



**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 Y 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:

**Velasco Tapia Viridiana Gricel**

DIRECTOR DE TESIS:

**M. en C. Higinio Estrada Juárez**

ASESOR INTERNO:

**Dra. Elia Roldán Reyes**



Junio 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:

Viridiana Gricel Velasco Tapia

N° de cuenta 409020177

FES-Zaragoza, UNAM

---

Director de tesis:

M. en C. Higinio Estrada Juárez

Departamento de Genómica humana 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 el Departamento de Genómica Humana bajo la dirección del M. en C. Higinio Estrada Juárez con colaboración de la Coordinación de Hematología Perinatal.

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 VIRIDIANA GRICEL VELASCO TAPIA con número de matrícula 409020177 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 X y Y como marcadores de la presencia de DNA fetal", a cargo del M. en Biol. Exp. Higinio Estrada Juárez. 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.

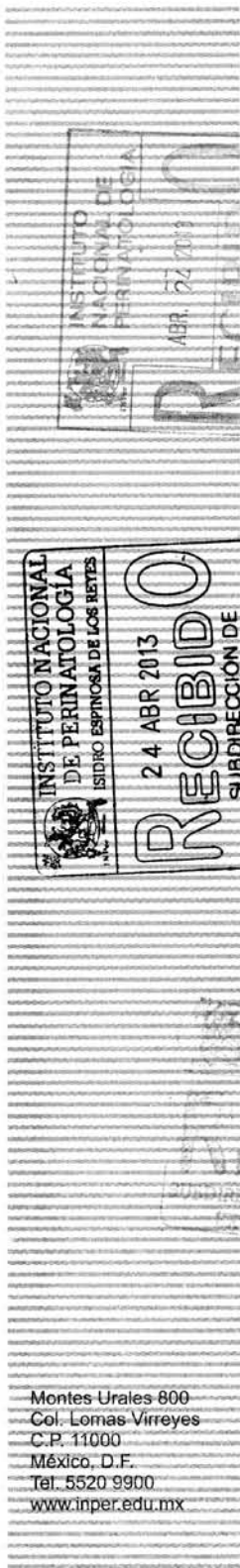
Sin otro particular por el momento, me despido de usted y quedo para cualquier aclaración que considere pertinente.

ATENTAMENTE

  
**Dra Patricia Grether González**  
Departamento de Genómica Humana  
Extensión 316

c.c.p. Dr. Manuel Velasco Pasillas. Subdirector de Intercambio y Vinculación.  
Dra. Itzel Carolina García Cravioto. Jefe del Departamento de Vinculación Educativa.  
Dr. Arturo Cébulo Vázquez. Subdirector de Investigación Biomédica  
Dra. Patricia Grether González. Jefa del Departamento de Genética

Montes Urales 800  
Col. Lomas Virreyes  
C.P. 11000  
México, D.F.  
Tel. 5520 9900  
www.inper.edu.mx



## Contenido

I. Índice de Tablas.....	VIII
II. Índice de Figuras.....	X
III. Lista de Abreviaturas .....	XII
IV. Resumen .....	15
1. Introducción .....	16
Diagnóstico prenatal. ....	16
Diagnóstico prenatal no invasivo. ....	17
Células fetales en sangre materna. ....	18
DNA fetal libre de células.....	19
Origen del DNA fetal libre de células. ....	20
Métodos utilizados en la extracción del DNA libre de células.....	23
Diagnóstico del sexo fetal. ....	23
Diagnóstico del factor Rh fetal. ....	24
Diagnóstico de enfermedades monogénicas. ....	26
Polimorfismos Genéticos. ....	30
Usos de los polimorfismos en Genética .....	30
Secuencias Repetidas en Tandem. ....	31
Cromosoma X.....	33
2. Planteamiento del problema.....	35
3. Hipótesis del trabajo.....	36

4. Objetivos .....	37
General.....	37
Particulares.....	37
5. Métodos .....	38
Toma de muestra.....	40
Aislamiento del DNA fetal libre de células en plasma materno.....	40
Electroforesis de integridad del DNA fetal libre de células. ....	42
Aislamiento de DNA materno de sangre total. ....	42
Espectrofotometría. ....	43
Determinación de las Secuencias Repetidas en Tandem por electroforesis capilar.....	44
Reacción en Cadena de la Polimerasa .....	46
Electroforesis en agarosa .....	47
Electroforesis Capilar.....	48
Análisis de los fragmentos .....	48
Análisis estadístico .....	49
Conflicto de Intereses .....	49
6. Resultados .....	50
Identificación del DNA libre de células en plasma.....	50
DNA Leucocitario.....	56
Identificación de los amplificados de los marcadores X y Y. ....	59
Identificación de las variaciones de los marcadores X y Y mediante electroforesis capilar.....	60

DXS998.....	60
DXS8061.....	61
DXS1108.....	62
Cromosoma Y .....	62
7. Discusión .....	65
8. Conclusiones.....	71
9. Perspectivas .....	72
Referencias bibliográficas .....	73
Referencias electrónicas.....	85
Anexo I.....	86
Tablas de frecuencia binomial. ....	86



## I. Índice de Tablas

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DEL CFFDNA EN PLASMA MATERNO .....	20
TABLA 2. ENFERMEDADES MONOGENICAS ESTUDIADAS A PARTIR DE DNA FETAL EN PLASMA MATERNO <sup>(62)</sup> .....	27
TABLA 3. ANEUPLOIDÍAS HUMANAS MÁS FRECUENTES <sup>(63)</sup> .....	28
TABLA 4. MARCADORES PARA LOS CROMOSOMAS Y Y X.....	45
TABLA 5. DESCRIPCIÓN ESTADÍSTICA DEL COMPORTAMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CFDNA.....	51
TABLA 6. DESCRIPCIÓN ESTADÍSTICA DEL COMPORTAMIENTO DE LA RELACIÓN 260/280 DEL CFDNA.....	53
TABLA 7. DESCRIPCIÓN ESTADÍSTICA DEL COMPORTAMIENTO DE LA RELACIÓN 260/230 DE CFDNA.....	54
TABLA 8. CUANTIFICACIÓN DE MUESTRAS TRATADAS CON RNASA.....	55
TABLA 9. DESCRIPCIÓN ESTADÍSTICA DEL COMPORTAMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE DNA MATERNO.....	57
TABLA 10. CONCENTRACIÓN, RELACIÓN 260/280 Y RELACIÓN 260/230.....	58
TABLA 11. PROPORCIONES DE MARCADOR DXS998.....	60
TABLA 12. PROPORCIONES DE MARCADOR DXS8061.....	61
TABLA 13. PROPORCIONES MARCADOR DXS1108.....	62
TABLA 14. PROPORCIONES DE DNA LEUCOCITARIO Y CFDNA.....	62
TABLA 15. CONCORDANCIA ENTRE DNA LEUCOCITARIO MATERNO Y CFDNA DE PLASMA.....	63
TABLA 16. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS SOBRE EL SEXO DE LOS FETOS.....	64
TABLA 17. CONCORDANCIA ENTRE DNA LEUCOCITARIO MATERNO Y CFDNA DE PLASMA OMITIENDO EL MARCADOR DXS998.....	86

<i>TABLA 18. CONCORDANCIA ENTRE DNA LEUCOCITARIO MATERNO Y CFDNA DE PLASMA OMITIENDO EL MARCADOR DXS8061. ....</i>	<i>87</i>
<i>TABLA 19. CONCORDANCIA ENTRE DNA LEUCOCITARIO MATERNO Y CFDNA DE PLASMA OMITIENDO EL MARCADOR DXS1108. ....</i>	<i>88</i>
<i>TABLA 20. CONCORDANCIA ENTRE DNA LEUCOCITARIO MATERNO Y CFDNA DE PLASMA OMITIENDO EL MARCADOR D21S211. ....</i>	<i>89</i>

## II. Índice de Figuras

FIGURA 1. EL ESPACIO INTERVELLOSO O CÁMARA HEMÁTICA:.....	21
FIGURA 2. MICROGRAFÍA DE NUDOS SINCISIALES EN PLACENTA DE 35 SEMANAS <sup>(36)</sup> .....	22
FIGURA 3. PRINCIPIOS DEL ANÁLISIS DEL DNA FETAL CIRCULANTE EN PLASMA MATERNO: .....	22
FIGURA 4. EL ANTICUERPO ANTI-D SE DEBE DAR A LAS MUJERES RH-NEGATIVO EMBARAZADAS DE UN RH-POSITIVO. ....	26
FIGURA 5. ANÁLISIS DEL TAMAÑO DE LOS DIFERENTES ALELOS FETALES SEGÚN EL ORIGEN PARENTAL. ....	33
FIGURA 6. DIAGRAMA DE FLUJO DE TRABAJO. ....	39
FIGURA 7. MUESTRAS SANGUÍNEAS.....	40
FIGURA 8. PLASMA SANGUÍNEO MATERNO PARA EXTRACCIÓN DE cfDNA. ....	42
FIGURA 9. ESPECTROFOTÓMETRO ACTGENE ASP-3700.....	44
FIGURA 10. MAPA DE POSICIÓN DE LOS MARCADORES EN LOS CROMOSOMAS X Y Y.....	46
FIGURA 11. CORRIDA DE PCR EN UN MASTERCYCLE GRADIENT EPPENDORF. ....	47
FIGURA 12. SECUENCIADOR ABI3130.....	48
FIGURA 13. ESQUEMA DE ELECTROFEROGRAMA. ....	49
FIGURA 14. DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS DE LA CONCENTRACIÓN DE DNA OBTENIDO EN PLASMA EMBARAZADAS Y CONTROLES.....	51
FIGURA 15. GEL DE AGAROSA AL 4% PARA ANALIZAR LA INTEGRIDAD DE LAS MUESTRAS. ....	52
FIGURA 16. DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS DE LA RELACIÓN 260/280 DE DNA OBTENIDO EN PLASMA DE EMBARAZADAS Y CONTROLES.....	53
FIGURA 17. DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS DE LA RELACIÓN 260/230 DE DNA OBTENIDO EN PLASMA DE MUJERES EMBARAZADAS Y CONTROLES. ....	54
FIGURA 18. EJEMPLOS DE GRÁFICA DE CUANTIFICACIÓN DE ABSORBANCIA; .....	55

<i>FIGURA 19. DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS DE LA CONCENTRACIÓN DE DNA LEUCOCITARIO</i>	
<i>MATERNO.....</i>	<i>57</i>
<i>FIGURA 20. GEL DE INTEGRIDAD DE AGAROSA AL 4%.....</i>	<i>58</i>
<i>FIGURA 21. EJEMPLIFICACIÓN DE AMPLIFICADOS DE LOS MARCADOR DEL CROMOSOMA X (A) Y Y</i>	
<i>(B).....</i>	<i>59</i>

### III. 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

**RNAsa:** Enzima ribonucleasa

**EHRN:** Enfermedad hemolítica del recién nacido

**CVS:** Velloosidades coriónicas

## IV. 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 con un par iniciadores de STR de los cromosomas X y Y. Se identificaron los fragmentos amplificados del cfDNA del plasma materno por medio de electroforesis capilar y se compararon con el DNA leucocitario materno. **Resultados:** Fue posible diferenciar 14 muestras, usando marcadores de los cromosomas X y Y. 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.

