

Determinación temprana del sexo fetal en plasma materno mediante PCR en tiempo real

Early fetal sex determination in maternal plasma by real-time PCR

Determinação precoce do sexo fetal em plasma materno por PCR em tempo real

► Silvina Quintana^{1a}, Vanesa Di Gerónimo^{2a}, María Susana Estévez^{3a}, Juan Passucci^{4b,c}, Mariana Rivero^{4b,c}

►

¹ PhD Licenciada en Ciencias Biológicas.

² Técnica.

³ Licenciada en Bioquímica.

⁴ PhD Médico.

^a Laboratorio de Biología Molecular, Fares Taie Instituto de Análisis, Mar del Plata. Argentina.

^b Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias.

^c Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Escuela Superior de Ciencias de la Salud.

Resumen

El análisis de ADN fetal libre en plasma materno permite estudiar material genético del feto sin realizar procedimientos invasivos sobre el embarazo. La identificación del sexo fetal mediante la detección de ADN del cromosoma masculino Y, en el plasma de mujeres embarazadas, es de gran utilidad en embarazos con riesgo para hiperplasia suprarrenal congénita o para enfermedades ligadas al cromosoma X. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la factibilidad y desempeño diagnóstico de la determinación del sexo fetal a través del análisis por PCR en tiempo real de ADN fetal libre en plasma de embarazadas. Se extrajeron 10 mL de sangre periférica a 134 pacientes embarazadas entre las semanas 5 y 32 de gestación, se separó el plasma y se efectuó extracción de ADN. Las muestras se analizaron mediante PCR en tiempo real amplificando el marcador DYS14 presente en el cromosoma Y. El sexo fetal se confirmó mediante ecografía realizada entre las semanas 20 y 32. La sensibilidad y especificidad de la técnica para detectar el sexo fetal fue del 98,5% y del 80,7% respectivamente. La menor edad gestacional de diagnóstico fue 5 semanas. La técnica implementada ha mostrado un desempeño diagnóstico similar al descrito en la bibliografía.

Palabras clave: determinación temprana del sexo fetal * PCR en tiempo real * plasma materno

Summary

Free fetal DNA analysis in maternal plasma permits the study of fetal genetic material without performing invasive procedures at pregnancy. The identification of fetal sex by detecting the male Y chromosome DNA in the plasma of pregnant women is very useful in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia or X-linked diseases. The present study aimed at evaluating the feasibility and the diagnostic performance of the determina-

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

tion of fetal sex analyzing free fetal DNA by real-time PCR in maternal plasma. A total of 10 mL of peripheral blood was taken from 134 pregnant patients undergoing between 5 and 32 weeks of gestation; the plasma was separated and DNA extraction was performed. Samples were analyzed by real-time PCR amplifying the marker DYS14 present in the Y chromosome. Fetal sex was confirmed by ultrasound performed between weeks 20 and 32. Sensitivity and specificity of the technique to detect the fetal sex were 98.5% and 80.7% respectively. The earliest gestational age at diagnosis was 5 weeks. The implemented technique has shown similar diagnostic performance to that described in the literature.

Keywords: *early fetal sex determination * real-time PCR * maternal plasma*

Resumo

A análise do DNA fetal livre no plasma materno permite o estudo do material genético fetal sem a realização de procedimentos invasivos na gravidez. A identificação do sexo fetal através da detecção do DNA do cromossomo masculino Y, no plasma de mulheres grávidas, é muito útil em gestações com risco de hiperplasia adrenal congênita ou para doenças ligadas ao cromossomo X. O presente estudo teve como objetivo avaliar a factibilidade e desempenho diagnóstico da determinação do sexo fetal através da análise por PCR em tempo real de DNA fetal livre no plasma de grávidas. 10 mL de sangue periférico foi extraído a partir de 134 pacientes grávidas entre 5 e 32 semanas de gestação, o plasma foi separado e foi feita a extração de DNA. As amostras foram analisadas por PCR em tempo real amplificando marcador de DYS14 presente no cromossomo Y. O sexo fetal foi confirmado por ultrassonografia realizada entre as semanas 20 e 32. A sensibilidade e a especificidade da técnica para detectar o sexo fetal foram de 98,5% e 80,7%, respectivamente. A menor idade gestacional de diagnóstico foi de 5 semanas. A técnica utilizada demonstrou um desempenho de diagnóstico semelhante ao descrito na literatura.

