamente a las 5 semanas después de la gestación, una vez que los testículos se han formado, éstos producen hormonas que dirigen los demás

aspectos en la diferenciación masculina. Es por ello que el SRY (por sus siglas en inglés de Región Sexual en el Y) actúa como un encendedor para la diferenciación sexual. Esto ha sido comprobado debido a la existencia de diversos pacientes aparentemente femeninos que poseían incluso todo el cromosoma Y pero la región SRY mutada o al insertar en embriones de ratones XX el SRY y observar que los ratones se desarrollaban como machos. Sin embargo no hay que olvidar que muchos otros genes participan también en la formación o no de testículos como SOX9, gen localizado en el cromosoma 17 (Marshall, 2001).

III. HIPÓTESIS

La presencia de DNA fetal extraído de sangre periférica materna, permitirá determinar el sexo del feto en etapas tempranas del embarazo mediante genes específicos obteniendo un alto porcentaje de especificidad y confiabilidad en la prueba, empleando PCR tiempo real.

IV. OBJETIVOS

IV.1 General.

Estandarizar una prueba de diagnóstico prenatal no invasiva para determinar el sexo fetal, a partir de la octava semana de gestación en sangre periférica materna, mediante PCR tiempo real (cualitativa).

IV.2 Específicos.

- Aislar DNA fetal libre de células a partir de sangre periférica materna.
- Comparar la especificidad y confiabilidad del método por PCR convencional y tiempo real para la identificación del sexo fetal.
- Determinar en qué semana de gestación se presenta el mayor porcentaje de especificidad y confiabilidad en las condiciones estandarizadas.
- Establecer si el suero y/o plasma muestran diferencias para la determinación de sexo.

V. METODOLOGÍA.

V.1 Materiales.

V.1.1 Equipos y consumibles.

- Micropipetas automáticas de 2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, y 1000 µl.
- Vórtex.
- Centrifuga.
- Microcentrifuga.
- Baño de agua.
- Refrigerador a -20 °C.
- Refrigerador a 4 °C.
- Campana para PCR con UV y flujo de aire.
- Gradillas.
- Gradilla para mantener los viales a 4°C.
- Termoblock a 56°C.
- Termociclador PCR tiempo real (Corbett).
- Computadora para el programa analizador.

V.1.2 Materiales.

- Tubos vacutainer con EDTA (tapa morada) y sin anticoagulante (tapa roja).
- Agujas vacutainer.
- Viales con capacidad de 5 mL, 2 mL, 1.5 mL, 0.5 mL y 0.2 mL.
- Pipetas Pasteur.
- Puntas para micropipetas estériles con y sin filtro de 10µl, 100µl y 1000µl.
- Columnas QIAamp Mini.

V.1.3 Material Biológico.

- Sangre periférica recolectada de una población de mujeres embarazadas de 8 semanas de gestación en adelante.
- Sangre periférica de mujer (Control negativo).

- Sangre periférica de hombre (Control positivo).

V.1.4 Reactivos.

- Kit de extracción de DNA genómico (Qiagen). Contiene: Proteasa, Buffer AL, Buffer AW1, AW1 y AE.
- Kit de extracción de DNA genómico BIORAD
- Alcohol etílico (96 a 100%).
- Agua grado inyectable.
- Agua MQ estéril.
- RNasa 4 mg/ mL.
- Platinum Quatitative PCR Super Mix-UDG.
- Agua destilada.
- Oligonucleótidos, según el Cuadro 1.
- Sondas, según el Cuadro 2.

Cuadro 1. Oligonucleótidos dirigidos hacia los genes SRY y GAPDH empleados para la reacción de PCR tiempo real.

Región	Gen	Secuencia
Yp11.3	SRY	5'TCCTCAAAGAAACCGTGCAT3' Forward 5'AGATTAATGGTTGCTAAGGACTGGAT3' Reverse
	GAPDH	5'CCCCACACACATGCACTTACC'3 Forward 5'CCTACTCCCAGGGCTTTGATT'3 Reverse

Cuadro 2. Sondas Taqman dirigidas hacia los genes SRY y GAPDH empleadas para la reacción de PCR tiempo real.

Gen	Secuencia
SRY	5TET/CACCAGCAGTAACTCCCCACAACCTCTTT/3IABLFQ/
GAPDH	56FAM/AAAGAGCTAGGAAGGACAGGCAACTTGGC/3BHQ_2

V.2 Métodos.

V.2.1 Selección de la población.

Nuestra población fueron mujeres que contaban con un embarazo de 8 semanas de gestación en adelante y que deseaban conocer el sexo de su futuro bebé. Por otra parte, se contaba con un consentimiento informado, el cual fue firmado por las mismas (Anexo 1) y se llenó un formato con los datos de dichas participantes (Anexo 2).

Se emplearon como controles negativos a mujeres con un cariotipo normal (mujeres no embarazadas) y como controles positivos se tomaron varones con un cariotipo normal.

V.2.2 Venopunción.

Se extrajo sangre de la vena cubital o basílica. Se limpió el sitio de la punción con un antiséptico (siempre en la misma dirección) y se colocó un torniquete (banda elástica) alrededor del antebrazo para aplicar presión y limitar el flujo sanguíneo a través de la vena. Se introdujo una aguja en la vena y se recogió la sangre en dos tubos vacutainer (uno con EDTA y otro sin anticoagulante). Se quitó el torniquete y una vez recolectada la sangre se retiró la aguja y se cubrió el punto de punción para detener cualquier sangrado. Se rotuló y mezcló suavemente el tubo con EDTA para homogeneizar el anticoagulante con la sangre. Para los controles positivos y negativos se tomaron tubos con EDTA de una mujer y un hombre.

V.2.3 Extracción de DNA genómico para los controles negativo y positivo.

Después de la venopunción se centrifugó la muestra durante 10 minutos a 3000 rpm (revoluciones por minuto). Se aspiró la capa de glóbulos blancos con una pipeta pasteur (300 μ l aproximadamente) y se colocó en un tubo de 2.0 ml. Se adicionaron 900 μ l de solución de lisis RBC e incubó durante 10 minutos a

temperatura ambiente, mezclando suavemente por inversión. Se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto y se removió el sobrenadante con una pipeta, dejando una capa blanca visible. Se agitó vigorosamente en vórtex para resuspender las células y se adicionaron 300 μ l de Genoma Lysis y se incubaron los tubos a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se agregó 1 μ L de RNAasa a cada uno y se incubaron 1 hora a 37°C. Se dejaron en refrigeración a 4°C durante 15 minutos y se centrifugaron durante 3 minutos a 13000 rpm, para recuperar el sobrenadante, depositándolo en un tubo de 1.5 mL con 500 μ L de isopropanol y se mezcló suavemente observando un botón, se centrifugó nuevamente a la misma velocidad anterior pero durante sólo 1 minuto, se retiró el isopropanol invirtiendo en un papel absorbente y se depositaron 300 μ L de etanol absoluto volviendo a mezclar y a centrifugar con las mismas condiciones anteriores, retirando nuevamente el etanol al invertir el tubo en un papel absorbente y se dejó secar durante 15 minutos para luego adicionar 100 μ L del buffer de hidratación AE.

V.2.4 Optimización de la prueba.

Primeramente los oligonucleótidos fueron reconstituidos a una concentración de 1000 nM, y a partir de esto se hicieron diversas diluciones, para encontrar la mejor concentración de la pareja de oligonucleótidos, según el Cuadro 3 siguiente.

Cuadro 3. Matriz de cebadores para GADPH y SRY.

Primer Forward → Primer Reverse ↓ (nM)	50 nM	100 nM	200 Nm	300 nM
50 nM	50 /50	100/50	200/50	300/50
100 nM	50/100	100/100	200/100	300/100
200 nM	50/200	100/200	200/200	300/200
300 nM	50/300	100/300	200/300	300/300

Se preparó una mezcla maestra propuesta para dicha optimización con los reactivos necesarios para la PCR (Nolan; et al 2006), mostrados en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Componentes y concentraciones para la mezcla maestra.

Componentes	Concentración final
Buffer 10X	1x
MgCl ₂	4 mM
dNTP	0.8 mM
Syber Green	2 x
Taq Polimerasa	2U
DNA masculino	100 ng/ μ L
H ₂ O grado PCR	C.b.p 25 μ L

Las condiciones de amplificación se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Condiciones para la optimización de oligonucleótidos.

Número de ciclos	Paso	Condición
1 ciclo	Activación	95°C por 10 minutos
50 ciclos	Desnaturalización	95°C por 30 seg
	Alineamiento	60°C por 30 seg (adquisición de datos)
	Extensión	72°C por 30 seg

V.2.5 Límite mínimo de detección para el gen SRY y GAPDH.

Una vez determinadas las concentraciones de los cebadores se procedió a encontrar la menor cantidad detectable de DNA masculino por el sistema, usando ahora las sondas Taqman específicas; se emplearon a una concentración de 150 nM que se encuentra entre los 100 y 200 nM recomendados. Para lo cual se hicieron 7 diluciones del DNA masculino (C+) mostradas en el Cuadro 6, además de incluir DNA femenino y un blanco para observar el comportamiento adecuado de la reacción.

Las condiciones probadas para el sistema en PCR tiempo real fueron una incubación de 50°C por 2 minutos, luego 10 minutos a 95°C, seguido de 50 ciclos a 95°C por 15 segundos y 60°C por un minuto (Lo y col., 1998; Zhong y col., 2000).

Cuadro 6. Diluciones del control positivo para la determinación del límite de detección.

Diluciones	Concentración DNA masculino
Dilución 1	50ng / μ L
Dilución 2	10 ng/ μ L
Dilución 3	1 ng / μ L
Dilución 4	0.1 ng/ μ L
Dilución 5	0.01 ng / μ L
Dilución 6	0.001 ng/ μ L
Dilución 7	0.0001 ng/ μ L
C-	5 ng / μ L
Bco	0ng/ μ L

V.2.6 Sensibilidad de la prueba.

Al ser posible que en la extracción de DNA fetal, también sea extraído DNA materno, es necesario conocer hasta que concentración de DNA fetal (representado por el DNA masculino) se puede detectar en un fondo de DNA materno (representado por el DNA femenino). Por lo que en un sistema fue agregado una concentración constante de DNA de mujer y aparte una serie de diluciones del DNA de varón, como se representa en el Cuadro 7. Usando nuevamente las condiciones anteriores que resultaron adecuadas.

Cuadro 7. Concentraciones del control positivo y negativo, utilizadas en el ensayo de sensibilidad de la prueba.

