



# Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Extracción de DNA fetal libre de células en plasma materno  
usando los cromosomas X y 21 como marcadores de la  
presencia de DNA fetal.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

**Fuentes García Nathali**

DIRECTOR DE TESIS:

**C. a Dra. Rocío Trueba Gómez**

ASESOR INTERNO:

**Dra. Elia Roldán Reyes**

Septiembre de 2014.





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

Tesista:

Nathali Fuentes García

No. de cuenta: 306282951

FES-Zaragoza, UNAM

---

Director de tesis:

C. a Dra. Roció Trueba Gómez

Coordinación de Hematología perinatal del

Instituto Nacional de Perinatología

---

Asesor interno:

Dra. Elia Roldán Reyes

Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis

UNIGEN, FES-Zaragoza, UNAM

Este trabajo se realizó en el Instituto Nacional de Perinatología (INPer) “Isidro Espinosa de los Reyes”, en la Coordinación de Hematología Perinatal bajo la dirección de la C. a Dra. Rocío Trueba Gómez; en colaboración con el Departamento de Genómica Humana.

**INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA**  
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES

22 de Abril de 2013

**Dr. Rodrigo Ayala Yáñez.**  
**Director de Enseñanza.**

PRESENTE


Por medio de éste conducto, me permito comunicarle que la Estudiante en **Biología NATHALI FUENTES GARCÍA** con número de matrícula **306282951** de la **FES Zaragoza** ha sido aceptada en mi grupo de investigación para la realización de su Tesis de Licenciatura con el trabajo "Extracción de DNA fetal libre de células en plasma materno usando los cromosomas 21 y X como marcadores de la presencia de DNA fetal", a cargo de la QBP Rocio Trueba Gómez. En el periodo comprendido del 22 de abril del presente al 22 de abril del 2014, en horario de lunes a viernes de 8:00 a 16:00hrs.

Por lo que le pido se realicen los trámites correspondientes para que se le proporcione la tarjeta de comedor y la credencial.

Sin otro particular por el momento, me despido de usted y quedo para cualquier aclaración que considere pertinente.

ATENTAMENTE

INPer

  
Dr. Hector A. Baptista González  
Coordinador de Hematología Perinatal  
Extensión 287



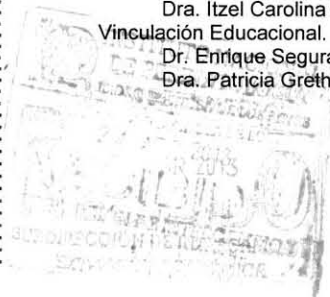
c.c.p. Dr. Manuel Velasco Pasillas. Subdirector de Intercambio y Vinculación.

Dra. Itzel Carolina García Cravioto. Jefe del Departamento de Vinculación Educativa.

Dr. Enrique Segura Cevantes Subdirector de Investigación Clínica

Dra. Patricia Grether González. Jefa del Departamento de Genética

Montes Urales 800  
Col. Lomas Virreyes  
C.P. 31000 México D.F.  
Tel. 5520 9900  
www.inper.mx



*Itzel*



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**

**“ZARAGOZA”**

**DIRECCIÓN**

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que la alumna **FUENTES GARCÍA NATHALI**, con número de cuenta **306282951**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **23 de septiembre de 2014** a las **14:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

**PRESIDENTE** M. en C. CARLOS BAUTISTA REYES

**VOCAL** M. en C. ROCÍO TRUEBA GÓMEZ\*

**SECRETARIO** Dra. ELIA ROLDÁN REYES

**SUPLENTE** Biól. MARÍA CRISTINA ALVARADO DOMÍNGUEZ

**SUPLENTE** M. en C. RODRIGO ANÍBAL MATEOS NAVA

El título de la tesis que presenta es: **Extracción de DNA fetal libre de células en plasma materno usando los cromosomas X y 21 como marcadores de la presencia de DNA fetal.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**

México, D. F., a 29 de junio de 2014

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**

**DIRECTOR**

**ZARAGOZA**

**DIRECCION**

RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL  
JEFE DE CARRERA

## I. Agradecimientos

Mi infinita gratitud a la Universidad Nacional Autónoma de México pero especialmente a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por darme la oportunidad de desarrollarme académica y personalmente.

Agradezco al Instituto Nacional de Perinatología (INPer) “Isidro Espinosa de los Reyes” por permitirme hacer uso de sus instalaciones para mi formación.

A mi directora de tesis la C. a Dra. Rocío Trueba Gómez por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo, por toda su ayuda y gran apoyo pero sobre todo por mantener mi cabeza fría.

A la Dra. Elia Roldán Reyes por los buenos consejos, las grandes enseñanzas y la infinita paciencia.

Al Dr. Héctor Baptista y a las increíbles personas de la Coordinación de Hematología Perinatal: la Dra. Fany Rosenfeld Mann y la Q.F.B. Patricia Bouchan Valencia, por toda la ayuda y el gran apoyo brindados.

A la Dra. Patricia Grether González, jefa del departamento de Genómica Humana por permitirme el uso de su laboratorio.

Y a mis sinodales el M. en C. Carlos Bautista Reyes, la Biól. María Cristina Alvarado Domínguez y el M. en C. Rodrigo Aníbal Mateos Nava; por su ayuda y consejos para que esto quedara mejor.

## II. Dedicatoria

***“Siempre parece imposible, hasta que se hace”***

*Nelson Mandela*

Esta dedicatoria está dividida en seis partes.

A mis padres:

***“Un padre no es el que da la vida, eso sería demasiado fácil, un padre es el que da el amor”***

*Denis Lord*

Fernando Fuentes Campuzano por tu apoyo incondicional, gran esfuerzo, paciencia, amor, por jamás dejarme rendir pero sobre todo por creer en mí. Sin ti no habría podido lograrlo. ¡Te amo!

Raquel García Orozco por enseñarme las cosas más sencillas pero importantes en la vida. ¡Gracias!

A mis hermanas:

***“Cuando dos hermanos trabajan juntos las montañas se convierten en oro”***

*Proverbio chino*

Karla Fuentes García por las madrugadas de tareas, por el apoyo incondicional y ayudarme a ser mejor persona con tus buenos (y también malos) ejemplos. ¡Te quiero muchísimo, Fufa!

Raquel Fuentes García por tu gran apoyo y las miles de cosas que hemos pasado que no terminaría de mencionar (me refiero a las travesuras). ¡Te adoro Memo, pero no voy a caer en tus juegos!



A mi mejor amiga y parabatai:

***“La amistad es una mente en dos cuerpos”***

Mencius

Viridiana Velasco Tapia por todas las batallas que has enfrentado conmigo, por guardar mis secretos, por nunca dejarme sola, por seguir mis locuras, por las buenas y las malas. Me ayuda mucho tenerte. Esta es una grande pero no la última juntas. ¡Por eso y mucho más 1500, manita!

A mi mentor y amigo:

***“Influir sobre una persona es transmitirle nuestra propia alma”***

Oscar Wilde

M. en Biol. Exp. Higinio Estrada Juárez por todo lo que me has enseñado, por la paciencia, los consejos, la ayuda y principalmente por tu amistad. ¡Mil gracias!

A mi equipo de elite:

***“La amistad lo es todo. La amistad vale más que el talento. Vale más que el gobierno. La amistad vale casi tanto como la familia”***

Mario Puzo

Javier Mirón Rivera por ser el hermano que nunca tuve (y no quise tener); por la ayuda y el apoyo incondicional brindados siempre, por hacerme reír en los momentos difíciles y por estar en los cuándo más te necesito... y cuándo no. Sin ti la escuela no habría sido tan divertida. ¡Te quiero muchote mi Javs!

Roberto Bárcenas Villalobos por darme tu amistad, ayuda (mate 1, por ejemplo) apoyo y cruel sinceridad, por muchos de los divertidos recuerdos que tengo, todos los “es por tu bien” y los arbustos en campus 1. ¡Te quiero, mugroso!

Carlos González Montes por ser un buen vecino y gran amigo, sé que puedo contar contigo. Eres mi dosis de locura necesaria para vivir. ¡Te adoro, Miau!

Y a increíbles personas conocidas en el camino:

***“La ciencia no nos ha enseñado aún si la locura es o no lo más sublime de la inteligencia”***

*Edgar Allan Poe*

Arely Salgado, Judith Aviña, Alejandra Millán, Ana Gómez, María del Carmen Sánchez, Alina Guerrero e Isabel Sixtos por su gran amistad e inmenso apoyo. Son las mujeres más increíbles y locas que he conocido. ¡Las quiero mucho, amigas!

M. en C. Mauricio Domínguez y Filiberto Ramírez por brindarme su ayuda y amistad haciendo mi estancia en el INPer mucho más agradable (y en caso de Fili, rápida) ¡Gracias!

### III. Contenido

I.	Agradecimientos .....	VI
II.	Dedicatoria.....	VII
IV.	Índice de Tablas .....	XIII
V.	Índice de Figuras.....	XV
VI.	Lista de Abreviaturas .....	XVII
1.	Resumen.....	19
2.	Introducción .....	20
	Diagnóstico prenatal.....	20
	Diagnóstico prenatal no invasivo.....	21
	Células fetales en sangre materna.....	22
	DNA fetal libre de células.....	23
	Origen del DNA fetal libre de células.....	24
	Métodos utilizados en la extracción del DNA libre de células.....	27
	Diagnóstico del sexo fetal.....	27
	Diagnóstico del factor Rh fetal.....	28
	Diagnóstico de enfermedades monogénicas.....	30
	Polimorfismos Genéticos.....	34
	Usos de los polimorfismos en Genética.....	34
	Secuencias Repetidas en Tandem.....	35
	Cromosoma X.....	36

Cromosoma 21.....	37
3. Planteamiento del problema.....	38
4. Hipótesis del trabajo.....	39
5. Objetivos.....	40
General.....	40
Particulares.....	40
6. Métodos.....	41
Toma de muestra.....	43
Aislamiento del DNA fetal libre de células en plasma materno.....	43
Electroforesis de integridad del DNA fetal libre de células. ....	45
Aislamiento de DNA materno de sangre total. ....	45
Espectrofotometría. ....	46
Determinación de las Secuencias Repetidas en Tandem por electroforesis capilar. ....	47
Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	49
Electroforesis en agarosa.....	50
Electroforesis Capilar.....	51
Análisis de los fragmentos.....	51
Análisis estadístico.....	52
Conflicto de Intereses.....	52
7. Resultados.....	53
Identificación del DNA libre de células en plasma.....	53
DNA Leucocitario.....	59

Identificación de los amplificados de los marcadores X y 21.....	62
Identificación de las variaciones de los marcadores X y 21 mediante electroforesis capilar.....	63
DXS998 .....	63
DXS8061.....	64
DXS1108.....	65
D21S211.....	66
D21S1258.....	67
D21S1887.....	68
8. Discusión .....	71
9. Conclusiones .....	77
10. Perspectivas.....	78
Referencias bibliográficas .....	79
Referencias electrónicas.....	86
Anexo I.....	87
Tablas de frecuencia binomial. ....	87

## IV. Índice de Tablas

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DEL CFFDNA EN PLASMA MATERNO .....	24
TABLA 2. ENFERMEDADES MONOGENICAS ESTUDIADAS A PARTIR DE DNA FETAL EN PLASMA MATERNO [62]. .....	31
TABLA 3. ANEUPLOIDÍAS HUMANAS MÁS FRECUENTES. ....	32
TABLA 4. MARCADORES PARA LOS CROMOSOMAS X Y 21. ....	48
TABLA 5. DESCRIPCIÓN ESTADÍSTICA DEL COMPORTAMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CFDNA. ....	54
TABLA 6. DESCRIPCIÓN ESTADÍSTICA DEL COMPORTAMIENTO DE LA RELACIÓN 260/280 DEL CFDNA. ....	56
TABLA 7. DESCRIPCIÓN ESTADÍSTICA DEL COMPORTAMIENTO DE LA RELACIÓN 260/230 DE CFDNA. ....	57
TABLA 8. CUANTIFICACIÓN DE MUESTRAS TRATADAS CON RNASA .....	58
TABLA 9. DESCRIPCIÓN ESTADÍSTICA DEL COMPORTAMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE DNA MATERNO. ....	60
TABLA 10. CONCENTRACIÓN, RELACIÓN 260/280 Y RELACIÓN 260/230. ....	61
TABLA 11. PROPORCIONES DE MARCADOR DXS998. ....	63
TABLA 12. PROPORCIONES DE MARCADOR DXS8061. ....	64
TABLA 13. PROPORCIONES MARCADOR DXS1108. ....	65
TABLA 14. PROPORCIONES MARCADOR D21S211. ....	66
TABLA 15. PROPORCIONES MARCADORES D21S1258. ....	67
TABLA 16. PROPORCIONES MARCADOR D21S1887. ....	68
TABLA 17. CONCORDANCIA ENTRE DNA LEUCOCITARIO MATERNO Y CFDNA DE PLASMA. ....	69
TABLA 18. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS SOBRE EL SEXO DE LOS FETOS. ....	70

<i>TABLA 19. CONCORDANCIA ENTRE DNA LEUCOCITARIO MATERNO Y CFDNA DE PLASMA OMITIENDO EL MARCADOR DXS998.....</i>	<i>87</i>
<i>TABLA 20. CONCORDANCIA ENTRE DNA LEUCOCITARIO MATERNO Y CFDNA DE PLASMA OMITIENDO EL MARCADOR DXS8061.....</i>	<i>88</i>
<i>TABLA 21. CONCORDANCIA ENTRE DNA LEUCOCITARIO MATERNO Y CFDNA DE PLASMA OMITIENDO EL MARCADOR DXS1108.....</i>	<i>89</i>
<i>TABLA 22. CONCORDANCIA ENTRE DNA LEUCOCITARIO MATERNO Y CFDNA DE PLASMA OMITIENDO EL MARCADOR D21S211.....</i>	<i>90</i>
<i>TABLA 23. CONCORDANCIA ENTRE DNA LEUCOCITARIO MATERNO Y CFDNA DE PLASMA OMITIENDO EL MARCADOR D21S1258.....</i>	<i>91</i>
<i>TABLA 24. CONCORDANCIA ENTRE DNA LEUCOCITARIO MATERNO Y CFDNA DE PLASMA OMITIENDO EL MARCADOR D21S1887.....</i>	<i>92</i>

## V. Índice de Figuras

FIGURA 1. EL ESPACIO INTERVELLOSO O CÁMARA HEMÁTICA:.....	25
FIGURA 2. MICROGRAFÍA DE NUDOS SINCISIALES EN PLACENTA DE 35 SEMANAS. H&E 400X. .	26
FIGURA 3. PRINCIPIOS DEL ANÁLISIS DEL DNA FETAL CIRCULANTE EN PLASMA MATERNO: .....	26
FIGURA 4. EL ANTICUERPO ANTI-D SE DEBE DAR A LAS MUJERES RH-NEGATIVO EMBARAZADAS DE UN RH-POSITIVO. ....	30
FIGURA 5. ANÁLISIS DEL TAMAÑO DE LOS DIFERENTES ALELOS FETALES SEGÚN EL ORIGEN PARENTAL. ....	36
FIGURA 6. DIAGRAMA DE FLUJO DE TRABAJO. ....	42
FIGURA 7. MUESTRAS SANGUÍNEAS.....	43
FIGURA 8. PLASMA SANGUÍNEO MATERNO PARA EXTRACCIÓN DE CFDNA. ....	45
FIGURA 9. ESPECTROFOTÓMETRO ACTGENE ASP-3700.....	47
FIGURA 10. MAPA DE POSICIÓN DE LOS MARCADORES EN LOS CROMOSOMAS 21 Y X. ....	49
FIGURA 11. CORRIDA DE PCR EN UN MASTERCYCLE GRADIENT EPPENDORF. ....	50
FIGURA 12. SECUENCIADOR ABI3130.....	51
FIGURA 13. ESQUEMA DE ELECTROFEROGRAMA. ....	52
FIGURA 14. DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS DE LA CONCENTRACIÓN DE DNA OBTENIDO EN PLASMA EMBARAZADAS Y CONTROLES.....	54
FIGURA 15. GEL DE AGAROSA AL 4% PARA ANALIZAR LA INTEGRIDAD DE LAS MUESTRAS. ....	55
FIGURA 16. DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS DE LA RELACIÓN 260/280 DE DNA OBTENIDO EN PLASMA DE EMBARAZADAS Y CONTROLES.....	56
FIGURA 17. DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS DE LA RELACIÓN 260/230 DE DNA OBTENIDO EN PLASMA DE MUJERES EMBARAZADAS Y CONTROLES. ....	57
FIGURA 18. EJEMPLOS DE GRÁFICA DE CUANTIFICACIÓN DE ABSORBANCIA; .....	58



<i>FIGURA 19. DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS DE LA CONCENTRACIÓN DE DNA LEUCOCITARIO</i>	
<i>MATERNO.....</i>	<i>60</i>
<i>FIGURA 20. GEL DE INTEGRIDAD DE AGAROSA AL 4%.....</i>	<i>61</i>
<i>FIGURA 21. EJEMPLIFICACIÓN DE AMPLIFICADOS DE LOS MARCADOR DEL CROMOSOMA X (A) Y</i>	
<i>21 (B).....</i>	<i>62</i>

## VI. Lista de Abreviaturas

**DPNI:** Diagnóstico prenatal no invasivo

**DPI:** Diagnóstico prenatal invasivo

**DPGNI:** Diagnóstico prenatal genético no invasivo

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**RNA:** Ácido ribonucleico

**cffDNA:** Ácido desoxirribonucleico fetal libre de células (cell free fetal desoxirribonucleic acid)

**pb:** Pares de bases

**SRY:** Región determinante del sexo (sex-determining region Y)

**HDFN:** Enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido

**QF-PCR:** Fluorescencia cuantitativa de PCR (Quantitative fluorescence PCR)

**STR:** Secuencias repetidas en tándem (Short tandem repeat)

**mRNA:** Ácido ribonucleico mensajero

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**TE:** Hidroximetil aminometano – Etilendiaminotetraacético

**TAE:** Hidroximetil aminometano – Ácido acético – Etilendiaminotetraacético

**cfDNA:** Ácido desoxirribonucleico libre de células (cell free desoxirribonucleic acid)

**NCBI:** Centro nacional para la información biotecnológica (National center for biotechnology information)

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)

**DNAsas:** Enzima nucleasa

**UDO:** Unidades de densidad óptica

**RNAasa:** Enzima ribonucleasa

**EHRN:** Enfermedad hemolítica del recién nacido

**CVS:** Velloosidades coriónicas

## 1. Resumen

**Introducción:** El diagnóstico prenatal nace de la necesidad de poder acceder al feto en la búsqueda de alteraciones cromosómicas. El descubrimiento del DNA fetal libre de células en plasma materno (cffDNA) ha permitido el uso de nuevas técnicas no invasivas.