Palavras-chave: *determinação precoce do sexo fetal * PCR em tempo real * plasma materno*

Introducción

En 1997 se demostró por primera vez la presencia de secuencias de ADN fetal libre en plasma y suero materno, el cual se estima que es entre el 3 al 6%. Se desconoce su origen preciso, aunque se propone que podría deberse a la apoptosis de células del trofoblasto y que su concentración aumenta a medida que avanza la gestación y desaparece luego de 2 h posparto (1-4). También se ha asociado la concentración de ADN fetal circulante en plasma materno con diferentes complicaciones de los embarazos, por ejemplo; en embarazos pretérmino hubo mayor ADN fetal que en embarazos que llegaron a término (5). También se ha asociado estos aumentos en la concentración de ADN fetal con la preeclampsia (6) (7) y la restricción de crecimiento intrauterino (8).

En la actualidad, el análisis del ADN fetal libre en plasma materno se ha focalizado en la evaluación de genes presentes en el feto pero no en la madre, como el RhD fetal en madres RhD negativas (9) (10) así como el diagnóstico de algunas enfermedades de origen genético que no estén presentes en la madre (11) (12), como por ejemplo acondroplasia (13), fibrosis quística y enfermedad de Huntington (14). Asimismo, el estudio del ADN fetal libre se ha utilizado también para la determinación de anomalías cromosómicas fetales (15-17). Una de las primeras aplicaciones del análisis de ADN

fetal ha sido el diagnóstico de sexo fetal analizando secuencias de ADN del cromosoma Y (18).

El diagnóstico del sexo fetal en forma no invasiva se puede realizar confiablemente por ecografía (sexo fenotípico) a partir de las 13-14 semanas (19). En el caso particular del diagnóstico de sexo genético prenatal mediante técnicas de biología molecular la asignación del sexo fetal puede realizarse a partir de las semanas 7-11 de gestación, aunque también se ha demostrado su factibilidad en muestras de 5 y 6 semanas de gestación (20). Esta herramienta permitiría evitar procedimientos invasivos sobre embarazos con riesgo de enfermedades ligadas al cromosoma X, hiperplasia suprarrenal congénita o malformaciones que afectan selectivamente a un sexo (21-23).

Es posible detectar secuencias específicas del cromosoma Y masculino en plasma de mujeres embarazadas de varones mediante la técnica de PCR convencional (con una sensibilidad del 87-100%, y una especificidad del 45-100%) y por PCR en tiempo real (sensibilidad 87%-100%, especificidad del 98%-100%) (1) (2) (24) (25). Asimismo, la metodología de PCR en tiempo real también permite medir la concentración del ADN fetal en el plasma materno. Si bien en la bibliografía figuran un gran número de trabajos describiendo metodologías de PCR convencional y PCR en tiempo real para la determinación del sexo fetal en plasma materno (24), en

Argentina existen muy pocos antecedentes de la aplicación de esta metodología y su desempeño en el laboratorio de diagnóstico (26).

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la factibilidad y desempeño diagnóstico de la determinación del sexo fetal a través del análisis por PCR en tiempo real de ADN fetal libre en plasma de embarazadas.