## 1. 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)</sup>, <sup>(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)</sup> <sup>(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)</sup> <sup>(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 intervelloso, 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)</sup> <sup>(22)</sup> <sup>(23)</sup>.

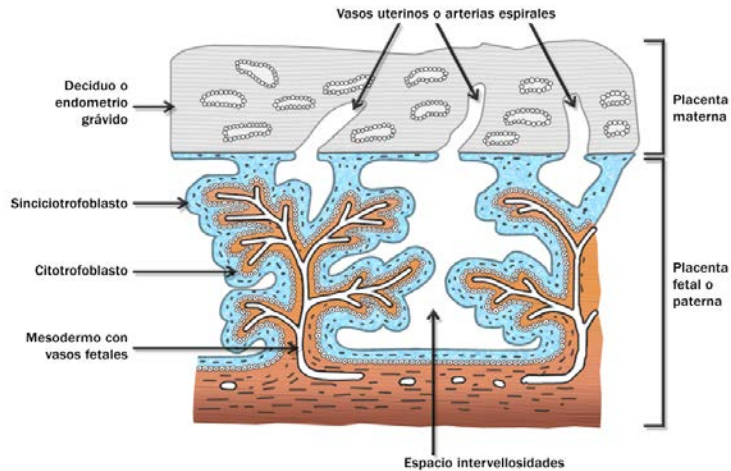
A partir del día 18 de la gestación el cffDNA está presente en el plasma materno y se incrementa a medida que la gestación avanza, representa alrededor del 3% del DNA total en estadios tempranos y un 6% al término (**Tabla 1**) <sup>(24)</sup> <sup>(25)</sup> <sup>(26)</sup> <sup>(27)</sup>. Las estimaciones 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)</sup> <sup>(29)</sup>. Después del parto el cffDNA se elimina rápidamente del plasma materno <sup>(30)</sup>.

<i>Tabla 1. Características principales del cffDNA en plasma materno</i>
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)</sup> <sup>(32)</sup> <sup>(33)</sup> <sup>(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 intervelloso 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 (30).*

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 (35).

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 (36). 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**) (37).

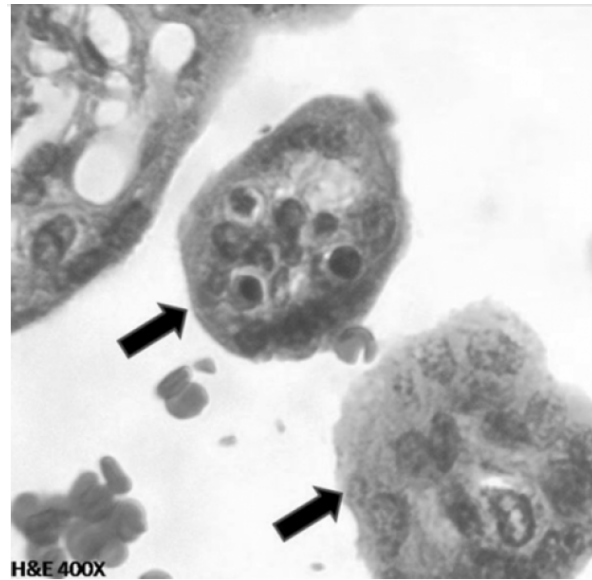


Figura 2. Micrografía de nudos sincisiales en placenta de 35 semanas (36).

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**) (24) (38) (39).

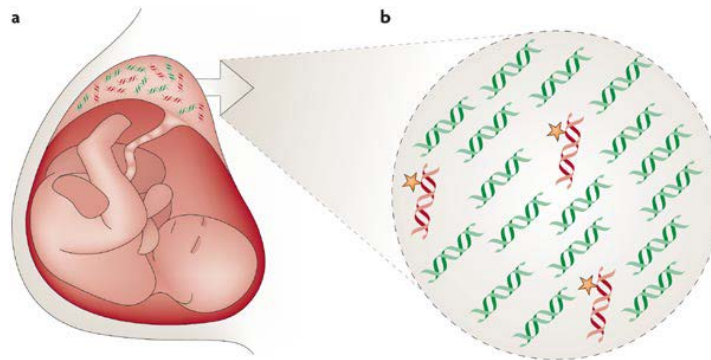


Figura 3. Principios del análisis del DNA fetal circulante en plasma materno:  
a) Liberación de DNA fetal al torrente sanguíneo materno a través de la placenta. b) En el plasma materno las moléculas de DNA fetal se encuentran en menor proporción que el DNA materno. Los alelos fetales específicos de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

## 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)</sup> <sup>(42)</sup> <sup>(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)</sup> <sup>(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)</sup> <sup>(47)</sup> <sup>(48)</sup> <sup>(49)</sup> <sup>(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)</sup> <sup>(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>.

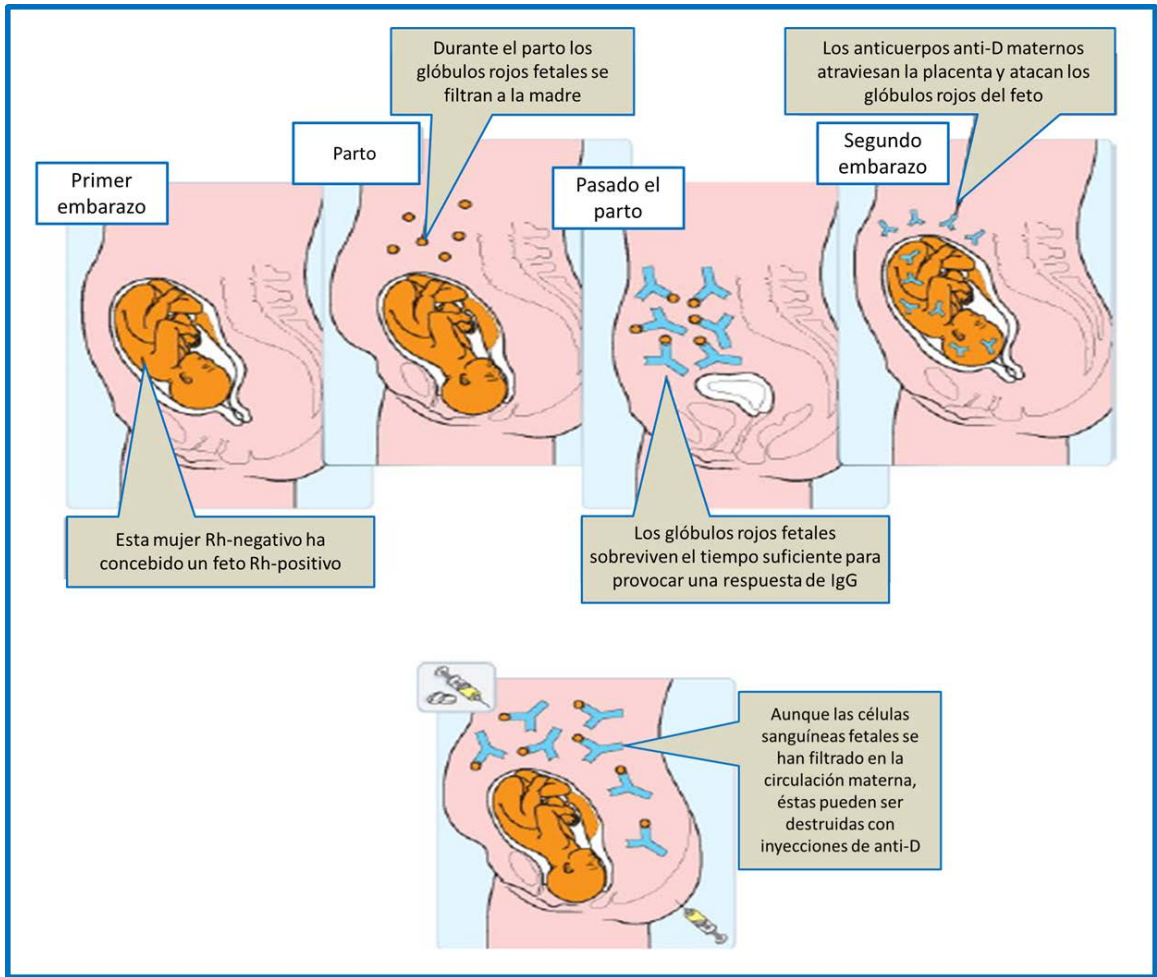


Figura 4. El anticuerpo anti-D se debe dar a las mujeres Rh-negativo embarazadas de un Rh-positivo. El anti-D destruye las células fetales Rh-positivo en el torrente sanguíneo de la madre antes de que ella tenga la oportunidad de hacer su propio anti-D, lo que puede afectar el siguiente embarazo. El 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).