**Objetivo:** Extraer y diferenciar DNA fetal libre de células a partir de plasma materno para el diagnóstico prenatal no invasivo. **Material y método:** Para el presente estudio se obtuvieron 23 muestras de DNA leucocitario y 20 de DNA libre de células en plasma materno (cfDNA), se amplificaron por PCR punto final secuencias repetidas en tándem que posteriormente fueron identificadas por electroforesis capilar. **Resultados:** Fue posible diferenciar 14 muestras, usando marcadores de los cromosomas X y 21. Se confirmó el sexo del producto al nacimiento en 10 casos. La certidumbre en la diferenciación del cfDNA del DNA materno fue del 0.857. **Conclusiones:** Podemos decir que con 6 marcadores de 2 cromosomas distintos es posible diferenciar hasta con un 85% de certidumbre el DNA fetal del materno, inclusive en aquellos casos en que no fue concordante estadísticamente fue posible diferenciarlos con el sexo al nacimiento.

## 2. Introducción

El diagnóstico prenatal nace de la necesidad de poder acceder al feto en la búsqueda de alteraciones sistémicas, metabólicas, morfológicas y cromosómicas que se presentan entre el 3 y el 6% de todos los fetos <sup>[1]</sup>, durante mucho tiempo ha sido realizado por métodos invasivos los cuales son la base para el avance de nuevas técnicas no invasivas como el descubrimiento del DNA fetal libre de células en el plasma de la madre.

### Diagnóstico prenatal.

El análisis de los cromosomas ha sido la herramienta más aceptada para el estudio genético en el diagnóstico prenatal. La cantidad de cromosomas humanos en células somáticas fue establecida en 1956 por Tjio y Levan. Se compone de 22 pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales ( $2n=46,XX$  y  $2n=46,XY$ ). Esto dio lugar al nacimiento de la citogenética humana, permitiendo determinar el ordenamiento de los cromosomas de acuerdo a su tamaño y localización del centrómero, llamándolo cariotipo <sup>[2]</sup>.

En 1956 Fuch y Riis determinaron por primera vez el sexo del feto mediante la investigación de la cromatina X en líquido amniótico <sup>[3]</sup>. Posteriormente los avances en las técnicas citogenéticas y la determinación del cariotipo humano permitieron a Funch y Philips realizar los primeros cultivos celulares del líquido amniótico. De esta forma se logran, entre 1965 y 1966, los primeros cariotipos fetales a partir de líquido amniótico <sup>[4]; [5]</sup>, y dos años después se realiza el primer diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas <sup>[6]</sup>.

En 1983 las vellosidades coriales fueron utilizadas por primera vez para la identificación de anomalías cromosómicas <sup>[7]: [8]</sup>, estas técnicas de muestreo siguen siendo utilizadas hasta hoy en día, para la realización del cariotipo.

### **Diagnóstico prenatal no invasivo.**

El Diagnóstico prenatal no invasivo (DPNI) igual que el invasivo busca obtener información sobre posibles alteraciones en el feto pero sin ser riesgoso, ya que el diagnóstico prenatal invasivo (DPI) puede inducir pérdida gestacional hasta en 1% de los casos <sup>[9]</sup>.

Dentro de los métodos de DPNI está el ultrasonido, que ha sido utilizado desde 1940 como método diagnóstico de malformaciones fetales, tiene una sensibilidad del 60% <sup>[10]; [11]</sup>, aunque no está contemplado como parte del protocolo oficial de control prenatal que se realiza a las mujeres embarazadas cuya gestación sea de bajo riesgo obstétrico.

Los avances en el campo de DPNI se basan en mejorar las técnicas existentes y desarrollar nuevas, intentando reducir los riesgos tanto para la madre como para el feto, y mejorar la eficacia que presentan.

Existen dos tipos de estudios diferentes en el Diagnóstico prenatal genético no invasivo (DPGNI):

- El estudio de células fetales circulantes en sangre materna.
- El estudio de ácidos nucleicos fetales libres (DNA fetal y RNA fetal) circulantes en sangre materna.

## Células fetales en sangre materna.

Desde hace más de un siglo se sabe que las células fetales pueden atravesar las barreras vasculares y encontrarse en la circulación materna, el sitio básico de intercambio en la placenta es el espacio intervilloso, donde la sangre materna contacta con el tejido fetal; el constante movimiento de sangre, a través de este sitio depende de la presión que entra al sitio. La vasoconstricción de los vasos uterinos y los cambios en la presión intrauterina alteran la presión de perfusión placentaria favoreciendo este intercambio. En mujeres saludables se encuentra una frecuencia baja de una célula fetal en 10 millones de eritrocitos <sup>[12]</sup>, <sup>[13]</sup>. Entre las células circulantes que se han estudiado se encuentran los eritrocitos, las células sanguíneas progenitoras y el trofoblasto <sup>[14]</sup>; <sup>[15]</sup>. Los trabajos sobre métodos de aislamiento, enriquecimiento y análisis de células fetales permitieron realizar diversos estudios prenatales como la determinación del sexo fetal <sup>[16]</sup>, mosaísmos confinados a la placenta <sup>[17]</sup>, aneuploidías fetales <sup>[18]</sup> y diagnóstico de enfermedades de herencia mendeliana <sup>[19]</sup>.

En la actualidad el uso de las células fetales en sangre materna ha pasado a un segundo plano dentro del DPGNI debido al descubrimiento de DNA y RNA fetal libre de células en sangre materna <sup>[10]</sup>; <sup>[11]</sup>.

Las principales razones para desestimar el uso de las células fetales para realizar un DPGNI son el escaso número de células fetales, una metodología requerida para el estudio de las células fetales es compleja, tediosa y costosa. Los eritroblastos fetales presentan un tamaño específico que les permite quedar retenidos en un sistema de filtros. Por sus características, el eritroblasto fetal primitivo es la célula más utilizada para el diagnóstico prenatal no invasivo en el primer trimestre, se trata de una célula nucleada, por lo que contiene la información genética del feto, no se encuentra en la sangre de adultos sanos, pero sí en la fetal a partir de la octava semana de gestación, y su vida

media corta (aproximadamente 30 días), hace improbable el aislamiento de eritroblastos de embarazos previos. Aproximadamente la mitad de los eritroblastos existentes en sangre materna son de origen materno <sup>[20]</sup>.

### DNA fetal libre de células.

El DNA fetal libre de células (Cell-free fetal DNA, cffDNA) en el plasma y el suero de mujeres embarazadas fue descubierto en 1997 por Lo y Corbetta, esto dio paso a nuevas posibilidades para el DPNI <sup>[21]</sup>. Los tumores y el tejido placentario tienen una gran similitud, ambos son elementos invasivos que se reproducen rápidamente; en estudios realizados en plasma de mujeres embarazadas que padecían cáncer se planteó la existencia de DNA libre de células procedentes del tumor, sin embargo, también observaron la presencia de DNA fetal, que posteriormente confirmaron mediante la detección de secuencias específicas del cromosoma Y en plasma y suero de gestantes con un feto varón, obteniendo una sensibilidad de detección del 80% en plasma y 70% en suero <sup>[21]; [22]; [23]</sup>.

A partir del día 18 de la gestación el cffDNA está presente en el plasma materno y se incrementa a medida que la gestación avanza, representa alrededor del 3% del DNA total en estadios tempranos y un 6% al término (**Tabla 1**) <sup>[24]; [25]; [26]; [27]</sup>. Las estimaciones más recientes se basan en el uso de epigenética y/o diferencias entre el DNA de la madre y del feto, se lleva a cabo entre las 10 y 20 semanas de gestación <sup>[28]; [29]</sup>. Después del parto el cffDNA se elimina rápidamente del plasma materno <sup>[30]</sup>.



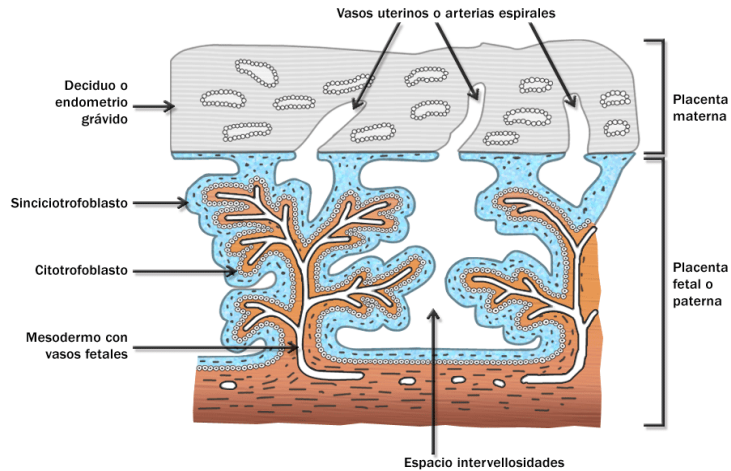
*Tabla 1. Características principales del cffDNA en plasma materno*

Origen trofoblástico
Escasa concentración (3-6 %)
Coexistencia con DNA libre de origen materno
Fragmentado
Aumenta a lo largo de la gestación
Aumenta en gestaciones con determinadas patologías
Desaparece tras el alumbramiento

### Origen del DNA fetal libre de células.

Se han propuesto diversos mecanismos responsables de la presencia del cffDNA circulante en sangre materna. Una de las primeras hipótesis sostenía que este DNA podía proceder de la apoptosis de las células hematopoyéticas fetales existentes en sangre materna. Esta idea surgió tras un estudio que reveló la existencia de marcadores apoptóticos en aproximadamente el 40% de las células fetales que se aislaron a partir de sangre materna <sup>[31]</sup>. Esta primera hipótesis fue sustentada por el hecho de que la apoptosis en sangre materna se acentúa con la edad gestacional y con la presencia de aneuploidías en el feto fenómenos que justificarían el aumento de cffDNA <sup>[27]; [32]; [33]; [34]</sup>.

Una segunda hipótesis plantea que el origen del cffDNA es resultado de la apoptosis de células trofoblástica, el cual es liberado al espacio intervilloso llegando a la circulación materna, desapareciendo rápidamente tras el parto. La placenta, con su gran tamaño e intensa actividad celular fetal, es una posible fuente de DNA (**Figura 1**) <sup>[30]</sup>.



*Figura 1. El espacio intervelloso o cámara hemática:*

*Es una gran laguna sanguínea (de sangre materna) presente en la placenta, rodeando las vellosidades trofoblásticas que contienen los vasos sanguíneos del feto. Las vellosidades están separadas de los espacios intervellosos por la membrana placentaria de tal manera que solo ciertos componentes de la sangre materna y fetal se entremezclan. Las arterias y venas maternas entran directamente a los espacios intervellosos al transcurrir unas 8 semanas de gestación y las cámaras hemáticas se forman y unen entre sí al cabo de la semana <sup>[30]</sup>.*

En 2005 Tjoa encontró, en un modelo ex vivo, una relación directa entre la apoptosis y la necrosis del trofoblasto y la liberación de DNA, lo cual sugiere que el trofoblasto es la fuente de buena parte del DNA circulante <sup>[35]</sup>.

En condiciones normales, el sincitiotrofoblasto viejo o en malas condiciones sale hacia la circulación materna como nudos sincitiales que los pulmones filtran y remueven. Este sufre apoptosis antes de salir a la circulación <sup>[36]</sup>. La tasa de fusión sincitial excede la requerida para el crecimiento de las vellosidades y, en consecuencia, se liberan diariamente más de tres gramos de sincitiotrofoblasto en el tercer trimestre en la circulación materna (**Figura 2**) <sup>[37]</sup>.

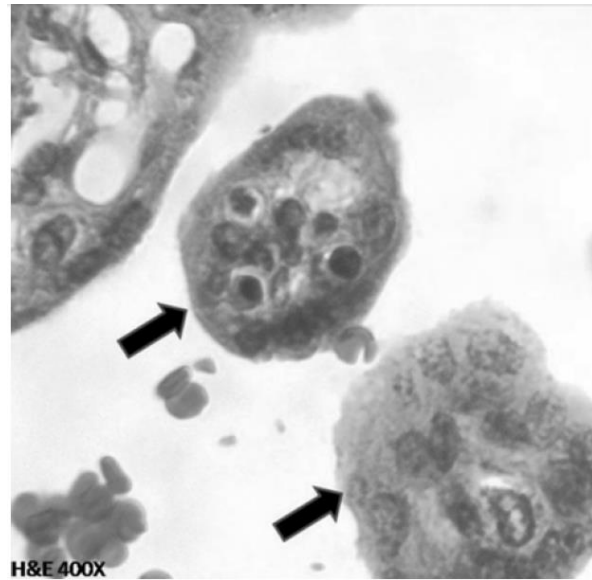


Figura 2. Micrografía de nudos sincisiales en placenta de 35 semanas <sup>[36]</sup>.

Se ha observado la existencia de productos de transcripción de genes de expresión placentaria en plasma materno, lo que sugiere que la presencia de DNA fetal se origina después de que la placenta se haya formado pero antes de la formación del sistema circulatorio fetal (**Figura 3**) <sup>[24]; [38]; [39]</sup>.

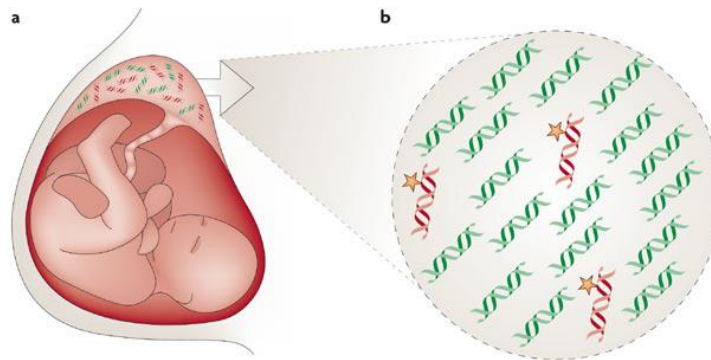


Figura 3. Principios del análisis del DNA fetal circulante en plasma materno:  
a) Liberación de DNA fetal al torrente sanguíneo materno a través de la placenta. b) En el plasma materno las moléculas de DNA fetal se encuentran en menor proporción que el DNA materno. Los alelos fetales específicos de origen paterno (estrella), que no están presentes en el DNA materno, son las secuencias más fácilmente detectables <sup>[40]</sup>.

## **Métodos utilizados en la extracción del DNA libre de células.**

Uno de los primeros trabajos se basó en el descubrimiento de fragmentos de menor tamaño del cffDNA comparado con los del materno <sup>[41]</sup>. Más del 99% del cffDNA circulante en sangre materna tiene un tamaño inferior a los 313 pb como máximo pero mayor a 145 pb mientras que los fragmentos de DNA materno son significativamente de mayor longitud <sup>[41]; [42]; [43]</sup>. Esta diferencia en la longitud de los fragmentos de DNA de ambos orígenes se ha empleado para la separación y enriquecimiento de las moléculas de cffDNA mediante distintos métodos. En geles de agarosa, la separación de fragmentos se realiza en función del tamaño <sup>[43]</sup>. En cuanto al uso de polvo de cristal o columnas de silica, permite protocolos rápidos y eficientes, este logro técnico se correlaciona con un incremento de costos en los procedimientos de purificación puesto que las columnas de silica utilizadas hoy en día son de alta tecnología. Otros ensayos comerciales de purificación de DNA por columnas se basan en la afinidad de las membranas por las moléculas pequeñas <sup>[44]; [45]</sup>.

Otro método de enriquecimiento propone la adición de formaldehído en el tubo de muestra de sangre materna lo que aumenta la proporción de cffDNA al evitar la lisis de las células maternas y por tanto la liberación de su DNA al plasma <sup>[46]</sup>.

Otra vía alterna para la discriminación del cffDNA y el de origen materno, es la posibilidad de utilizar las diferencias de metilación en secuencias específicas del feto <sup>[39]; [47]; [48]; [49]; [50]</sup>.

## **Diagnóstico del sexo fetal.**

El primer marcador desarrollado para la detección de cffDNA en plasma materno fue el cromosoma Y que se ha encontrado en la sangre materna desde el día 14 posconcepción, la secuencia SRY está presente solo en los fetos masculinos, este método ha sido muy preciso para la determinación del sexo fetal, que es útil para la

investigación prenatal de enfermedades ligadas al sexo. Este dato sorprende cuando se considera que la circulación fetoplacentaria no se establece sino al día 28 posconcepción; para esa fecha el 80% de las mujeres ya tienen cfDNA circulando en la sangre [21]; [25]; [51]; [52]; [53]; [54]; [55].

El conocimiento del sexo fetal, a partir del análisis de secuencias específicas de ADN fetal del cromosoma Y, en estadios tempranos de la gestación es un dato relevante en embarazos con riesgo de alguna enfermedad ligada al sexo como son, entre otras, la distrofia muscular de Duchenne, hemofilia, distrofia muscular de Becker, hiperplasia adrenal congénita, enfermedad de Norrie, retinosquiasis y retinosis pigmentaria ligada al cromosoma X [56]. Mediante la determinación del sexo fetal en sangre materna se puede suprimir el diagnóstico prenatal convencional en el 50% de estas gestaciones, lo que implicaría la supresión del riesgo de pérdida fetal asociado a las técnicas obstétricas invasivas [57].

### **Diagnóstico del factor Rh fetal.**

El grupo sanguíneo Rh, antígeno D también es conocido como polipéptido Rh 1 (RhPI) o grupo de diferenciación 240D (CD240D) que se refiere al gen RHD que codifica para una proteína presente en la membrana de los eritrocitos que en los humanos es el factor Rh de antígenos del sistema de grupos sanguíneos Rh [58].

Este es uno de los sistemas de grupos sanguíneos más importantes y complejos debido al gran número de antígenos y las complicaciones graves para el feto de una mujer sensibilizado por transfusión o embarazo [58].

La inmunización relacionada con el embarazo en contra del antígeno D en las células rojas de la sangre que es la principal causa de la enfermedad hemolítica del feto y del

recién nacido (HDFN), una enfermedad que se caracteriza por una anemia fetal, hidrops fetal, ictericia, ictericia nuclear y muerte intrauterina <sup>[59]</sup>.

El análisis de cfDNA en plasma materno también es útil para la determinación prenatal no invasiva del grupo sanguíneo RhD en mujeres embarazadas RhD negativo lo cual ayuda al diagnóstico correcto y seguimiento de un feto Rh positivo <sup>[25]; [60]</sup>, determinando así la necesidad de un tratamiento profiláctico prenatal con inmunoglobulina anti-D.

Pilgrim y colaboradores han estimado que la reducción de riesgo de inmunización después del tratamiento profiláctico prenatal es del 66% (**Figura 4**) <sup>[61]</sup>.