Materiales y Métodos

MUESTRAS BIOLÓGICAS

Para el presente estudio se analizaron 134 muestras de mujeres embarazadas entre las 5 y las 32 semanas de gestación que asistieron entre los años 2010 y 2013 al Laboratorio de Análisis Fares Taie, previa firma de consentimiento informado. La muestra consistió en plasma materno obtenido en tubo con EDTA separado dentro de los 45 minutos de la toma de muestra (sin excepción), y conservado a -20 °C. Todas las muestras fueron manipuladas, desde la extracción hasta el procesamiento, por personal técnico femenino para evitar contaminaciones con ADN masculino.

EXTRACCIÓN DE ADN

Se realizó la extracción de ADN de plasma materno mediante el equipo comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) con modificaciones respecto al protocolo sugerido por el fabricante, el volumen inicial de plasma materno fue de 800 µL y el volumen final de resuspensión del ADN fue de 40 µL. Se cuantificó la cantidad de ADN presente en cada extracción mediante el equipo Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

ESTUDIOS MOLECULARES

PCR Control interno

Con el fin de corroborar la correcta extracción de ADN y la ausencia de inhibidores en las muestras, se efectuaron amplificaciones por PCR en tiempo real de un fragmento de 99 pb del gen de la beta actina humana mediante cebadores de diseño propio (fw: 5'-TGCGTGACATTAAGGAGAAG-3' y rv: 5'-GCTCGTAGCTCTTCTCCA-3'). Las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en un termociclador Rotor Gene Q (Qiagen, Hilden, Alemania), en un volumen final de 20 µL, utilizando EvaGreen como intercalante fluorescente (Biodynamics, Bs. As., Argentina). El programa de ciclado para la detección del gen de la beta actina consistió en una desnaturalización inicial de 3 min de 95 °C y 40 ciclos de 10 segundos a 95 °C, 15 segundos a 54 °C y 20 segundos a 72 °C. Una vez finalizada la amplificación se efectuó un análisis de curva de *melting*, siendo la temperatura de *melting* (Tm) del amplicón específico

de 84,5 °C. Se consideraron aptas para el estudio sólo aquellas muestras cuyo valor de Ct (Ciclo umbral) de beta actina fuera menor a 35.

PCR para la detección de la secuencia DYS14

Se llevaron a cabo reacciones de PCR en tiempo real para detectar la secuencia multicopia DYS14, la cual según lo descrito previamente mejora la sensibilidad de la técnica con respecto a la amplificación del gen SRY (3). Se utilizaron dos pares de cebadores diferentes: DYS14 F 5'-GGGCCAATGTTGTATCCTTCTC-3' y DYS14 R 5'-GCCCATCGGTCACCTTACACTTC-3' que amplifican un fragmento de 84 pb de la secuencia DYS 14 (21) y además se utilizaron DYS14-sentido

5'-CATCCAGAGCGTCCCTGG-3' y DYS14-antisentido 5'-GCCCATCGGTCACCTTACACTT-3' que amplifican un fragmento de 107 pb de la secuencia DYS14 (27).

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Rotor Gene Q, en un volumen final de 20 µL, utilizando EvaGreen como intercalante fluorescente (Biodynamics) y utilizando como template 8 µL del ADN extraído. El programa de ciclado para ambos pares de cebadores consistió en una desnaturalización inicial de 3 minutos de 95 °C y 45 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 20 segundos a 58 °C y 30 a 72 °C, una vez finalizada la amplificación se efectuó una curva de *melting*, siendo la Tm del producto generado por DYS14-sentido/antisentido de 84,5±1 °C y la Tm del producto generado por DYS14 F/R de 82,5±1 °C.

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado con ambos pares de cebadores y en cada reacción se incluyeron los controles positivos y negativos correspondientes.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos de las amplificaciones por PCR en tiempo real de la secuencia DYS14 en plasma materno fueron comparados con el fenotipo sexual del recién nacido.

Se determinó la sensibilidad (capacidad para determinar a los varones como tales) y la especificidad (capacidad para determinar a las mujeres como tales) de la técnica, y sus intervalos de confianza del 95%. También se calcularon los valores predictivos positivos y negativos con los intervalos de confianza del 95%.