Dilución	Concentración DNA masculino	Concentración DNA femenino
Dilución 1	10 ng/ μ L	100 ng/ μ L
Dilución 2	5 ng/ μ L	100 ng/ μ L
Dilución 3	1 ng / μ L	100 ng/ μ L
Dilución 4	0.1 ng/ μ L	100 ng/ μ L
Dilución 5	0.01 ng/ μ L	100 ng/ μ L
Dilución 6	0.001 ng/ μ L	100 ng/ μ L
Bco	0 ng/ μ L	0 ng/ μ L

V.2.7 Extracción de DNA libre de células (Fetal y Materno).

Inmediatamente después de la venopunción se le otorgaba un número consecutivo a cada caso y se centrifugaban los tubos 10 minutos a 2,000 rpm (revoluciones por minuto), se transfería el suero y el plasma a un tubo estéril y rotulado. Las muestras se centrifugaban nuevamente durante 10 minutos a 3,200 rpm y se recuperaba el plasma y/o suero en tubos de 2 mL (cada uno), etiquetados correctamente, dejando únicamente 800 μ L de plasma y suero en tubos de 5 mL para procesarse, con el kit de QIAamp DNA de Qiagen. En el tubo de 5 mL, referido anteriormente, se colocaban 80 μ l de proteasa, 1 μ l de RNAasa, posteriormente se adicionaba 800 μ l de Buffer AL, mezclando 15 segundos en vórtex, para llevar la mezcla a incubación por 10 minutos a 56°C, luego se centrifugaba 5 segundos y se le adicionaba 800 μ l de etanol (96-100%), se volvía a centrifugar y se pasaba cuidadosamente la mezcla a las columnas del kit y se ponía un tubo colector en la parte de abajo, se centrifugaba a 8000 rpm durante 1 minuto y desechaba el filtrado, se adicionaba 500 μ l de buffer AW1 a la columna y se centrifugaba nuevamente a las condiciones anteriores, se adicionaba 500 μ l de Buffer AW2 y se centrifugaba a 14,000 rpm por 3 minutos y eliminaba el filtrado, se pasaba la columna a un tubo de 1.5 ml, a la cual se le agregaban 40 μ l de buffer AE precalentado a 56°C y se dejaba a 56 °C por 5 minutos, por último se centrifugaba durante un minuto a 8000 rpm, obteniendo el DNA puro, éste último paso se hacía 2 veces.

V.2.8 Mezcla de reacción para PCR tiempo real.

La reacción se llevó a cabo en condiciones asépticas para lo cual se prendía la campana de PCR durante 15 minutos antes y el flujo laminar durante todo el procedimiento, la reacción se realizaba con material estéril y puntas con filtro para evitar contaminación cruzada, la mezcla de reacción tenía un volumen final de 20 μ l y contenía las cantidades y concentraciones como se muestran en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Cantidades y concentraciones para la mezcla de reacción de PCR.

Reactivo	Concentraciones
Platinum Quatitative PCR Super Mix-UDG	10 μ l
Oligonucleótido GAPDH Forward	200 nM
Oligonucleótido GAPDH Reverse	300 nM
Sonda Taqman GAPDH	150 nM
Oligonucleótido SRY Forward	300 nM
Oligonucleótido SRY Reverse	200 nM
Sonda Taqman SRY	150 nM
DNA Fetal	7.4 μ l

V.2.9 PCR tiempo real.

La reacción de PCR se llevaba a cabo en un termociclador Rotor-Gene 6000 de la marca Corbett, con una incubación de 50°C por 2 minutos, luego 10 minutos a 95°C, seguido de 50 ciclos a 60°C por un minuto y 95°C por 15 segundos, que son las mismas condiciones que fueron probadas para el límite de detección de los genes SRY y GAPDH con resultados satisfactorios (Lo y col., 1998; Zhong y col., 2000).

V.2.10 Interpretación de resultados.

Las gráficas obtenidas eran analizadas mediante el programa de Rotor-Gene 6000, siguiendo los pasos siguientes:

1. Se abría el programa Rotor- Gene 6000 Series Software 1.7
2. Se procedía al análisis del gen GAPDH, detectado en el canal verde, se colocaba el umbral aproximadamente a 0.04 unidades de fluorescencia normalizada, siendo necesario que los Controles positivos, negativos amplificaran y el blanco no lo hiciera. Y que además tuvieran una curva bien definida para pasar al punto 3.
3. Después se analizaba la amplificación detectada en el canal verde (SRY), situando el umbral aproximadamente de 0.02 a 0.04 unidades de fluorescencia y revisando que el Control positivo amplificara y el control negativo y blanco no lo hicieran.

VI. RESULTADOS.

VI.1. Descripción de la población.

Los resultados obtenidos en este estudio fueron de una población de 35 mujeres de 24 a 36 años de edad, con un embarazo de 8 a 38 semanas de gestación, las cuales accedieron a la realización de un estudio molecular para determinar el sexo fetal. Este trabajo fue efectuado en el laboratorio de Genética en el periodo comprendido de mayo a octubre del 2008. El estudio para conocer el sexo del futuro bebé fue realizado por medio de la técnica de PCR tiempo real y todas las muestras fueron analizadas por triplicado a la par con controles negativos (DNA femenino) y positivos (DNA masculino), así como con un blanco de agua libre de RNAsas y DNAsas.

VI.2 Optimización de la prueba.

Para la determinación de las concentraciones óptimas de cebadores fue realizada una matriz con diversas combinaciones para los genes GAPDH y SRY como se mostró en el Cuadro 3 (Metodología).

Las gráficas para la matriz fueron efectuadas usando el DNA de un varón (46,XY), a una concentración de 100 ng/ μ L. Las gráficas que se obtuvieron para el gen constitutivo GAPDH (Figura 6) y para el gen de interés SRY (Figura 7), cada combinación de concentración fue realizada por duplicado, para ambos casos se eligieron las concentraciones con la curva más definida y uno de los Cp (por sus siglas en inglés de Cross point) menores, como se muestra en el Cuadro 9 para GAPDH y en el Cuadro 10 para el SRY.

Se determinó que para GAPDH el cebador de sentido y antisentido se usaron a 200 nM y 300 nM respectivamente, en cuanto a SRY los oligonucleótidos se emplearían a 300 nM y 200 nM para cada reacción, debido a que éstas concentraciones de oligonucleótidos presentan el Cp menor o una gráfica con una forma típica más definida y un Cp dentro de los 3 menores.

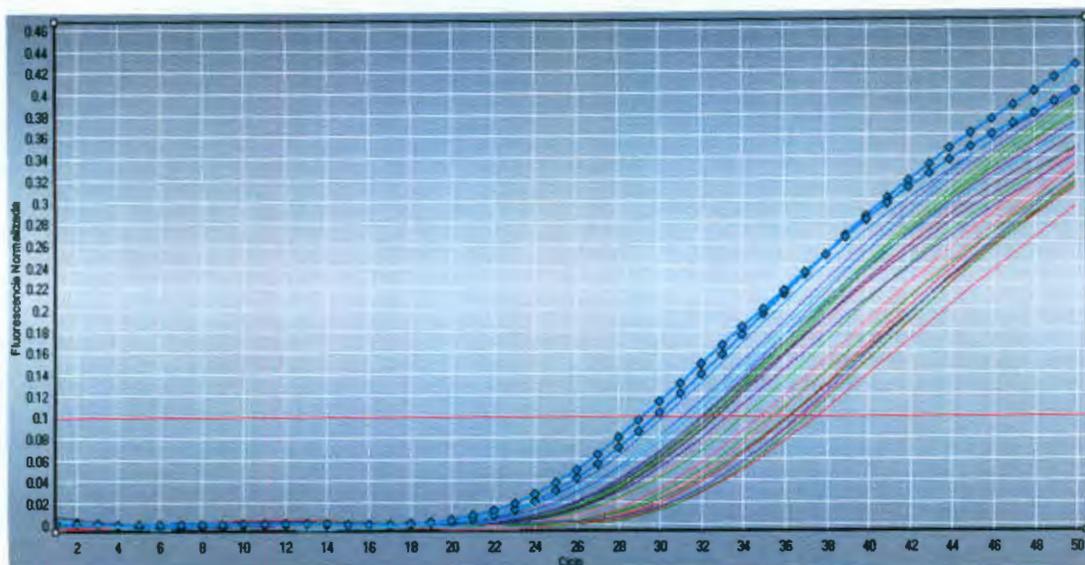


Figura 6. Amplificación del gen GAPDH por PCR tiempo real para la optimización de cebadores. La línea roja horizontal representa el umbral de fluorescencia, los duplicados de las distintas concentraciones de cebadores están marcados por curvas de diferentes colores y las líneas con los rombos muestran la concentración elegida para la realización final de la prueba.

Cuadro 9. Relación de concentraciones de oligonucleótidos para GAPDH con sus respectivos Cp.

Nombre	Concentración (Forward/Reverse)	Cp
F1/R1	50 nM/50 nM	36.3
F2/ R1	100 nM/50 nM	37.24
F3/R1	200 nM/50 nM	35.28
F4/R1	300 nM/50 nM	34.42
F1/R2	50nM/100nM	36.7
F2/R2	100nM/100nM	33.87
F3/R2	200nM/100nM	33.3
F4/R2	300nM/100nM	32.59
F1/R3	50nM/200nM	32.65
F2/R3	100nM/200nM	31.6
F3/R3	200nM/200nM	34.42
F4/R3	300nM/200nM	31.62
F1/R4	50nM/300nM	29.65
F2/R4	100nM/300nM	29.99
◆ F3/R4	200nM/300nM	29.53
F4/R4	300nM/300nM	31.41

◆ Concentración elegida de cebador para la prueba.