<b>Enfermedad</b>	<b>Técnica empleada</b>	<b>Referencia bibliográfica</b>
<b><i>Acondroplasia</i></b>	Análisis de restricción MALDI-TOF MS	Li, et al. 2007.
<b><i>Beta-talasemia</i></b>	PCR Tiempo Real Espectrometría de masas PNA-Clamp PCR	Chiu, et al. 2002.
<b><i>Hiperplasia adrenal congénita</i></b>	PCR fluorescente-SNPs	Chiu et al. 2002.
<b><i>Corea de Huntington</i></b>	QF-PCR	Bustamante-Aragones, et al. 2008.
<b><i>Fibrosis Quística</i></b>	Análisis de restricción Minisequenciación	Bustamante-Aragones, et al. 2008.
<b><i>Hb Lepore</i></b>	PCR Standard específica de alelos	Lazaros, et al. 2006.
<b><i>Distrofia Miotónica</i></b>	PCR anidada	Amicucci, et al. 2000
<b><i>Distrofias de Retina</i></b>	Secuenciación automática dHPLC	Bustamante-Aragones, et al. 2006.
<b><i>Acidemia propiónica</i></b>	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
Trisomía 21	Down	1.5 / 1,000 nacidos	Retraso mental. Braquicefalia. Rasgos faciales mongoloides. Alteraciones diversas (oculares, cardíacas, etc.).
Trisomía 18	Edwads	1 / 6,766	Deficiencia mental profunda. Malformaciones renales y cardíacas.
Trisomía 13	Patau	1 / 4,600	Deficiencia mental profunda. Malformaciones cardíacas, genitales, cerebrales y dactilares.
XXX(mujeres)	Triple X	1 / 1,000	Retraso mental moderado. Alteraciones neuropsíquicas.
X0 (mujeres)	Turner	0.3 / 1,000	Genitales infantiles. Esterilidad. Estatura baja
XXY (varones)	Klinefelter	1.4 / 1,000	Genitales pequeños. Falta de espermatogénesis. Retraso mental moderado
XYY (varones)	Duplo Y	1 / 2,000	Trastornos de conducta (agresividad). Estatura elevada.

Se ha descrito el aumento de la cantidad de cffDNA 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 gravidica <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)</sup> <sup>(57)</sup> <sup>(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 cffDNA 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<sup>(79)</sup>.

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**)<sup>(80)</sup>.



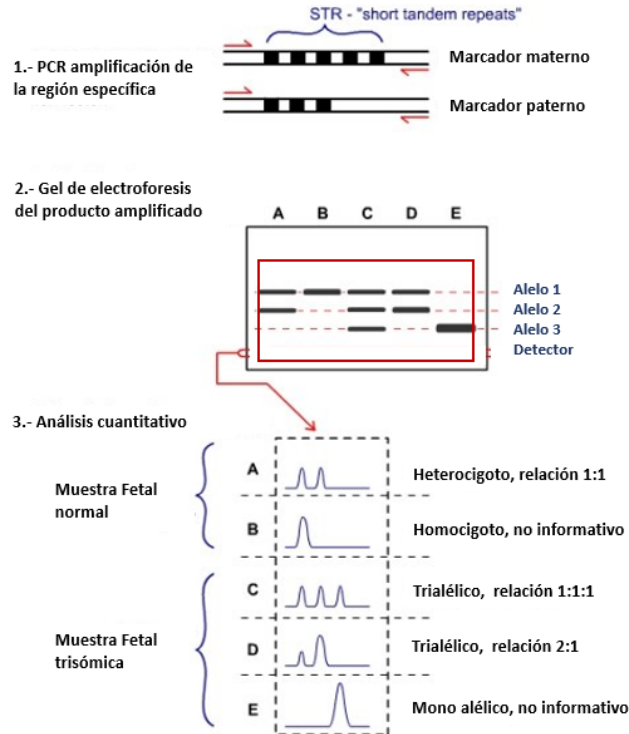


Figura 5. Análisis del tamaño de los diferentes alelos fetales según el origen parental.

## 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>(81)</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>(82)</sup>.

## Cromosoma Y

El cromosoma Y humano contiene más de 60 millones de nucleótidos, pero menos número de genes en comparación con cualquier otro cromosoma y actúa como un determinante genético de los rasgos característicos de sexo masculino, está constituido por DNA de 40 mm de longitud , de los cuales el 95% no recombina (región no recombinante) y el 5%, llamado porción pseudoautosómica, puede recombinar su contenido con el cromosoma X <sup>(82-83)·(84)</sup>. Goodfellow sugiere este modelo para el estudio clásico del cromosoma Y que se divide en subregiones; una región de apareamiento meiótico homóloga XY que abarca la mayor parte del brazo corto del cromosoma Y, y , tal vez, que incluye una región pseudoautosómica de intercambio de los cromosomas sexuales; una región pericéntrica que contiene el gen o genes determinantes del sexo; y un largo brazo de región heterocromática genéticamente inerte <sup>(85)</sup>.

## 2. 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.

### 3. 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 Y y X permitirán distinguir entre el DNA materno y el fetal libre de células.

## 4. 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 Y y X fetales y maternos en bases de datos.
- Comparar las secuencias repetidas en tándem de los cromosomas Y y X entre ambas muestras.

## 5. 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.

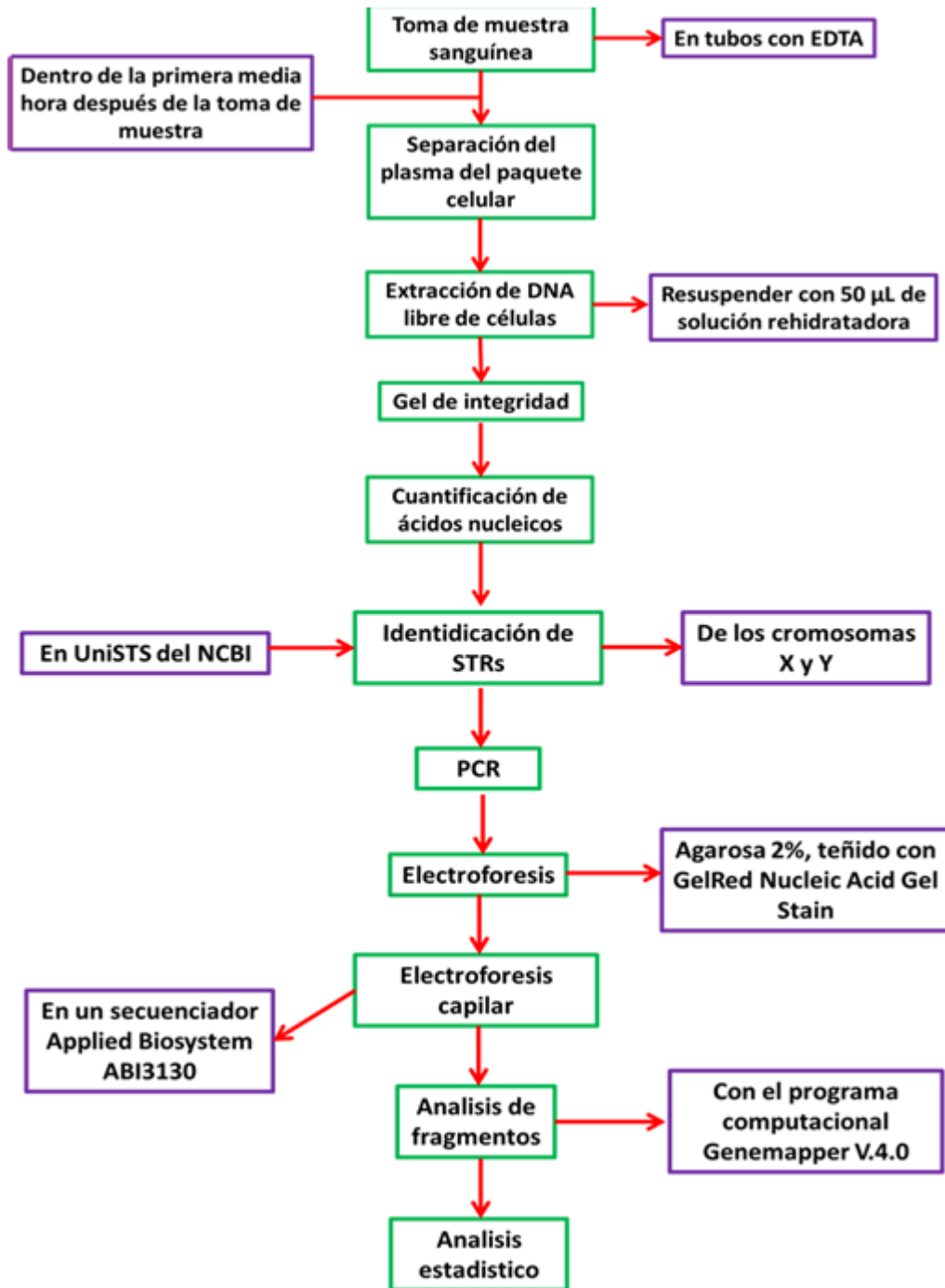


Figura 6. Diagrama de flujo de trabajo.

### 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.

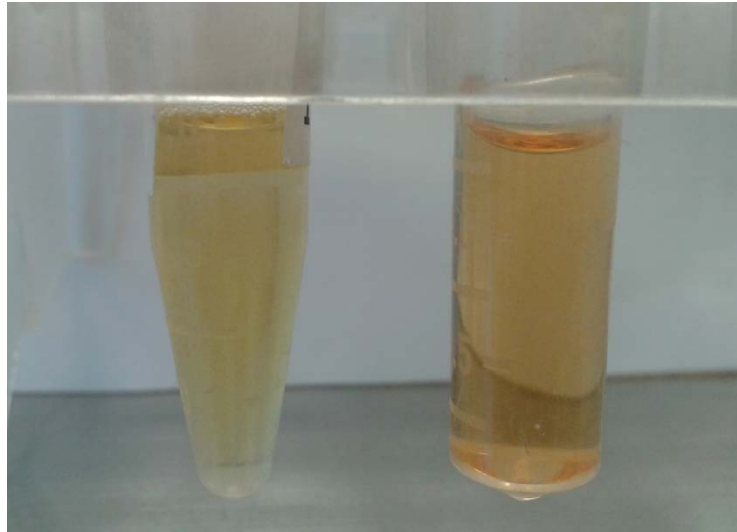


Para 400  $\mu\text{L}$  de plasma se realizó el siguiente procedimiento (escalar en proporción directa cualquier incremento del volumen).

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  $72^{\circ}\text{C}$  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  $8,000 \times g$ , el centrifugado del tubo colector se desecha. Esto se repitió (usando la misma columna) hasta que se haya agotado la mezcla.