Para determinar la concordancia entre la PCR en tiempo real y el diagnóstico ecográfico se evaluó el índice *Kappa* considerando que la concordancia es excelente cuando el valor de *Kappa* es mayor a 0,76. Asimismo, se calculó la exactitud de la técnica, es decir qué probabilidad tiene cada resultado de ser correcto.

Se realizó un análisis global y también otro considerando exclusivamente las muestras de pacientes que se encontraban cursando menos de 13 semanas de embarazo.

Resultados

De un total de 134 muestras, se produjeron 4 abortos espontáneos y se perdió el seguimiento de 2 pacientes. Tres casos correspondieron a embarazos múltiples y 79 correspondieron a embarazos previos a la semana 13 de gestación.

Cuando se detectó alguna inconsistencia en el análisis de la muestra (no concordancia en la amplificación de los duplicados, valores de Ct altos (>42), falta de concordancia entre los resultados de las dos reacciones de PCR para DYS14), se categorizó el resultado como "no concluyente". Cuatro muestras presentaron resultados no concluyentes, razón por la cual no fue posible la asignación del sexo fetal en estos casos y fueron excluidas del análisis final.

A todas aquellas muestras que presentaron valores de Ct de beta actina humana >35 se les realizó una nueva extracción de ADN. De modo que todas las muestras analizadas para la determinación del sexo fetal presentaron valores de Ct de beta actina humana <35. Finalmente quedaron en el estudio 124 muestras (76 correspondieron a embarazos menores a 13 semanas). La menor edad gestacional a la cual se detectó señal del cromosoma Y fetal fue a las 5 semanas.

Dentro de las muestras analizadas (n=124), 67 correspondieron a varones. De éstas, 66 fueron determinadas como positivas por PCR en tiempo real a la secuencia DYS14. Por otro lado, 57 muestras fueron fenotípicamente mujeres, siendo negativas por PCR en tiempo real 46 (Tabla I). La sensibilidad global de la técnica fue del 98,5% (IC95% 95,6%-100%) y presentó una especificidad del 80,7% (IC95% 70,5%, 90,9%). El valor predictivo positivo fue de 85,7% (IC 95% 77,9%-93,5%) y el valor predictivo negativo fue del 97,9% (IC 95% 93,7%- 100%). La concordancia entre las pruebas fue excelente ($kappa$ 0,803; $p=0,0000$), y la exactitud fue del 90,3% (IC 95% 85,1%-95,5%).

Tabla I. Concordancia entre diagnóstico mediante PCR en tiempo real (marcador DYS14) en embarazos de 5 a 32 semanas de gestación y fenotipo determinado ecográficamente en las semanas 20 y 32.

Determinación de DYS 14	Sexo fetal por ecografía	
	Masculino	Femenino
Positivo	66	11
Negativo	1	46
Total	67	57

Cuando se analizaron exclusivamente las muestras correspondientes a embarazos menores a 13 semanas (n=76), 42 correspondieron a varones, todos determinados como positivos por PCR en tiempo real a la secuencia DYS14. En cambio de las 34 mujeres, 27 fueron positivas a la técnica de PCR en tiempo real (Tabla II).

Por lo tanto, la sensibilidad encontrada en este grupo fue del 100% (IC 5% 98,81%-100,00), una especificidad del 79,41% IC 95% (64,35-94,47%), un valor predictivo positivo del 85,71% (IC 95% 74,90%-96,53%) y un valor predictivo negativo del 100% (IC 95% 98,15-100,00%). La concordancia fue excelente ($Kappa=0,810$) y la exactitud fue del 90,79 (IC95% 83,63- 97,95%).

Tabla II. Concordancia entre diagnóstico mediante PCR en tiempo real (marcador DYS14) en embarazos de menos de 13 semanas de gestación y fenotipo determinado ecográficamente en las semanas 20 y 32.