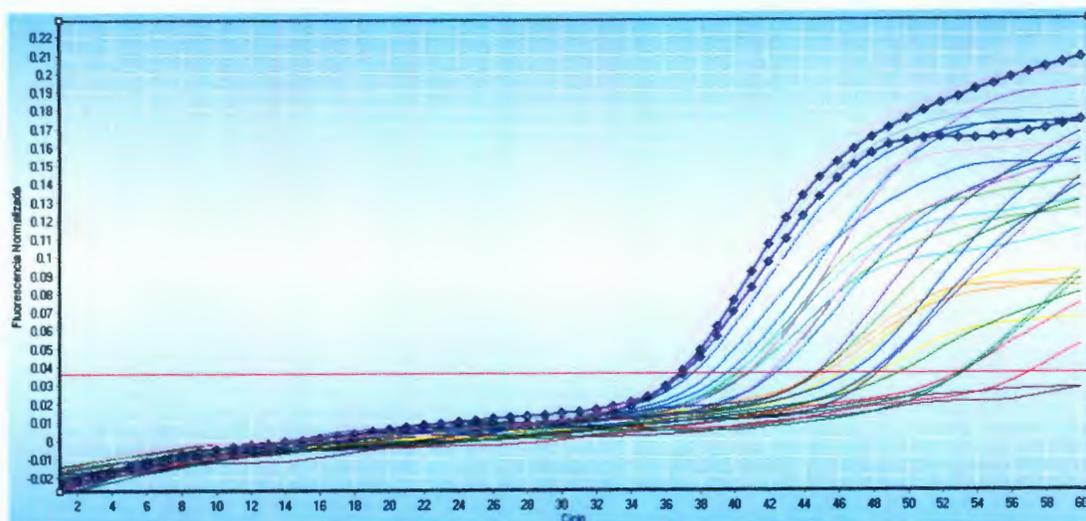


Figura 7. Amplificación del gen SRY por PCR tiempo real para la optimización de la concentración de oligonucleótidos para SRY. La línea roja horizontal representa el umbral de fluorescencia, los duplicados de las distintas concentraciones de cebadores están marcados por curvas de diferentes colores, las líneas con los rombos muestran la concentración elegida para la realización de la prueba.

Cuadro 10. Relación de concentraciones de oligonucleótidos para SRY con sus diferentes Cp.

Name	Concentración (Forward/Reverse)	Cp
F1/R1	50 nM/50 nM	56.00
F2/R1	100 nM/50 nM	50.98
F3/R1	200 nM/50 nM	44.97
F4/R1	300 nM/50 nM	44.74
F1/R2	50nM/100nM	50.98
F2/R2	100nM/100nM	44.70
F3/R2	200nM/100nM	39.14
F4/R2	300nM/100nM	39.81
F1/R3	50nM/200nM	42.50
F2/R3	100nM/200nM	38.60
F3/R3	200nM/200nM	36.42
◆ F4/R3	300nM/200nM	35.34
F1/R4	50nM/300nM	45.09
F2/R4	100nM/300nM	38.57
F3/R4	200nM/300nM	35.00
F4/R4	300nM/300nM	35.16

◆ Concentración de cebador elegida para la prueba

VI.3 Límite mínimo de detección para el gen SRY y GAPDH

El control positivo, es decir el DNA de varón, el cual conocemos que contiene el gen SRY, nos permitió conocer el límite de detección de nuestra metodología para los dos genes empleados. Esto se realizó mediante diluciones seriadas en la concentración de DNA y determinando a que concentración se pierde la señal de detección para el Cp debido a que no posee una gráfica de amplificación, haciendo esto tanto para el gen constitutivo (Cuadro 11 y Figura 8), como para el gen problema (Cuadro 12 y Figura 9).

Cuadro 11. Relación de concentraciones de la muestra con su respectivo Cp para el gen GAPDH.

Muestra	Concentración	Promedio de Cp
C+	50 ng / μ L	24.75
C+	10 ng/ μ L	26.88
C+	1 ng / μ L	29.99
C+	0.1 ng/ μ L	33.64
C+	0.01 ng / μ L	36.51
C+	0.001 ng/ μ L	-
C+	0.0001 ng/ μ L	-
C-	5 ng / μ L	30.32
Bco	0 ng/ μ L	-

V.1.4 Sensibilidad de la prueba.

Se probó hasta qué punto el sistema utilizado es capaz de detectar la presencia de regiones SRY a diferentes concentraciones, empleando en el diluyente un DNA femenino con una concentración constante de 100 ng en todas las diluciones. Encontrando que el sistema puede detectar hasta 0.01 ng de DNA de varón en 100 ng de DNA femenino, mediante la amplificación del gen SRY, demostrando que no hay reacción cruzada y que ello no interfiere en la reacción de amplificación para la secuencia específica empleada para amplificar el gen SRY. Las concentraciones usadas fueron en diluciones seriadas, según el Cuadro 13.

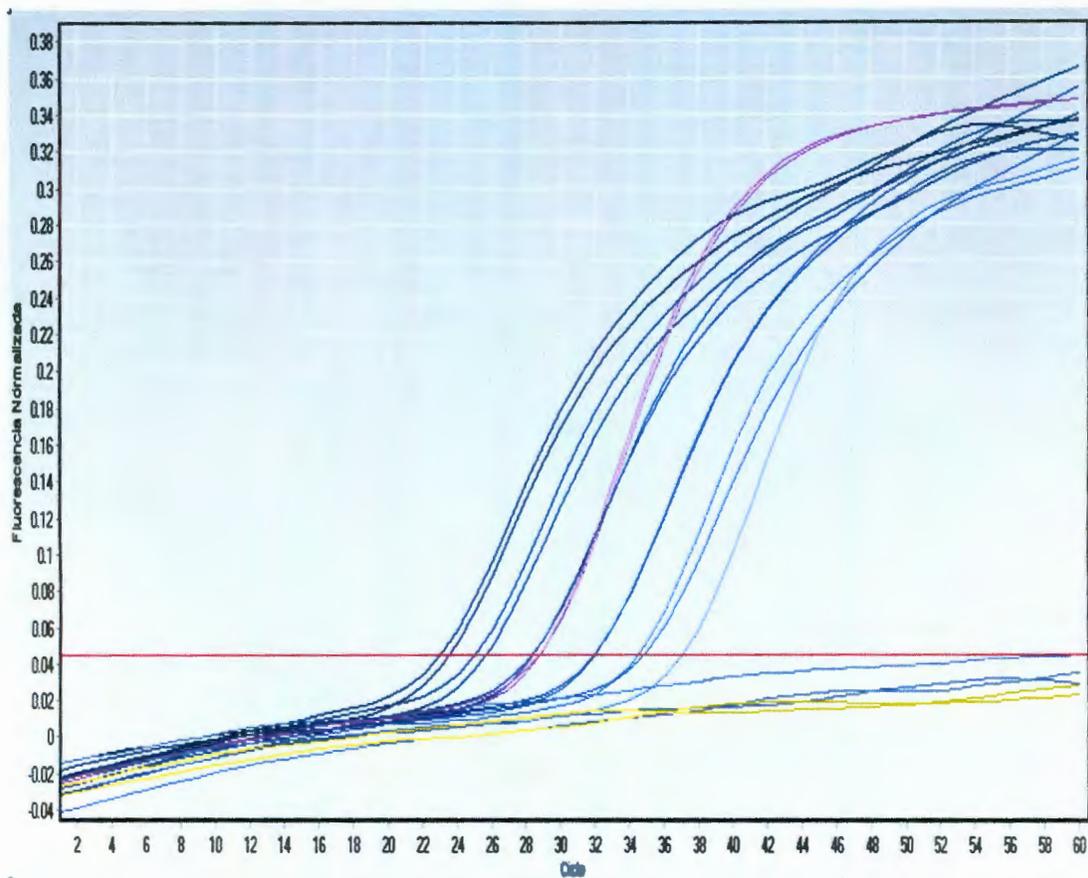


Figura 8. Amplificación del gen GADPH por PCR tiempo real en distintas concentraciones de DNA. DNA de varón a distintas concentraciones (azul), DNA control de mujer (rosa), blanco sin DNA (amarillo).

Cuadro 12. Relación de concentraciones de la muestra con su respectivo Cp para el gen SRY.

Muestra	Concentración	Promedio de Cp
C+	50 ng / μ L	25.88
C+	10 ng/ μ L	27.95
C+	1 ng / μ L	31.22
C+	0.1 ng/ μ L	34.79
C+	0.01 ng / μ L	38.28
C+	0.001 ng/ μ L	-
C+	0.0001 ng/ μ L	-
C-	5 ng / μ L	-
Bco	0 ng/ μ L	-

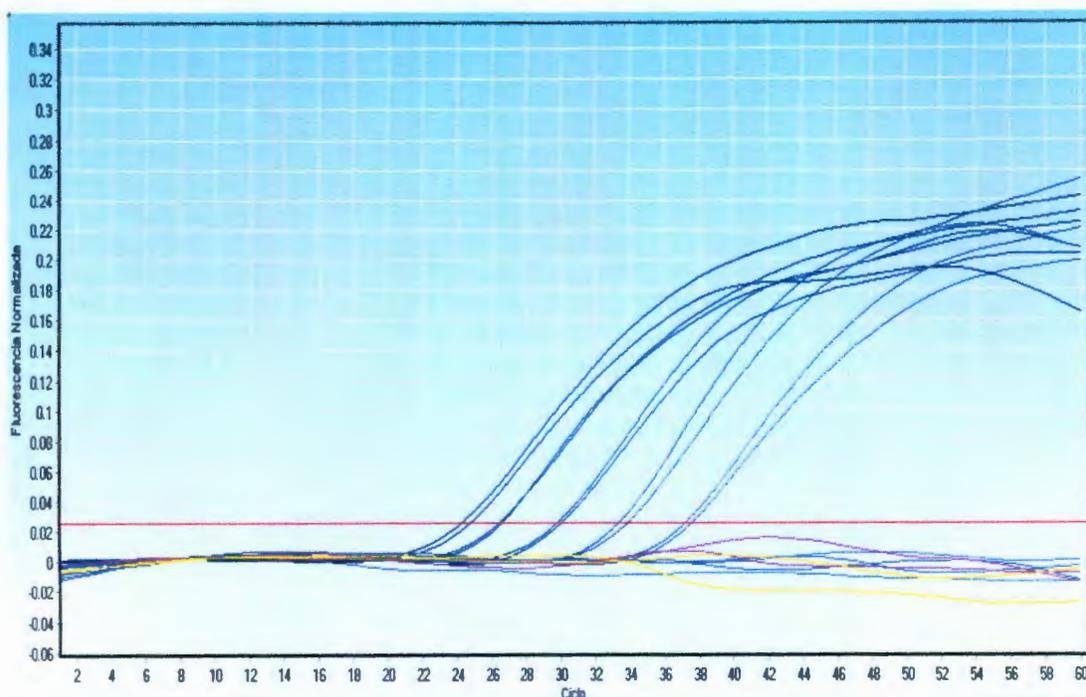


Figura 9. Amplificación de diluciones seriadas para el gen SRY mediante PCR tiempo real. DNA de varón a distintas concentraciones (azul), DNA control de mujer (rosa), blanco sin DNA (amarillo).

Cuadro 13. Concentraciones de DNA masculino y femenino empleadas en la determinación de sensibilidad de la prueba.