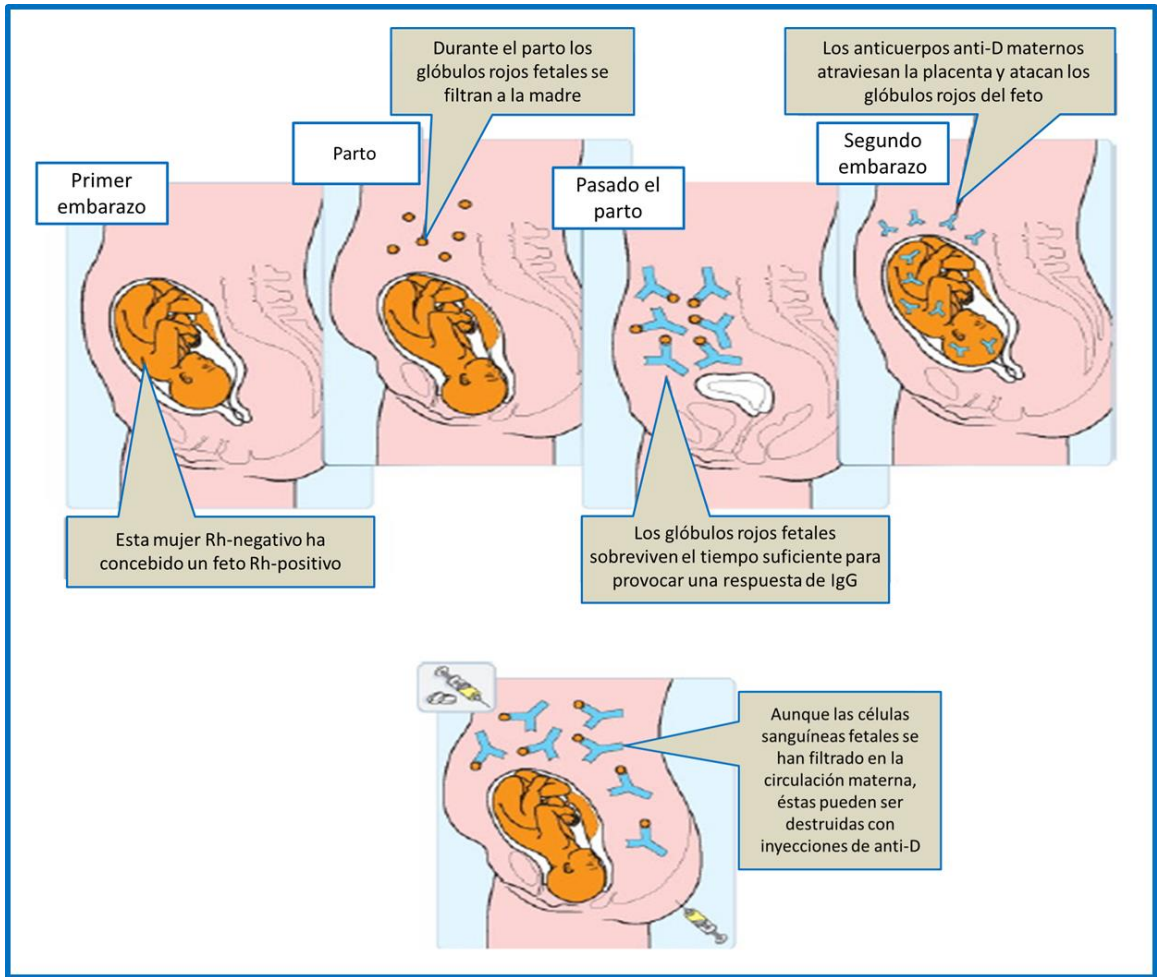


Figura 4. El anticuerpo anti-D se debe dar a las mujeres Rh-negativo embarazadas de un Rh-positivo. El anti-D destruye las células fetales Rh-positivo en el torrente sanguíneo de la madre antes de que ella tenga la oportunidad de hacer su propio anti-D, lo que puede afectar el siguiente embarazo. El anti-D es un tipo de inmunoterapia pasiva y puede prevenir la enfermedad hemolítica del recién nacido cuando se usa apropiadamente<sup>[61]</sup>.

### Diagnóstico de enfermedades monogénicas.

El cfDNA está siendo utilizado en el diagnóstico de diversas enfermedades de herencia mendeliana (**Tabla 2**). Dada la existencia de DNA de origen materno en la muestra de plasma, estos estudios se han limitado a la detección de defectos congénitos de herencia paterna o de novo.

Tabla 2. Enfermedades monogénicas estudiadas a partir de DNA fetal en plasma materno [62].

Enfermedad	Técnica empleada	Referencia bibliográfica
<i>Acondroplasia</i>	Análisis de restricción MALDI-TOF MS	Li, et al. 2007.
<i>Beta-talasemia</i>	PCR Tiempo Real Espectrometría de masas PNA-Clamp PCR	Chiu, et al. 2002.
<i>Hiperplasia adrenal congénita</i>	PCR fluorescente-SNPs	Chiu et al. 2002.
<i>Corea de Huntington</i>	QF-PCR	Bustamante-Aragones, et al. 2008.
<i>Fibrosis Quística</i>	Análisis de restricción Minisequenciación	Bustamante-Aragones, et al. 2008.
<i>Hb Lepore</i>	PCR Standard específica de alelos	Lazaros, et al. 2006.
<i>Distrofia Miotónica</i>	PCR anidada	Amicucci, et al. 2000
<i>Distrofias de Retina</i>	Secuenciación automática dHPLC	Bustamante-Aragones, et al. 2006.
<i>Acidemia propiónica</i>	Minisequenciación	Bustamante-Aragones, et al. 2006.

De los grandes objetivos del DPNI también está la posibilidad de detectar aneuploidías fetales tales como el síndrome de Down (trisomía 21), síndrome de Patau (trisomía 13), síndrome de Edwards (trisomía 18) o aneuploidías de los cromosomas sexuales como son, entre otros, el síndrome de Turner (monosomía del X) o el síndrome de Klinefelter (varones XXY), estas alteraciones representan alrededor del 90%. La coexistencia del cfDNA y DNA materno, junto con el hecho de que la mayoría de las aneuploidías son de origen materno, ha dificultado la diferenciación entre cromosomas fetales y maternos lo que ha representado durante mucho tiempo un gran obstáculo, sin embargo existen



técnicas como la QF-PCR que permiten identificar el DNA fetal por medio de las variaciones en el tamaño de los fragmentos amplificados. Estas alteraciones pueden ser numéricas o estructurales, que afectan a uno o a varios cromosomas y son una de las causas más frecuentes de muerte perinatal y discapacidad infantil, **Tabla 3**<sup>[63]</sup>.

*Tabla 3. Aneuploidías humanas más frecuentes*<sup>[63]</sup>.

Alteración	Síndrome	Frecuencia	Cuadro clínico
<b>Trisomía 21</b>	Down	1.5 / 1,000 nacidos	Retraso mental. Braquicefalia. Rasgos faciales mongoloides. Alteraciones diversas (oculares, cardíacas, etc.).
<b>Trisomía 18</b>	Edwads	1 / 6,766	Deficiencia mental profunda. Malformaciones renales y cardíacas.
<b>Trisomía 13</b>	Patau	1 / 4,600	Deficiencia mental profunda. Malformaciones cardíacas, genitales, cerebrales y dactilares.
<b>XXX(mujeres)</b>	Triple X	1 / 1,000	Retraso mental moderado. Alteraciones neuropsíquicas.
<b>X0 (mujeres)</b>	Turner	0.3 / 1,000	Genitales infantiles. Esterilidad. Estatura baja
<b>XXY (varones)</b>	Klinefelter	1.4 / 1,000	Genitales pequeños. Falta de espermatogénesis. Retraso mental moderado
<b>XYY (varones)</b>	Duplo Y	1 / 2,000	Trastornos de conducta (agresividad). Estatura elevada.

Se ha descrito el aumento de la cantidad de cfDNA total en plasma materno en algunas situaciones patológicas, como en Preeclampsia<sup>[64]</sup>, retraso en crecimiento intrauterino<sup>[65]</sup>, polihidramnios<sup>[66]</sup>, abortos espontáneos<sup>[67]</sup> o parto pretérmino<sup>[68]</sup>, hiperemesis gravídica

<sup>[52]</sup>, embarazos con placenta invasiva <sup>[69]</sup>, y en algunas aneuploidías como la trisomía 13 <sup>[70]</sup> y la 21 <sup>[64]</sup>, aunque Hromadnikova y colaboradores en el 2002 presenta datos contradictorios <sup>[71]</sup>.

Incluso ahora solamente se sabe sobre la incorporación de este método de diagnóstico a la práctica clínica en países del primer mundo como: Inglaterra, Dinamarca, Canadá, algunos otros países de Europa <sup>[56]; [57]; [72]</sup> y Estados Unidos.

Es de esperar que cuando este DPNI sea posible en países tercermundistas muchas parejas que actualmente no recurren al diagnóstico genético prenatal por temor al riesgo del procedimiento y en mayor medida por el alto costo, solicitarán el análisis. Se pretende que este método revele la existencia de un cromosoma extra en el feto, específicamente trisomía 21 o 18, que son las más comunes <sup>[63]</sup>.

La secuenciación de siguiente generación permitió a Fan y colaboradores en el 2008 demostrar que el DNA fetal proveniente de los cromosomas 21 y 18, es cuantitativamente diferente del resto de los cromosomas en muestras de plasma materno <sup>[73]</sup>.

Las sociedades profesionales, como la Sociedad Internacional de Diagnóstico Prenatal, <sup>[74]</sup> Sociedad Nacional de Consejeros Genéticos, <sup>[75]</sup> y el Colegio Americano de Obstetricia y Ginecología (The American College of Obstetricians and Gynecologists committee on genetics, the Society for Maternal-Fetal Medicine publications committee 2012) describen a las pruebas realizadas con cffDNA como altamente sensible a la identificación de aneuploidías pero que requieren una confirmación por cariotipo que es el estándar de oro. Estas organizaciones ratifican, el ofrecimiento de la prueba con el uso de cffDNA aunque no es recomendado hacerlo de manera indiscriminada, pues por el momento sólo es recomendado a mujeres con embarazo de alto riesgo como las mujeres con edad materna avanzada o que tienen anomalías en el ultrasonido. Sin embargo, existe un reciente

avance hacia la validación clínica de la prueba de aneuploidías en las mujeres con embarazo de bajo riesgo <sup>[76]</sup>, es probable que las pruebas con cfDNA sean ofrecidas cada vez más a todas las mujeres embarazadas en los próximos años. De hecho, las normas más recientes del Colegio Americano de Genética Médica no discriminan entre "poblaciones de alto riesgo" y "poblaciones de bajo riesgo", a pesar de que siguen recomendando pruebas invasivas confirmatorias para el diagnóstico definitivo.

### **Polimorfismos Genéticos.**

Gran cantidad de genes se caracterizan por tener un número relativamente común de alelos, que permiten clasificar a los miembros de una población originada naturalmente dentro de fenotipos finamente distinguibles. Un polimorfismo genético se define cuando un gen tiene múltiples alelos y donde al menos dos de ellos tienen frecuencias mayores al 1% entre la población y cuando la frecuencia de heterocigotos en la población es de al menos 2%. No obstante, debido a que muchos loci polimórficos se caracterizan por tener un alto número de alelos diferentes, la proporción de heterocigotos es mucho mayor. A los alelos con frecuencias menores de 1% se le llaman variantes raras <sup>[77]</sup>.

### **Usos de los polimorfismos en Genética**

Los polimorfismos se utilizan como marcadores genéticos que permiten distinguir el patrón de herencia de un gen en estudios familiares.

Tienen aplicación práctica en:

- a) Localización y mapeo de genes en cromosomas individuales mediante estudios de análisis de ligamiento.

- b) El diagnóstico presintomático y prenatal, así como en la detección de portadores (heterocigotos) de enfermedades genéticas.
- c) La evaluación del riesgo en personas con predisposición a desórdenes como: enfermedades coronarias, cáncer y diabetes, entre otras.
- d) Estudios de paternidad, forenses y casos de inmigración.
- e) Establecer la compatibilidad donador-receptor para realizar trasplantes de tejidos y órganos.
- f) La identificación de gemelos idénticos <sup>[77]</sup>.

### Secuencias Repetidas en Tandem.

La identificación entre dos DNA distintos puede realizarse mediante el análisis de secuencias de longitud variable, específicas para cada especie y únicas en cada individuo. Estas secuencias repetidas en tandem o STR (short tandem repeat) son secuencias cortas de DNA, normalmente con una longitud de 2 a 5 pares de bases, que se repiten muchas veces de forma consecutiva, cabeza con cola; por ejemplo, la secuencia de 16 pb "GATAGATAGATAGATA" representaría 4 copias dispuestas cabeza con cola del tetrámero "GATA". Los polimorfismos en STR se deben al distinto número de copias del elemento repetido que puede aparecer en una población de individuos <sup>[78]</sup>. Los marcadores STR autosómicos se emplean convencionalmente para determinar parentescos. Sin embargo, la existencia de casos complejos o no concluyentes requiere tener en cuenta un amplio número de marcadores autosómicos o el análisis de marcadores sobre los cromosomas sexuales X o Y.

Una estrategia que se está desarrollando actualmente para solucionar las limitaciones ha sido la cuantificación de secuencias específicas del feto para después poder compararlas con las secuencias de origen materno. Para esto se han empleado mRNA expresados en

la placenta o STR localizados en los cromosomas de los que se cree una posible aneuploidía.

La variante de origen paterna es un marcador del DNA fetal. Para este diagnóstico es importante la búsqueda de un STR para el que ambos progenitores sean homocigotos de una variante diferente, lo que limita el estudio. Los dos cromosomas sexuales, el X y el Y, divergieron de un solo autosoma hace aproximadamente 300 millones años, de hecho, aún tienen homología y recombinan entre sí cerca de sus extremos, en las dos regiones pseudoautosomal (**Figura 5**).

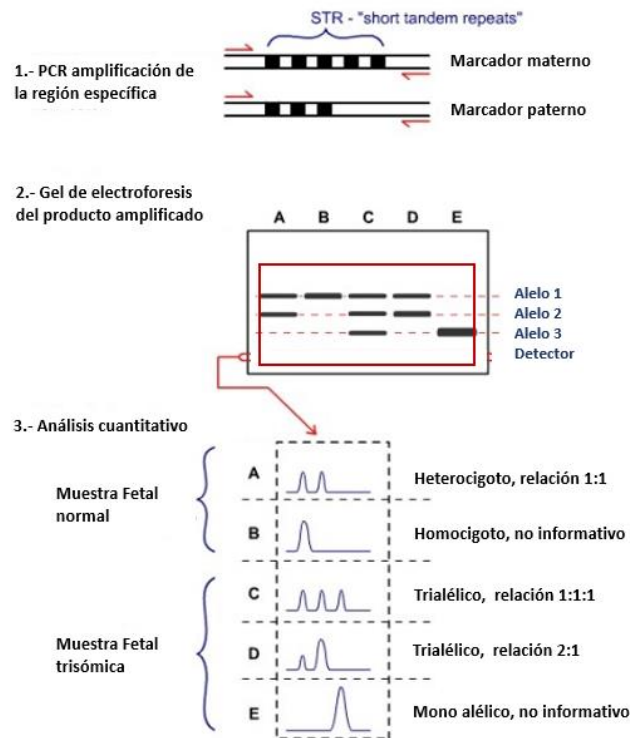


Figura 5. Análisis del tamaño de los diferentes alelos fetales según el origen parental.

## Cromosoma X.

El cromosoma X tiene una baja proporción de genes, está compuesto por muchos segmentos de DNA repetitivo que no codifica para alguna proteína o que su función no es

conocida. Solo el 1.7% del cromosoma codifica para proteínas funcionales que son de baja longitud, es más grande y tiene mayor cantidad de regiones de eucromatina que el cromosoma Y. Ambos cromosomas presentan regiones de homología muy pequeñas <sup>[79]</sup>. El cromosoma Y está constituido por DNA de 40 mm de longitud (60 megabases), de los cuales el 95% no recombina y el 5%, llamado porción pseudoautosómica, puede recombinar su contenido con el cromosoma X <sup>[80]</sup>.

### **Cromosoma 21.**

El cromosoma 21 es el autosoma humano más pequeño, conteniendo alrededor de 47 millones de nucleótidos, que representan el 1.5% del contenido total de DNA en la célula aproximadamente. El número estimado de genes que tiene este cromosoma se encuentra entre 200 y 400 <sup>[81]</sup>.

### 3. Planteamiento del problema

El diagnóstico prenatal actualmente se realiza utilizando técnicas invasivas que conllevan un riesgo de pérdida del embarazo de hasta el 1%, además de presentar la desventaja de requerir personal altamente capacitado, con instrumentos tecnológicos costosos y con la gran limitante de representar un riesgo de daño fetal (3-6%), materno o de ambos, por lo que es necesaria una técnica de diagnóstico prenatal no invasiva, que no represente riesgo de pérdida gestacional, capaz de realizarse en etapas tempranas del embarazo (12 semanas) y a un menor costo. Hoy en día es posible el aislamiento y obtención de cantidades muy pequeñas de DNA fetal presentes en el plasma materno. Esta técnica por lo tanto requerirá de la validación metodológica y analítica para acercarse a los recursos diagnósticos o terapéuticos del feto. La utilización de las secuencias de repetición en tándem permitirá la diferenciación del DNA fetal del materno.

## 4. Hipótesis del trabajo

Sabemos que existe DNA fetal libre de células en el plasma de mujeres gestantes y que actualmente no hay una metodología descrita que permita con certeza la plena diferenciación del DNA materno. Por lo que las diferencias entre las secuencias repetidas en tándem de los cromosomas 21 y X permitirán distinguir entre el DNA materno y el fetal libre de células.



## 5. Objetivos

### General.

Extraer y diferenciar DNA fetal libre de células a partir de plasma materno para el diagnóstico prenatal no invasivo.

### Particulares.

- Estandarizar el método de extracción del DNA fetal libre de células a partir de plasma materno y aislar DNA materno a partir de sangre total para ser utilizado como control.
- Establecer las secuencias repetidas en tándem de los cromosomas 21 y X fetales y maternos en bases de datos.
- Comparar las secuencias repetidas en tándem de los cromosomas 21 y X entre ambas muestras.

## 6. Métodos

Para el presente estudio exploratorio se tomaron los siguientes criterios:

- De inclusión: Mujeres con embarazo único confirmado, de las 10 semanas en adelante, que asistan al INPer, con previa firma de consentimiento informado.
- De exclusión: Padres que presenten consanguinidad, madre con alteraciones cromosómicas, negativa a participar en el estudio.
- De eliminación: Muestras de mala calidad.