Determinación de DYS 14	Sexo fetal por ecografía	
	Masculino	Femenino
Positivo	42	7
Negativo	0	27
Total	42	34

Discusión y Conclusiones

La determinación del sexo prenatal en el segundo y tercer trimestre 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 13 semanas de gestación. El diagnóstico del sexo fetal 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 (25).

El presente estudio muestra que el diagnóstico genético prenatal no invasivo del sexo fetal a través del análisis de ADN fetal libre en plasma materno por PCR en tiempo real fue factible de realizar en la mayoría de los casos. La sensibilidad promedio (98,5%) de la técnica aplicada fue similar a la reportada en estudios previos (87%-100%), mientras que la especificidad (80,7%) se encontró por debajo de lo reportado en la literatura (98%-100%) (24) (25). Es interesante remarcar que todas las mediciones de la PCR en tiempo real mejoraron cuando se evaluaron las muestras de pacientes cursando menos de 13 semanas de embarazo, momento crucial para la determinación de sexo fetal en el que no es posible hacerlo por métodos ecográficos. La alta sensibilidad y el valor predictivo negativo del 100% indican que cuando se realiza el diagnóstico de sexo femenino hay muy poca probabilidad de estar en presencia de un feto masculino. De todas maneras el valor predictivo positivo también fue bueno. Asimismo, los valores de exactitud también fueron altos.

En el presente trabajo en cuatro casos no fue posible asignar el sexo fetal, los resultados categorizados como "no concluyentes" sólo implican que debe repetirse la extracción de la muestra de sangre materna. A dife-

rencia de lo que ocurre en los estudios de diagnóstico prenatal invasivos, en los cuales en caso de obtenerse un resultado indeterminado se debe poner en riesgo nuevamente el embarazo.

Previo al desarrollo de este trabajo, se tomaron muestras de sangre de mujeres embarazadas por duplicado y se analizó la concentración de ADN total al realizar la extracción de ADN de manera inmediata y luego de almacenar las muestras 24 h en heladera. Se comprobó lo previamente descrito por Barrett *et al.* (28) o sea que la concentración de ADN total aumenta debido a la lisis de células maternas (datos no mostrados), razón por la cual para mejorar la eficiencia del test se debe realizar la extracción de ADN de manera inmediata.

Como en otros trabajos donde se ha implementado este análisis, hubo algunas discrepancias diagnósticas. Se han descrito como posibles fuente de discrepancias factores relacionados con la técnica, como baja concentración de ADN, amplificación inespecífica de ADN materno, contaminación y factores biológicos como persistencia de trofoblasto proveniente de un segundo embarazo detenido (*vanishing twin*) (10). Scheffer *et al.*, han descrito señales de amplificación con *primers* que amplifican la secuencia multicopia DYS14 en muestras de mujeres embarazadas de fetos femeninos, tal y como ha sucedido en el presente estudio en 10 casos (29). Se ha sugerido que la incorporación de más marcadores genéticos, como otras secuencias del cromosoma Y (DYS1/DAZ, DY3, AMELY, SRY), permitirán mejorar la eficiencia de la prueba y minimizar la posibilidad de discrepancias. En el presente trabajo, la mayoría de las discrepancias diagnósticas correspondieron a falsos positivos.

En los casos de falsos positivos se realizaron ampliificaciones por PCR en tiempo real con el marcador SRY (30) con el ADN restante de las muestras analizadas, demostrando que el agregado de este marcador al análisis no resultó de utilidad para poder realizar una correcta asignación del sexo (datos no mostrados). Para una correcta asignación del sexo fetal se deberían evaluar otros marcadores que sean sensibles pero que no presenten la inespecificidad que muestra la utilización de la secuencia DYS 14.