Muestra	Concentración DNA masculino	Concentración DNA femenino
Dilución 1	10 ng	100 ng
Dilución 2	5 ng	100 ng
Dilución 3	1 ng	100 ng
Dilución 4	0.1 ng	100 ng
Dilución 5	0.01 ng	100 ng
Dilución 6	0.001 ng	100 ng
Bco	0 ng	0 ng

Las diluciones se hicieron para GAPDH, sólo para asegurarnos de que efectivamente tuvieran DNA y presentaran una gráfica típica en la cual, entre menor sea la cantidad de DNA, mayor el número de ciclos requeridos para la amplificación (Figura 10) y para SRY para mostrar la sensibilidad (Figura 11).

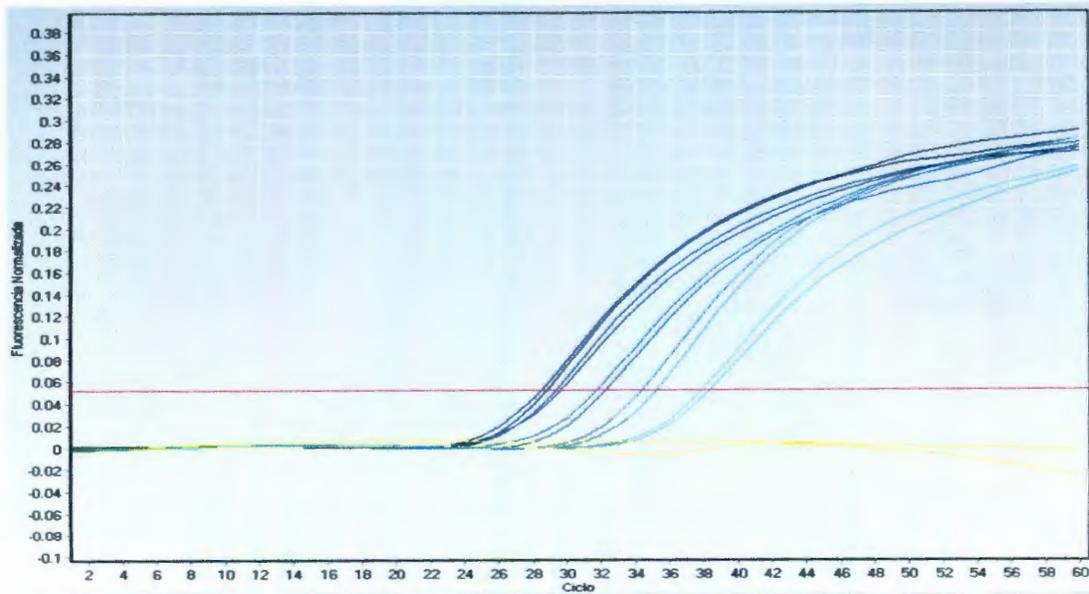


Figura 10. Amplificación del gen GAPDH mediante PCR tiempo real en diluciones seriadas del control positivo con DNA femenino. Las muestras y los blancos se representan de color azul y amarillo, respectivamente.

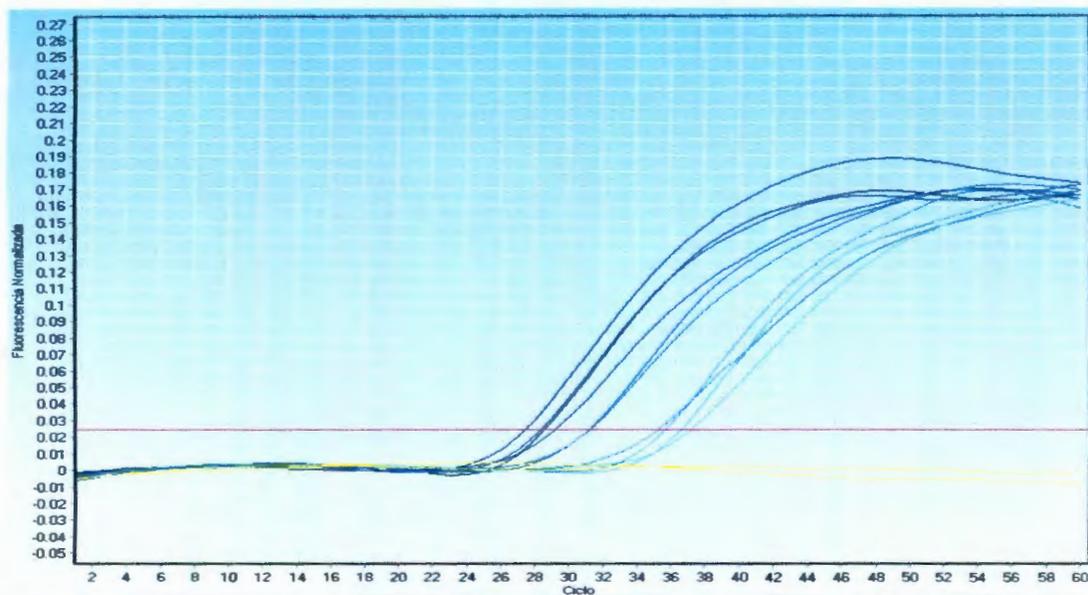


Figura 11. Gráfica de PCR tiempo real de diluciones del control positivo para el gen SRY en presencia de DNA femenino. Se adicionaron 100 ng de DNA femenino en las diluciones del control (curvas en color azul) y con un blanco sin DNA (amarillo).

V.1.5 Determinación de sexo.

Las gráficas obtenidas para el análisis cualitativo de los diferentes casos, mostraban la presencia o ausencia de dos genes, analizando primero el gen constitutivo (GAPDH) y sólo que existiera la amplificación de éste se analizaba el gen problema (SRY), asegurando así que realmente se hubiera extraído DNA, para luego poder enfocarse a la determinación de sexo, mediante la amplificación del gen de origen masculino, además de corroborar que ambos genes también amplificarán en el control positivo, el control negativo únicamente debía amplificar para GAPDH y el blanco para ninguno de los dos, sino eran cumplidos dichos requisitos, la prueba se invalidaba y tenía que realizarse una nueva amplificación.

A continuación se presentan dos gráficas representativas en las cuales se realiza el análisis para determinar el sexo fetal. La primera es una gráfica evidenciando a un feto de sexo femenino (Figura 12) y la segunda muestra una gráfica de un feto masculino (Figura 13). La Figura 12 y 13 en su inciso A muestra la amplificación para el gen como para los negativos, excepto para el blanco que carece de DNA, para la Figura 12 el inciso B, muestra la amplificación sólo del control positivo, evidenciando que en la muestra problema no hay presencia de secuencias SRY, lo que indica que es un feto de sexo femenino. Para la Figura 13 en su inciso B, muestra amplificación para el gen SRY tanto para el control positivo así como de la muestra problema en plasma, demostrando la presencia de secuencias SRY que confirman la presencia de un feto masculino. En suero, la muestra no amplifica para el gen en cuestión.

De las muestras de suero y plasma materno colectadas de 35 mujeres empleadas, todas ellas fue posible detectar la presencia de GAPDH en todos los plasmas recolectados, no así para el suero, en el cual en 3 casos no hubo amplificación del gen constitutivo. Para el gen problema SRY, 15 muestras dieron una señal positiva en las muestras de plasma, mientras que en suero sólo en 2 de ellas tuvo amplificación para dicho gen.

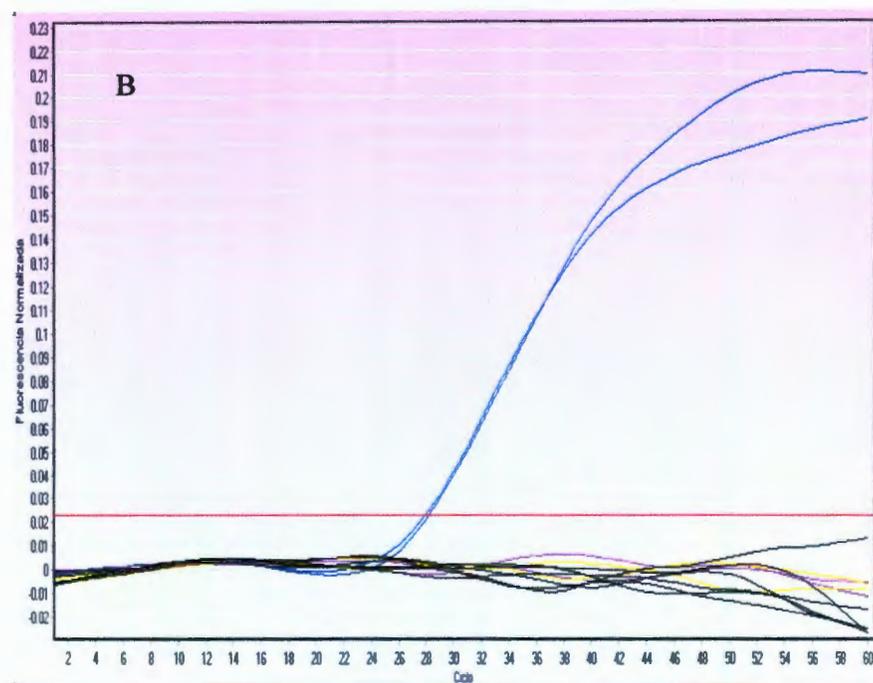
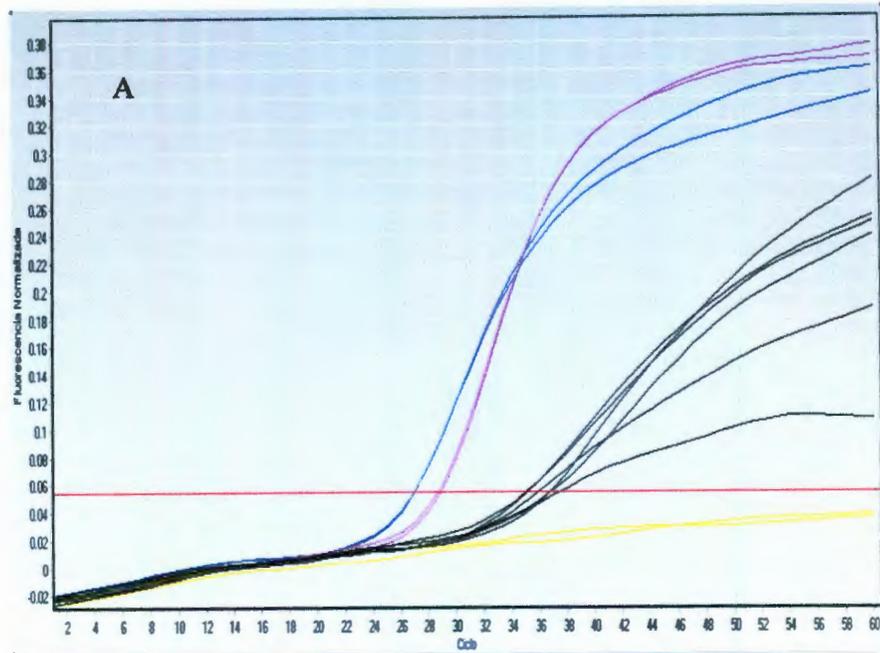


Figura 12. Determinación de sexo fetal empleando PCR tiempo real para el caso SF-030-08. A) Amplificación de GAPDH. B) Amplificación de SRY. Las muestras positivas, negativas, blancos sin DNA y el caso SF-030-08 se representan de color azul, rosa, amarillo y negro, respectivamente.