Se colocó la columna dentro de un tubo colector limpio y se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de amortiguador de remoción, centrifugando a  $8,000 \times g$  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  $8,000 \times g$  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  $13,000 \times g$ ) 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  $8,000 \times g$  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 Y 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 Y y X.

Iniciador	Secuencias	Longitud del amplificado	Temperatura de alineación	Acceso al GenBank
DXS998	<b>Sentido</b> 5' – CAGCAATTTTCAAAGGC – 3'	113-119 (pb), <i>Homo sapiens</i>	58.4° C	<a href="#">Z17020</a>
	<b>Anti-sentido</b> 5' – AGATCATTCATATAACCTCAAAAGA – 3'			
DXS1108	<b>Sentido</b> 5' – GTGAATTCATCATATGTGATTCC – 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'			
DYS200	<b>Sentido</b> 5' – CAGCAAAAAGGACTAAGGCA – 3'	130 (bp), <i>Homo sapiens</i>	58° C	<a href="#">G11993</a>
	<b>Anti-sentido</b> 5' – TGGATCTCTGGAATTTGGAA – 3'			
DYS242	<b>Sentido</b> 5' – CCTGGTGCTTCTGTGAAAAA – 3'	210 (bp), <i>Homo sapiens</i>	57.5° C	<a href="#">G12007</a>
	<b>Anti-sentido</b> 5' – TGAAAGGAGCATAGTCCTGC – 3'			
DYS278	<b>Sentido</b> 5' – CAGTGCCCCATAACACTTTC – 3'	176 (bp), <i>Homo sapiens</i>	57.6° C	<a href="#">G38357</a>
	<b>Anti-sentido</b> 5' – ATGGTAATACAGCAGCTCGC – 3'			

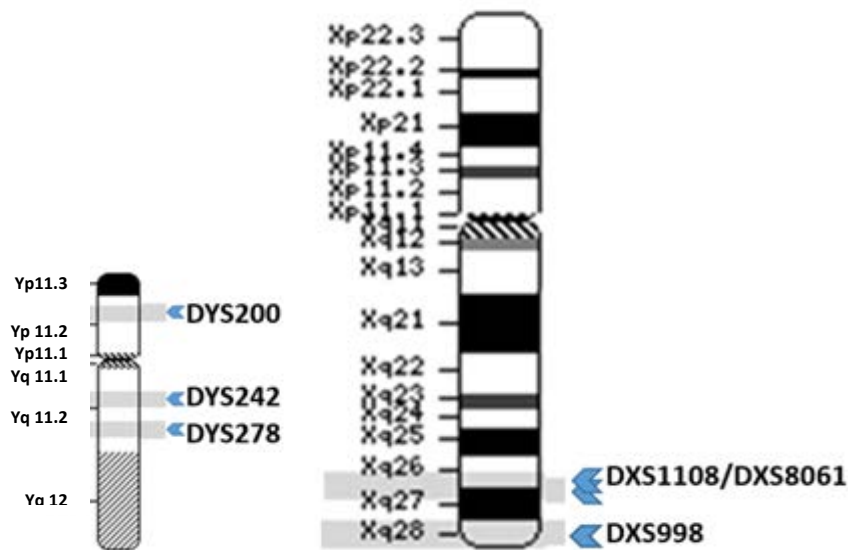


Figura 10. Mapa de posición de los marcadores en los cromosomas X y Y.

### 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-500Iiz en un capilar de 36 cm, donde se cuantificó 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.



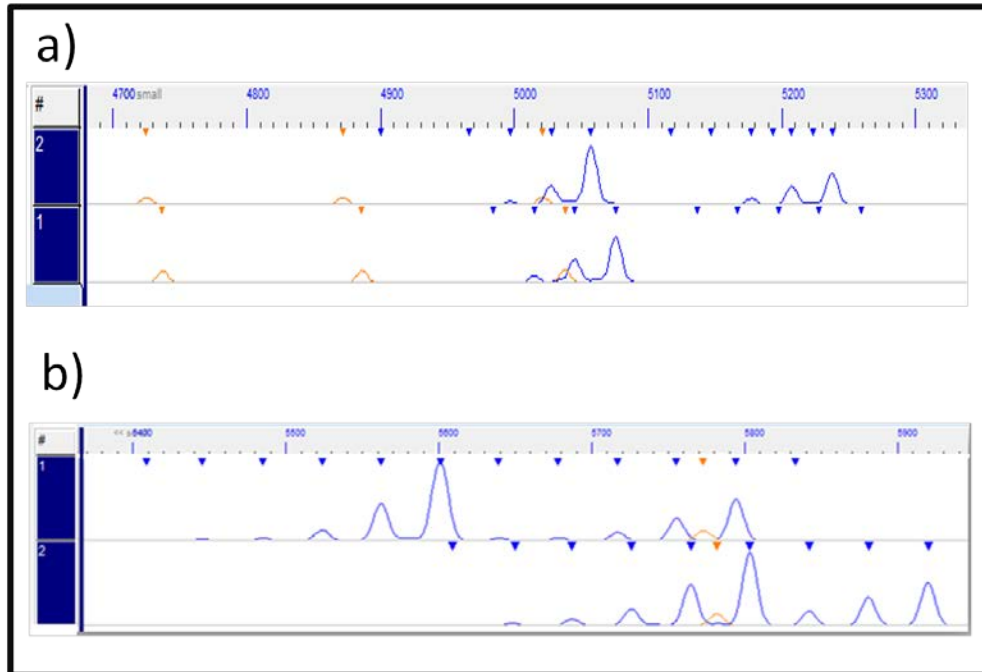


Figura 13. Esquema de electroferograma.  
a) 1=DNA leucocitario materno homocigoto, 2= cfDNA heterocigoto. b) 1=DNA leucocitario materno heterocigoto, 2= cfDNA heterocigoto.

### 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.

## 6. 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

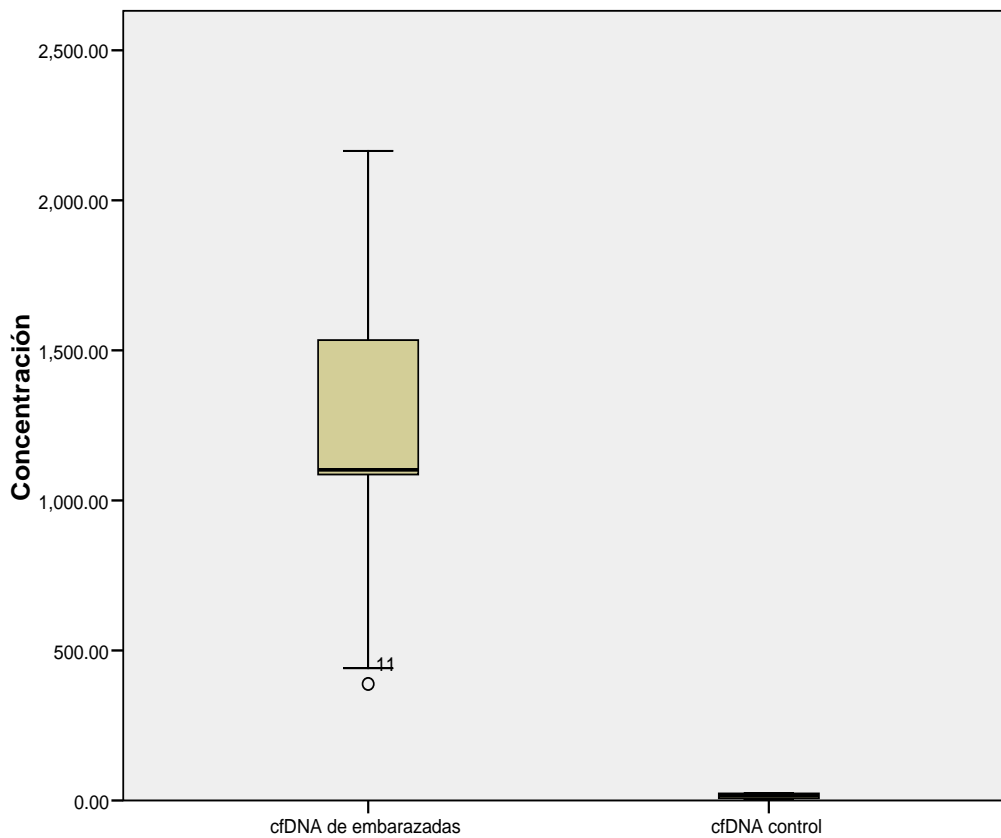
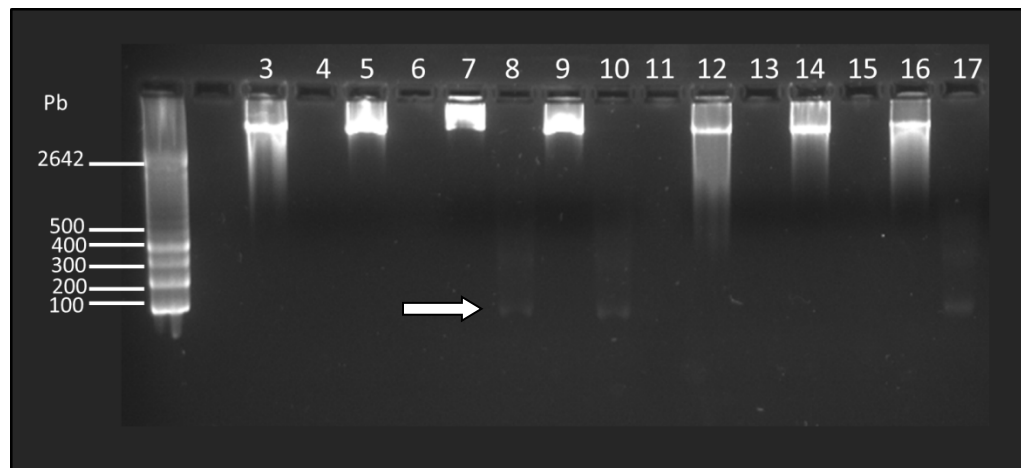


Figura 14. Distribución de frecuencias de la concentración de DNA obtenido en plasma embarazadas y controles.

