

O plasma materno para determinação do sexo fetal

The maternal plasma for determination of fetal sex

Ana Carolina Ferreira ^a; Selma Cecilia Bourroul ^a

a: Faculdade de Biomedicina, Centro Universitário da Faculdades Metropolitanas Unidas; Avenida Santo Amaro, 1239 – Vila Nova Conceição – São Paulo, SP – CEP: 04505-002

RESUMO

O desenvolvimento embrionário possui diversos estágios, sendo todos importantes, entretanto, neste trabalho o destaque será para a diferenciação do sexo gonadal fetal, pois dentro deste processo é possível determinar precocemente o sexo fetal através da reação em cadeia polimerase em tempo Real (PCR em tempo real). Esta descoberta é possível através da extração de sangue periférico materno, segundo literatura, existem 6% de DNA fetal no plasma total materno e conforme o avanço da idade gestacional esta porcentagem tende a aumentar. Com o plasma materno é realizado amplificação do DNA fetal através de PCR em tempo real. A finalidade deste trabalho é indicar por qual motivo é importante idade gestacional e explicar o porquê deste ser realizado acima de oito semanas de gestação. A determinação do sexo fetal é realizada por deleção, pois é identificada duas regiões genômicas, uma no cromossomo Y e outra no cromossomo X, detectando sequências do cromossomo Y no plasma materno é confirmado sexo fetal masculino considerando que mulheres normais não possuem tais sequências em seu genoma e quando não é encontradas sequências do cromossomo Y é excluída a possibilidade do sexo fetal masculino então se entende que sexo fetal é feminino.

Palavras-chave: PCR em tempo real; sexo fetal; determinação gonadal; desenvolvimento embrionário

SUMMARY

Embryonic development has several stages, with all important, however, this work will be the highlight for the differentiation of fetal gonadal sex, because within this process it is possible to determine fetal sex early by polymerase chain reaction in real time (time PCR real). This discovery is possible through the extraction of maternal peripheral blood according to the literature, there are 6% of the total fetal DNA in maternal plasma and as advancing gestational age this percentage tends to increase. With maternal plasma is performed amplification of fetal DNA by PCR in real time. The purpose of this paper is to indicate for what reason it is important to gestational age and explain why this

over eight weeks of pregnancy be performed. The fetal sex determination is performed by deletion because it identified two genomic regions, one on the Y chromosome and one X chromosome, detecting the Y chromosome sequences in maternal plasma is confirmed male fetal sex whereas normal females have no such sequences in their and when genome sequences are not found on the Y chromosome is excluded male fetal gender then understands that fetal gender is female.

Keyword: Real time PCR; fetal sex; gonadal determination; embryonic

Desenvolvimento embrionário x Técnicas não invasivas

Atualmente há estudos para exames de pré-natal para que não traga malefício para mãe ou para o bebê, sendo assim cientistas buscam avanços para técnicas não invasivas. A técnica não invasiva atual utilizada é a determinação precoce do sexo fetal através do plasma materno por meio da reação em cadeia polimerase (PCR em tempo real). Sabe-se que o DNA livre fetal esta representando em apenas 6% do plasma total presente na circulação sanguínea materna, estes ácidos nucleicos são liberados através do apoptose de células trofoblásticas que estão presentes na composição da placenta e a partir deste achado pesquisadores conseguiram quantificar o DNA fetal em relação ao DNA materno através do PCR em tempo real.¹

A princípio no Brasil está técnica é utilizada somente para a determinação do sexo fetal, mais há estudos com aplicação clínica para contribuir na pesquisa de doenças genéticas ligadas ao cromossomo X², como a Distrofia Muscular de Duchene e Hemofilia, em que a confirmação do sexo feminino exclui a possibilidade do feto ser portador de tais doenças, ou até mesmo indica o tratamento de doenças metabólicas associadas à ambiguidade da genitália, como Hiperplasia Congênita Adrenal (HCA).¹