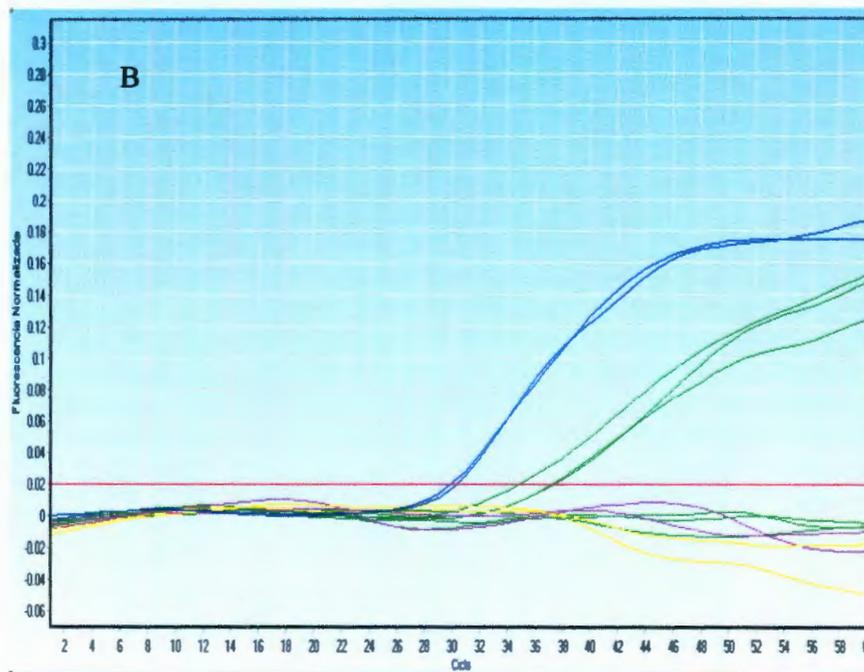
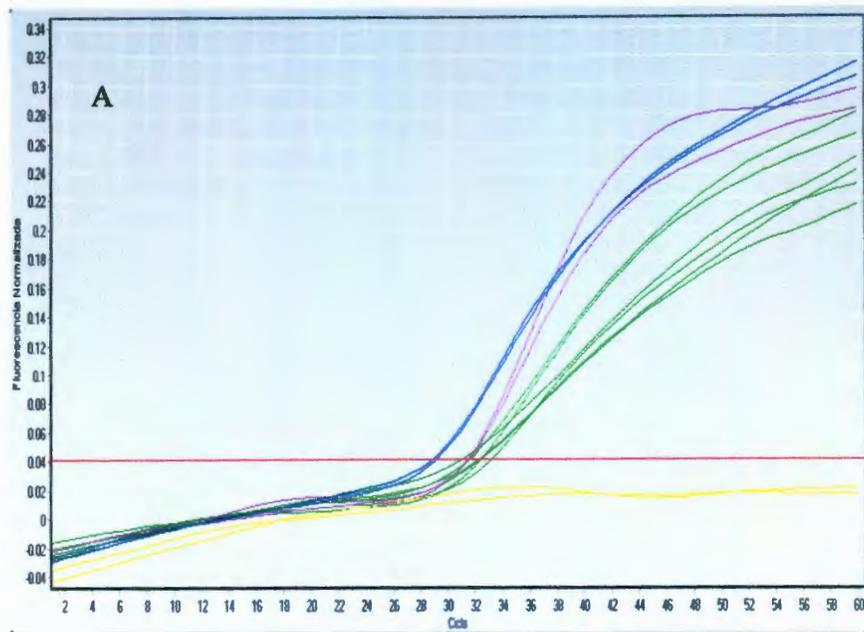


Figura 13. Determinación de sexo fetal empleando PCR tiempo real para el caso SF-037-08. A) Gráfica de GAPDH. B) Gráfica de SRY. Las muestras positivas, negativas, blancos sin DNA y el caso SF-037-08 se representan de color azul, rosa, amarillo y verde, respectivamente. El triplicado de color verde que amplifica (corresponde a DNA extraído a partir de plasma) y otro triplicado de color verde que no lo hace (a suero).

Ninguna de las 19 mujeres restantes que se confirmaron que estaban embarazadas de niñas, tuvo señales de la presencia de SRY. El caso SF-028-08, a pesar de la amplificación tanto en suero como en plasma del gen constitutivo, no hubo señal para SRY, dando como resultado la ausencia de SRY y por lo tanto la presencia de un bebé de sexo femenino, generando así un falso negativo.

Mientras que los controles positivos amplificaron positivamente para los genes GADPH y SRY, los controles negativos amplificaron únicamente para GADPH y los blancos incluidos no amplificaron en ninguno de los dos casos. Los resultados obtenidos fueron confirmados por ultrasonografía aproximadamente a las 22 semanas de gestación; como se resume en el Cuadro 14.

De la población en estudio y que se confirmó por ultrasonido, se evidenció que el 56% fueron fetos femeninos y un 46% de fetos masculinos como se ilustra en la Figura 14.

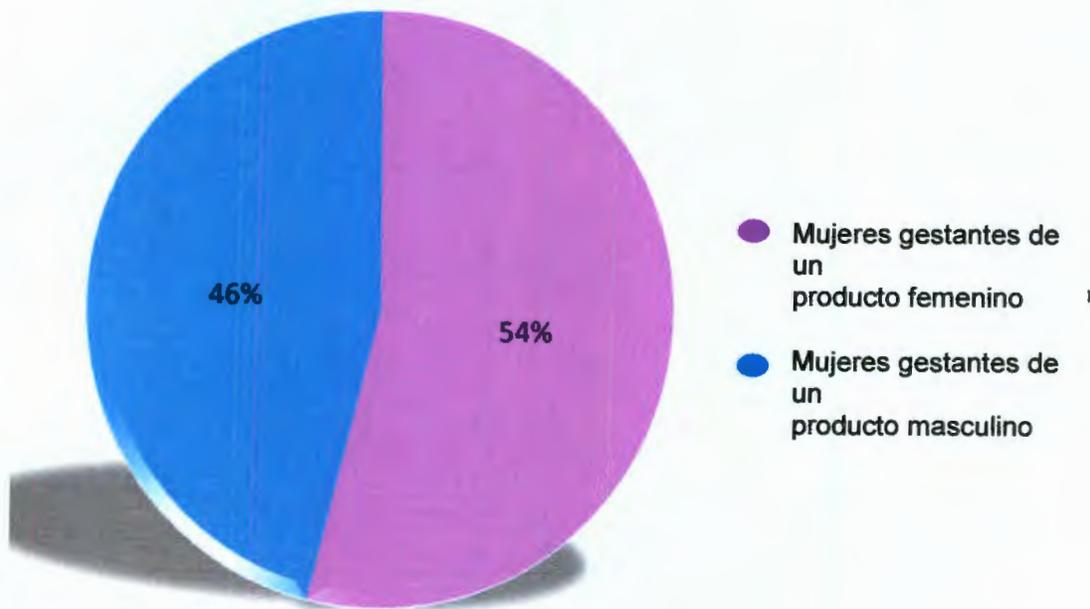


Figura 14. Proporción de niños o niñas determinadas mediante PCR tiempo real en sangre periférica materna entre la 8^a y la 38^a semana de gestación.

Cuadro 14. Relación de casos con el resultado de PCR Tiempo Real y su confirmación por ultrasonografía, continúa.

Número de caso	Semanas de gestación (sdg)	Presencia de GADPH		Presencia de SRY		Resultado PCR tiempo real	Confirmación por Ultrasonografía
		Plasma	Suero	Plasma	Suero		
SF-00-01	12.2	+	+	-	-	Niña	Niña
SF-00-02	12.3	+	+	-	-	Niña	Niña
SF-00-03	16	+	-	+	-	Niño	Niño
SF-00-04	8	+	+	-	-	Niña	Niña
SF-024-08	10	+	+	-	-	Niña	Niña
SF-026-08	24	+	+	-	-	Niña	Niña
SF-027-08	25	+	+	-	-	Niña	Niña
SF-028-08	11	+	+	-	-	Niña	Niño
SF-029-08	11	+	+	+	-	Niño	Niño
SF-030-08	17	+	+	-	-	Niña	Niña
SF-031-08	38	+	+	+	-	Niño	Niño
SF-032-08	10	+	+	-	-	Niña	Niña
SF-033-08	8	+	+	-	-	Niña	Niña
SF-034-08	23	+	+	-	-	Niña	Niña
SF-035-08	12	+	+	+	-	Niño	Niño
SF-036-08	12	+	-	-	-	Niña	Niña
SF-037-08	20	+	+	+	-	Niño	Niño
SF-038-08	12	+	+	+	+	Niño	Niño
SF-039-08	12	+	+	-	-	Niña	Niña

+ = Amplificación - = No amplificación = Presencia de bebé de sexo masculino = Presencia de bebé de sexo femenino

Continuación, Cuadro 14. Relación de casos con el resultado de PCR Tiempo Real y su confirmación por ultrasonografía

Número de caso	Semanas de gestación (sdg)	Presencia de GADPH		Presencia de SRY		Resultado PCR tiempo real	Confirmación por Ultrasonografía
		Plasma	Suero	Plasma	Suero		
SF-040-08	16	+	+	-	-	Niña	Niña
SF-041-08	11	+	+	+	-	Niño	Niño
SF-042-08	10	+	+	-	-	Niña	Niña
SF-043-08	15	+	+	+	-	Niño	Niño
SF-044-08	10	+	+	+	-	Niño	Niño
SF-045-08	12	+	+	-	-	Niña	Niña
SF-046-08	13	+	+	+	+	Niño	Niño
SF-047-08	8	+	+	+	-	Niño	Niño
SF-048-08	11.2	+	+	-	-	Niña	Niña
SF-049-08	12	+	+	-	-	Niña	Niña
SF-050-08	10.1	+	-	-	-	Niña	Niña
SF-051-08	9	+	+	+	-	Niño	Niño
SF-052-08	12.4	+	+	-	-	Niña	Niña
SF-053-08	12	+	-	+	-	Niño	Niño
SF-054-08	13.1	+	-	+	-	Niño	Niño
SF-055-08	13	+	-	+	-	Niño	Niño

+= Amplificación - = No amplificación ■ = Presencia de bebé de sexo masculino □ = Presencia de bebé de sexo femenino

V.1.6 Estadística

La validez de la determinación como una prueba diagnóstica, se hizo con los datos anteriores. Los cuales se resumen en el Cuadro 15.