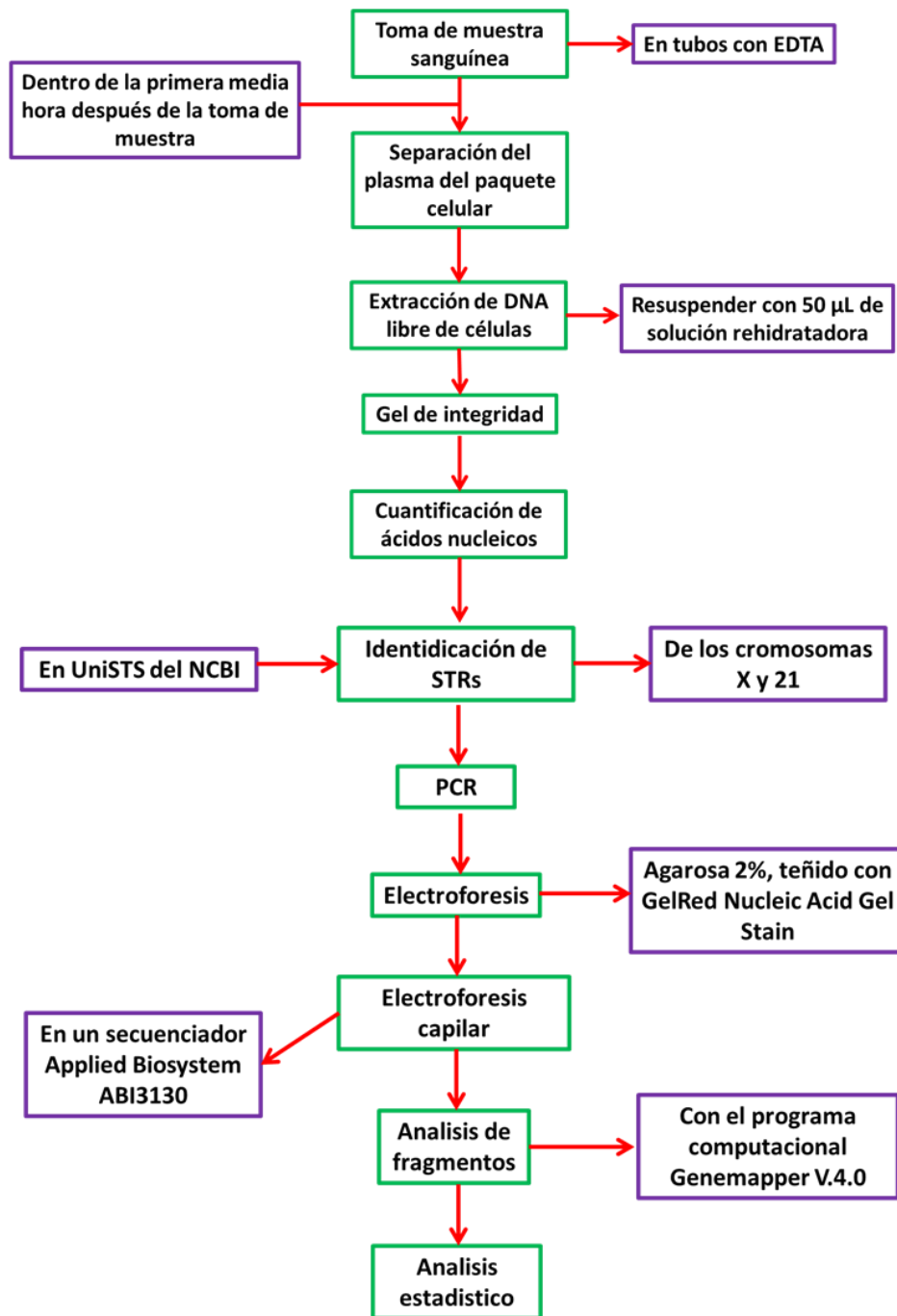


Figura 6. Diagrama de flujo de trabajo.

### Toma de muestra.

Se tomó aproximadamente 3 mL de sangre periférica mediante punción venosa en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante (**Figura 7**).



*Figura 7. Muestras sanguíneas.*

### Aislamiento del DNA fetal libre de células en plasma materno.

Se realizó por medio del ensayo comercial High Pure Viral Nucleic Acid (100) Roche Applied Science (Cat. No. 11 858 874 001) <sup>[45]</sup>. Considerando las indicaciones del fabricante, ajustando los valores como se describe a continuación.

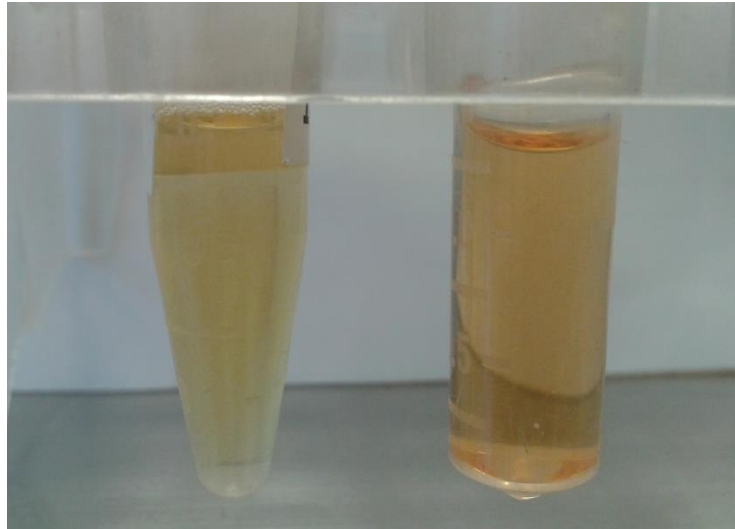
Dentro de los primeros 30 minutos después de obtener la muestra esta fue centrifugada durante 20 minutos a 3,220 x g (Eppendorf 5810 R) a temperatura ambiente y el plasma (sobrenadante) se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 2 mL evitando tomar células sanguíneas, para después ser centrifugado a 18,890 x g (Rotina 38 R) a 4°C durante 10 minutos. Aproximadamente 1 mL del sobrenadante fue transferido a tubos nuevos dejando cerca de 100  $\mu$ L en el fondo (**Figura 8**). A partir de este momento la muestra puede ser procesada o almacenada a -70°C, para su manejo posterior. Se descongeló a temperatura ambiente.

Para 400  $\mu\text{L}$  de plasma se realizó el siguiente procedimiento (escalar en proporción directa cualquier incremento del volumen).

En un tubo de 2.5 mL se mezclaron 400  $\mu\text{L}$  de plasma, 450  $\mu\text{L}$  de solución de trabajo (441  $\mu\text{L}$  de amortiguador de unión y 9  $\mu\text{L}$  de Poli (A), por cada muestra) y 100  $\mu\text{L}$  de proteinasa K dando un volumen total de 1,050  $\mu\text{L}$ , se incubó a 72°C durante 10 minutos con agitación de 400 rpm y se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de amortiguador de unión, después se colocó una columna High Pure dentro de un tubo colector de 2 mL y se agregaron 700  $\mu\text{L}$  de la mezcla anterior procurando no tocar la membrana, esto fue centrifugado por 1 minuto a 8,000 x g, el centrifugado del tubo colector se desecha. Esto se repitió (usando la misma columna) hasta que la mezcla se agotó.

Se colocó la columna dentro de un tubo colector limpio y se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de amortiguador de remoción, centrifugando a 8,000 x g durante 1 minuto, el líquido del tubo colector fue desechado y se agregaron 450  $\mu\text{L}$  de amortiguador de lavado en la columna, nuevamente se centrifugó a 8,000 x g por 1 minuto y el centrifugado fue desechado; este paso se repitió una vez más. Se dio un pulso de centrifugación por 10 segundos a máxima velocidad (aproximadamente 13,000 x g) a la columna con el tubo colector, esto con el fin de remover residuos del amortiguador de lavado. Posteriormente el tubo colector fue desechado y la columna se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL estéril y libre de nucleasas. Para recuperar el DNA se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de amortiguador TE (10mM Tris, 1mM EDTA), esto se centrifugó a 8,000 x g durante 1 minuto. Para ese punto el tubo colector ya contenía el DNA.

Se hicieron alícuotas en tubos de microcentrifuga de 600  $\mu\text{L}$ ; dos de 20  $\mu\text{L}$  y una de 10  $\mu\text{L}$ .



*Figura 8. Plasma sanguíneo materno para extracción de cfDNA.*

### **Electroforesis de integridad del DNA fetal libre de células.**

Se realizó un corrimiento electroforético de las muestras del DNA libre de células en gel de agarosa 2% utilizando DNA Typing Grade 50X TAE Buffer (Cat. No. 24710-030) en dilución 1X como medio de conducción; a 100 voltios por 10 minutos y 90 voltios por 30 minutos, teñido con GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X (USB Cat. No. 41003). Con la finalidad de diferenciar el DNA genómico materno del DNA libre de células, con base al criterio de separación de fragmentos en función del tamaño <sup>[43]</sup>.

### **Aislamiento de DNA materno de sangre total.**

La extracción se realizó por medio ensayo comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit (Cat. No. A1125) Promega. Siguiendo las indicaciones del comerciante.

Una vez colectado el plasma de la muestra sanguínea se separaron los leucocitos en un tubo de microcentrifuga de 2 mL.

Se retiró el anillo de leucocitos, teniendo un volumen aproximado de 500  $\mu\text{L}$ , a los que se les adiciono 1,000  $\mu\text{L}$  de solución de lisis celular y se incubo durante 10 minutos a temperatura ambiente, agitando por inversión ocasionalmente. Transcurrido el tiempo fue centrifugado a 15,000 x g por 1 minuto, el sobrenadante se descartó y el botón fue lavado con la solución de lisis celular las veces que fue necesario para obtener un botón completamente blanco.

Una vez eliminados los eritrocitos se añadieron 300  $\mu\text{L}$  de solución de lisis para células nucleadas y se incubo a 37°C 10 minutos. Inmediatamente después se colocó en hielo para después agregar 200  $\mu\text{L}$  de solución precipitadora de proteínas fría, se agito con vortex y se incubo 5 minutos en el hielo. Centrifugar a 15,000 x g durante 3 minutos.

El sobrenadante se transfiere por las paredes de tubos limpios que contienen 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol frio y se agita suavemente por inversión. Fue centrifugado a 15,000 x g 3 minutos. El sobrenadante se eliminó y se agregaron 600  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% que fue preparado en fresco, el DNA se despegó de las paredes del tubo para centrifugarlo nuevamente 15,000 X g durante 1 minuto.

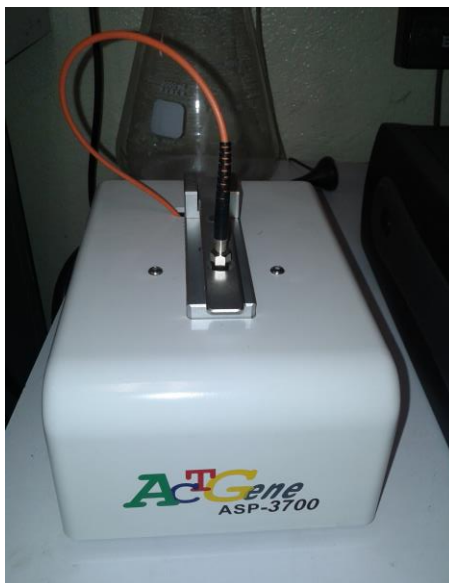
El sobrenadante se eliminado completamente y el DNA fue secado al aire libre, tomando las debidas precauciones para evitar contaminación.

Se resuspendió añadiendo 150  $\mu\text{L}$  de amortiguador TE y dejando incubar a 60°C por 1 h, aproximadamente.

### **Espectrofotometría.**

La concentración de ácidos nucleicos se cuantifico mediante espectrofotometría en un equipo ACTGene ASP-3700 (**Figura 9**), tomando como blanco amortiguador TE. A una

longitud de onda de 260 nm así como la concentración de proteínas y algunos contaminantes a una longitud de onda de 280 nm y 230 nm respectivamente. Se calcularon las relaciones 260/280 y 260/230 para determinar la calidad del DNA. Los datos se obtuvieron mediante el uso del programa computacional ASP-3700.



*Figura 9. Espectrofotómetro ACTGene ASP-3700.*

### **Determinación de las Secuencias Repetidas en Tandem por electroforesis capilar.**

Se realizó una búsqueda en la base de datos UniSTS del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists/>) para al menos tres STR de los cromosomas 21 y X (**Tabla 4** y **Figura 10**). Para cada uno de los STR seleccionados se diseñaron un par de iniciadores, de los cuales la secuencia Sentido se encuentra asociada al fluorocromo 6FAM.



Tabla 4. Marcadores para los cromosomas X y 21.

Iniciador	Secuencias	Longitud del amplificado	Temperatura de alineación	Acceso al GenBank
DXS998	<b>Sentido</b> 5' – CAGCAATTTTTCAAAGGC – 3'	113-119 (pb), <i>Homo sapiens</i>	58.4° C	<a href="#">Z17020</a>
	<b>Anti-sentido</b> 5' – AGATCATTCATATAACCTCAAAGA – 3'			
DXS1108	<b>Sentido</b> 5' – GTGAATTCATCATATGTGATTTCC – 3'	163 (pb), <i>Homo sapiens</i>	55° C	
	<b>Anti-sentido</b> 5' – ACTAGGCGACTAATACAGTGGTGC – 3'			
DXS8061	<b>Sentido</b> 5' – GCTTGAAGTGTCCATGAGGTATC – 3'	125-153 (pb), <i>Homo sapiens</i>	55° C	<a href="#">Z53487</a>
	<b>Anti-sentido</b> 5' – AGAAGCTGATGTGCTCCCTG – 3'			
D21S211	<b>Sentido</b> 5' – ATATTTTCCAAGTTGAGCGC – 3'	93-101 (bp), <i>Homo sapiens</i>	54.8° C	<a href="#">L02017</a>
	<b>Anti-sentido</b> 5' – CTATTTTATATGCATGGGTC – 3'			
D21S1258	<b>Sentido</b> 5' - CGTTTCAATATAGACCAGATAAAGG – 3'	139-157 (bp), <i>Homo sapiens</i>	54.6° C	<a href="#">Z24160</a>
	<b>Anti-sentido</b> 5' – AGGTCAACTGCCAAAATCTAAG - 3'			
D21S1887	<b>Sentido</b> 5' – CAGACAAACAGAATGATGAAG – 3'	123-147 (bp), <i>Homo sapiens</i>	57.5° C	<a href="#">Z52246</a>
	<b>Anti-sentido</b> 5' – AAAGATGATGTCAGGAATGC – 3'			

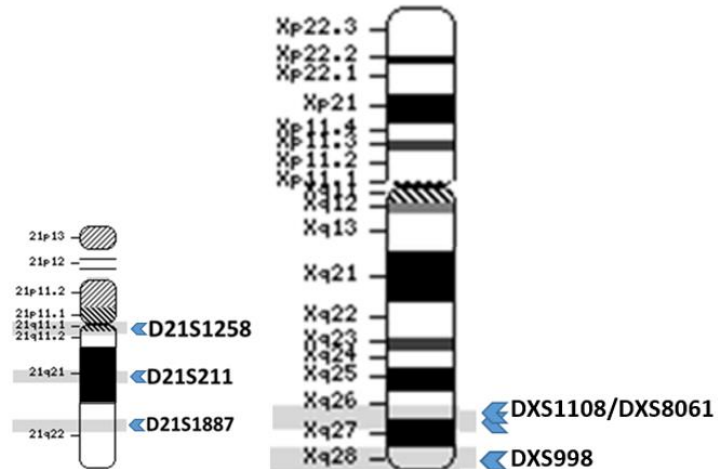


Figura 10. Mapa de posición de los marcadores en los cromosomas 21 y X.

### Reacción en Cadena de la Polimerasa

Se utilizó el kit HotStarTaq Master Mix (Cat. No. 203445). La reacción se llevó a cabo de la siguiente manera:

- 10.5 uL de enzima
- 0.5 µL de Primer R (20 nM)
- 0.5 µL de Primer F (20 nM)
- 0.5 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM/mL)
- 3 µL de DNA (25 ng/µL)

Se ajustó el volumen final a 20 µL con agua libre de DNAsas.

Las condiciones de corrida para la PCR fueron las sugeridas por el fabricante. Las mejores condiciones de alineamiento para cada iniciador se determinaron por medio de un gradiente de temperatura y en algunos casos el uso de la fórmula:

$$T_aOpt=0.3(T_m \text{ del iniciador})+ 0.7(T_m \text{ del producto})-25$$

Activación enzimática	95°C	15 min
Desnaturalización	95°C	1 min
Alineamiento	Dependiente de cada par de iniciadores	1 min
Extensión	72°C	1 min
Extensión final	94°C	1 min

35 ciclos



Figura 11. Corrida de PCR en un Mastercycle gradient Eppendorf.

### Electroforesis en agarosa

Para comprobar la amplificación del segmento de interés, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% utilizando DNA Typing Grade 50X TAE Buffer (Cat. No. 24710-030) en dilución 1X, teñido con GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X (Cat. No. 41003). Se corrió a 100 voltios por 10 minutos y 90 voltios por 30 minutos o hasta que la separación de las bandas fuera visible. Usando DNA Molecular Weight Marker XIV (100-1500 bp) (Cat. No. 11721933001) para determinar el tamaño de las bandas.

## Electroforesis Capilar

Se realizó una electroforesis capilar, en un secuenciador Applied Biosystem ABI3130 (**Figura 12**) de cuatro capilares utilizando polímero POP7 y marcador GS-500liz en un capilar de 36 cm, donde se cuantifico la fluorescencia de los amplicones y se comparó contra los de la madre y un control negativo.



*Figura 12. Secuenciador ABI3130.*

## Análisis de los fragmentos

Los resultados fueron analizados identificando las longitudes e intensidad de fluorescencia mediante el programa computacional Genemapper V.4.0.

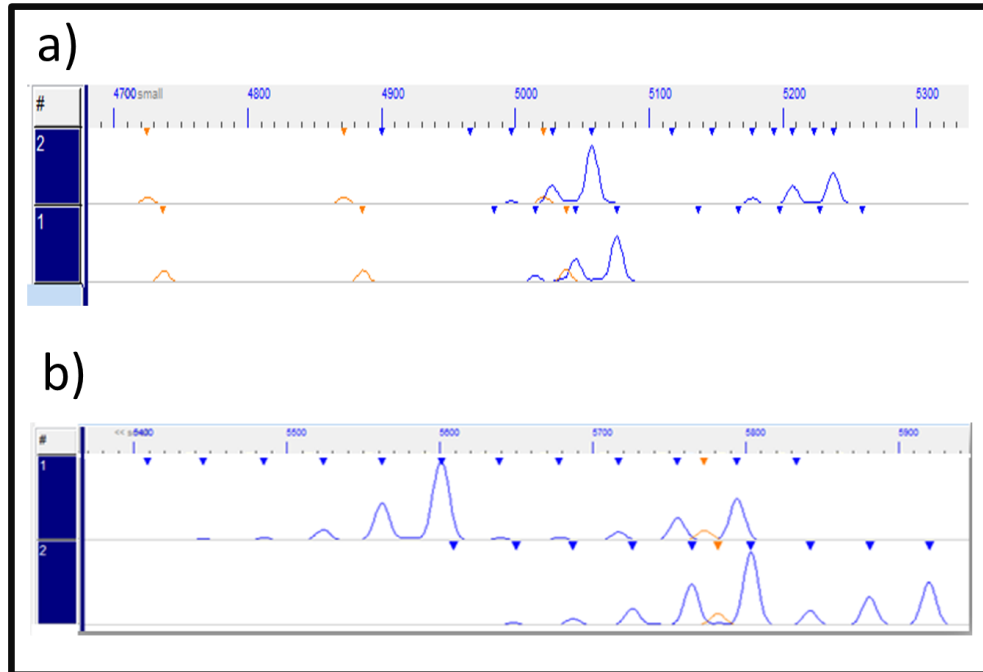


Figura 13. Esquema de electroferograma.  
a) 1=DNA leucocitario materno homocigoto, 2= cfDNA heterocigoto. b) 1=DNA leucocitario materno heterocigoto, 2= cfDNA heterocigoto.

### Análisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva para analizar la dispersión de las concentraciones de DNA, relación 260/280 y 260/230 mediante la determinación de cuartiles y medidas de tendencia central.

Las diferencias entre los alelos maternos y fetales se llevaron a cabo mediante la comparación de las variaciones en la longitud de los STR por análisis de frecuencia.