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

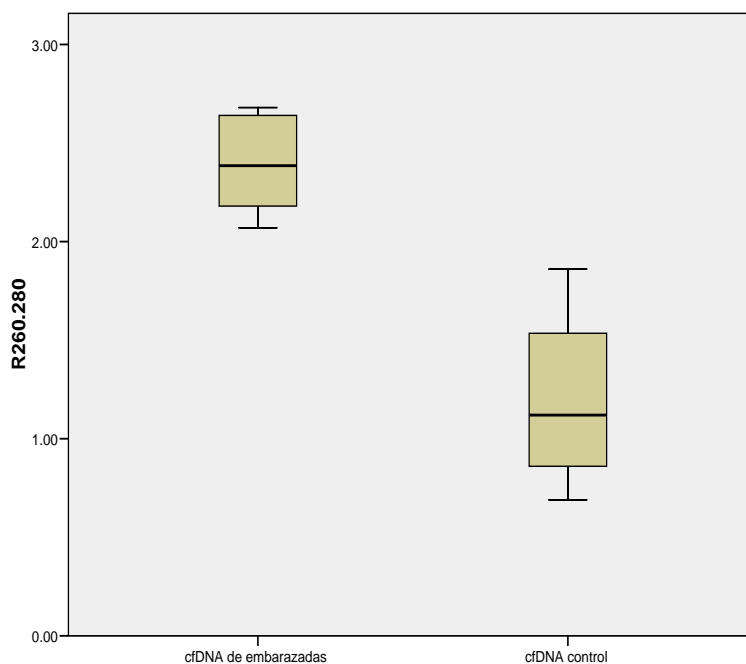


Figura 16. Distribución de frecuencias de la relación 260/280 de DNA obtenido en plasma de embarazadas y controles.

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

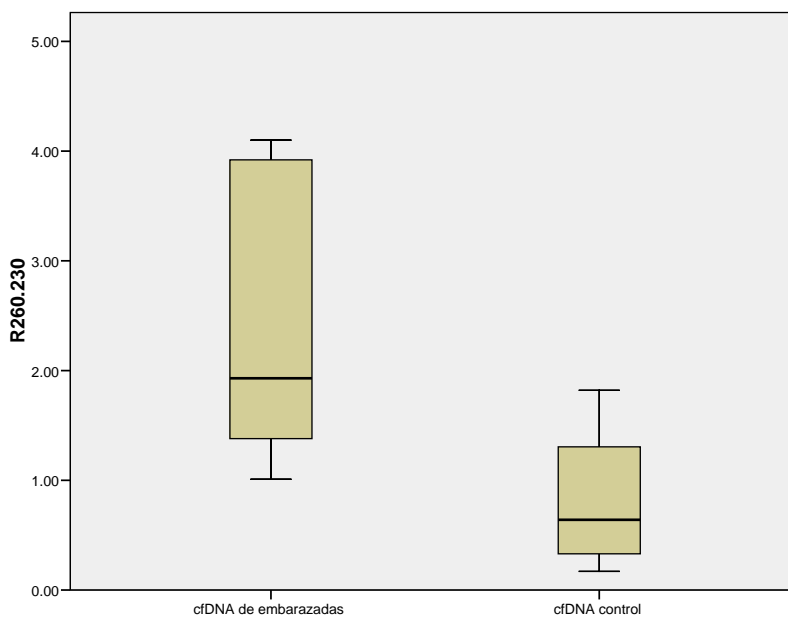


Figura 17. Distribución de frecuencias de la relación 260/230 de DNA obtenido en plasma de mujeres embarazadas y controles.

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**).

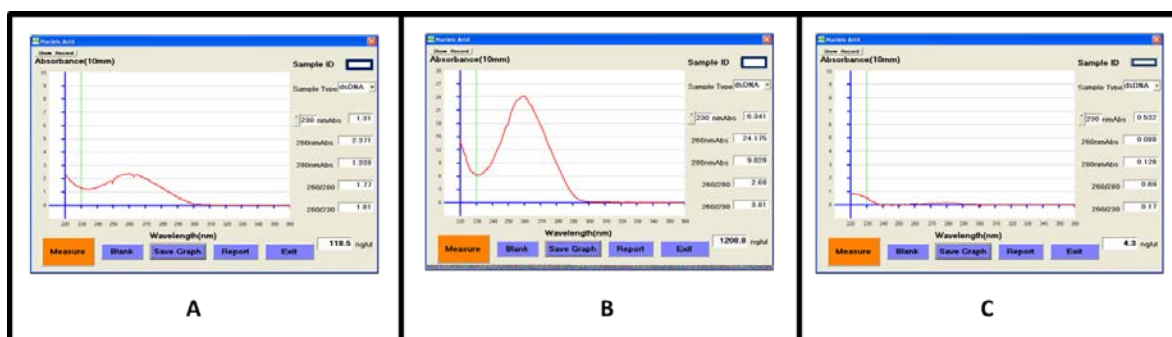


Figura 18. Ejemplos de gráfica de cuantificación de absorbancia; A) DNA Genómico, B) cfDNAe y C) cfDNAc.

### 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/ $\mu$ L, 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/ $\mu$ L, 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

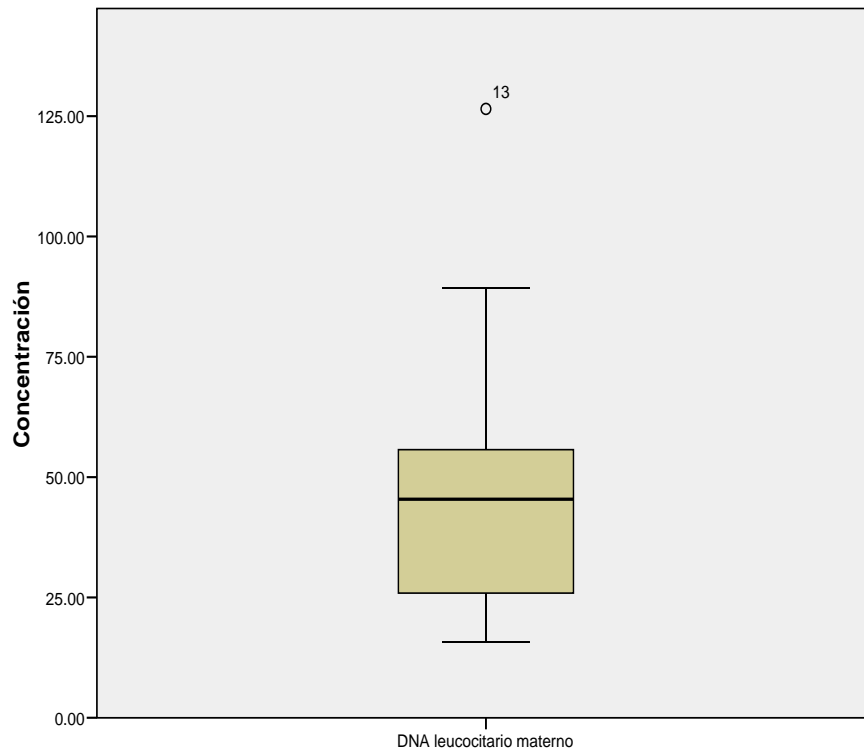
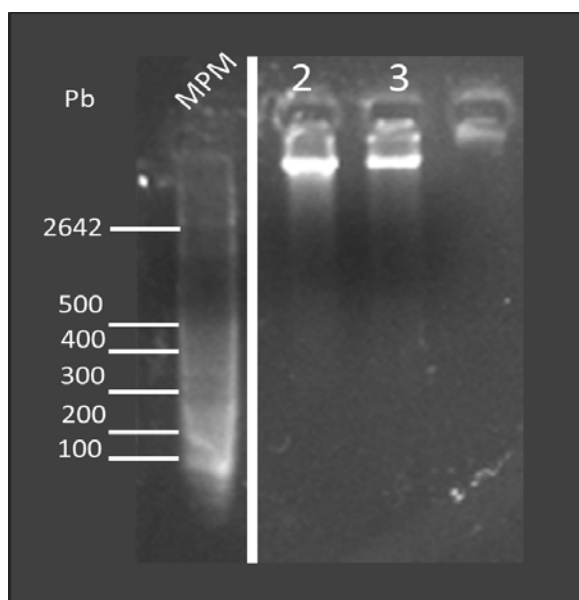


Figura 19. Distribución de frecuencias de la concentración de DNA leucocitario materno.

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**).



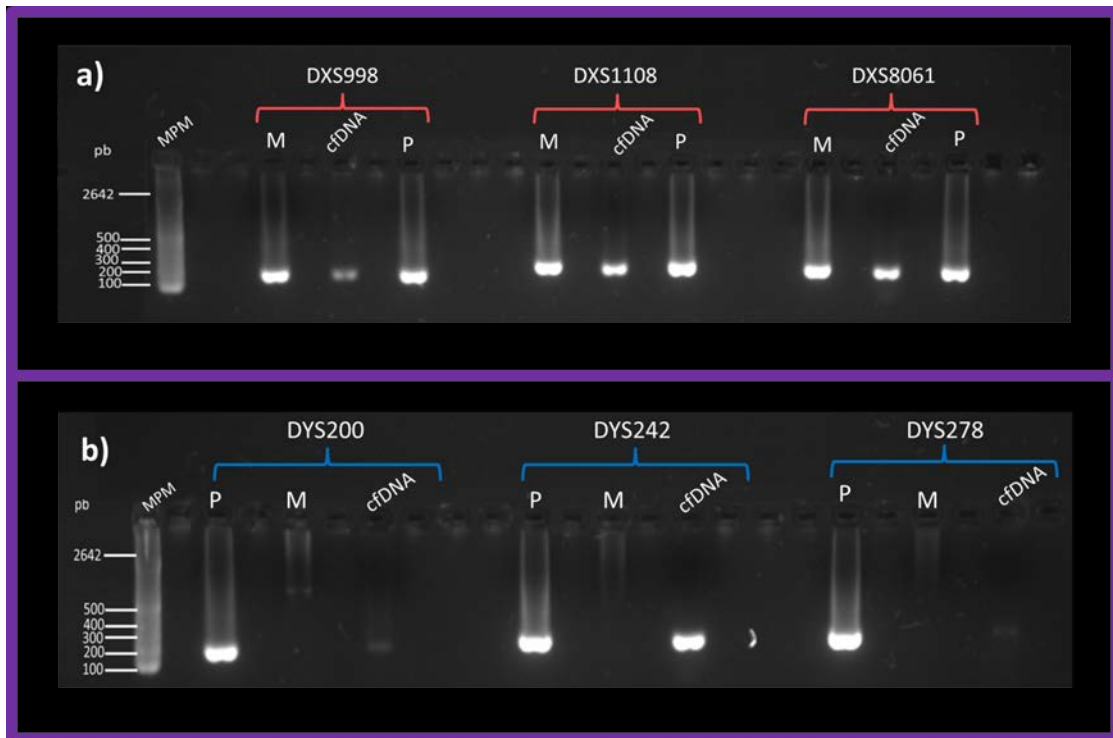
*Figura 20. Gel de integridad de agarosa al 4%. Se muestra el marcador de peso molecular (100-1500 bp), en los carriles 2 y 3 se encuentra el DNA leucocitario.*

*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 Y.

