

Diagnóstico genético prenatal no invasivo de factor Rh y sexo fetal a través del análisis de ADN fetal libre en plasma materno

Non invasive prenatal genetic diagnosis of fetal RhD and sex through the analysis of free fetal DNA in maternal plasma

Lic. Carla Sesarini^a, Dra. María Laura Giménez^b, Lic. María Ana Redal^a,
Dr. Gustavo Izbizky^b, Dr. Horacio Aiello^b, Dr. Pablo Argibay^a y Dr. Lucas Otaño^b

RESUMEN

Introducción. El análisis de ADN fetal libre en plasma materno permite estudiar material genético del feto sin realizar procedimientos invasivos sobre el embarazo.

Objetivo. Evaluar la factibilidad y desempeño diagnóstico de la determinación del genotipo RhD y del sexo fetal a través del análisis molecular de ADN fetal libre en plasma de embarazadas mediante reactivos de uso general en biología molecular.

Material y métodos. Se extrajeron 109 muestras de sangre de embarazadas. Se amplificó por PCR en tiempo real una porción del gen RhD para el diagnóstico de Rh fetal en mujeres Rh-negativas y una región del cromosoma Y para la determinación del sexo fetal. Ambos datos se compararon con los resultados neonatales.

Resultados. Respecto de las 109 muestras, 26 embarazadas están en curso, 4 tuvieron abortos espontáneos y en 3 se perdió el seguimiento. De las 76 restantes con resultado neonatal, en 65 mujeres Rh-negativas se efectuó el análisis del gen RhD para la determinación del Rh fetal y en 66 muestras se realizó la determinación del sexo fetal. Quince muestras fueron no concluyentes y se excluyeron del análisis. El valor predictivo para RhD-positivo y RhD-negativo fue 85% y 90%, respectivamente, mientras que la predicción de sexo masculino fue 94,3% y la del femenino 95%.

Conclusiones. La determinación no invasiva del RhD y sexo fetal en plasma materno mediante reactivos de uso general en biología molecular fue factible en la mayoría de los casos, con un desempeño diagnóstico similar al descrito en la bibliografía.

Palabras clave: ADN fetal libre, diagnóstico prenatal, Rh fetal, sexo fetal.

SUMMARY

Introduction. The analysis of free fetal DNA in maternal plasma allows the assessment of fetal genetic material avoiding the necessity of invasive procedures during pregnancy.

Objective. To evaluate the feasibility and the diagnostic performance of fetal sex and fetal RhD detection through the analysis of free fetal DNA in maternal plasma using standard reagents in molecular biology.

Material and methods. A hundred and nine blood samples of pregnant women were obtained.

Amplification by real time PCR a sequence from the RhD gene in Rh negative patients and a Y-chromosome sequence, for the diagnosis of fetal Rh and sex respectively, were performed. Results were compared with neonatal outcomes.

Results. From the 109 samples, 26 are still ongoing, 4 ended in spontaneous abortions and in 3 were lost to follow up. From the remaining 76 samples with neonatal result, the determination of fetal Rh from the RhD gene was performed in 65 Rh negative women, whereas in 66 samples the fetal sex analysis was evaluated. Overall, 15 samples had not conclusive results and were excluded from the study. The predictive values for RhD positive and negative were 85% and 90%, respectively, while the prediction for male sex was 94.3% and for female sex 95%.

Conclusion. The non invasive determination of fetal RhD and sex in maternal plasma using standard reagents in molecular biology was feasible in the majority of the samples, with a diagnostic performance similar to the reported in the literature.

Key words: free fetal DNA, prenatal diagnosis, fetal Rh, fetal sex.

- a. Unidad de Medicina Molecular y Genómica, Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental (ICBME).
- b. Servicio de Obstetricia. Instituto Universitario, Escuela de Medicina del Hospital Italiano de Buenos Aires.

Conflicto de intereses:
Nada que declarar.