### Conflicto de Intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses en la publicación de este trabajo.

## 7. Resultados

Se obtuvieron 20 muestras sanguíneas de mujeres con embarazo de producto único de entre 17 y 35 semanas de gestación, con un rango de edad de 16 a 41 años, en un periodo comprendido del año 2010 a Diciembre de 2013. También fueron incluidas las muestras de DNA de tres de los padres, sin consanguinidad. En total se colectaron 23 muestras DNA leucocitario y 20 de cffDNA.

Fueron incluidas las muestras de 2 hombres y 2 mujeres nulíparas para la obtención de DNA leucocitario y de DNA libre en plasma (cfDNA) a manera de control, todos con cariotipo normal. Las muestras fueron cuantificadas mediante espectrofotometría.

### Identificación del DNA libre de células en plasma

Los valores de la concentración de DNA extraído a partir del plasma de mujeres embarazadas están comprendidos en un rango de 388.50 a 2,164.8 ng/ $\mu$ L, sin presentar un valor modal, sin embargo el 71.4% de los datos está dentro del segundo y tercer cuartil, con un promedio de  $1,226.66 \pm 490.5$ . En los valores de plasma de controles tampoco hubo valor modal, los datos se encuentran en un intervalo de 4.30 a 23.70 ng/ $\mu$ L, presentan un promedio de  $15.53 \pm 9.5$  (**Tabla 5** y **Figura 14**).

Tabla 5. Descripción estadística del comportamiento de la concentración de cfDNA.

		cfDNA de embarazadas	cfDNA control
N	Válidos	14	4
	Perdidos	0	0
Promedio		1226.66 ± 490.5	15.53 ± 9.5
Rango		1776.3	19.4
Mínimo		388.5	4.3
Máximo		2164.8	23.7
Percentiles	25	1068.1	5.975
	50	1101.75	17.05
	75	1566.6	23.55

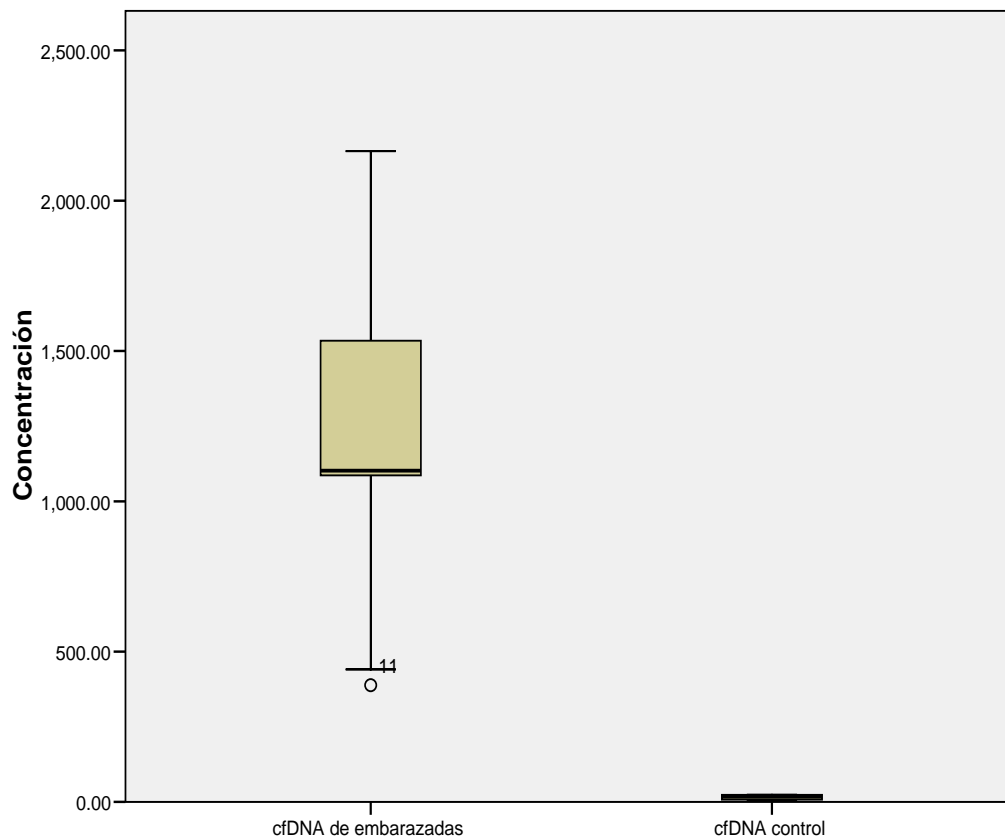
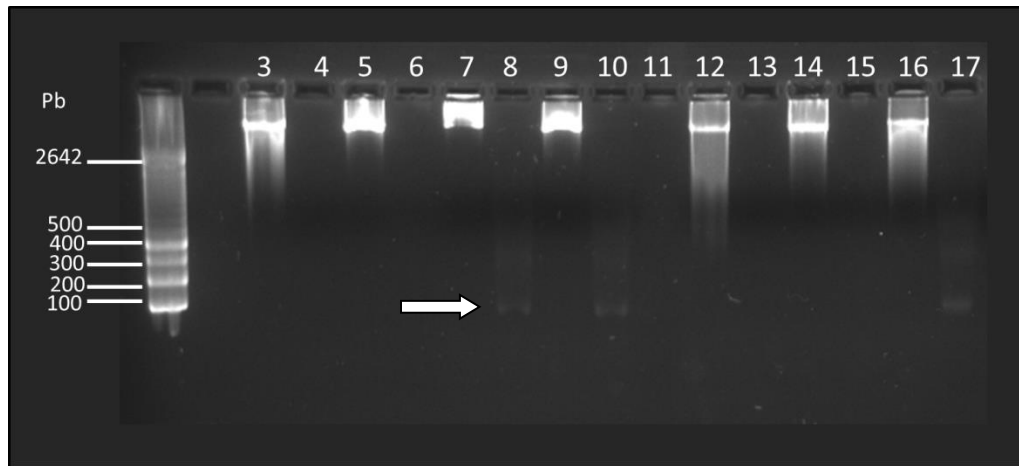


Figura 14. Distribución de frecuencias de la concentración de DNA obtenido en plasma embarazadas y controles.

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 4% para determinar el tamaño de los DNA, los extraídos del plasma de las gestantes presentan una banda de entre 200 y 300 pb, mientras que los aislados de plasma de controles no presenta banda (**Figura 15**).



*Figura 15. Gel de agarosa al 4% para analizar la integridad de las muestras. De izquierda a derecha se muestra el marcador de peso molecular (100-1500 bp). Mujeres nulíparas: carriles 3 y 12 DNA leucocitario, 4 y 13 cfDNA. Hombres: 5 y 14 DNA leucocitario, 6 y 15 cfDNA. Gestantes: 7, 9 y 16 DNA leucocitario, 8, 10 y 17 cfDNA.*



La relación 260/280 de los ácidos nucleicos extraídos del plasma están incluidos en un intervalo de 2.07 a 2.68 UDO, sin mostrar un valor modal, el cuartil uno y cuatro representan el 70% de los datos, con un promedio de  $2.4 \pm 0.23$ . Los valores obtenidos de los plasmas control están incluidas en el intervalo de 0.69 a 1.86 UDO y no presentan un valor modal, presentan un promedio de  $1.20 \pm 0.5$  (**Tabla 6** y **Figura 16**).

Tabla 6. Descripción estadística del comportamiento de la relación 260/280 del cfDNA.

		cfDNA de embarazadas	cfDNA control
N	Válidos	14	4
	Perdidos	0	0
Promedio		$2.4 \pm 0.23$	$1.20 \pm 0.5$
Rango		0.61	1.17
Mínimo		2.07	0.69
Máximo		2.68	1.86
Percentiles	25	2.18	0.775
	50	2.385	1.12
	75	2.6475	1.6975

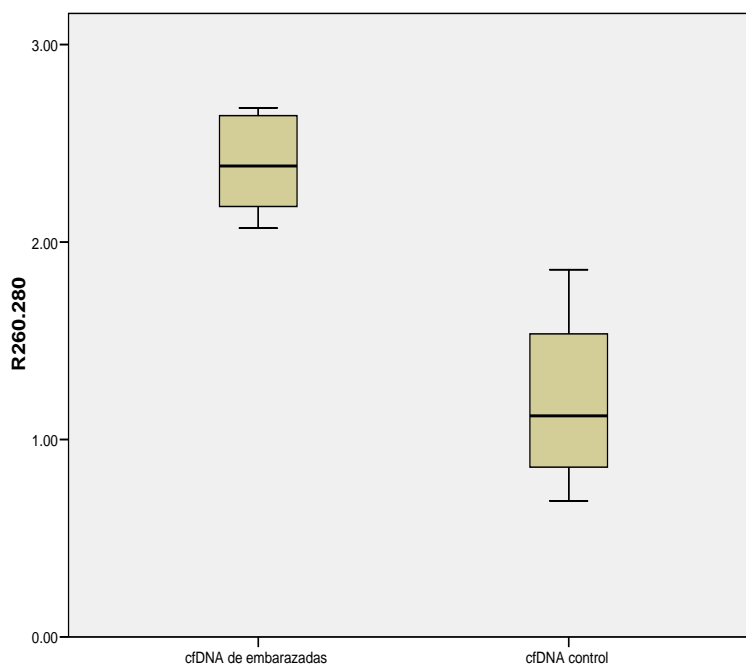


Figura 16. Distribución de frecuencias de la relación 260/280 de DNA obtenido en plasma de embarazadas y controles.

La relación 260/230 de los ácidos nucleicos extraídos del plasma muestra un rango de 1.01 a 4.10 UDO sin mostrar un valor modal, el 35% de los datos están dentro del segundo cuartil y el 28% son valores extremos; el promedio es de  $2.48 \pm 1.2$ . Los obtenidos de los plasmas control tienen un intervalo de 0.17 a 1.82 UDO, no presentan una moda; el promedio es de  $0.82 \pm 0.71$  (**Tabla 7** y **Figura 17**).

Tabla 7. Descripción estadística del comportamiento de la relación 260/230 de cfDNA.

		cfDNA de embarazadas	cfDNA control
N	Válidos	14	4
	Perdidos	0	0
Promedio		$2.48 \pm 1.2$	$0.82 \pm 0.71$
Rango		3.09	1.65
Mínimo		1.01	0.17
Máximo		4.1	1.82
Percentiles	25	1.38	0.25
	50	1.93	0.64
	75	3.945	1.5625

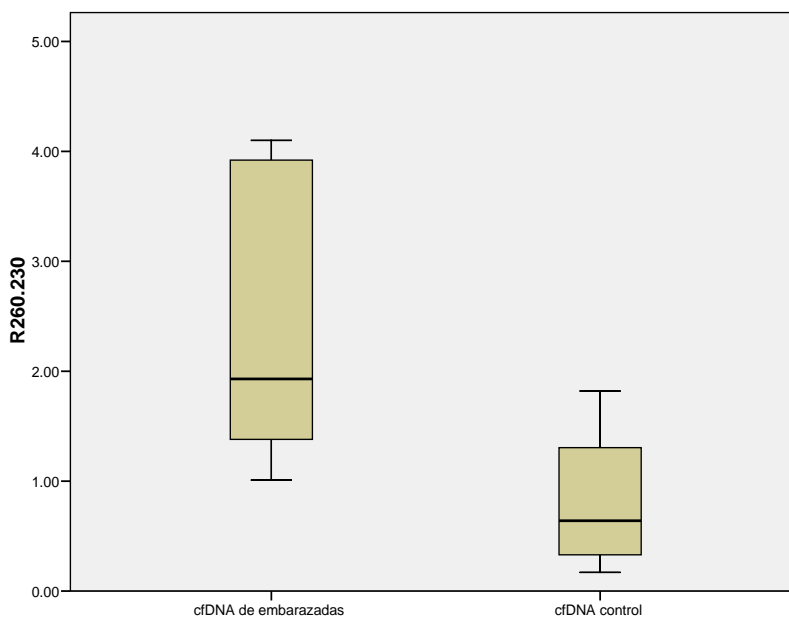


Figura 17. Distribución de frecuencias de la relación 260/230 de DNA obtenido en plasma de mujeres embarazadas y controles.

Por los valores obtenidos en las absorbancias del cfDNA de plasma materno se probó realizar la extracción sustituyendo el reactivo poli(A) por 50  $\mu$ L de ribonucleasa (RNAsa) resultando en concentraciones disminuidas que no se lograron amplificar mediante PCR (**Tabla 8**).

Tabla 8. Cuantificación de muestras tratadas con RNAsa

Muestra	Abs260/280	Abs260/230	Concentración ng/ $\mu$ L
DPF15	1.89	1.16	10.8
DPF16	1.83	1.04	11
DPF17	1.69	0.77	15.5

La comparación del espectro de absorción entre los distintos tipos de DNA purificados muestra que el cfDNA tiene un comportamiento grafico similar al obtenido de DNA leucocitario (**Figura 18**).

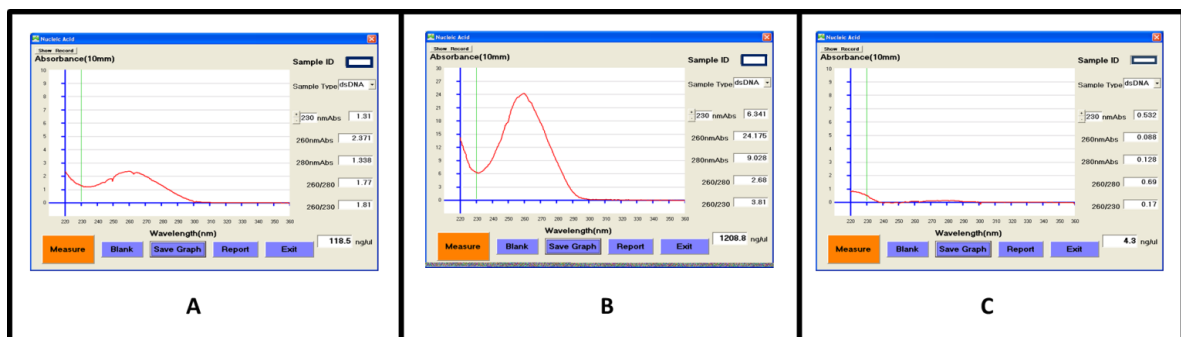


Figura 18. Ejemplos de gráfica de cuantificación de absorbancia; A) DNA Genómico, B) cfDNAe y C) cfDNAc.

### DNA Leucocitario

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa para determinar el tamaño de los DNA genómicos. Tanto en las mujeres embarazadas como en los controles se observa una banda superior a 2642 pb (**Figura 15**).

La concentración de DNA leucocitario de las madres se encuentran en un rango de 15.70 a 126.50 ng/μL, no tiene valor modal, el 50% de los datos está comprendido en el primer cuartil, el promedio es de  $49.12 \pm 29.8$ . Paralelamente los obtenidos de los controles no muestran una moda, el intervalo va de 62.10 a 182.90 ng/μL, con un promedio  $108.9 \pm 58.2$  (**Tabla 9 y Figura 19**).

Tabla 9. Descripción estadística del comportamiento de la concentración de DNA materno.

		DNA materno
N	Válidos	14
	Perdidos	0
Promedio		49.12 ± 9.8
Rango		110.80
Mínimo		15.70
Máximo		126.50
Percentiles	25	25.2750
	50	45.4000
	75	57.9250

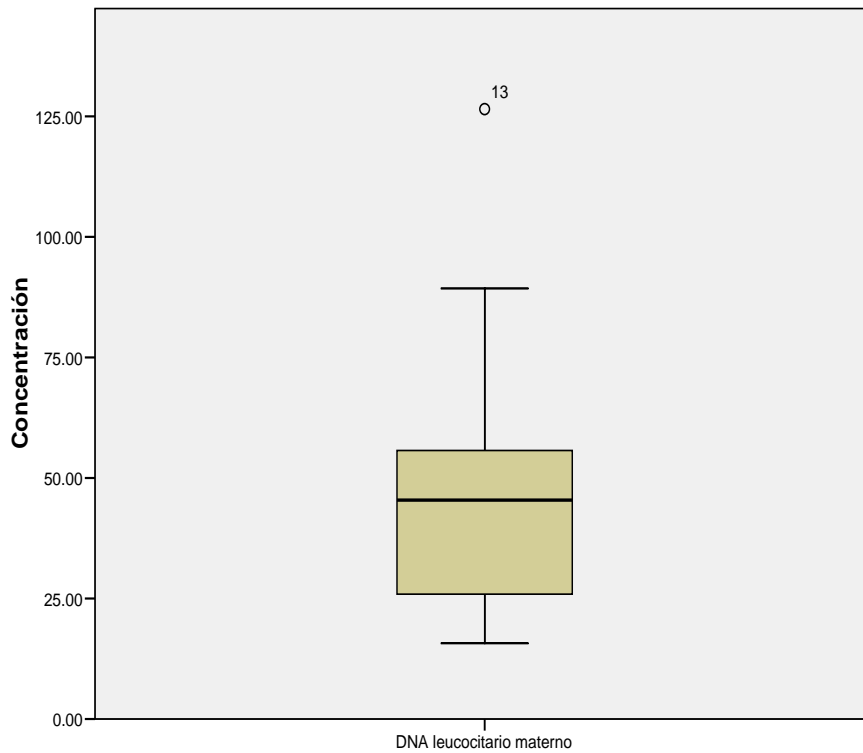
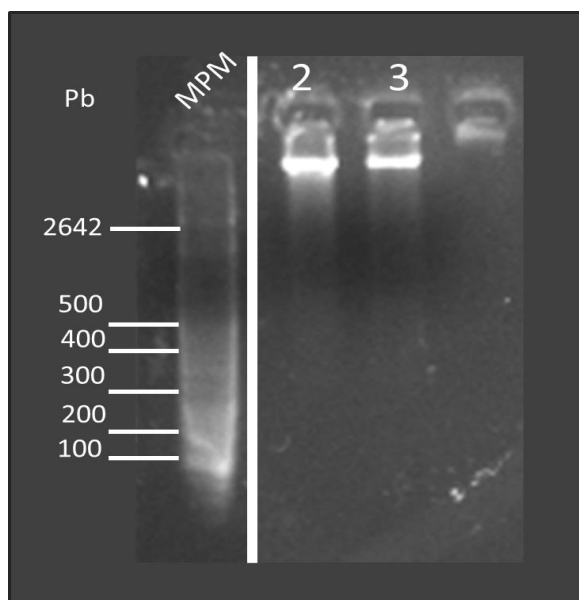


Figura 19. Distribución de frecuencias de la concentración de DNA leucocitario materno.

Con el fin de comprobar que el ensayo comercial High Pure Viral Nucleic Acid no induce fragmentación en el DNA, se extrajo DNA leucocitario de una gestante y un hombre, el tamaño se verifico en un gel de agarosa al 4% (**Figura 20**). La concentración, relación 260/280 y 260/230 se determinaron espectrofotométricamente (**Tabla 10**).