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 Y (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 Y 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>Frecuencia de DNA Leucocitario</b>	<b>Frecuencia DNA Materno</b>	<b>Frecuencia de cffDNA</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)

## Cromosoma Y

Los marcadores Y no presentan polimorfismos reportados. La amplificación obtenida corresponde al tamaño reportado para cada marcador tanto en las cinco muestras de DNA leucocitario masculino como en las cuatro muestras de cfDNA (**Tabla 14**).

Tabla 14. Proporciones de DNA leucocitario y cfDNA.

<b>Cromosoma Y</b>	<b>Marcador pb</b>	<b>Frecuencia de DNA Leucocitario</b>	<b>Frecuencia de cffDNA</b>
<b>DYS200</b>	130	5	4
<b>DYS242</b>	210	5	4
<b>DYS278</b>	176	5	4

Dado que el análisis de frecuencia no proporciono la suficiente robustez estadística se realizó un análisis de frecuencia binomial de los posibles alelos comparando el cfDNA contra el DNA leucocitario materno (**Tabla 15**). El análisis de concordancia de un solo marcador muestra que no existe la suficiente variabilidad para diferenciar los DNAs (de 0.286 a 0.357), sin embargo, el análisis con seis marcadores muestra una proporción de no concordancia de 0.857. En las muestras en las que no existió diferencia estadística se comparó el sexo al nacimiento en donde todos los casos fueron masculinos (**Tabla 16**).

*Tabla 15. Concordancia entre DNA leucocitario materno y cfDNA de plasma.  
0=Concordante; 1=No concordante.*

MUESTRAS	MARCADORES X			MARCADORES Y			Concordancia/no concordancia
	DXS998	DXS8061	DXS1108	DYS200	DYS242	DYS278	
DPF01	0	0	0	1	1	1	1
DPF02	1	1	1	0	0	0	1
DPF03	1	0	0	0	0	0	1
DPF04	0	0	0	0	0	0	0
DPF05	1	1	1	0	0	0	1
DPF06	1	1	0	0	0	0	1
DPF07	1	0	1	0	0	0	1
DPF08	0	0	0	1	1	1	1
DPF09	0	1	0	0	0	0	1
DPF10	0	0	0	1	1	1	1
DPF11	0	1	1	0	0	0	1
DPF12	0	0	0	0	0	0	0
DPF13	0	0	1	0	0	0	1
DPF14	0	0	0	1	1	1	1
Proporción	<b>0.357</b>	<b>0.357</b>	<b>0.357</b>	<b>0.286</b>	<b>0.286</b>	<b>0.286</b>	<b>0.857</b>

Tabla 16. 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



## 7. 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>(86)</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)</sup> <sup>(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)</sup> <sup>(42)</sup> <sup>(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>(87)</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>(88)</sup> <sup>(89)</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>(90)</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>(91)</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>(92)</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.

Por medio de electroforesis capilar se identificaron los tamaños de los seis marcadores amplificados por PCR para cada una de las muestras.

Los dos cromosomas sexuales divergieron de un solo autosoma aproximadamente hace unos 300 millones de años; de hecho, aún tienen cierta homóloga ya que recombinan cerca de sus extremos, en las dos regiones pseudoautosómicas (89).

Actualmente el principal uso del cffDNA es la determinación en estadios tempranos el sexo fetal, que está teniendo un gran impacto en el manejo de los desórdenes genéticos ligados al cromosoma X (90). También es utilizado para guiar la terapia prenatal en los casos de riesgo de hiperplasia suprarrenal congénita. Otras pruebas diagnósticas que utilizan esta tecnología están actualmente en desarrollo para su uso clínico, por ejemplo, la identificación del tipo de plaquetas en la trombocitopenia aloinmune, determinación del RhD fetal para la prevención de la EHRN y la detección de mutaciones paternas en enfermedad recesiva como la fibrosis quística, talasemias o en enfermedades autosómicas dominantes de origen paterno (91).

Por medio de electroforesis capilar se analizaron los fragmentos amplificados y con un análisis de frecuencias realizado se pudieron determinar pequeñas variaciones de los tamaños de los amplificados entre los obtenidos del DNA leucocitario materno y del cfDNA, presentando proporciones distintas en algunos fragmentos.

En el cromosoma X, cada uno de los tres marcadores amplificados presentó 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 (89).

Los tres marcadores del cromosoma Y no son secuencias polimórficas, solamente amplificaron en DNA masculino por lo que podemos asegurar que en cuatro muestras de plasma materno se trataba de DNA fetal. El DNA leucocitario materno y diez muestras de cfDNA de plasma materno no amplificaron para estas secuencias.

Sin embargo para ninguno de estos seis STRs existen estudios relacionados acerca de su comportamiento en la población mexicana.

Ya que esto no proporcionaba la certidumbre suficiente se decidió realizar una prueba de concordancias y no concordancias para poder diferenciar el DNA leucocitario materno del cfDNA, obteniendo un grado de discordancia de ambos DNAs de 0.857 para los seis marcadores (**Tabla 16**).

Los seis marcadores utilizados fueron suficientes para diferenciar a 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, calculamos nuevamente las proporciones omitiendo en cada ocasión uno y solo un marcador, sin embargo la proporción solo varía en los casos de los marcadores del cromosoma X que mostraron 0.786 de proporción cada uno, en los marcadores del cromosoma Y 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 STRs de diversas regiones de otros cromosomas, destacando al cromosoma X pues aunque presentaron variaciones en los amplificadores, la comparación de los STRs 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 (89) y una mayor certidumbre de no concordancia.

Paralelamente el equipo de trabajo realizó ampliaciones de tres marcadores del cromosoma 21 que para este trabajo sirvieron para mejorar la certidumbre de no concordancia, ya que el 0.142 de proporción que no se logró diferenciar usando los marcadores de X y Y se identificó con estos marcadores de 21 (Ver tesis Extracción de DNA fetal libre de células en plasma materno usando los cromosomas X y 21 como marcadores de la presencia de DNA fetal).

## 8. 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 grado de certidumbre considerablemente alto.

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 Y resultaron favorables para la diferenciación de los DNA obtenidos, tanto del leucocitario como del cfDNA del plasma.

## 9. 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. ADN fetal en plasma materno nuevas estrategias para el estudio de mutaciones de herencia paterna y diagnóstico prenatal no invasivo del sexo fetal (Fetal DNA in maternal plasma : new strategics for the study of mutations with a paternal origin and non-invasive prenatal diagnosis of fetal gender); Tesis doctoral inédita. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. 2008.
2. Joe Hin Tjio I.L. The Chromosome number of man *Hereditas*. 1956;Volumen 42 (1-2).
3. Fuchs F., y Riis P. Antenatal sex determination. *Nature*. 1956. 18;177(4503):330.
4. Steele Mw Fau - Breg W.R., Jr., y Breg W.R., Jr. Chromosome analysis of human amniotic-fluid cells. 1966 19660525 DCOM- 19660525(0140-6736 ). eng.
5. Thiede H.A., Creasman W.T., y Metcalfe S. Antenatal analysis of the human chromosomes. *Am J Obstet Gynecol*. 1966.15;94(4):589-590.
6. Jacobson C.B., yBarter R.H. Intrauterine diagnosis and management of genetic defects. *Am J Obstet Gynecol*. 1967. 15;99(6):796-807.
7. Brambati B., y Simoni G. Diagnosis of fetal trisomy 21 in first trimester. *Lancet*. 1983. 12;1(8324):586.
8. Ramos C., Recasens J.D., Benitez J., Santaolaya J., y Sanchez Cascos A. [Early cytogenetic diagnosis by chorion biopsy. Preliminary communication. *Rev Clin Esp*. 1984.15-31;174(1-2):21-23. PubMed PMID: 6515061. Diagnostico citogenetico precoz mediante biopsia corial. Comunicacion preliminar.

9. P. Metcalfe P.R., E. Tait y S. Urbaniak. An international reference reagent for the detection of RHD and SRY DNA in plasma Vox Sanguinis. 2011;102, 243–249.
10. Duric K., Skrablin S., Lesin J., Kalafatic D., Kuvacic I., y Suchanek E. 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. 2003.10;110(1):12-15.
11. Raniga S., Desai P.D., y Parikh H. Ultrasonographic soft markers of aneuploidy in second trimester: are we lost?. MedGenMed. 2006;8(1):9.
12. Hahn S., y Holzgreve W. Fetal cells and cell-free fetal DNA in maternal blood: new insights into pre-eclampsia. Hum Reprod Update. 2002;8(6):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. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. 1997 19971107 DCOM- 19971107(0002-9297 ). eng.
14. Leung T.N., Zhang J., Lau T.K., Chan L.Y., y Lo Y.M. Increased maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop preeclampsia. Clin Chem. 2001;47(1):137-139.
15. Sekizawa A., Jimbo M., Saito H., Iwasaki M., Matsuoka R., Okai T., et al. Cell-free fetal DNA in the plasma of pregnant women with severe fetal growth restriction. Am J Obstet Gynecol. 2003;188(2):480-484.
16. Rodriguez de Alba M., Palomino P., Gonzalez-Gonzalez C., Lorda-Sanchez I., Ibanez M.A., Sanz R., et al. Prenatal diagnosis on fetal cells from maternal blood: practical

comparative evaluation of the first and second trimesters. *Prenat Diagn.* 2001;21(3):165-170.