Correspondencia:
Dr. Lucas Otaño
lucas.otano@hospitalitaliano.org.ar

Recibido: 27-1-09
Aceptado: 10-6-09

INTRODUCCIÓN

La existencia de células fetales en la circulación materna durante el embarazo planteó la posibilidad de desarrollar técnicas no invasivas de diagnóstico prenatal. Sin embargo, la escasa concentración de estas células, las dificultades metodológicas para identificarlas y analizarlas, y su persistencia en la circulación materna por años, han constituido obstáculos insalvables para su aplicación clínica.¹

En 1997, Lo y col. demuestran por primera vez, sobre la base de observaciones previas de ADN libre circulante de origen tumoral en pacientes oncológicos,² la presencia de secuencias de ADN fetal libre en plasma y suero

materno.³ Las técnicas utilizadas para la detección del ADN fetal libre en la circulación materna son más simples, rápidas y confiables que para la detección de células fetales.⁴

Se estima que 2-6% del ADN que circula libremente en la sangre de la embarazada es de origen fetal.⁵ Se desconoce su origen preciso, pero podría deberse a la apoptosis de células del trofoblasto;⁶ su concentración aumenta a medida que avanza la gestación y desaparece luego de 2 h postparto.⁷

En la actualidad, el análisis del ADN fetal libre en plasma materno se limita a la evaluación de genes presentes en el feto pero no en la madre, como por ejemplo el RhD fetal en madres RhD-negativas o secuencias de ADN del cromosoma Y para diagnóstico de sexo fetal.⁸

Desde el punto de vista de la aplicación clínica, el conocimiento del factor Rh fetal en mujeres RhD-negativas tiene implicancias directas en la prevención primaria y secundaria de la isoimmunización Rh. De la misma manera, el diagnóstico de sexo genético prenatal permitiría evitar procedimientos invasivos sobre el embarazo en riesgo de enfermedades ligadas al cromosoma X, hiperplasia suprarrenal congénita o malformaciones que afectan selectivamente a un sexo.⁹

La utilización de reactivos comercialmente disponibles en el proceso de amplificación de secuencias en la reacción en cadena de la polimerasa, PCR (de las siglas en inglés: *polymerase chain reaction*) en tiempo real, propuestos por algunos protocolos,¹⁰ resultaría excesivamente costoso para su aplicación en nuestro medio.

El presente estudio tiene como objetivo evaluar la factibilidad y desempeño diagnóstico de la determinación del genotipo RhD y del sexo fetal a través del análisis molecular de ADN fetal libre en plasma de embarazadas mediante reactivos de uso general en biología molecular.

POBLACIÓN, MATERIAL Y MÉTODOS

Para el presente estudio exploratorio se extrajo sangre a 109 mujeres embarazadas que asistieron, entre diciembre de 2007 y octubre de 2008, al Servicio de Obstetricia del Hospital Italiano de Buenos Aires, previa firma del consentimiento informado. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética en Protocolos de Investigación del mismo hospital.

Para el análisis de los resultados se incluyeron sólo los casos con la evaluación del Rh y el sexo en el período neonatal. El criterio de inclusión para evaluar el genotipo fetal Rh fue de mujeres

embarazadas RhD-negativas, mientras que para la evaluación de sexo fetal se incluyeron también embarazadas RhD-positivas.

Se extrajeron 5 ml de sangre periférica anticoagulada con EDTA. El plasma se separó por centrifugación dentro de las 2 h de la recolección de la muestra y, dentro de las 24 h, se extrajo ADN (por duplicado) con el equipo de extracción QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen®). Para el procedimiento se siguieron las recomendaciones de manufactura con algunas modificaciones; el volumen inicial de plasma fue 1000 µl y el volumen final de resuspensión del ADN de 40 µl.

Las muestras se amplificaron por duplicado en un termociclador Real Time (Light Cycler, Roche®) con 5 µl de la muestra como molde y utilizando el fluorocromo SYBR I Green (Invitrogen).

Los cebadores (*primers*) utilizados son específicos para una secuencia del exón 7 del gen RhD de 125 pares de bases (pb):

RHD 7 S - GGGTGTGTAACCGAGTGCTG -
RHD 7 R - CCGGCTCCGACGGTATC -

Para la determinación del sexo fetal se amplificó una secuencia de 84 pb del marcador multicopia DYS14 del cromosoma Y:

DYS14 F - GGGCCAATGTTGTATCCTTCTC -
DYS14 R - GCCCATCGGTCACCTTACACTTC -

Se utilizó como control interno de amplificación, en todas las muestras analizadas, una secuencia del gen β-actina de 88 pb.

B-ACT F - CCCTTGCCATCCTAAAAGCC -
B-ACT R - TGCTATCACCTCCCCTGTGT -

Se incluyeron como controles mujeres no embarazadas Rh-negativo y Rh-positivo y hombres Rh-negativo y Rh-positivo.