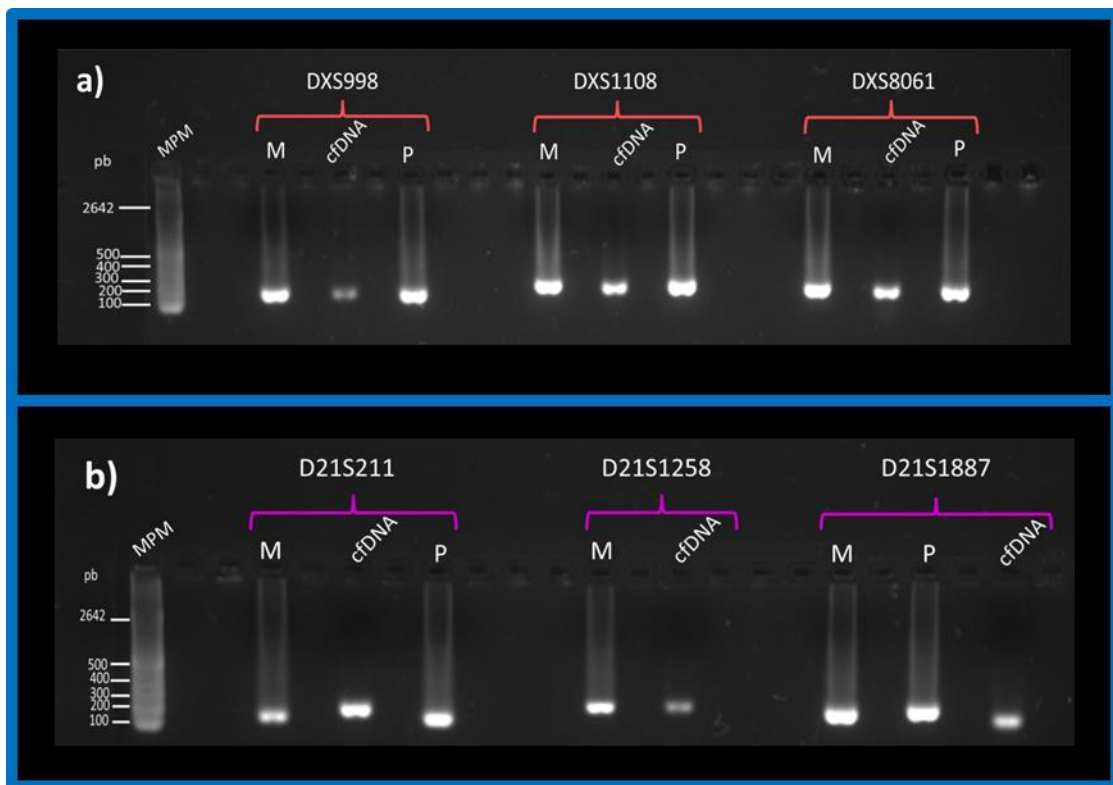
*Figura 20. Gel de integridad de agarosa al 4%. Se muestra el marcador de peso molecular (100-1500 bp), en los carriles 2 y 3 se encuentra el DNA leucocitario.*

*Tabla 10. Concentración, relación 260/280 y relación 260/230 de DNA leucocitario extraído con el ensayo comercial High Pure Viral Nucleic Acid.*

<b>Muestra</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>	<b>Concentración ng/<math>\mu</math>L</b>
Control F1	1.64	2.41	99.9
Control F2	1.74	1.87	99.2

### Identificación de los amplificadores de los marcadores X y 21.

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR punto final de los seis marcadores, a partir del DNA leucocitario de las madres y los padres (en caso de contar con ellos), así como, del cfDNA del plasma de la madre. Los amplicones estaban dentro de los tamaños esperados (*Tabla 4*) (*Figura 21*).



*Figura 21. Ejemplificación de amplificadores de los marcadores del cromosoma X (a) y 21 (b). Donde, amplificación de DNA leucocitario (M= madre), (P= padre), cfDNA=amplificación de DNA libre de células en plasma de gestante.*

## Identificación de las variaciones de los marcadores X y 21 mediante electroforesis capilar.

Por medio de electroforesis capilar del producto de PCR punto final se identificaron las frecuencias de los diferentes tamaños obtenidos de los seis marcadores.

### DXS998

No se observan diferencias aparentes entre las frecuencias de los fragmentos de 113, 115 y 117 pb. Estos tres fragmentos representan el 0.9 de las muestras (**Tabla 11**).

Tabla 11. Proporciones de marcador DXS998.

*n*= cantidad de muestras amplificadas en cada marcador (proporción equivalente).

<b>DXS998 (113-119)</b>			
<b>Marcador pb</b>	<b>DNA Leucocitario n(proporción)</b>	<b>DNA Materno n(proporción)</b>	<b>cfDNA n(proporción)</b>
113	9(0.243)	8(0.286)	8(0.286)
115	11(0.297)	11(0.392)	7(0.251)
117	12(0.324)	7(0.251)	11(0.392)
119	5(0.136)	2(0.071)	2(0.071)



## DXS8061

Los fragmentos de 145, 147 y 149 pb representan el 0.758 de la muestra contemplando ocho tamaños posibles (**Tabla 12**).

Tabla 12. Proporciones de marcador DXS8061.

*n*= cantidad de muestras amplificadas en cada marcador (proporción equivalente).

<b>DXS8061 (125-153)</b>			
<b>Marcador pb</b>	<b>DNA Leucocitario n(proporción)</b>	<b>DNA Materno n(proporción)</b>	<b>cfDNA n(proporción)</b>
131	1( 0.027)	1(0.036)	2(0.071)
133	1(0.027)	1(0.036)	4(0.142)
137	2(0.054)	2(0.071)	1(0.036)
141	2(0.054)	2(0.071)	2(0.071)
143	1(0.027)	1(0.036)	0
145	8(0.216)	6(0.214)	7(0.250)
147	14(0.379)	9(0.322)	9(0.322)
149	8(0.216)	6(0.214)	3(0.108)

## DXS1108

Este marcador no está reportado como polimórfico, sin embargo se logró identificar dos fragmentos adicionales (160 y 166 pb) con repetidos de 3 pb. El fragmento de mayor proporción corresponde al tamaño del valor reportado para toda la muestra (**Tabla 13**).

Tabla 13. Proporciones marcador DXS1108.

*n*= cantidad de muestras amplificadas en cada marcador (proporción equivalente).

<b>DXS1108 (163)</b>			
<b>Marcador pb</b>	<b>DNA Leucocitario n(proporción)</b>	<b>DNA Materno n(proporción)</b>	<b>cffDNA n(proporción)</b>
163	10(0.271)	6(0.214)	5(0.178)
	24(0.648)	21(0.750)	22(0.786)
	3(0.081)	1(0.036)	1(0.036)

## D21S211

El fragmento de 93 pb presenta la mayor proporción (0.751) comparado con los otros cuatro (**Tabla 14**).

Tabla 14. Proporciones marcador D21S211.

*n*= cantidad de muestras amplificadas en cada marcador (proporción equivalente).

<b>D21S211 (93-101)</b>			
<b>Marcador pb</b>	<b>DNA Leucocitario n(proporción)</b>	<b>DNA Materno n(proporción)</b>	<b>cfDNA n(proporción)</b>
93	28(0.6)	21(0.751)	21(0.751)
95	7(0.2)	3(0.107)	3(0.107)
97	5(0.11)	2(0.072)	3(0.107)
99	1(0.023)	1(0.035)	0
101	1(0.023)	1(0.035)	1(0.035)

## D21S1258

El fragmento de 139 pb fue el que más frecuentemente amplificó en los tres tipos de muestra (0.405, 0.250, 0.321), comparado con el resto de los fragmentos (**Tabla 15**).

Tabla 15. Proporciones marcadores D21S1258.

*n*= cantidad de muestras amplificadas en cada marcador (proporción equivalente).

<b>D21S1258 (139-157)</b>			
<b>Marcador pb</b>	<b>DNA Leucocitario n(proporción)</b>	<b>DNA Materno n(proporción)</b>	<b>cfDNA n(proporción)</b>
139	17(0.405)	7(0.250)	9(0.321)
141	4(0.095)	2(0.071)	2(0.071)
143	1(0.024)	1(0.036)	1(0.036)
145	1(0.024)	0	1(0.036)
147	6(0.143)	6(0.214)	4(0.143)
149	2(0.048)	2(0.071)	2(0.071)
151	4(0.095)	4(0.143)	5(0.179)
153	4(0.095)	4(0.143)	4(0.143)
155	1(0.024)	1(0.036)	0
157	2(0.048)	1(0.036)	0

## D21S1887

Los fragmentos identificados en los DNA leucocitarios muestran que el fragmento de mayor frecuencia es de 133 pb, en cambio en el cfDNA fue el fragmento de 131 pb el que se presentó en mayor proporción (**Tabla 16**).

Tabla 16. Proporciones marcador D21S1887.

*n*= cantidad de muestras amplificadas en cada marcador (proporción equivalente).

<b>D21S1887 (123-147)</b>			
<b>Marcador pb</b>	<b>DNA Leucocitario n(proporción)</b>	<b>DNA Materno n(proporción)</b>	<b>cfDNA n(proporción)</b>
131	10 (0.239)	9 (0.321)	11(0.393)
133	13(0.310)	11(0.393)	8(0.285)
137	1(0.023)	1(0.036)	1(0.036)
139	1(0.023)	1(0.036)	2(0.071)
141	8(0.191)	5(0.178)	4(0.143)
143	2(0.048)	1(0.036)	0
145	1(0.023)	0	1(0.036)
147	6(0.143)	0	1(0.036)

Dado que el análisis de frecuencia no proporciono la suficiente fuerza estadística se realizó un análisis de frecuencia binomial de los posibles alelos comparando el cfDNA contra el DNA leucocitario materno. La certidumbre con la que se puede diferenciar el DNA leucocitario materno del cfDNA es de 0.857 usando tres marcadores para el cromosoma X y tres para el cromosoma 21 (*Tabla 17*).

*Tabla 17. Concordancia entre DNA leucocitario materno y cfDNA de plasma.  
0=Concordante; 1=No concordante.*

Familia	Cromosoma X			Cromosoma 21			Concordancia/ no concordancia
	DXS998	DXS8061	DXS1108	D21S211	D21S1258	D21S1887	
DPF01	0	0	0	1	0	0	1
DPF02	1	1	1	0	0	1	1
DPF03	1	0	0	1	0	1	1
DPF04	0	0	0	0	1	0	1
DPF05	1	1	1	0	1	0	1
DPF06	1	1	0	0	0	1	1
DPF07	1	0	1	1	1	0	1
DPF08	0	0	0	0	0	0	0
DPF09	0	1	0	1	1	1	1
DPF10	0	0	0	0	1	1	1
DPF11	0	1	1	0	1	1	1
DPF12	0	0	0	1	0	1	1
DPF13	0	0	1	1	0	0	1
DPF14	0	0	0	0	0	0	0
Proporción	0.357	0.357	0.357	0.429	0.429	0.500	0.857

El análisis de concordancia de un solo marcador muestra que no existe la suficiente variabilidad para diferenciar los DNA (de 0.357 a 0.500). En las muestras en las que no existió diferencia estadística se comparó el sexo al nacimiento en donde todos los casos fueron masculinos (**Tabla 18**).

Tabla 18. Comparación de los resultados sobre el sexo de los fetos.

SD = sin datos.

Muestra	Resultado molecular		Determinación del sexo al nacimiento
	X	Y	SEXO
DPF01	X	Y	SD
DPF02	X		SD
DPF03	X	Y	Masculino
DPF04	X		SD
DPF05	X	Y	Masculino
DPF06	X		Femenino
DPF07	X		Femenino
DPF08	X		SD
DPF09	X		Femenino
DPF10	X	Y	Masculino
DPF11	X		Femenino
DPF12	X		Femenino
DPF13	X		Femenino
DPF14	X		Femenino

## 8. Discusión

La extracción de DNA fetal a partir de plasma materno no es una técnica relativamente reciente, Lo en 1997 describió su presencia en pacientes con cáncer <sup>[21]</sup>, no fue hasta el 2007 que el consorcio Wiley InterScience que realizó una comparación entre los distintos métodos de extracción <sup>[45]</sup>. Sin embargo ha persistido la duda de la presencia del DNA materno en el DNA fetal. La posibilidad de diferenciarlos mediante su tamaño podría permitirnos realizar estudios asequibles con un alto grado de certidumbre.

En este estudio se utilizaron plasmas almacenados a -70°C, comprendidos en el periodo de agosto del 2010 a noviembre del 2013. Al momento de ser procesados la descongelación se realizó a temperatura ambiente, ya que si el plasma es descongelado a 4°C forma crioprecipitados <sup>[82]</sup> que pueden restar volumen a la muestra y por otro lado tapar las columnas de purificación afectando a la concentración final del cfDNA .

La concentración de cfDNA de plasma materno fue 78 veces mayor que las del producto de extracción de controles (**Tabla 5** y **Figura 14**), como menciona Tjoa la fuente principal de DNA fetal libre en sangre materna es originada de la apoptosis de células placentarias (sincitiotrofoblastos) es así como pueden entrar en la circulación de la madre <sup>[35]; [55]</sup>, lo que explicaría la ausencia de cfDNA en las muestras control.

Los productos extraídos del plasma de los controles se compararon en una electroforesis en gel de agarosa con los obtenidos de los plasmas de mujeres embarazadas los cuales presentaron una banda entre los 100 y 200 pb (**Figura 15**). Lo que concuerda con lo reportado por Li en donde describe que el fragmento se encuentra entre los 145 y 313 pb <sup>[41]; [42]; [43]</sup>, sin embargo, en ninguno de los trabajos describen el comportamiento de cfDNA en personas no gestantes (hombres o mujeres), en este estudio se utilizaron controles no gestantes y no se observa alguna banda.



La relación de 260/280 depende de la composición de los nucleótidos en la muestra, cada uno se mide de manera independiente presentando los siguientes valores: Guanina: 1.15, Adenina: 4.50, Citosina: 1.51, Timina 1,47 y Uracilo: 4,00. La relación resultante 260/280 para el ácido nucleico que se está estudiando será aproximadamente la media ponderada de la 260/280, el rango establecido para esta relación debe estar entre 1.8 y 2.0, los valores mayores suelen estar asociados a la presencia de RNA <sup>[83]</sup>. Las relaciones obtenidas de las muestras extraídas del plasma de gestantes se encuentran entre 2.07 y 2.68, mientras que los productos obtenidos de la extracción del plasma de controles resultaron en el intervalo de 0.69 a 1.86, esto nos hace suponer que en el cfDNA materno no solo existe DNA si no también RNA. Sayres y Cho estudiaron el mRNA fetal o placentario libres en circulación materna, pese a que este es muy inestable y fácil de degradar por nucleasas, una teoría que explicaría su resistencia es que son encapsulados dentro de microvesículas que se unen a cuerpos apoptóticos del sincitiotrofoblasto <sup>[84]; [85]</sup>. Los resultados indican, que en las muestras obtenidas con el uso de ribonucleasa (RNAsa) las concentraciones disminuyeron, por lo que no se lograron amplificar (**Tabla 8**), suponemos que el RNA confiere un microambiente protector al cfDNA de plasma materno y que no afecta su amplificación.

Se determinó la relación 260/230 que, comúnmente los valores se encuentran en el intervalo de 2.0 a 2.2. Si los valores son inferiores puede deberse a la presencia de contaminantes como compuestos orgánicos por ejemplo, el fenol y otros aromáticos o algunos reactivos utilizados para la extracción de RNA como el TRIzol que tienen una absorbancia a 230 nm. Sin embargo los valores que se obtuvieron de las muestras de las mujeres gestantes se encuentran en un rango de 1.01 a 4.10, mientras que las de los plasmas control están dentro de un intervalo de 0.17 a 1.82. Tanto los valores de 260/280

y 260/230 justificarían las bajas concentraciones que nos indican la ausencia de ácidos nucleicos en estas muestras <sup>[86]</sup>.

Para diferenciar entre los alelos maternos de los fetos femeninos y poder detectar cualquier secuencia ausente en la madre pero presente en el feto es necesario realizar también un estudio del DNA de los padres <sup>[87]</sup>, por lo que el DNA leucocitario de la madre y de los controles se analizó en un gel de agarosa, ambos presentaron una banda superior a 2642 pb, comprobando así la integridad del DNA. En cuanto a su concentración, el DNA leucocitario materno presentó un rango de valores comprendidos entre 15.7 a 126.5 ng/μL, este fue amplificado para compararlo con los fragmentos presentes en el cfDNA del plasma materno.

La demostración de que el ensayo comercial empleado para la extracción del cfDNA (High Pure Viral Nucleic Acid) no induce cambios en la integridad del DNA se realizó mediante la extracción de dos muestras de sangre total y gracias a la afinidad que esta molécula tiene por el sustrato sólido que contienen las columnas de purificación fue posible obtener DNA leucocitario, los cuales se cuantificaron, mostrando valores de aproximadamente 99 ng/μL y valores aceptables en las relaciones 260/280 y 260/230. Se comprobó su integridad con una electroforesis en gel de agarosa donde se observó una banda superior a 2642 pb sin mostrar fragmentación.

Los marcadores usados para diferenciar el DNA materno del cfDNA y descartar posibles contaminaciones de origen materno, fueron seleccionados por sus tamaños y por ser polimórficos, ya que estas secuencias permiten diferenciar a un individuo de otro, puesto que uno de los alelos que se presentan proviene del padre y el otro de la madre <sup>[88]</sup> y al heredarse permiten establecer relaciones biológicas de parentesco. Con la electroforesis en gel de agarosa se comprobó la amplificación observando para cada marcador una banda correspondiente al peso esperado que no van más allá de 163 pb tanto en los DNA

leucocitarios de los padres y del cfDNA, con lo que se comprueba la obtención y amplificación de material genético a partir del plasma materno.

Los dos cromosomas sexuales divergieron de un solo autosoma aproximadamente hace unos 300 millones de años; de hecho, aún tienen cierta homología ya que recombinan cerca de sus extremos, en las dos regiones pseudoautosómicas <sup>[89]</sup>.

Más del 95% de las mujeres embarazadas tienen que elegir algún tipo de atención prenatal, que puede conducir a un procedimiento de diagnóstico prenatal. La mayoría de las mujeres consideran las pruebas de detección de aneuploidías a base de suero, como el síndrome de Down (trisomía 21) que es con mucho el trastorno más común que afecta aproximadamente a 1:800 embarazos. El riesgo puede ser evaluado mediante la combinación de varios factores, incluyendo las alteraciones en los niveles normales de biomarcadores proteínicos, incluyendo  $\beta$ -hCG,  $\alpha$ -fetoproteína, PAPP-A y la inhibina A, la edad materna avanzada y translucencia nucal incrementada que indicarían el diagnóstico prenatal invasivo ya sea por biopsia de vellosidades coriónicas (CVS) o por amniocentesis para obtener células fetales implica un pequeño pero significativo riesgo de pérdida espontánea de la gestación y por supuesto, de la incomodidad y el estrés causados a la madre, para evitar los peligros que pueden ser causados podría ofrecerse una prueba de diagnóstico no invasivo utilizando una muestra de sangre materna <sup>[90]</sup>.

Por medio de electroforesis capilar se identificaron los tamaños de los seis marcadores amplificados por PCR para cada una de las muestras. La identificación de los tamaños de los fragmentos amplificados y el análisis de frecuencias realizado nos permitió determinar pequeñas variaciones de los tamaños de los amplicones de DNA leucocitario materno y del cfDNA, presentando proporciones distintas en algunos fragmentos.