17. Bischoff F.Z., Lewis D.E., Simpson J.L., Nguyen D.D., Scott J., Schober W., et al. Detection of low-grade mosaicism in fetal cells isolated from maternal blood. *Prenat Diagn.* 1995;15(12):1182-1184.

18. Elias S., Price J., Dockter M., Wachtel S., Tharapel A., Simpson J.L., et al. First trimester prenatal diagnosis of trisomy 21 in fetal cells from maternal blood. *Lancet.* 1992. 24;340(8826):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., et al. Genetic characterisation of circulating fetal cells allows non-invasive prenatal diagnosis of cystic fibrosis. 2006. 20061016 DCOM- 20070216(0197-3851 ). eng.

20. Troeger C., Zhong X.Y., Burgemeister R., Minderer S., Tercanli S., Holzgreve W., et al. Approximately half of the erythroblasts in maternal blood are of fetal origin. *Mol Hum Reprod.* 1999;5(12):1162-1165.

21. Lo Y.M., Corbetta N., Chamberlain P.F., Rai V., Sargent I.L., Redman C.W., et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997. 16;350(9076):485-487.

22. Kress S., Sutter C., Strickland P.T., Mukhtar H., Schweizer J., ySchwarz M. Carcinogen-specific mutational pattern in the p53 gene in ultraviolet B radiation-induced squamous cell carcinomas of mouse skin. *Cancer Res.* 1992. 15;52(22):6400-6403.

23. Strickland S., y Richards W.G. Invasion of the trophoblasts. *Cell.* 1992 30;71(3):355-357.

24. Guibert J., Benachi A., Grebille A.G., Ernault P., Zorn J.R., y Costa J.M. Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by real time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique. *Hum Reprod.* 2003 Aug;18(8):1733-1736.
25. Lo Y.M., Tein M.S., Lau T.K., Haines C.J., Leung T.N., Poon P.M., et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet.* 1998;62(4):768-775. PubMed PMID: 9529358.
26. Angert R.M., LeShane E.S., Lo Y.M., Chan L.Y., Delli-Bovi L.C., y Bianchi D.W. Fetal cell-free plasma DNA concentrations in maternal blood are stable 24 hours after collection: analysis of first- and third-trimester samples. *Clin Chem.* 2003;49(1):195-198.
27. Galbiati S., Smid M., Gambini D., Ferrari A., Restagno G., Viora E., et al. Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation. *Hum Genet.* 2005;117(2-3):243-248.
28. Palomaki G.E., Kloza E.M., Lambert-Messerlian G.M., Haddow J.E., Neveux L.M., Ehrich M., et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med.* 2011;13(11):913-920.
29. Zimmermann B., Hill M., Gemelos G., Demko Z., Banjevic M., Baner J., et al. Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenat Diagn.* 2012 ;32(13):1233-1241.
30. Lo Y.M., Zhang J., Leung T.N., Lau T.K., Chang A.M., y Hjelm N.M. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet.* 1999;64(1):218-224.

31. Sekizawa A., Samura O., Zhen D.K., Falco V., Farina A., y Bianchi D.W. Apoptosis in fetal nucleated erythrocytes circulating in maternal blood. *Prenat Diagn.* 2000 ;20(11):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., et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. 1998 19980610 DCOM- 19980610(0002-9297 ). eng.
33. Lo Y.M., Lau T.K., Zhang J., Leung T.N., Chang A.M., Hjelm N.M., et al. Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clin Chem.* 1999;45(10):1747-1751.
34. Kolialexi A., Tsangaris Gt Fau - Mavrou A., Mavrou A Fau - Antsaklis A., Antsaklis A Fau - Tzortzatos F., Tzortzatos F Fau - Touliatos V., Touliatos V Fau - Metaxotou C., et al. Use of annexin V antibody to identify apoptotic cells during pregnancy. 2001 20011115 DCOM- 20011205(0077-8923 ). eng.
35. Tjoa M.L., Cindrova-Davies T., Spasic-Boskovic O., Bianchi D.W., y Burton G.J. Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free fetoplacental DNA. *Am J Pathol.* 2006;169(2):400-404.
36. Lo Y.M. Fetal DNA in maternal plasma: biology and diagnostic applications. *Clin Chem.* 2000;46(12):1903-1906.
37. Huppertz B., y Kingdom J.C. Apoptosis in the trophoblast--role of apoptosis in placental morphogenesis. *J Soc Gynecol Investig.* 2004 ;11(6):353-362.

38. Masuzaki H., Miura K., Yoshiura K.I., Yoshimura S., Niikawa N., y Ishimaru T. Detection of cell free placental DNA in maternal plasma: direct evidence from three cases of confined placental mosaicism. *J Med Genet.* 2004 ;41(4):289-292.
39. Chim S.S., Tong Y.K., Chiu R.W., Lau T.K., Leung T.N., Chan L.Y., et al. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 11;102(41):14753-14758.
40. Dennis Lo Y.M., yChiu R.W. Prenatal diagnosis: progress through plasma nucleic acids. 2007 20061218 DCOM- 20070209(1471-0056 ). eng.
41. Chan K.C., Zhang J., Hui A.B., Wong N., Lau T.K., Leung T.N., et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem.* 2004;50(1):88-92..
42. Li Y., Holzgreve W., Page-Christiaens G.C., Gille J.J., y Hahn S. 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.* 2004;24(11):896-898..
43. Li Y., Di Naro E., Vitucci A., Zimmermann B., Holzgreve W., yHahn S. Detection of paternally inherited fetal point mutations for beta-thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma. *JAMA.* 2005, 16;293(7):843-849..
44. Clausen F.B., Krog G.R., Rieneck K., y Dziegiel M.H. 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.* 2007;27(1):6-10.
45. Legler T.J., Liu Z., Mavrou A., Finning K., Hromadnikova I., Galbiati S., et al. Workshop report on the extraction of foetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2007;27(9):824-829.

46. Dhallan R., Au W.C., Mattagajasingh S., Emche S., Bayliss P., Damewood M., et al. Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered from the maternal circulation. *JAMA*. 2004, 3;291(9):1114-1119.
47. Poon L.L., Leung T.N., Lau T.K., Chow K.C., y Lo Y.M. Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*. 2002;48(1):35-41.
48. Chan K.C., Ding C., Gerovassili A., Yeung S.W., Chiu R.W., Leung T.N., et al. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. *Clin Chem*. 2006;52(12):2211-2218.
49. Tong Y.K., y Lo Y.M. Plasma epigenetic markers for cancer detection and prenatal diagnosis. *Front Biosci*. 2006;11:2647-2656.
50. Old R.W., Crea F., Puszyk W., y Hulten M.A. Candidate epigenetic biomarkers for non-invasive prenatal diagnosis of Down syndrome. *Reprod Biomed Online*. 2007;15(2):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. First-trimester fetal sex determination in maternal serum using real-time PCR. 2001 20011217 DCOM-20020301(0197-3851).
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., et al. Cell-free fetal DNA is increased in plasma of women with hyperemesis gravidarum. 2001 20011123 DCOM-20011207(0009-9147 ).

53. Costa Jm Fau - Benachi A., Benachi A Fau - Gautier E., y Gautier E. New strategy for prenatal diagnosis of X-linked disorders. 2002 20020509 DCOM- 20020515(1533-4406 (Electronic)). eng.
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., et al. Earliest gestational age for fetal sexing in cell-free maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2003, 30;23(13):1042-1044.
55. Alberry M., Maddocks D., Jones M., Abdel Hadi M., Abdel-Fattah S., Avent N., et al. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn.* 2007;27(5):415-418.
56. Hyett J.A., Gardener G., Stojilkovic-Mikic T., Finning K.M., Martin P.G., Rodeck C.H., et al. Reduction in diagnostic and therapeutic interventions by non-invasive determination of fetal sex in early pregnancy. *Prenat Diagn.* 2005;25(12):1111-1116.
57. Finning K.M., y Chitty L.S. Non-invasive fetal sex determination: impact on clinical practice. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2008;13(2):69-75.
58. Westhoff C.M. The structure and function of the Rh antigen complex. *Semin Hematol.* 2007;44(1):42-50.
59. Urbaniak S.J., y Greiss M.A. RhD haemolytic disease of the fetus and the newborn. 2000 20000823 DCOM- 20000823(0268-960X). eng.
60. Faas B.H., Beuling E.A., Christiaens G.C., von dem Borne A.E., y van der Schoot C.E. Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma. *Lancet.* 1998. 10;352(9135):1196.



61. Pilgrim H., Lloyd-Jones M., y Rees A. Routine antenatal anti-D prophylaxis for RhD-negative women: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2009;13(10):iii, ix-xi, 1-103.
62. Norbury G., y Norbury C.J. Non-invasive prenatal diagnosis of single gene disorders: how close are we? *Semin Fetal Neonatal Med.* 2008;13(2):76-83.
63. Simpson JL B.A.T. Chromosomal abnormalities in spontaneous abortion frequency, pathology and genetic counselling. Bennet MJ & Edmonds EK (eds). *Spontaneous and recurrent abortion.* Blackwell Scientific Publication, London 1987;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., et al. Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. 1999 19991021 DCOM- 19991021(0009-9147 ). eng.
65. Illanes S., Parra M., Serra R., Pino K., Figueroa-Diesel H., Romero C., et al. Increased free fetal DNA levels in early pregnancy plasma of women who subsequently develop preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Prenat Diagn.* 2009;29(12):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., et al. Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia. 2001 20010306 DCOM- 20010329(0002-9378 ). eng.