Cuadro 15. Resumen de los resultados obtenidos de la determinación de sexo fetal en sangre periférica materna (plasma).

Resultado de la prueba	Confirmación por ultrasonografía	
	Masculino	Femenino
Presencia SRY	15	0
Ausencia SRY	1	19
Total	16	19

De la tabla anterior fue posible determinar la sensibilidad (S) que estableció que la capacidad de la prueba para detectar el gen SRY en plasma es del 94%, mientras que tiene una especificidad (E) del 100%, un valor predictivo positivo (VPP) del 100% y una probabilidad de que una mujer con resultado negativo en la prueba esté embarazada de una niña o un valor predictivo negativo (VPN) del 95%. Considerado que las fórmulas usadas fueron $S = VP / (VP + FN)$ para sensibilidad, $E = VN / (VN + FP)$ para especificidad, $VPP = VP / (VP + FP)$ para el valor predictivo positivo y $VPN = VN / (FN + VN)$ para el valor predictivo negativo. Siendo que, VP= Verdaderos positivos, FP= Falsos positivos, VN= Verdaderos negativos y FN= falsos negativos.

En suero los valores obtenidos están resumidos en la Cuadro 16.

Cuadro 16. Resumen de los resultados obtenidos de la determinación de sexo fetal en sangre periférica materna (suero).

Resultado de la prueba	Confirmación por ultrasonografía	
	Masculino	Femenino
Presencia SRY	2	0
Ausencia SRY	14	19
Total	16	19

Resultando que la sensibilidad para el suero fue de 12.5 %, la especificidad y el valor predictivo positivo fueron del 100%, y el valor predictivo negativo obtuvo un

valor del 58%; esto debido a que sólo en 2 casos de los 16 confirmados como masculinos fue posible amplificar regiones del SRY, teniendo en cuenta que para el suero en 6 casos de los 35 no fue posible detectar el GAPDH y por lo tanto no aseguraba que hubiera DNA ni materno ni fetal.

VII. DISCUSIÓN.

El presente estudio demuestra la existencia de DNA fetal en sangre periférica en mujeres embarazadas con un mínimo de ocho semanas de embarazo; a través de técnicas moleculares, específicamente PCR tiempo real, haciendo posible en el laboratorio una prueba de diagnóstico prenatal "no invasivo" para identificar el género del futuro bebé, en las primeras semanas de embarazo.

El método empleado difiere de otras técnicas no invasivas, un ejemplo de ello es el uso de células fetales como las células rojas nucleadas que a pesar de los esfuerzos para ser empleadas en la obtención de DNA fetal para estudios genéticos, no es fácil llevarlas a la práctica, principalmente por lo complicado de su aislamiento. El porcentaje de sensibilidad para la determinación de sexo por éste método ha sido reportado entre el 55-86% (Little y col., 1997; Sohda y col., 1997; Valerio y col., 1997). La sensibilidad de la hibridación in situ fluorescente o PCR usando células rojas fetales nucleadas varía con un rango del 60-70% (Kolialexi y col., 2004). Sin embargo estos métodos son laboriosos, costosos y su sensibilidad es baja para una aplicación clínica. Otra opción es emplear el DNA fetal libre de células y emplear una PCR anidada obtenido de sangre total materna, dicha metodología ofrece una sensibilidad de 83-94% con mujeres con 10-18 sdg (Honda y col., 2001). Este modelo fue probado con anterioridad en el laboratorio de Genética, en el cual se determinó el sexo fetal a mujeres embarazadas mostrando resultados que si bien permitieron identificar DNA fetal en sangre materna y abrieron el camino para el diagnóstico prenatal no invasivo, no fueron óptimos, debido a la necesidad de efectuar una reamplificación, pudiendo originar productos inespecíficos o mayor probabilidad de contaminación, además de que las concentraciones de DNA fetal son sumamente bajas y por lo tanto poco recomendadas para una PCR punto final, mostrando así una sensibilidad del 80% y una especificidad del 60% (Jiménez, 2008), por lo que es requerido el uso de técnicas más sensibles y específicas como lo es la PCR tiempo real, en la cual no es necesario llevar a cabo procedimientos posteriores a la reacción evitando contaminación y se puede obtener el resultado en solo unas cuantas horas, además de que las diferentes

químicas que pueden ser utilizadas en esta metodología nos permiten elegir la(s) que tengan mayor especificidad (Honda y col., 2001; Jiménez, 2007); además de mencionar que la concentración de DNA que se requiere es del orden de 0.01 ng / μ L, lo que nos permite aumentar la sensibilidad del estudio.

Actualmente se ha reportado una detección de DNA fetal en plasma materno por PCR tiempo real que ha alcanzado sensibilidades y especificidades cercanas al 100% (Bischoff y col., 2005) en aplicaciones que involucran la búsqueda de marcadores del cromosoma Y y el gen del Rh-D, éste último tiene gran importancia ya que a pesar de los grandes avances en la ciencia, la aloinmunización del grupo rhesus, aún sigue afectando a 6.8 niños de cada 1000 nacidos vivos, causando la enfermedad hemolítica del recién nacido provocando abortos, muerte fetal y recién nacidos con las diferentes formas clínicas de la enfermedad: hidrops fetal, anemia congénita, insuficiencia cardíaca y síndrome icterico (Mckenzie,2000; Brítez y Samudio, 2007).

En nuestros resultados se evidencian secuencias de un gen masculino (SRY) en sangre periférica de mujeres embarazadas, lo que demuestra que el DNA fetal está presente en el plasma y suero materno, como fue asentado hace más de una década (Lo y col., 1997). Por lo tanto, para la detección del DNA fetal se han implementado a lo largo del tiempo métodos más eficientes y selectivos para el aislamiento del DNA fetal. Algo que es muy importante es la cantidad de éste DNA que puede recuperarse y el cual depende en gran medida del método empleado y de las semanas de gestación debido a que la concentración aumenta al avanzar el embarazo. La centrifugación es un paso crítico en dicho aislamiento, mostrando que un proceso ineficiente puede dejar células residuales en el plasma, por lo que fue necesario realizar dos centrifugaciones, observando entre cada una de ellas, un precipitado rojizo, lo que indicaba células rojas de la madre (Bischoff y col., 2005; Chiu y col., 2001). Otro punto importante es el tiempo en el que las concentraciones de DNA fetal libre de células permanece estable después de la flebotomía; existen reportes donde se ha encontrado que el DNA fetal permanece estable hasta después de 24 horas después de extraía la muestra (Angert y col., 2003), sin embargo para nuestro

estudio y evitar algún tipo de degradación, las muestras fueron procesadas inmediatamente después de colectada la sangre. Otra manera de hacer más eficiente la recuperación del DNA fetal se realizó empleando columnas de sílica que permiten obtener una buena concentración de DNA de gran calidad a partir de sólo 800 μ L de plasma (Lo y col., 1998).

La edad gestacional más temprana a la cual el DNA fetal circulante ha sido detectado en el plasma materno es 18 días, sin embargo solo un caso ha sido reportado, el resto de los investigadores han logrado la detección del DNA fetal en semanas de gestación que van desde la quinta a la trigésima novena, y para la mayoría de los casos se detecta a partir de la décima. Nuestro estudio fue posible realizarse exitosamente desde la octava semana de gestación, demostrando que a lo largo de los tres trimestres es posible la detección del DNA fetal, conociendo que como han descrito diversos investigadores, el material genético fetal aumenta conforme avanza el embarazo (Lo y col., 1998; Benachi y col., 2003).

De los 35 casos analizados, sólo en un caso no se detectó la amplificación de secuencia del SRY en plasma, siendo el producto un feto de sexo masculino, obteniendo un falso negativo, probablemente debido a una extracción no eficiente que en algún paso no se recuperó el DNA fetal, aunque si fue posible amplificar para GAPDH, probablemente ésta amplificación fue debida sólo a DNA materno, o a que los límites de detección de 0.01 ng/ μ L de la prueba no fueron suficientes para detectarlo. Pero que comparando los resultados de sensibilidad, valor predictivo positivo, especificidad y valor predictivo negativo, son de 94%, 100%, 100% y 95% respectivamente, resultados que también han sido reportados por otros autores empleando las mismas secuencias para SRY y obteniendo los mismos porcentajes, demostrando que la técnica tiene resultados certeros y equiparables a investigaciones de nivel internacional (Johnson y col., 2004; Zhong y col., 2000).

Si se comparan los dos tipos de muestra a partir del cual se realizó el estudio, la mejor recuperación de DNA fetal se observó en plasma y era poco eficiente en

suero, ya que en un 37.5 % de los casos en el suero ni siquiera fue factible la amplificación de la secuencia del gen constitutivo GAPDH, al contrario del plasma donde todos los casos amplificaron satisfactoriamente para la secuencia mencionada. En cuanto a la secuencia del gen de interés SRY, el plasma rebasa de forma importante la sensibilidad al detectarse en 15 de los 16 casos y en el suero en sólo 2 de 16. La preferencia del plasma sobre el suero queda también compartida por Lo y Houfflin que alcanzaron sensibilidades mayores, en plasma de 80% que en suero de 70%, que si bien no son tan dispares y se realizaron con la PCR convencional, dejan un antecedente de la mejor sensibilidad del plasma, en otra prueba, esta vez usando PCR tiempo real, concluyendo que si bien las cuantificaciones absolutas del DNA fetal en suero y plasma fueron muy similares, en el suero existe una mayor cantidad de DNA materno de fondo, posiblemente debida a la liberación de DNA durante el proceso de coagulación, lo que les arrojó los valores de una concentración fraccional de DNA fetal en plasma del 3.4 % y de 0.13% en suero (Lo y col., 1998). La mayoría de los artículos en los que se usa DNA fetal parten ya de plasma, sin embargo existe uno que demuestra una superioridad del suero contra el plasma ya que cuando usan el suero reportan una sensibilidad cercana al 100%, y con el plasma su sensibilidad baja a un 87%, sugiriendo que la eficiencia en la extracción es mayor en suero que en plasma, explicando esto al decir que la eficiencia disminuye en el plasma debido a la formación de crioprecipitados formados en el plasma y que según el método de QIAamp, pueden interferir; una posible respuesta a la diferencia entre su resultado y el nuestro es debido a que ellos congelan sus muestras a -20°C, a diferencia de nosotros y otros grupos, que procesamos las muestras antes de 1 hora evitando así la formación de los crioprecipitados (Lo y col., 1997., Houfflin y col., 2000; Honda y col., 2001).