En el cromosoma X, cada uno de los tres marcadores amplificados presento una proporción de 0.357 de nuestra muestra estudiada. Las características distintivas del cromosoma X deriva en gran medida de la forma en que se hereda. Los hombres tienen una sola copia de este cromosoma, y su diversidad puede ser baja comparada con los autosomas pero comparado con el cromosoma Y es el doble <sup>[89]</sup>.

En los tres marcadores utilizados para el cromosoma 21 se presenta una proporción de entre 0.429 a 0.500 de los fragmentos encontrados de nuestra muestra estudiada. Sin embargo para ninguno de estos seis STR existen estudios relacionados acerca de su comportamiento en la población mexicana.

Los seis marcadores utilizados fueron suficientes para diferenciar en una proporción de 0.857 de la muestra. Para identificar la influencia de cada uno de los marcadores en la posibilidad de diferenciar las muestras, se calcularon nuevamente las proporciones omitiendo en cada ocasión uno y solo un marcador, sin embargo la proporción solo varia en los casos de los marcadores D21S211 y D21S1258 que mostraron 0.786 de proporción de cada uno (**Tabla 22** y **Tabla 23**), en todos los demás la proporción permanecía cercana a 0.857 (Anexo I). Aun así es recomendable usar un conjunto de mínimo seis marcadores y preferentemente aumentar el número de STR de diversas regiones de otros cromosomas, destacando al cromosoma X pues aunque presentaron variaciones en los amplificados, la comparación de los STR del hijo con la madre darán información más detallada de la variación en la tasa de mutación en todo el cromosoma, permitiendo un mejor análisis <sup>[89]</sup> y una mayor certidumbre de no concordancia.

Paralelamente el equipo de trabajo realizo amplificaciones de tres marcadores del cromosoma Y que para este trabajo sirvieron para mejorar la certidumbre de no concordancia, ya que el 0.071 de proporción que no se logró diferenciar usando los marcadores de X y 21 se identificó con estos marcadores de Y (Ver tesis de Velasco

Tapia Viridiana Grisel “Extracción de DNA fetal libre de células en plasma materno usando los cromosomas X y Y como marcadores de la presencia de DNA fetal”).

## 9. Conclusiones

El presente estudio confirma la presencia de DNA libre de células en plasma materno el cual se logró diferenciar del DNA leucocitario materno mediante el uso de los STR, con un alto grado de certidumbre.

Se consiguió la estandarización de la técnica de extracción y amplificación de DNA libre de células presente en el plasma de mujeres embarazadas, así como la obtención del DNA materno a partir de sangre completa.

Los STR establecidos de los cromosomas X y 21 resultaron favorables para la diferenciación de los DNA obtenidos, tanto del leucocitario como del cfDNA del plasma.

## 10. Perspectivas

La obtención del cffDNA puede ser de utilidad en aquellas mujeres que requieren de un análisis genético por la sospecha de alguna anomalía fetal de origen genético, lo que hasta el momento en México solo puede resolverse mediante algún tipo de muestreo invasivo, incrementando así el riesgo de pérdida.

Este estudio abre las puertas a la realización de numerosas investigaciones para determinar trisomías fetales, el grupo RhD para prevenir la EHRN y la determinación del sexo para diagnosticar enfermedades ligadas a X en etapas tempranas de la gestación.

Es recomendable se realice una búsqueda dirigida a marcadores polimórficos determinados para la población mexicana de distintos cromosomas.

## Referencias bibliográficas

1. Bustamante Aragonés, A., Fetal DNA in Maternal Plasma: New Strategies for the Study of Mutations with a Paternal Origin and Non-Invasive Prenatal Diagnosis of Fetal Gender, in Universidad Autónoma de Madrid. Departamento de Biología2008, Universidad Autónoma de Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.
2. Joe Hin Tjio, I.L. 1956. The Chromosome Number of Man *Hereditas*. Volumen 42 (1-2).
3. Fuchs, F. y Riis, P. 1956. Antenatal Sex Determination. *Nature*. 177(4503): p. 330.
4. Steele Mw Fau - Breg, W.R., Jr. y Breg, W.R., Jr. 1966. Chromosome Analysis of Human Amniotic-Fluid Cells. (0140-6736 (Print)).
5. Thiede, H.A., Creasman, W.T., y Metcalfe, S. 1966. Antenatal Analysis of the Human Chromosomes. *Am J Obstet Gynecol*. 94(4): p. 589-590.
6. Jacobson, C.B. y Barter, R.H. 1967. Intrauterine Diagnosis and Management of Genetic Defects. *Am J Obstet Gynecol*. 99(6): p. 796-807.
7. Brambati, B. y Simoni, G. 1983. Diagnosis of Fetal Trisomy 21 in First Trimester. *Lancet*. 1(8324): p. 586.
8. Ramos, C., Recasens, J.D., Benitez, J., Santaolaya, J., y Sanchez Cascos, A. 1984. [Early Cytogenetic Diagnosis by Chorion Biopsy. Preliminary Communication]. *Rev Clin Esp*. 174(1-2): p. 21-23.
9. P. Metcalfe, P.R., E. Tait & S. Urbaniak. 2011. An International Reference Reagent for the Detection of Rhd and Sry DNA in Plasma *Vox Sanguinis*. 102, 243–249
10. Duric, K., Skrablin, S., Lesin, J., Kalafatic, D., Kuvacic, I., y Suchanek, E. 2003. Second Trimester Total Human Chorionic Gonadotropin, Alpha-Fetoprotein and Unconjugated Estriol in Predicting Pregnancy Complications Other Than Fetal Aneuploidy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 110(1): p. 12-15.
11. Raniga, S., Desai, P.D., y Parikh, H. 2006. Ultrasonographic Soft Markers of Aneuploidy in Second Trimester: Are We Lost? *MedGenMed*. 8(1): p. 9.
12. Hahn, S. y Holzgreve, W. 2002. Fetal Cells and Cell-Free Fetal DNA in Maternal Blood: New Insights into Pre-Eclampsia. *Hum Reprod Update*. 8(6): p. 501-508.
13. Bianchi, D.W., Williams Jm Fau - Sullivan, L.M., Sullivan Lm Fau - Hanson, F.W., Hanson Fw Fau - Klinger, K.W., Klinger Kw Fau - Shuber, A.P., y Shuber, A.P. 1997. Pcr Quantitation of Fetal Cells in Maternal Blood in Normal and Aneuploid Pregnancies. (0002-9297 (Print)).
14. Leung, T.N., Zhang, J., Lau, T.K., Chan, L.Y., y Lo, Y.M. 2001. Increased Maternal Plasma Fetal DNA Concentrations in Women Who Eventually Develop Preeclampsia. *Clin Chem*. 47(1): p. 137-139.



15. Sekizawa, A., Jimbo, M., Saito, H., Iwasaki, M., Matsuoka, R., Okai, T., y Farina, A. 2003. Cell-Free Fetal DNA in the Plasma of Pregnant Women with Severe Fetal Growth Restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 188(2): p. 480-484.
16. Rodriguez de Alba, M., Palomino, P., Gonzalez-Gonzalez, C., Lorda-Sanchez, I., Ibanez, M.A., Sanz, R., Fernandez-Moya, J.M., Ayuso, C., Diaz-Recasens, J., y Ramos, C. 2001. Prenatal Diagnosis on Fetal Cells from Maternal Blood: Practical Comparative Evaluation of the First and Second Trimesters. *Prenat Diagn.* 21(3): p. 165-170.
17. Bischoff, F.Z., Lewis, D.E., Simpson, J.L., Nguyen, D.D., Scott, J., Schober, W., Murrell, S., y Elias, S. 1995. Detection of Low-Grade Mosaicism in Fetal Cells Isolated from Maternal Blood. *Prenat Diagn.* 15(12): p. 1182-1184.
18. Elias, S., Price, J., Dockter, M., Wachtel, S., Tharapel, A., Simpson, J.L., y Klinger, K.W. 1992. First Trimester Prenatal Diagnosis of Trisomy 21 in Fetal Cells from Maternal Blood. *Lancet.* 340(8826): p. 1033.
19. Saker, A., Benachi A Fau - Bonnefont, J.P., Bonnefont Jp Fau - Munnich, A., Munnich A Fau - Dumez, Y., Dumez Y Fau - Lacour, B., Lacour B Fau - Paterlini-Brechot, P., y Paterlini-Brechot, P. 2006. Genetic Characterisation of Circulating Fetal Cells Allows Non-Invasive Prenatal Diagnosis of Cystic Fibrosis. (0197-3851 (Print)).
20. Troeger, C., Zhong, X.Y., Burgemeister, R., Minderer, S., Tercanli, S., Holzgreve, W., y Hahn, S. 1999. Approximately Half of the Erythroblasts in Maternal Blood Are of Fetal Origin. *Mol Hum Reprod.* 5(12): p. 1162-1165.
21. Lo, Y.M., Corbetta, N., Chamberlain, P.F., Rai, V., Sargent, I.L., Redman, C.W., y Wainscoat, J.S. 1997. Presence of Fetal DNA in Maternal Plasma and Serum. *Lancet.* 350(9076): p. 485-487.
22. Kress, S., Sutter, C., Strickland, P.T., Mukhtar, H., Schweizer, J., y Schwarz, M. 1992. Carcinogen-Specific Mutational Pattern in the P53 Gene in Ultraviolet B Radiation-Induced Squamous Cell Carcinomas of Mouse Skin. *Cancer Res.* 52(22): p. 6400-6403.
23. Strickland, S. y Richards, W.G. 1992. Invasion of the Trophoblasts. *Cell.* 71(3): p. 355-357.
24. Guibert, J., Benachi, A., Grebille, A.G., Ernault, P., Zorn, J.R., y Costa, J.M. 2003. Kinetics of Sry Gene Appearance in Maternal Serum: Detection by Real Time Pcr in Early Pregnancy after Assisted Reproductive Technique. *Hum Reprod.* 18(8): p. 1733-1736.
25. Lo, Y.M., Tein, M.S., Lau, T.K., Haines, C.J., Leung, T.N., Poon, P.M., Wainscoat, J.S., Johnson, P.J., Chang, A.M., y Hjelm, N.M. 1998. Quantitative Analysis of Fetal DNA in Maternal Plasma and Serum: Implications for Noninvasive Prenatal Diagnosis. *Am J Hum Genet.* 62(4): p. 768-775.
26. Angert, R.M., LeShane, E.S., Lo, Y.M., Chan, L.Y., Delli-Bovi, L.C., y Bianchi, D.W. 2003. Fetal Cell-Free Plasma DNA Concentrations in Maternal Blood Are Stable 24 Hours after Collection: Analysis of First- and Third-Trimester Samples. *Clin Chem.* 49(1): p. 195-198.
27. Galbiati, S., Smid, M., Gambini, D., Ferrari, A., Restagno, G., Viora, E., Campogrande, M., Bastonero, S., Pagliano, M., Calza, S., Ferrari, M., y Cremonesi, L.

2005. Fetal DNA Detection in Maternal Plasma Throughout Gestation. *Hum Genet.* 117(2-3): p. 243-248.
28. Palomaki, G.E., Kloza, E.M., Lambert-Messerlian, G.M., Haddow, J.E., Neveux, L.M., Ehrich, M., van den Boom, D., Bombard, A.T., Deciu, C., Grody, W.W., Nelson, S.F., y Canick, J.A. 2011. DNA Sequencing of Maternal Plasma to Detect Down Syndrome: An International Clinical Validation Study. *Genet Med.* 13(11): p. 913-920.
29. Zimmermann, B., Hill, M., Gemelos, G., Demko, Z., Banjevic, M., Baner, J., Ryan, A., Sigurjonsson, S., Chopra, N., Dodd, M., Levy, B., y Rabinowitz, M. 2012. Noninvasive Prenatal Aneuploidy Testing of Chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, Using Targeted Sequencing of Polymorphic Loci. *Prenat Diagn.* 32(13): p. 1233-1241.
30. Lo, Y.M., Zhang, J., Leung, T.N., Lau, T.K., Chang, A.M., y Hjelm, N.M. 1999. Rapid Clearance of Fetal DNA from Maternal Plasma. *Am J Hum Genet.* 64(1): p. 218-224.
31. Sekizawa, A., Samura, O., Zhen, D.K., Falco, V., Farina, A., y Bianchi, D.W. 2000. Apoptosis in Fetal Nucleated Erythrocytes Circulating in Maternal Blood. *Prenat Diagn.* 20(11): p. 886-889.
32. Lo, Y.M., Tein Ms Fau - Lau, T.K., Lau Tk Fau - Haines, C.J., Haines Cj Fau - Leung, T.N., Leung Tn Fau - Poon, P.M., Poon Pm Fau - Wainscoat, J.S., Wainscoat Js Fau - Johnson, P.J., Johnson Pj Fau - Chang, A.M., Chang Am Fau - Hjelm, N.M., y Hjelm, N.M. 1998. Quantitative Analysis of Fetal DNA in Maternal Plasma and Serum: Implications for Noninvasive Prenatal Diagnosis. (0002-9297 (Print)).
33. Lo, Y.M., Lau, T.K., Zhang, J., Leung, T.N., Chang, A.M., Hjelm, N.M., Elmes, R.S., y Bianchi, D.W. 1999. Increased Fetal DNA Concentrations in the Plasma of Pregnant Women Carrying Fetuses with Trisomy 21. *Clin Chem.* 45(10): p. 1747-1751.
34. Kolialexi, A., Tsangaris Gt Fau - Mavrou, A., Mavrou A Fau - Antsaklis, A., Antsaklis A Fau - Tzortzidou, F., Tzortzidou F Fau - Touliatou, V., Touliatou V Fau - Metaxotou, C., y Metaxotou, C. 2001. Use of Annexin V Antibody to Identify Apoptotic Cells During Pregnancy. (0077-8923 (Print)).
35. Tjoa, M.L., Cindrova-Davies, T., Spasic-Boskovic, O., Bianchi, D.W., y Burton, G.J. 2006. Trophoblastic Oxidative Stress and the Release of Cell-Free Feto-Placental DNA. *Am J Pathol.* 169(2): p. 400-404.
36. Lo, Y.M. 2000. Fetal DNA in Maternal Plasma: Biology and Diagnostic Applications. *Clin Chem.* 46(12): p. 1903-1906.
37. Huppertz, B. y Kingdom, J.C. 2004. Apoptosis in the Trophoblast--Role of Apoptosis in Placental Morphogenesis. *J Soc Gynecol Investig.* 11(6): p. 353-362.
38. Masuzaki, H., Miura, K., Yoshiura, K.I., Yoshimura, S., Niikawa, N., y Ishimaru, T. 2004. Detection of Cell Free Placental DNA in Maternal Plasma: Direct Evidence from Three Cases of Confined Placental Mosaicism. *J Med Genet.* 41(4): p. 289-292.
39. Chim, S.S., Tong, Y.K., Chiu, R.W., Lau, T.K., Leung, T.N., Chan, L.Y., Oudejans, C.B., Ding, C., y Lo, Y.M. 2005. Detection of the Placental Epigenetic Signature of the Maspin Gene in Maternal Plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(41): p. 14753-14758.

40. Dennis Lo, Y.M. y Chiu, R.W. 2007. Prenatal Diagnosis: Progress through Plasma Nucleic Acids. (1471-0056 (Print)).
41. Chan, K.C., Zhang, J., Hui, A.B., Wong, N., Lau, T.K., Leung, T.N., Lo, K.W., Huang, D.W., y Lo, Y.M. 2004. Size Distributions of Maternal and Fetal DNA in Maternal Plasma. *Clin Chem.* 50(1): p. 88-92.
42. Li, Y., Holzgreve, W., Page-Christiaens, G.C., Gille, J.J., y Hahn, S. 2004. Improved Prenatal Detection of a Fetal Point Mutation for Achondroplasia by the Use of Size-Fractionated Circulatory DNA in Maternal Plasma--Case Report. *Prenat Diagn.* 24(11): p. 896-898.
43. Li, Y., Di Naro, E., Vitucci, A., Zimmermann, B., Holzgreve, W., y Hahn, S. 2005. Detection of Paternally Inherited Fetal Point Mutations for Beta-Thalassemia Using Size-Fractionated Cell-Free DNA in Maternal Plasma. *JAMA.* 293(7): p. 843-849.
44. Clausen, F.B., Krog, G.R., Rieneck, K., y Dziegiel, M.H. 2007. Improvement in Fetal DNA Extraction from Maternal Plasma. Evaluation of the Nuclisens Magnetic Extraction System and the Qiaamp Dsp Virus Kit in Comparison with the Qiaamp DNA Blood Mini Kit. *Prenat Diagn.* 27(1): p. 6-10.
45. Legler, T.J., Liu, Z., Mavrou, A., Finning, K., Hromadnikova, I., Galbiati, S., Meaney, C., Hulten, M.A., Crea, F., Olsson, M.L., Maddocks, D.G., Huang, D., Fisher, S.A., Sprenger-Haussels, M., Soussan, A.A., y van der Schoot, C.E. 2007. Workshop Report on the Extraction of Foetal DNA from Maternal Plasma. *Prenat Diagn.* 27(9): p. 824-829.
46. Dhallan, R., Au, W.C., Mattagajasingh, S., Emche, S., Bayliss, P., Damewood, M., Cronin, M., Chou, V., y Mohr, M. 2004. Methods to Increase the Percentage of Free Fetal DNA Recovered from the Maternal Circulation. *JAMA.* 291(9): p. 1114-1119.
47. Poon, L.L., Leung, T.N., Lau, T.K., Chow, K.C., y Lo, Y.M. 2002. Differential DNA Methylation between Fetus and Mother as a Strategy for Detecting Fetal DNA in Maternal Plasma. *Clin Chem.* 48(1): p. 35-41.
48. Chan, K.C., Ding, C., Gerovassili, A., Yeung, S.W., Chiu, R.W., Leung, T.N., Lau, T.K., Chim, S.S., Chung, G.T., Nicolaidis, K.H., y Lo, Y.M. 2006. Hypermethylated *Rassf1a* in Maternal Plasma: A Universal Fetal DNA Marker That Improves the Reliability of Noninvasive Prenatal Diagnosis. *Clin Chem.* 52(12): p. 2211-2218.
49. Tong, Y.K. y Lo, Y.M. 2006. Plasma Epigenetic Markers for Cancer Detection and Prenatal Diagnosis. *Front Biosci.* 11: p. 2647-2656.
50. Old, R.W., Crea, F., Puszyk, W., y Hulten, M.A. 2007. Candidate Epigenetic Biomarkers for Non-Invasive Prenatal Diagnosis of Down Syndrome. *Reprod Biomed Online.* 15(2): p. 227-235.
51. Costa, J.M., Benachi A Fau - Gautier, E., Gautier E Fau - Jouannic, J.M., Jouannic Jm Fau - Ernault, P., Ernault P Fau - Dumez, Y., y Dumez, Y. 2001. First-Trimester Fetal Sex Determination in Maternal Serum Using Real-Time Pcr. (0197-3851 (Print)).
52. Sekizawa, A., Sugito Y Fau - Iwasaki, M., Iwasaki M Fau - Watanabe, A., Watanabe A Fau - Jimbo, M., Jimbo M Fau - Hoshi, S., Hoshi S Fau - Saito, H., Saito H