67. Yin A., Ng E.H., Zhang X., He Y., Wu J., y Leung K.Y. Correlation of maternal plasma total cell-free DNA and fetal DNA levels with short term outcome of first-trimester vaginal bleeding. *Hum Reprod.* 2007;22(6):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. Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. 1998 19990128 DCOM- 19990128(0140-6736 ). eng.
69. Sekizawa A., Jimbo M., Saito H., Iwasaki M., Sugito Y., Yukimoto Y., et al. Increased cell-free fetal DNA in plasma of two women with invasive placenta. *Clin Chem.* 2002;48(2):353-354.
70. Wataganara T., LeShane E.S., Farina A., Messerlian G.M., Lee T., Canick J.A., et al. Maternal serum cell-free fetal DNA levels are increased in cases of trisomy 13 but not trisomy 18. *Hum Genet.* 2003;112(2):204-208.
71. Hromadnikova I., Houbova B., Hridelova D., Voslarova S., Calda P., Nekolarova K., et al. Quantitative analysis of DNA levels in maternal plasma in normal and Down syndrome pregnancies. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2002, 28;2(1):4.
72. Bustamante-Aragones A., Perez-Cerda C., Perez B., de Alba M.R., Ugarte M., y Ramos C. Prenatal diagnosis in maternal plasma of a fetal mutation causing propionic acidemia. *Mol Genet Metab.* 2008;95(1-2):101-103.
73. Fan H.C., Blumenfeld Y.J., Chitkara U., Hudgins L., y Quake S.R. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008, 21;105(42):16266-16271.

74. Benn P., Borell A., Chiu R., Cuckle H., Dugoff L., Faas B., et al. Position statement from the Aneuploidy Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis. *Prenat Diagn.* 2013;33(7):622-629.
75. Devers P.L., Cronister A., Ormond K.E., Facio F., Brasington C.K., y Flodman P. Noninvasive prenatal testing/noninvasive prenatal diagnosis: the position of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns.* 2013;22(3):291-295.
76. Nicolaides K.H., Syngelaki A., Ashoor G., Birdir C., y Touzet G. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population. *Am J Obstet Gynecol.* 2012;207(5):374 e371-376.
77. Griffiths AJF G.W., Miller JH, et al. *Modern Genetic Analysis.* New York: W H Freeman. 1999.
78. Goodman M. Actividad nº 2 con el ADN de la familia Blackett. *El Proyecto Biológico.* 2000.
79. Xu J., Lei L., Xu N., Fu G., Xu Z., Wang Y., et al. (Study of genetic polymorphisms of 12 short tandem repeats on X chromosome in ethnic Han population from Hebei Province). *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2014, 10;31(3):388-392.
80. Purps J., Siegert S., Willuweit S., Nagy M., Alves C., Salazar R., et al. A global analysis of Y-chromosomal haplotype diversity for 23 STR loci. *Forensic Sci Int Genet.* 2014, 28;12C:12-23..
81. Carrel L., y Willard H.F. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. 2005 20050317 DCOM- 20050330(1476-4687 (Electronic)). eng.
82. Cann R. Stone K a.W.C.A. Mitochondrial Eve, . *Nature* 325. 1986, ;325: 31-36.

83. Cann R.L., Stoneking M., y Wilson A.C. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*. 1987, 1-7;325(6099):31-36.
84. Rozen S., Skaletsky H., Marszalek J.D., Minx P.J., Cordum H.S., Waterston R.H., et al. Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes. *Nature*. 2003, 19;423(6942):873-876.
85. Goodfellow P., Darling S., y Wolfe J. The human Y chromosome. *J Med Genet*. 1985;22(5):329-344. PubMed PMID: 3908683.
86. Kelton J.G. Blood Component Therapy. *Can Fam Physician*. 1984; 30(1809–1814).
87. Leninger A.L. New York, 1975 *Biochemistry, 2nd ed.,* [http://www.bio.davidson.edu/projects/gcat/protocols/NanoDrop\\_tip.pdf](http://www.bio.davidson.edu/projects/gcat/protocols/NanoDrop_tip.pdf): Worth Publishers.
88. Sayres L.C., yCho M.K. Cell-free fetal nucleic acid testing: a review of the technology and its applications. *Obstet Gynecol Surv*. 2011;66(7):431-442.
89. Ng E.K., Tsui N.B., Lau T.K., Leung T.N., Chiu R.W., Panesar N.S., et al. mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003, 15;100(8):4748-4753.
90. Leninger A.L. *Biochemistry*. 2nd Ed. 1975;New York(Worth Publishers).
91. Gonzalez-Gonzalez C., Garcia-Hoyos M., Trujillo-Tiebas M.J., Lorda-Sanchez I., de Alba M.R., Infantes F., et al. Application of fetal DNA detection in maternal plasma: a prenatal diagnosis unit experience. *J Histochem Cytochem*. 2005;53(3):307-314.
92. Aranguren-Méndez J.A., Román-Bravo R., Isea W., Villasmil Y., y Jordana J. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas

de conservación: una revisión. Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal. 2005;Vol 13 Num 1(ISSN: 1022-1301).

93. Schaffner S.F. The X chromosome in population genetics. Nat Rev Genet. 2004;5(1):43-51.

94. Avent N.D., Madgett T.E., Maddocks D.G., y Soothill P.W. Cell-free fetal DNA in the maternal serum and plasma: current and evolving applications. Curr Opin Obstet Gynecol. 2009;21(2):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 disminuye 0.071 (*Tabla 17*).

*Tabla 17. Concordancia entre DNA leucocitario materno y cfDNA de plasma omitiendo el marcador DXS998. 0=Concordante; 1=Discordante.*

MUESTRAS	MARCADORES X			MARCADORES Y			Concordancia/no concordancia
	DXS998	DXS8061	DXS1108	DYS200	DYS242	DYS278	
DPF01	0	0	0	1	1	1	1
DPF02	1	1	1	0	0	0	1
DPF03	1	0	0	0	0	0	0
DPF04	0	0	0	0	0	0	0
DPF05	1	1	1	0	0	0	1
DPF06	1	1	0	0	0	0	1
DPF07	1	0	1	0	0	0	1
DPF08	0	0	0	1	1	1	1
DPF09	0	1	0	0	0	0	1
DPF10	0	0	0	1	1	1	1
DPF11	0	1	1	0	0	0	1
DPF12	0	0	0	0	0	0	0
DPF13	0	0	1	0	0	0	1
DPF14	0	0	0	1	1	1	1
Proporción	<b>0.357</b>	<b>0.357</b>	<b>0.357</b>	<b>0.286</b>	<b>0.286</b>	<b>0.286</b>	<b>0.786</b>

De igual manera, el análisis se realizó omitiendo, ahora, el marcador DXS8061 encontrando la misma disminución que el marcador DXS998 (*Tabla 18*).

*Tabla 18. Concordancia entre DNA leucocitario materno y cfDNA de plasma omitiendo el marcador DXS8061. 0=Concordante; 1=Discordante.*

MUESTRAS	MARCADORES X			MARCADORES Y			Concordancia/no concordancia
	DXS998	DXS8061	DXS1108	DYS200	DYS242	DYS278	
DPF01	0	0	0	1	1	1	1
DPF02	1	1	1	0	0	0	1
DPF03	1	0	0	0	0	0	1
DPF04	0	0	0	0	0	0	0
DPF05	1	1	1	0	0	0	1
DPF06	1	1	0	0	0	0	1
DPF07	1	0	1	0	0	0	1
DPF08	0	0	0	1	1	1	1
DPF09	0	1	0	0	0	0	0
DPF10	0	0	0	1	1	1	1
DPF11	0	1	1	0	0	0	1
DPF12	0	0	0	0	0	0	0
DPF13	0	0	1	0	0	0	1
DPF14	0	0	0	1	1	1	1
Proporción	<b>0.357</b>	<b>0.357</b>	<b>0.357</b>	<b>0.286</b>	<b>0.286</b>	<b>0.286</b>	<b>0.786</b>

Sin tomar en cuenta al marcador DXS1108 la certidumbre sigue siendo 0.786, para los tres marcadores de X se observa el mismo valor sin importar que marcador sea (*Tabla 19*).

*Tabla 19. Concordancia entre DNA leucocitario materno y cfDNA de plasma omitiendo el marcador DXS1108. 0=Concordante; 1=Discordante.*

MUESTRAS	MARCADORES X			MARCADORES Y			Concordancia/no concordancia
	DXS998	DXS8061	DXS1108	DYS200	DYS242	DYS278	
DPF01	0	0	0	1	1	1	1
DPF02	1	1	1	0	0	0	1
DPF03	1	0	0	0	0	0	1
DPF04	0	0	0	0	0	0	0
DPF05	1	1	1	0	0	0	1
DPF06	1	1	0	0	0	0	1
DPF07	1	0	1	0	0	0	1
DPF08	0	0	0	1	1	1	1
DPF09	0	1	0	0	0	0	1
DPF10	0	0	0	1	1	1	1
DPF11	0	1	1	0	0	0	1
DPF12	0	0	0	0	0	0	0
DPF13	0	0	1	0	0	0	0
DPF14	0	0	0	1	1	1	1
Proporción	<b>0.357</b>	<b>0.357</b>	<b>0.357</b>	<b>0.286</b>	<b>0.286</b>	<b>0.286</b>	<b>0.786</b>



Contrariamente a los casos anteriores, sin cualquiera de los marcadores del cromosoma Y la certidumbre no presenta una disminución (**Tabla 20**). Por lo cual solo se muestra un ejemplo omitiendo un solo marcador.

*Tabla 20. Concordancia entre DNA leucocitario materno y cfDNA de plasma omitiendo el marcador D21S211. 0=Concordante; 1=Discordante.*

MUESTRAS	MARCADORES X			MARCADORES Y			Concordancia/no concordancia
	DXS998	DXS8061	DXS1108	DYS200	DYS242	DYS278	
DPF01	0	0	0	1	1	1	1
DPF02	1	1	1	0	0	0	1
DPF03	1	0	0	0	0	0	1
DPF04	0	0	0	0	0	0	0
DPF05	1	1	1	0	0	0	1
DPF06	1	1	0	0	0	0	1
DPF07	1	0	1	0	0	0	1
DPF08	0	0	0	1	1	1	1
DPF09	0	1	0	0	0	0	1
DPF10	0	0	0	1	1	1	1
DPF11	0	1	1	0	0	0	1
DPF12	0	0	0	0	0	0	0
DPF13	0	0	1	0	0	0	1
DPF14	0	0	0	1	1	1	1
Proporción	<b>0.357</b>	<b>0.357</b>	<b>0.357</b>	<b>0.286</b>	<b>0.286</b>	<b>0.286</b>	<b>0.857</b>