Por lo que este trabajo deja asentadas las bases para el futuro diagnóstico prenatal no invasivo en nuestro país además de ser usado como un pre-test para determinar cuando deben realizarse métodos invasivos de diagnóstico como la amniocentesis en fetos con riesgo de tener una enfermedad genética ligada al sexo como por ejemplo hemofilia A, distrofia muscular de Duchenne,

síndrome X frágil, entre otras. Así como se ha sugerido el uso de ésta técnica para determinar en que casos las mujeres embarazadas deben recibir dexametasona para el tratamiento de fetos con posible hiperplasia adrenal congénita (Bianchi, 2004).

Es posible mejorar el protocolo, al usar como gen constitutivo secuencias de DYS14 o del DYZ3, es decir de genes multicopia, en vez del conocido SRY, ya que varios autores han demostrado un incremento de 10 veces en los límites de detección y cuantificación del DNA fetal y sensibilidades del 100% (Maron y Bianchi, 2007).

Existe además un gran interés en la detección no invasiva de aneuploidias fetales, al ser consideradas como la mayor causa de anomalías fetales que a su vez provocan gran morbilidad y mortalidad neonatal; hasta el momento los estudios realizados se centran en medir las concentraciones de DNA fetal circulante, ya que se ha encontrado que existen elevadas concentraciones de éste en mujeres embarazadas de fetos con trisomía 21 en comparación con mujeres portadoras de fetos con cariotipo normal, por lo que se busca encontrar una técnica que alcance valores muy altos de confiabilidad y sensibilidad, así como ampliar el estudio a otros síndromes como el de Patau o el de Down, ya que se ha visto en estudios previos que los niveles circulantes de DNA fetal (usando secuencias del cromosoma Y como marcador de DNA fetal) se elevan en mujeres embarazadas de fetos con trisomía 21 y 13 y también ha sido posible detectar un aumento en las concentraciones de genes localizados en los cromosomas 21, en mujeres embarazadas de fetos con Síndrome de Down, con respecto a personas con un cariotipo normal utilizando PCR tiempo real cuantitativa, siendo esto una excelente posible prueba de diagnóstico que superaría con mucho a los marcadores bioquímicos que tradicionalmente se utilizan y pueden detectar sólo el 60% de embarazos con Síndrome de Down (Lo y col., 1999; Zimmermann y col., 2002; Wataganara y col., 2003; Bianchi, 2004; Tsujie y col., 2006; Jorgez y col., 2007).

No obstante este estudio de determinación de sexo fetal constituye un adelanto en nuestro país para la investigación del DNA fetal libre de células y establece antecedentes para el seguimiento mediante métodos no invasivos a mujeres embarazadas que puedan tener complicaciones como las que generan pre-eclampsia, parto a pre-término, restricción del crecimiento uterino, etc.

VIII. CONCLUSIONES.

Se evidenció la presencia de DNA fetal en sangre periférica materna, a partir de la octava semana de gestación.

El método presenta los límites de detección de 0.01ng/μL tanto para las secuencias de GAPDH, como de SRY.

La mejor muestra para determinar el sexo fetal es empleando plasma en comparación con el suero materno.

En plasma se obtuvo una sensibilidad del 94% y una especificidad del 100%.

Se implementa por primera vez en nuestro país la primera prueba prenatal “no invasiva” para la determinación de sexo fetal mediante PCR tiempo real con alta especificidad y confiabilidad.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Affara, N.A., Sargen, C.A. 2005. Chromosome Y. Enciclopedia of Life Sciences. 1-11.

Angert, R.M., Leshane, E., Bianchi, D. W., Lo, Y.M., Chan, L., Laurent C. 2003. Fetal Cell-free plasma DNA concentrations in maternal blood are stable 24 hours after collection: analysis of first and third trimester samples. *Clinical Chemistry*. Vol. 49:195-198.

Arezi, B., Xing, W., Sorge, J.A., Hogrefe, H.H. 2003. Amplification efficiency of thermostable DNA polymerases. *Analytical Biochemistry*. Vol. 321: 226-235.

Benachi, A., Steffann, J., Gautier, E., Ernault, P., Olivi, M., Dumez, Y. 2003 Fetal DNA in Maternal Serum : Does it Persist After Pregnancy?. *Human Genetics*. Vol. 113:76-79.

Bianchi, D. W., Flint, A.F., Pizzimenti, M.F., Knoll, J.H., Latt, S.A. 1990. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 87: 3279-3283.

Bianchi, D. W. 1998. Fetal DNA in Maternal Plasma: The Plot Thickens and the Placental Barrier. *American Journal of Human Genetics*. Vol. 62: 763-764.

Bianchi, D. W. 2000. Fetomaternal Cell Trafficking: A new cause of disease?. *American Journal of Medical Genetics*. Vol. 91: 22-28.

Bianchi, D.W., Lo, Y.M. 2001. Fetomaternal Cellular and Plasma DNA Trafficking. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol. 945:119-131.

Bianchi, D. W. 2004. Circulating Fetal DNA: It's Origin and Diagnostic Potencial. *Review. Placenta Supplement A, Trophoblast Research*. Vol. 18: 93-101.

Bischoff, F. Z., Lewis, D. E., Simpson, J. L. 2005. Cell-free fetal DNA in maternal blood: Kinetics, source and structure. *Human Reproduction Update*. Vol. 11: 59-67.

Brítez, C., Samudio G.C. 2007. Costo ocasionado por la enfermedad hemolítica del recién nacido por incompatibilidad Rh vs costo de la profilaxis. *Pediatría Asunción Impresa*. Vol. 34: 15-23.

Castro, V.I. 2004. El diagnóstico prenatal de defectos cromosómicos en Costa Rica. *Revista de Biología. Tropical*. Vol. 52: 545-549.

- Cha, R., Thilly, W.G. 1993.** Specificity, Efficiency and Fidelity of PCR. *Genome Research*. Vol. 3:18-29.
- Chan, K.C., Zhan, J., Hui, A.B., Wong N., Lau, T.K., Leung, T.N., Lo, K.W., Huang, D.W., Lo, Y.M. 2004.** Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clinical Chemistry*. Vol. 50: 88-92.
- Chiu, W.K., Poon, L.M., Lau, T.K., Leung, T.N., Wong, M.C., Lo, Y.M. 2001.** Effects of blood-processing protocols on quantification of fetal and maternal DNA in maternal plasma. *Clinical Chemistry*. Vol. 47: 1607-1613.
- Costa, J. 2004.** Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Vol. 22: 299-305.
- Díaz, M.A., Valdes, A., Díaz, D.A. 1997.** Antecedentes y actualidades en el diagnóstico prenatal. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. Vol. 23: 25-30.
- Dussault, A.A., Pouliot, M. 2006.** Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biological Procedures*. Vol. 8: 1-10.
- Guizar, V. J. 2001.** *Genética Clínica*. 3era. ed., Manual Moderno, México: 127-128.
- Halicka, H.D., Bedner, E., Darzynkiewicz, Z. 2000.** Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. *Experimental Cell Research*. Vol. 260: 248-256.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K., Williams, M. 1996.** Real time quantitative PCR. *Genome Research*. Vol. 5: 986-994.
- Honda, H., Ohashi, Y., Ohama, K. 2001.** Successful Diagnosis of Fetal Gender Using Conventional PCR Analysis of Maternal Serum. *Clinical Chemistry*. Vol 47: 41-46.
- Houfflin, D.V., Donnell, H., Overton, T., Bennet, P.R., Fisk, N.M. 2000.** High Sensitivity of Fetal DNA in Plasma Compared to Serum and Nucleated Cells Using Unnested PCR in Maternal Blood. *Fetal Diagnosis and Therapy*. Vol. 15:102-107.
- Jiménez, A. 2007.** Determinación de sexo en las primeras semanas de gestación, utilizando DNA fetal a partir de sangre materna por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Instituto Médica Fértil, Qro/

Universidad Nacional Autónoma de México-FESC. Tesis para obtener el título de licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo.

Johnson, K.L., Dukes, K.A., Vidaver, J., Leshane, E.S., Ramírez, I., Weber, W., Bischoff F.Z., Hahn, S., Sharma, A., Dang, D., Hire, L.M., Bianchi, D.W., Simpson, J.L., Holzgreve, W., Elias, S., Klinger, K. 2004. Interlaboratory comparison of fetal male DNA detection from common maternal plasma samples by real time PCR. *Molecular Diagnostics and Genetics*. Vol. 50: 516-521.

Jorgez, C.J., Dang, D.D., Wapner, R., Farina, A., Simpson, J., Bischoff, F.Z. 2007. Elevated levels of total (maternal and fetal) β -globin DNA in maternal blood from first trimester pregnancies with trisomy 21. *Human Reproduction*. Vol. 22: 2267-2272.

Kolialexi, A., Tsangaris, G.A., Antsaklis, A., Mavrou, A. 2004. Fetal cells in maternal plasma are found in a late state of apoptosis. *Prenatal Diagnosis*. Vol 24: 719-721.

Lee, N. 2008. Microquimerismo. *Investigación y Ciencia*. Vol. 379: 72-79.

Little, M.T., Langlois, S., Wilson, R.D., Lansdorp, P.M. 1997. Frequency of fetal cells in sorted subpopulations of nucleated erythroid and CD341 hematopoietic progenitor cells from maternal peripheral blood. *Blood*. Vol. 89: 2347-2358.

Lo, Y.M., Patel, P., Baigent, N.C., Gillmer, G.M., Chamberlain, P., Trabi, M., Sapietro, M., Wainscoat, J., Fleming, K. 1993. Prenatal sex determination from maternal peripheral blood using the polymerase chain reaction. *Human Genetics*. Vol. 90: 483-488.