A la hora de analizar los resultados de sensibilidad y especificidad de este tipo de estudios se debe tomar en cuenta que para enfermedades ligadas al cromosoma X, es más importante eliminar resultados falsos negativos (por ejemplo, clasificar como femenino un feto de sexo masculino), ya que todos los embarazos masculinos portadores necesitarán pruebas de seguimiento invasivas. Por lo tanto, el umbral debe establecerse para favorecer la sensibilidad en el déficit de especificidad. En el caso de la hiperplasia suprarrenal congénita, que afecta a los genitales femeninos en el útero, la especificidad debe ser favorecida.

En la mayoría de los estudios, como el presente, la presencia del feto femenino se infiere por un resultado

negativo a las PCR de detección del cromosoma Y. Si bien se corrobora la correcta extracción del ADN total (fetal y materno) por la amplificación del gen de la beta actina humana, para brindar esta metodología como rutina en el laboratorio de diagnóstico, se debe corroborar la presencia de ADN fetal en aquellos casos en los cuales no se detecta amplificación de secuencias del cromosoma Y (24) (29). Esto obliga a la extracción de sangre del padre y la realización de estudios más complejos para determinar la presencia de alelos que sólo están presentes en el padre en el ADN fetal extraído de la sangre materna, por ello estos autores no consideran viable la implementación de este tipo de estudios en Argentina, dada la complejidad técnica y altos costos.

La metodología implementada en el presente trabajo presentó una sensibilidad promedio del 98,5%, y una especificidad del 80,7%, razón por la cual se considera que debe mejorar técnicamente para poder implementarse como servicio y realizar una correcta asignación del sexo fetal en el laboratorio de diagnóstico. Es posible que la incorporación de otros marcadores del cromosoma Y permita mejorar el desempeño. Los próximos desafíos en este medio, en cuanto a diagnóstico fetal no invasivo, estarán dados por la evaluación diferenciada de los ácidos nucleicos de origen fetal respecto de los maternos y la evaluación de aneuploidías cromosómicas.

CORRESPONDENCIA

DRA. SILVINA QUINTANA
Rivadavia 3331, (7600) M.D.P. 54-223-4753855 (Int.112),
Argentina.
biologiamolecular@farestaie.com.ar

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a las Dras. Mariana Recavarren, Andrea Ramonda y Marcela Venara, así como el Dr. Gustavo Fares Taie por la lectura crítica del manuscrito y las observaciones realizadas.

Referencias bibliográficas

1. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, *et al.* Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350: 485-7.
2. Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, *et al.* Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 768-75.
3. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999a; 64:218-24.
4. Lo YM, Chiu RW. Prenatal diagnosis: progress through plasma nucleic acids. *Nature Rev* 2007; 8: 71-7.
5. Leung TN, Zhang J, Lau TK, Hjelm NM, Lo YM. Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet* 1998; 352: 1904-5.