- Fau - Okai, T., y Okai, T. 2001. Cell-Free Fetal DNA Is Increased in Plasma of Women with Hyperemesis Gravidarum. (0009-9147 (Print)).
53. Costa Jm Fau - Benachi, A., Benachi A Fau - Gautier, E., y Gautier, E. 2002. New Strategy for Prenatal Diagnosis of X-Linked Disorders. (1533-4406 (Electronic)).
54. Rijnders, R.J., Van Der Luijt, R.B., Peters, E.D., Goeree, J.K., Van Der Schoot, C.E., Ploos Van Amstel, J.K., y Christiaens, G.C. 2003. Earliest Gestational Age for Fetal Sexing in Cell-Free Maternal Plasma. *Prenat Diagn.* 23(13): p. 1042-1044.
55. Alberry, M., Maddocks, D., Jones, M., Abdel Hadi, M., Abdel-Fattah, S., Avent, N., y Soothill, P.W. 2007. Free Fetal DNA in Maternal Plasma in Anembryonic Pregnancies: Confirmation That the Origin Is the Trophoblast. *Prenat Diagn.* 27(5): p. 415-418.
56. Hyett, J.A., Gardener, G., Stojilkovic-Mikic, T., Finning, K.M., Martin, P.G., Rodeck, C.H., y Chitty, L.S. 2005. Reduction in Diagnostic and Therapeutic Interventions by Non-Invasive Determination of Fetal Sex in Early Pregnancy. *Prenat Diagn.* 25(12): p. 1111-1116.
57. Finning, K.M. y Chitty, L.S. 2008. Non-Invasive Fetal Sex Determination: Impact on Clinical Practice. *Semin Fetal Neonatal Med.* 13(2): p. 69-75.
58. Westhoff, C.M. 2007. The Structure and Function of the Rh Antigen Complex. *Semin Hematol.* 44(1): p. 42-50.
59. Urbaniak, S.J. y Greiss, M.A. 2000. Rhd Haemolytic Disease of the Fetus and the Newborn. (0268-960X (Print)).
60. Faas, B.H., Beuling, E.A., Christiaens, G.C., von dem Borne, A.E., y van der Schoot, C.E. 1998. Detection of Fetal Rhd-Specific Sequences in Maternal Plasma. *Lancet.* 352(9135): p. 1196.
61. Pilgrim, H., Lloyd-Jones, M., y Rees, A. 2009. Routine Antenatal Anti-D Prophylaxis for Rhd-Negative Women: A Systematic Review and Economic Evaluation. *Health Technol Assess.* 13(10): p. iii, ix-xi, 1-103.
62. Norbury, G. y Norbury, C.J. 2008. Non-Invasive Prenatal Diagnosis of Single Gene Disorders: How Close Are We? *Semin Fetal Neonatal Med.* 13(2): p. 76-83.
63. Simpson JL, B.A.T. 1987. Chromosomal Abnormalities in Spontaneous Abortion Frequency, Pathology and Genetic Counselling. Bennet Mj & Edmonds Ek (Eds). *Spontaneous and Recurrent Abortion.* Blackwell Scientific Publication, London. pp 78-100.
64. Lo, Y.M., Lau Tk Fau - Zhang, J., Zhang J Fau - Leung, T.N., Leung Tn Fau - Chang, A.M., Chang Am Fau - Hjelm, N.M., Hjelm Nm Fau - Elmes, R.S., Elmes Rs Fau - Bianchi, D.W., y Bianchi, D.W. 1999. Increased Fetal DNA Concentrations in the Plasma of Pregnant Women Carrying Fetuses with Trisomy 21. (0009-9147 (Print)).
65. Illanes, S., Parra, M., Serra, R., Pino, K., Figueroa-Diesel, H., Romero, C., Arraztoa, J.A., Michea, L., y Soothill, P.W. 2009. Increased Free Fetal DNA Levels in Early Pregnancy Plasma of Women Who Subsequently Develop Preeclampsia and Intrauterine Growth Restriction. *Prenat Diagn.* 29(12): p. 1118-1122.

66. Zhong, X.Y., Laivuori H Fau - Livingston, J.C., Livingston Jc Fau - Ylikorkala, O., Ylikorkala O Fau - Sibai, B.M., Sibai Bm Fau - Holzgreve, W., Holzgreve W Fau - Hahn, S., y Hahn, S. 2001. Elevation of Both Maternal and Fetal Extracellular Circulating Deoxyribonucleic Acid Concentrations in the Plasma of Pregnant Women with Preeclampsia. (0002-9378 (Print)).
67. Yin, A., Ng, E.H., Zhang, X., He, Y., Wu, J., y Leung, K.Y. 2007. Correlation of Maternal Plasma Total Cell-Free DNA and Fetal DNA Levels with Short Term Outcome of First-Trimester Vaginal Bleeding. *Hum Reprod.* 22(6): p. 1736-1743.
68. Leung Tn Fau - Zhang, J., Zhang J Fau - Lau, T.K., Lau Tk Fau - Hjelm, N.M., Hjelm Nm Fau - Lo, Y.M., y Lo, Y.M. 1998. Maternal Plasma Fetal DNA as a Marker for Preterm Labour. (0140-6736 (Print)).
69. Sekizawa, A., Jimbo, M., Saito, H., Iwasaki, M., Sugito, Y., Yukimoto, Y., Otsuka, J., y Okai, T. 2002. Increased Cell-Free Fetal DNA in Plasma of Two Women with Invasive Placenta. *Clin Chem.* 48(2): p. 353-354.
70. Wataganara, T., LeShane, E.S., Farina, A., Messerlian, G.M., Lee, T., Canick, J.A., y Bianchi, D.W. 2003. Maternal Serum Cell-Free Fetal DNA Levels Are Increased in Cases of Trisomy 13 but Not Trisomy 18. *Hum Genet.* 112(2): p. 204-208.
71. Hromadnikova, I., Houbova, B., Hridelova, D., Voslarova, S., Calda, P., Nekolarova, K., Kofer, J., Stejskal, D., Doucha, J., Cinek, O., y Vavrirec, J. 2002. Quantitative Analysis of DNA Levels in Maternal Plasma in Normal and Down Syndrome Pregnancies. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2(1): p. 4.
72. Bustamante-Aragones, A., Perez-Cerda, C., Perez, B., de Alba, M.R., Ugarte, M., y Ramos, C. 2008. Prenatal Diagnosis in Maternal Plasma of a Fetal Mutation Causing Propionic Acidemia. *Mol Genet Metab.* 95(1-2): p. 101-103.
73. Fan, H.C., Blumenfeld, Y.J., Chitkara, U., Hudgins, L., y Quake, S.R. 2008. Noninvasive Diagnosis of Fetal Aneuploidy by Shotgun Sequencing DNA from Maternal Blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(42): p. 16266-16271.
74. Benn, P., Borell, A., Chiu, R., Cuckle, H., Dugoff, L., Faas, B., Gross, S., Johnson, J., Maymon, R., Norton, M., Odibo, A., Schielen, P., Spencer, K., Huang, T., Wright, D., y Yaron, Y. 2013. Position Statement from the Aneuploidy Screening Committee on Behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis. *Prenat Diagn.* 33(7): p. 622-629.
75. Devers, P.L., Cronister, A., Ormond, K.E., Facio, F., Brasington, C.K., y Flodman, P. 2013. Noninvasive Prenatal Testing/Noninvasive Prenatal Diagnosis: The Position of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns.* 22(3): p. 291-295.
76. Nicolaidis, K.H., Syngelaki, A., Ashoor, G., Birdir, C., y Touzet, G. 2012. Noninvasive Prenatal Testing for Fetal Trisomies in a Routinely Screened First-Trimester Population. *Am J Obstet Gynecol.* 207(5): p. 374 e371-376.
77. Griffiths AJF, G.W., Miller JH, et al. 1999. *Modern Genetic Analysis*. New York: W. H. Freeman.

78. Goodman, M. 2000. Actividad N° 2 Con El Adn De La Familia Blackett. El Proyecto Biológico.
79. Carrel, L. y Willard, H.F. 2005. X-Inactivation Profile Reveals Extensive Variability in X-Linked Gene Expression in Females. (1476-4687 (Electronic)).
80. Cann R. Stone K, a.W.C.A. 1986, . Mitochondrial Eve, . Nature 325. 325: 31-36.
81. Gardiner, K., Davisson, M.T., y Crnic, L.S. 2004. Building Protein Interaction Maps for Down's Syndrome. Brief Funct Genomic Proteomic. 3(2): p. 142-156.
82. Kelton, J.G. 1984. Blood Component Therapy. Can Fam Physician. (1809–1814).
83. Sayres, L.C. y Cho, M.K. 2011. Cell-Free Fetal Nucleic Acid Testing: A Review of the Technology and Its Applications. Obstet Gynecol Surv. 66(7): p. 431-442.
84. Ng, E.K., Tsui, N.B., Lau, T.K., Leung, T.N., Chiu, R.W., Panesar, N.S., Lit, L.C., Chan, K.W., y Lo, Y.M. 2003. Mrna of Placental Origin Is Readily Detectable in Maternal Plasma. Proc Natl Acad Sci U S A. 100(8): p. 4748-4753.
85. Leninger, A.L. 1975. Biochemistry. 2nd Ed. New York (Worth Publishers).
86. Gonzalez-Gonzalez, C., Garcia-Hoyos, M., Trujillo-Tiebas, M.J., Lorda-Sanchez, I., de Alba, M.R., Infantes, F., Gallego, J., Diaz-Recasens, J., Ayuso, C., y Ramos, C. 2005. Application of Fetal DNA Detection in Maternal Plasma: A Prenatal Diagnosis Unit Experience. J Histochem Cytochem. 53(3): p. 307-314.
87. Aranguren-Méndez, J.A., Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y., y Jordana, J. 2005. Los Microsatélites (Str´S), Marcadores Moleculares De Adn Por Excelencia Para Programas De Conservación: Una Revisión. Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal. Vol 13 Num 1(ISSN: 1022-1301).
88. Schaffner, S.F. 2004. The X Chromosome in Population Genetics. Nat Rev Genet. 5(1): p. 43-51.
89. Avent, N.D., Madgett, T.E., Maddocks, D.G., y Soothill, P.W. 2009. Cell-Free Fetal DNA in the Maternal Serum and Plasma: Current and Evolving Applications. Curr Opin Obstet Gynecol. 21(2): p. 175-179.

## Referencias electrónicas

- Hallick, R. y Ryan, C. 2000 Actividad n° 2 con el ADN de la familia. El proyecto Biológico (Sitio en Internet). Disponible en: [http://www.biologia.arizona.edu/human/activities/blackett2/str\\_description.html](http://www.biologia.arizona.edu/human/activities/blackett2/str_description.html). Acceso el 28 de Enero de 2013
- Naveiro F., 2011 Screening de aneuploidías del primer trimestre. (Sitio en Internet). Disponible en: [http://www.hvn.es/servicios\\_asistenciales/ginecologia\\_y\\_obstetricia/ficheros/clase2\\_011\\_screening\\_de\\_aneuploidias.pdf](http://www.hvn.es/servicios_asistenciales/ginecologia_y_obstetricia/ficheros/clase2_011_screening_de_aneuploidias.pdf). Acceso el 28 de Enero de 2013
- TECHNICAL SUPPORT BULLETIN NanoDrop® (Sitio en Internet). Disponible en: [http://www.bio.davidson.edu/projects/gcat/protocols/NanoDrop\\_tip.pdf](http://www.bio.davidson.edu/projects/gcat/protocols/NanoDrop_tip.pdf). Acceso el 04 de Abril de 2014

## Anexo I

### Tablas de frecuencia binomial.

Los cálculos de concordancia se realizaron omitiendo el marcador DXS998 y se determinó que la certidumbre no varía (**Tabla 19**).

*Tabla 19. Concordancia entre DNA leucocitario materno y cfDNA de plasma omitiendo el marcador DXS998. 0=Concordante; 1=Discordante.*

Familia	Cromosoma X			Cromosoma 21			Concordancia/ no concordancia
	DXS998	DXS8061	DXS1108	D21S211	D21S1258	D21S1887	
DPF01	0	0	0	1	0	0	1
DPF02	1	1	1	0	0	1	1
DPF03	1	0	0	1	0	1	1
DPF04	0	0	0	0	1	0	1
DPF05	1	1	1	0	1	0	1
DPF06	1	1	0	0	0	1	1
DPF07	1	0	1	1	1	0	1
DPF08	0	0	0	0	0	0	0
DPF09	0	1	0	1	1	1	1
DPF10	0	0	0	0	1	1	1
DPF11	0	1	1	0	1	1	1
DPF12	0	0	0	1	0	1	1
DPF13	0	0	1	1	0	0	1
DPF14	0	0	0	0	0	0	0
Proporción	0.357	0.357	0.357	0.429	0.429	0.500	0.857



De igual manera, el análisis se realizó omitiendo, ahora, el marcador DXS8061 sin encontrar cambios en la certidumbre (**Tabla 20**).

Tabla 20. Concordancia entre DNA leucocitario materno y cfDNA de plasma omitiendo el marcador DXS8061.  
0=Concordante; 1=Discordante.

Familia	Cromosoma X			Cromosoma 21			Concordancia/ no concordancia
	DXS998	DXS8061	DXS1108	D21S211	D21S1258	D21S1887	
DPF01	0	0	0	1	0	0	1
DPF02	1	1	1	0	0	1	1
DPF03	1	0	0	1	0	1	1
DPF04	0	0	0	0	1	0	1
DPF05	1	1	1	0	1	0	1
DPF06	1	1	0	0	0	1	1
DPF07	1	0	1	1	1	0	1
DPF08	0	0	0	0	0	0	0
DPF09	0	1	0	1	1	1	1
DPF10	0	0	0	0	1	1	1
DPF11	0	1	1	0	1	1	1
DPF12	0	0	0	1	0	1	1
DPF13	0	0	1	1	0	0	1
DPF14	0	0	0	0	0	0	0
Proporción	0.357	0.357	0.357	0.429	0.429	0.500	0.857

Sin tomar en cuenta al marcador DXS1108 la certidumbre sigue siendo 0.857 (**Tabla 21**).

*Tabla 21. Concordancia entre DNA leucocitario materno y cfDNA de plasma omitiendo el marcador DXS1108.  
0=Concordante; 1=Discordante.*

Familia	Cromosoma X			Cromosoma 21			Concordancia/ no concordancia
	DXS998	DXS8061	DXS1108	D21S211	D21S1258	D21S1887	
DPF01	0	0	0	1	0	0	1
DPF02	1	1	1	0	0	1	1
DPF03	1	0	0	1	0	1	1
DPF04	0	0	0	0	1	0	1
DPF05	1	1	1	0	1	0	1
DPF06	1	1	0	0	0	1	1
DPF07	1	0	1	1	1	0	1
DPF08	0	0	0	0	0	0	0
DPF09	0	1	0	1	1	1	1
DPF10	0	0	0	0	1	1	1
DPF11	0	1	1	0	1	1	1
DPF12	0	0	0	1	0	1	1
DPF13	0	0	1	1	0	0	1
DPF14	0	0	0	0	0	0	0
Proporción	0.357	0.357	0.357	0.429	0.429	0.500	0.857

Contrariamente a los casos anteriores, si el marcador D21S211 queda fuera del análisis la certidumbre baja a 0.786 (**Tabla 22**).

Tabla 22. Concordancia entre DNA leucocitario materno y cfDNA de plasma omitiendo el marcador D21S211.  
0=Concordante; 1=Discordante.

Familia	Cromosoma X			Cromosoma 21			Concordancia/ no concordancia
	DXS998	DXS8061	DXS1108	D21S211	D21S1258	D21S1887	
DPF01	0	0	0	1	0	0	0
DPF02	1	1	1	0	0	1	1
DPF03	1	0	0	1	0	1	1
DPF04	0	0	0	0	1	0	1
DPF05	1	1	1	0	1	0	1
DPF06	1	1	0	0	0	1	1
DPF07	1	0	1	1	1	0	1
DPF08	0	0	0	0	0	0	0
DPF09	0	1	0	1	1	1	1
DPF10	0	0	0	0	1	1	1
DPF11	0	1	1	0	1	1	1
DPF12	0	0	0	1	0	1	1
DPF13	0	0	1	1	0	0	1
DPF14	0	0	0	0	0	0	0
Proporción	0.357	0.357	0.357	0.429	0.429	0.500	0.786

Al excluir el marcador D21S1258 la certidumbre baja a 0.786 (**Tabla 23**).

Tabla 23. Concordancia entre DNA leucocitario materno y cfDNA de plasma omitiendo el marcador D21S1258.

0=Concordante; 1=Discordante.

Familia	Cromosoma X			Cromosoma 21			Concordancia/ no concordancia
	DXS998	DXS8061	DXS1108	D21S211	D21S1258	D21S1887	
DPF01	0	0	0	1	0	0	1
DPF02	1	1	1	0	0	1	1
DPF03	1	0	0	1	0	1	1
DPF04	0	0	0	0	1	0	0
DPF05	1	1	1	0	1	0	1
DPF06	1	1	0	0	0	1	1
DPF07	1	0	1	1	1	0	1
DPF08	0	0	0	0	0	0	0
DPF09	0	1	0	1	1	1	1
DPF10	0	0	0	0	1	1	1
DPF11	0	1	1	0	1	1	1
DPF12	0	0	0	1	0	1	1
DPF13	0	0	1	1	0	0	1
DPF14	0	0	0	0	0	0	0
Proporción	0.357	0.357	0.357	0.429	0.429	0.500	0.786

Si el marcador D21S1887, que es el que presenta mayor proporción de discordancia (0.500), es omitido la certidumbre se mantiene en 0.857, contrariamente a lo que se esperaba (**Tabla 24**).

*Tabla 24. Concordancia entre DNA leucocitario materno y cfDNA de plasma omitiendo el marcador D21S1887.  
0=Concordante; 1=Discordante.*

Familia	Cromosoma X			Cromosoma 21			Concordancia/ no concordancia
	DXS998	DXS8061	DXS1108	D21S211	D21S1258	D21S1887	
DPF01	0	0	0	1	0	0	1
DPF02	1	1	1	0	0	1	1
DPF03	1	0	0	1	0	1	1
DPF04	0	0	0	0	1	0	1
DPF05	1	1	1	0	1	0	1
DPF06	1	1	0	0	0	1	1
DPF07	1	0	1	1	1	0	1
DPF08	0	0	0	0	0	0	0
DPF09	0	1	0	1	1	1	1
DPF10	0	0	0	0	1	1	1
DPF11	0	1	1	0	1	1	1
DPF12	0	0	0	1	0	1	1
DPF13	0	0	1	1	0	0	1
DPF14	0	0	0	0	0	0	0
Proporción	0.357	0.357	0.357	0.429	0.429	0.500	0.857

La certidumbre de discordancia que se puede obtener con el uso de estos seis marcadores es aceptable, sin embargo para tener una mayor proporción fue necesaria la amplificación de tres marcadores más del cromosoma Y.