Lo, Y.M., Corbetta, N., Chamberlain, P.F., Rai, V., Sargent, I.L., Redman, C.W. 1997. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. Vol. 350: 485-487.

Lo, Y.M., Tein, M.S., Lau, T.K., Haines, J.C., Leung, T.N., Poon, M.K., Wainscoat, S.J., Johnson, J.P., Chang, A.M., Hjelm N.M. 1998. Quantitative Analysis of Fetal DNA in Maternal Plasma and Serum: Implications for Noninvasive Prenatal Diagnosis. *American Journal of Human Genetics*. Vol. 62: 768-775.

Lo, Y.M., Lau, T.K., Zhang, J., Leun T.N., Chang, A.M., Hjelm, N.M, Elmes, S., Bianchi, D.W. 1999. Increased Fetal DNA Concentrations in the Plasma of

Pregnant Women Carrying Fetuses with Trisomy 21. *Clinical Chemistry*. Vol. 45: 1747-1751.

Lo, Y.M., Zhang, J., Leung, T.N., Chang, A.M., Hjelm, N.M. 1999. Rapid Clearance of Fetal DNA from Maternal Plasma. *American Journal of Human Genetics* . Vol. 64: 218-224.

Lo, Y.M., Chiu, W.K. 2007. Prenatal Diagnosis: progress through plasma nucleic acids. *Nature*. Vol. 8: 71-77.

Lucchesi, J.C. 2005. Sex Chromosomes. *Encyclopedia of Life Sciences*. 1-4.

Maron, J.L., Bianchi, D.W. 2007. Prenatal Diagnosis Using Cell-Free Nucleic Acids in Maternal Body Fluids: A Decade of Progress. *American Journal of Medical Genetics*. Vol. 145: 5-17.

Marshall, G.J. 2001. Y-chromosome-linked traits. *Encyclopedia of Life Sciences*.

Mckenzie, S.B. 2000. Hematología clínica. 2da, ed., Manual Moderno, México D.F: 325-327.

Mueller, F.R., Young, D.I. 2001. *Genética Médica*. 10a. ed; Marbán, España: 245-248.

Nollan, T., Handas, R. E., Bustin, S. 2006 Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*. Vol. 1: 1559-1582.

Ohashi, Y., Miharu, N., Honda, H., Samura, O., Ohama, K. 2002. Correlation of Fetal DNA and Human Chorionic Gonadotropin Concentrations in Second-Trimester Maternal Serum. *Clinical Chemistry*. Vol 48: 386-388.

Pernoll, M. 2003. *Manual de Obstetricia y Ginecología*. 5ª. Ed; McGraw Hill, México: 257-258.

Rodríguez, P., Barrera H.A. 2004. La Reacción en Cadena de la Polimerasa a Dos Décadas de su Invención. *Ciencia UANL*. Vol 7: 323-335.

Schröder, J. 1975. Transplacental passage of blood cells. *Journal of Medical Genetics*. Vol. 12: 230-242.

Sohda, S., Arinami, T., Hamanda, H., Nakauchi, H., Hamaguchi, H., Kubo, T. 1997. The proportion of fetal nucleated red blood cells in maternal blood: estimation by FACS analysis. *Prenatal Diagnosis*. Vol. 17: 743-752.

- Smid, M., Galbiati, S., Vassallo, A., Gambini, D., Ferrari, A., Viora, E., Pagliano, M., Restagno, G., Cremonesi, L. 2003.** No Evidence of Fetal DNA Persistence in Maternal Plasma After Pregnancy. *Human Genetics*. Vol. 112: 617-618.
- Smith, B. R., Hosmer W., Feldstein, V.A., Deeks, J., Goldberg, J. 2001.** Second-Trimester Ultrasound to Detect Fetuses With Down Syndrome. *American Medical Association*. Vol. 285:1044-1055.
- Stroun, M., Maurice, P., Vasioukhin, V., Lyautey, J., Lederrey, C., Lefort, F., Rossier, A., Chen, X., Anker, P. 2000.** The Origin and Mechanism of Circulating DNA. *Annals New York Academy Of Sciences*.
- Tong, Y., Lo Y.M. 2006.** Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids. *Clinica Chimica Acta*. Vol. 363:187-196.
- Tsujie, T., Takemura, M., Kimura, T., Shimoya, K., Tsutsui, T., Ogita, K., Ozaki, M., Murata, Y. 2006.** Rapid detection of trisomy 21 by gene dosage analysis using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Journal of Obstetrics and Gynaecology. Res.* Vol. 32:368-372.
- Tyler, S.C. 2007.** Y Chromosome. *Encyclopedia of Life Sciences*. 1-4.
- Valerio, D., Aiello, R., Altieri, V. 1997.** Isolation of fetal erythroid cells from maternal blood based on expression of erythropoietin receptors. *Molecular Human Reproduction*. Vol. 3: 451-455.
- Wataganara, T., Leshane, E., Farina, A., Messerlian, G., Lee, T., Canick, J., Bianchi, D.W. 2003.** Maternal serum cell-free fetal DNA levels are increased in cases of trisomy 13 but not trisomy 18. *Human Genetics*. Vol. 112: 204-208.
- Wataganara, T., Inga, P., Geralyn, M., Lynn, B., Bianchi D.W. 2004.** Inverse Correlation Between Maternal Weight and Second Trimester Circulating Cell-Free Fetal DNA Levels. *Obstetrics and Gynecology*. Vol. 104: 545-550.
- Zhong, X.Y., Holzgreve, W., Hahn, S. 2000.** Detection of fetal Rhesus D and Sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex polymerase chain reaction. *International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. Vol. 107: 766-769.
- Zhong, Y.X., Holzgreve, W., Hahn, S. 2002.** Cell-free fetal DNA in the maternal circulation does not stem from the transplacental passage of fetal erythroblasts. *Molecular Human Reproduction*. Vol. 8: 864-870.
- Zimmermann, B., Holzgreve, W., Wenzel, F., Hahn, S. 2002.** *Clinical Chemistry*. Vol. 48: 362-363.

X. ANEXOS.

ANEXO I

Consentimiento informado

Proyecto: "DETERMINACIÓN DE SEXO FETAL A TRAVÉS DE SANGRE PERIFÉRICA MATERNA A PARTIR DE LA OCTAVA SEMANA DE GESTACIÓN EMPLEANDO PCR TIEMPO REAL"

Responsables: M. en C. Anna Berenice Juárez Espinosa, pQFB Bertha Lizzeth Godoy García y Dr. Rafael Alfonso Sánchez Usabiaga.

Laboratorio Genética, Instituto Médica Fértil, Centro de Investigación para la Salud Reproductiva.

Información preliminar:

El sexo del bebé en gestación es determinado desde el momento de la concepción, pero no es posible detectarlo por métodos sencillos y no invasivos hasta después de las 18 semanas.

Hasta la fecha, la forma común para la determinación del sexo fetal se hace mediante ultrasonido con una edad gestacional óptima de 22 semanas. Dicha determinación es importante debido a que existen enfermedades que se manifiestan de manera selectiva en bebés de sexo masculino o femenino, conocidas como desórdenes ligados al sexo. Cuando una pareja corre el riesgo de heredar este tipo de enfermedades, saber el sexo del bebé de manera temprana es vital con la finalidad de tomar medidas correctivas o preventivas.

Por otra parte, el equipo de trabajo del Instituto Médica Fértil, se ha dado a la tarea de realizar protocolos de estudio para la detección de sexo en fetos a partir de la octava semana de gestación. Esto es posible porque en la sangre de la madre se encuentra circulando DNA fetal y gracias al desarrollo de la biología molecular podemos detectar genes específicos que podrían reflejar si el bebé posee es del sexo masculino o femenino.

Por el momento, el laboratorio de Genética, estamos desarrollando y validando una técnica "no invasiva" para determinar sexo en un feto de 8 semanas de gestación en adelante.

Los resultados obtenidos del estudio permitirán a la pareja estar preparados y tener esta información en etapas muy tempranas del embarazo.

Que se le pide a usted:

La técnica requiere de una muestra de sangre periférica y usted podrá acceder en cualquier momento a la información generada en este estudio.

Las muestras que usted done se usarán exclusivamente para este proyecto y una vez que se termine de trabajar con ellas serán destruidas.

Cuales son los posibles beneficios:

Permitirá ofrecerle la detección de sexo fetal, a partir de la 8ª semana de gestación de sus bebés por una técnica no invasiva.

A que tiene derecho:

- ❖ Usted tiene derecho a obtener toda la información producida en este estudio.
- ❖ A obtener respuestas satisfactorias a todas sus preguntas.
- ❖ La información obtenida en este estudio es confidencial y solo tendrá acceso a esta información el personal de Médica Fértil directamente involucrado con la obtención de los resultados o aquel personal que por su labor deban tener conocimiento de ella.
- ❖ Si usted requiere que sea eliminada su muestra del estudio de investigación solo tendrá que solicitarlo.

“Declaro haber informado a la paciente de todo lo que concierne esta metodología y haber contestado hasta donde me fue posible cada una de sus dudas”

Responsable: _____
Nombre y Firma

Fecha

“Declaro que estoy de acuerdo con la realización del estudio, que entiendo la información contenida en este documento y que cada una de mis dudas ha sido resuelta de manera clara y completa. Por otra parte, me comprometo a confirmar el diagnóstico del sexo en los meses sucesivos o al nacimiento del bebé”

Paciente: _____
Nombre y Firma.

Fecha

ANEXO II

SOLICITUD DE ESTUDIO PARA "DETERMINACIÓN DE SEXO FETAL A TRAVÉS DE SANGRE PERIFÉRICA MATERNA A PARTIR DE LA OCTAVA SEMANA DE GESTACIÓN EMPLEANDO PCR TIEMPO REAL"

Fecha: _____

No. Caso: _____

Nombre: _____

Edad: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Semanas de gestación: _____

Embarazos anteriores. NO _____ SI _____ ¿Cuántos? _____

Sexo de los bebés en embarazos previos

Femenino _____ Masculino _____

Indicaciones:

- La paciente debe presentarse en ayuno de 8 horas.
- La muestra debe ser tomada en dos tubos rotulados perfectamente: uno sin anticoagulante (tapa roja/suero) y otro con anticoagulante con EDTA (tapa lila/ plasma). Centrifugar inmediatamente 10 minutos a 2000 rpm y separa en tubos diferentes el suero y el plasma. Enviar la muestra a -20°C en menos de 3 horas.

Médico Solicitante: _____

Querétaro

Celaya

S.L.P

Externo