6. Lo YM, Leung TN, Tein MS, Sargent IL, Zhang J, Lau TK, *et al.* Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem* 1999b; 45: 184-8.
7. Manokhina I, Singh TK, Peñaherrera MS, Robinson WP. Quantification of cell-free DNA in normal and complicated pregnancies: overcoming biological and technical issues. *PLoS ONE* 2014; 9(7): e101500.
8. Hahn S, Chitty LS. Noninvasive prenatal diagnosis: current practice and future perspectives. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008; 20:146-51.
9. Geifman-Holtzman O, Grotegut CA, Gaughan JP. Diagnostic accuracy of noninvasive fetal Rh genotyping from maternal blood--a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195: 1163-73.
10. Van der Schoot CE, Hahn S, Chitty LS. Non-invasive prenatal diagnosis and determination of fetal Rh status. *Semin Fetal Neonatal Med* 2008; 13: 63-8.
11. Liao GJ, Chiu RW, Lo YM. Prenatal assessment of fetal chromosomal and genetic disorders through maternal plasma DNA analysis. *Pathology* 2012; 44: 69-72.
12. Norwitz ER, Levy B. Noninvasive prenatal testing: the future is now. *Rev Obstet Gynecol* 2013; 6: 48-62.
13. Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, Suzuki M, Yanaihara T. Prenatal DNA diagnosis of a single gene disorder from maternal plasma. *Lancet* 2000; 356: 1170.
14. González-González MC, García-Hoyos M, Trujillo MJ, Rodríguez de Alba M, Lorda-Sánchez I, Díaz-Recasens J, *et al.* Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2002; 22: 946-8.
15. Jensen TJ, Zwiefelhofer T, Tim RC, Džakula Ž, Kim SK, Mazloom AR, *et al.* High-throughput massively parallel sequencing for fetal aneuploidy detection from maternal plasma. *PLoS One* 2013; 8(3): e57381.
16. Lim JH, Park SY, Ryu HM. Non-invasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 21 using cell-free fetal DNA in maternal blood. *Obstet Gynecol Sci* 2013; 56: 58-66.
17. Gekas J, Langlois S, Ravitsky V, Audibert F, van den Berg DG, Haidar H, *et al.* Identification of trisomy 18, trisomy 13, and Down syndrome from maternal plasma. *Appl Clin Genet* 2014; 7: 127-31.
18. 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: 70-4.
19. Odeh M, Granin V, Kais M, Ophir E, Bornstein J. Sonographic fetal sex determination. *Obstet Gynecol Surv* 2009; 64: 50-7.
20. Martinhago CD, de Oliveira RM, Tomitão Canas Mdo C, Vagnini LD, Alcantara Oliveira JB, Petersen CG, *et al.* Accuracy of fetal gender determination in maternal plasma at 5 and 6 weeks of pregnancy. *Prenat Diagn* 2006; 26: 1219-23.
21. Sesarini C, Pablo Argibay P, Lucas Otaño L. Diagnóstico prenatal no invasivo. Ácidos nucleicos de origen fetal en sangre materna. *Medicina (B. Aires)* 2010; 70: 537-42.
22. Avent ND, Plummer ZE, Madgett TE, Maddocks DG, Soot-hill PW. Post-genomics studies and their application to non-invasive prenatal diagnosis. *Semin Fetal Neonatal Med* 2008; 13: 91-8.
23. Wright CF, Burton H. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update* 2009; 15:139-51.
24. Devaney SA, Palomaki GE, Scott JA, Bianchi DW. Noninvasive fetal sex determination using cell-free fetal DNA: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2011; 306: 627-36.
25. Finning KM, Chitty LS. Non-invasive fetal sex determination: Impact on clinical practice. *Semin Fetal Neonatal Med* 2008; 13: 69-75.
26. Sesarini C, Giménez ML, Redal MA, Izbizky G, Aiello H, Argibay P, *et al.* Diagnóstico genético prenatal no invasivo de factor Rh y sexo fetal a través del análisis de ADN fetal libre en plasma materno. *Arch Argent Pediatr* 2009; 107: 405-9.
27. Illanes LS, Searovic VP, Pino LK, Trebilcock GJ, Figueroa DH, Horacio, Kottman CG, *et al.* Determinación del sexo fetal mediante ADN libre fetal en plasma materno. *Rev Chil Obstet Ginecol* 2008; 73: 27-30.
28. Barrett AN, Zimmerman BG, Wang D, Holloway A, Chitty LS. Implementing prenatal diagnosis based on cell-free fetal DNA: accurate identification of factors affecting fetal DNA yield. *PLoS One* 2011; 6(10): e25202.
29. Scheffer PG, van der Schoot CE, Page-Christiaens GC, Bossers B, van Erp F, de Haas M. Reliability of fetal sex determination using maternal plasma. *Obstet Gynecol* 2010; 115: 117-26.
30. Davalieva K, Dimcev P, Efremov G, Plaseska-Karanfilska D. Non-invasive fetal sex determination using real-time PCR. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2006; 19: 337-42.

Recibido: 3 de julio de 2014.

Aceptado: 27 de noviembre de 2014.