Los resultados del análisis del Rh fetal se expresaron en asignación de RhD-positivo (exón 7 positivo) y RhD-negativo (exón 7 negativo), en tanto para sexo fetal, sexo masculino (DYS14 positivo) y sexo femenino (DYS14 negativo). Cuando se detectó alguna inconsistencia en el proceso (más de 2 horas entre la toma de la muestra de sangre y la extracción de ADN, ruptura de un tubo durante las centrifugaciones, o sospecha de contaminación) o en el análisis de la muestra (no concordancia de los duplicados en la amplificación, alguno o todos los controles no dieron el resultado esperado) se categorizó el resultado como "no concluyente". Los resultados "no concluyentes" fueron excluidos para el análisis final.

Los resultados obtenidos en plasma materno se compararon con los resultados del factor Rh y el fenotipo sexual del recién nacido (RN). Se calcularon en tablas de contingencia la sensibilidad,

especificidad, valores predictivos y exactitud de las pruebas, con sus límites de confianza del 95%.

Los investigadores involucrados con el procesamiento y análisis de las muestras permanecieron ciegos a toda información clínica de la embarazada, su pareja y del RN.

RESULTADOS

De las 109 muestras obtenidas, 26 embarazos se encuentran en curso, 4 tuvieron aborto espontáneo y en 3 se perdió el seguimiento. De los 76 casos evaluados con resultado neonatal conocido, en 65 casos se realizó el análisis para la genotipificación Rh fetal y en 66 para la determinación de sexo fetal.

La edad gestacional media al momento de la extracción de sangre fue de 24 semanas (intervalo: 7-41 semanas).

En 7,7% (5/65) de las muestras de la serie para el estudio del Rh fetal y en 15,1% (10/66) de las muestras para el estudio de sexo fetal, los resultados fueron "no concluyentes" y se excluyeron para el análisis de los resultados finales.

Se detectó β -actina en todas las muestras analizadas.

Análisis de ADN fetal libre en plasma materno para RhD fetal

La predicción del fenotipo RhD fue correcta en 52/60 muestras (86,7%) (IC 95%= 75,8-93,1). Se registraron 6 falsos positivos (predicción de

RhD-positivo con RN RhD-negativo) y 2 falsos negativos (predicción de RhD-negativo con RN RhD-positivo).

La sensibilidad de la prueba fue del 94,4% (34/36) (IC 95%= 81,8-98,5) mientras que la especificidad fue del 75% (18/24) (IC 95%= 55,1-88). El valor predictivo del gen RhD-positivo para Rh-positivo fue de 85% (34/40) (IC 95%= 70,9-92,9), mientras que el valor predictivo del gen RhD-negativo para Rh-negativo fue de 18/20= 90% (IC 95%= 69,9-97,2) (Tabla 1).

Análisis de ADN fetal libre en plasma materno para sexo fetal

La determinación del sexo fetal fue correcta en 53/56 pacientes (94,6%) (IC 95%= 85,4-98,2). Se registraron 2 falsos positivos (DYS14 positivo con RN femenino) y 1 falso negativo (DYS14 negativo con RN masculino).

La sensibilidad de la prueba fue del 97,1% (33/34) (IC 95%= 85,1-99,5), mientras que la especificidad fue del 90,9% (20/22) (IC 95%= 72,2-97,5). El valor predictivo para sexo masculino fue 94,3% (33/35) (IC 95%= 81,4-98,4) mientras que el valor predictivo para sexo femenino fue del 95,2% (20/21) (IC 95%= 77,3-99,1) (Tabla 2).

DISCUSIÓN

El presente estudio muestra que el diagnóstico genético prenatal no invasivo del RhD fetal y del sexo fetal a través del análisis de ADN fetal libre

TABLA 1. Sensibilidad, especificidad y valor predictivo para Rh-positivo y Rh-negativo mediante la determinación del gen RhD en ADN fetal libre de plasma materno

Determinación del gen RhD en plasma materno	Rh de los recién nacidos			
		Positivo	Negativo	
	Positivo	34	6	40
Negativo	2	18	20	
		36	24	60

Valor predictivo para Rh positivo: 85% (IC 95%= 70,9-92,9). Valor predictivo para Rh-negativo: 90% (IC 95%= 69,9-97,2).

Sensibilidad: 94,4% (IC 95%= 81,8-98,5). Especificidad: 75% (IC 95%= 55,1-88). Exactitud de la prueba: 86,7% (IC 95%= 75,8-93,1).

TABLA 2. Sensibilidad, especificidad y valor predictivo para sexo masculino y femenino mediante la determinación del marcador DYS14 en ADN fetal libre de plasma materno

Determinación de secuencias del cromosoma Y en plasma materno	Sexo del recién nacido			
		Masculino	Femenino	
	Positivo	33	2	35
Negativo	1	20	21	
		34	22	56

Valor predictivo para sexo masculino: 94,3% (IC 95%= 81,4-98,4). Valor predictivo para sexo femenino: 95,2% (IC 95%= 77,3-99,1). Sensibilidad: 97,1% (IC 95%= 85,1-99,5). Especificidad: 90,9% (IC 95%= 72,2-97,5). Exactitud de la prueba: 94,6% (IC 95%= 85,4-98,2).

en plasma materno fue factible en la mayoría de los casos, con un alto grado de exactitud. La utilización del fluorocromo SYBR I Green, si bien exige emplear condiciones de amplificación óptimas, es más económica y permitirá considerar una evaluación de costos en función de los beneficios para la aplicación de rutina.

Como en otras series, hubo algunas discrepancias diagnósticas. Se han descrito como fuente de discrepancias factores relacionados con la técnica, como baja concentración de ADN, contaminación y factores biológicos como variantes alélicas del gen RhD¹¹ o por la persistencia de trofoblasto proveniente de un segundo embarazo detenido (*vanishing twin*).¹²

Si bien no fue motivo de análisis, las discrepancias diagnósticas se concentraron mayormente en la primera mitad de la serie, por lo cual se especula que pueden haber prevalecido factores técnicos relacionados con una curva de aprendizaje. Desde el punto de vista clínico, el mayor impacto de una discrepancia diagnóstica está dado por los falsos negativos, pues se perdería la oportunidad de realizar las intervenciones médicas recomendadas. Los falsos positivos tienen menor trascendencia porque sólo conducen a implementar lo que se hace habitualmente en ausencia de la información, como ser desconocer el Rh o el sexo fetal. El ejemplo más conspicuo sería hacer la profilaxis con gammaglobulina anti-D durante el embarazo a pesar de que el feto es RhD-negativo. En la presente serie, la mayoría de las discrepancias diagnósticas correspondieron a falsos positivos.

La sensibilidad y la especificidad de la técnica aplicada en el presente estudio se encuentran levemente por debajo de las últimas publicadas^{12,13} y es probable que sea debido al tamaño muestral pequeño. Sin embargo, la incorporación de más marcadores genéticos, como otra secuencia del gen RhD (exón 5) y del cromosoma Y (SRY), permitirá mejorar la eficiencia de la prueba y minimizar la posibilidad de discrepancias.

Desde un punto de vista clínico, los resultados categorizados como "no concluyentes" sólo implican que debe repetirse la extracción de la muestra de sangre materna, a diferencia de lo que ocurre en el diagnóstico genético prenatal tradicional, en donde la falta de una respuesta diagnóstica concluyente requiere la repetición de un procedimiento invasivo sobre el embarazo.

En la actualidad, la única forma de conocer el RhD y el sexo genético fetal es a través de métodos invasivos, cuyo riesgo de aborto es de un 0,5-1% (al que se suma el riesgo de agravar la

isoimmunización materna, en madres Rh-negativas). La amniocentesis es la principal técnica utilizada para determinar el Rh fetal; la sensibilidad y la especificidad de la determinación es del 98,7% y 100%, respectivamente, con valores predictivos positivos del 100% y negativos del 96,9%.¹⁴

La determinación del sexo prenatal en el segundo y tercer trimestres se puede realizar mediante ecografía con un alto grado de certeza. Sin embargo, es difícil en el primer trimestre y prácticamente imposible antes de las 10 semanas de amenorrea. El diagnóstico de sexo a través de la detección de secuencias del cromosoma Y permitiría un mejor manejo de madres portadoras de genes mutados ligados al cromosoma X, donde los fetos masculinos tendrán un 50% de riesgo de padecer alguna patología grave.¹³

La factibilidad de analizar ácidos nucleicos fetales en plasma materno también se extiende al análisis de ARN fetal libre. La existencia de ARN fetal libre fue comunicada por primera vez en el año 2000.¹⁵ La atención se ha centrado en el estudio del gen PLAC4 (*placenta specific 4*) localizado en el cromosoma 21 y cuya expresión es estrictamente placentaria, por lo que los análisis cuantitativos de los niveles de expresión del ARNm de PLAC4 podrían ser utilizados para medir la ploidía del cromosoma 21.¹⁶

Además de Rh y sexo, el diagnóstico prenatal no invasivo se ha aplicado en algunas enfermedades genéticas para evaluar alguna mutación de expresión dominante o recesiva que no esté presente en la madre. Por ejemplo, diagnóstico prenatal de acondroplasia¹⁷ o de fibrosis quística.¹⁸ Los próximos desafíos diagnósticos en esta área estarán dados por la evaluación diferenciada de los ácidos nucleicos de origen fetal de los maternos y la evaluación de aneuploidías cromosómicas.⁶ De esta misma manera, las observaciones de que las cantidades de ADN fetal se encuentran aumentadas en embarazos que desarrollarán trastornos como preeclampsia,¹⁹ restricción de crecimiento intrauterino y prematurez,²⁰ no sólo permitirán mejorar los conocimientos sobre estos cuadros, sino que también abrirán nuevas posibilidades para la pesquisa de estas patologías.

CONCLUSIÓN

La detección de secuencias de ADN fetal en sangre de mujeres embarazadas abre las puertas al diagnóstico prenatal no invasivo, a través de marcadores de ácidos nucleicos fetales aún no publicados en la Argentina. El protocolo de laboratorio aplicado en el presente estudio implica

la factibilidad del diagnóstico prenatal no invasivo con costos significativamente menores que la metodología actualmente empleada en países desarrollados.

Financiación

El presente trabajo ha sido financiado por la Fundación para el Desarrollo de las Ciencias Básicas (FUCIBA), Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental (ICBME) y una beca individual (Carla Sesarini), de iniciación "Ramón Carrillo-Arturo Oñativia" de la Comisión Nacional Salud, Ciencia y Tecnología (SACyT), Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación. ■

BIBLIOGRAFÍA

1. Bianchi DW. Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *Br J Haematol* 1999;105:574-583.
2. Strickland S, Richards WG. Invasion of the trophoblasts. *Cell* 1992;71:355-357.
3. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485-487.
4. Pertl B, Bianchi DW. Fetal DNA in maternal plasma: emerging clinical applications. *Obstet Gynecol* 2001;98:483-490.
5. Lo YM, Tein MS, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998;62:768-775.
6. Lo YM, Chiu RW. Prenatal diagnosis: progress through plasma nucleic acids. *Nature Rev* 2007;8:71-77.
7. Lo YM, Zhang J, Leung TN, et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999;64:218-224.
8. Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. Risk free simultaneous prenatal identification of fetal Rhesus D status and sex by multiplex real-time PCR using cell free fetal DNA in maternal plasma. *Swiss Med Wkly* 2001;131:70-74.
9. Avent ND, Plummer ZE, Madgett TE, et al. Post-genomics studies and their application to non-invasive prenatal diagnosis. *Semin Fetal Neonatal Med* 2008;13:91-98.
10. Legler TJ, Liu Z, Mavrou A, et al. Workshop report on the extraction of foetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2007;27:824-829.
11. Denomme GA, Wagner FF, Fernandes BJ, et al. Partial D, weak D types, and novel RhD alleles among 33,864 multiethnic patients: implications for anti-D alloimmunization and prevention. *Transfusion* 2005;45:1554-1560.
12. Van der Schoot CE, Hahn S, Chitty LS. Non-invasive prenatal diagnosis and determination of fetal Rh status. *Semin Fetal Neonatal Med* 2008;13:63-68.
13. Finning KM, Chitty LS. Non-invasive fetal sex determination: Impact on clinical practice. *Semin Fetal Neonatal Med* 2008;13:69-75.
14. Management of alloimmunization during pregnancy. ACOG Practice Bulletin N°75. *Obstet Gynecol* 2006;108:457-464.
15. Poon LL, Leung TN, Lau TK, et al. Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2000;46:1832-1834.
16. Lo YM, Tsui NB, Chiu RW, et al. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med* 2007;13:218-223.
17. Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, et al. Prenatal DNA diagnosis of a single gene disorder from maternal plasma. *Lancet* 2000;356:1170.
18. González-González MC, García-Hoyos M, Trujillo MJ, et al. Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2002;22:946-948.
19. Lo YM, Leung TN, Tein MS, et al. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem* 1999;45:184-188.
20. Hahn S, Chitty LS. Noninvasive prenatal diagnosis: current practice and future perspectives. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008;20:146-151.

Los médicos administran medicamentos que conocen poco, a enfermos que conocen menos, para curar enfermedades que no conocen en absoluto.

Voltaire