Em estudos recentes demonstraram que mulheres gestantes de fetos com aneuploidia principalmente a trissomia do cromossomo 21 (Síndrome de Down) ou do cromossomo 13 (síndrome de Patau), apresentaram concentração de DNA fetal muito maior que as mulheres que gestavam fetos

sem o mesmo distúrbio, esses dados são preliminares devido ao número pequeno de amostras.¹

Existem duas grandes linhas de pesquisa de testes de Doença Perinatal (DPN) não invasivo de aneuploidias cromossômicas fetais. Uma delas está focada na análise do DNA fetal livre, por meio de técnicas sofisticadas, como PCR Digital (contagem de cada molécula de DNA) e sequenciamento em massa, (sequenciamento simultâneo de milhões de moléculas DNA). Porém existem duas grandes limitações para implantar esta técnica sendo seu custo elevado e a complexidade que envolve esta tecnologia incluindo softwares sofisticados de bioinformática.¹

Outra linha de pesquisa está focada na análise da expressão gênica fetal, onde são isoladas do plasma materno mRNAs específicos do feto (os quais são expressos principalmente pelo tecido placentário). O teste é baseado na abordagem SNP/mRNA, em que a razão entre os alelos de polimorfismo de único nucleotídeo (SNPs) localizados em genes expressos pelo tecido placentário permitindo a detecção de cópia extra do cromossomo onde estão localizados os genes investigados.³

A determinação precoce do sexo fetal

A detecção do sexo fetal é cem por cento comprovadas a partir de oito semanas de gestação. Nesta fase do desenvolvimento embrionário ocorre a diferenciação entre gônadas femininas e masculinas havendo expressão dos genes responsáveis por tais alterações, a partir da detecção destes genes é possível pesquisar e identificar os mesmos para a quantificação e detecção do sexo fetal antes mesmo do término do desenvolvimento do aparelho reprodutor.²

Esta técnica se, utilizada precocemente, ou seja, antes oitava semana gestacional pode gerar resultados falso-negativo devido ao fato de se ter pouca quantidade de DNA fetal livre no plasma materno, pois sabe-se que conforme aumenta o tempo de gestação maior será a presença do DNA livre fetal no plasma materno e então a pesquisa de genes responsáveis pela expressão do sexo fetal são identificados facilmente.¹

Por meio da DNA fetal é identificado duas regiões genômicas sendo uma no cromossomo Y e outra na região homóloga no cromossomo X⁵; quando há detecção de sequências do cromossomo Y no plasma materno é indicativo de sexo fetal masculino considerando que mulheres normais não possuem cromossomo Y presente em seu genoma, já nas gestantes em que não são encontrados sequencias do cromossomo Y entende-se que sexo fetal é feminino.¹

Para quantificar o DNA fetal é utilizada uma “curva padrão” com o DNA fetal do sexo masculino onde são realizadas diluições para obter uma cópia do cromossomo Y, a partir desta cópia são feitas várias curvas padrão para que seja comparado com o DNA extraído da gestante e assim amplificar diversas vezes a região alvo escolhida para que seja descartado resultado como “falso negativo” e assim aumentando a capacidade de detecção de sequencias alvo por molécula de DNA do cromossomo Y.¹

Em uma região no braço curto do cromossomo Y, foi encontrada a região que determina o desenvolvimento testicular sendo considerado como gene SRY, a partir desta descoberta foi possível desvendar toda a cascata de diferenciação sexual pressupondo genes ligados ao cromossomo X e genes autossômicos.

Sabe-se que entre a 5^a e 6^a semana de gestação as gônadas são indiferenciadas, uma vez diferenciadas em células de Sertoli, inicia-se a secreção de hormônio Anti-Mulleriano que provoca a atrofia do canal Muller e assim impossibilitando a diferenciação das genitais femininas.

O processo de determinação sexual é um evento primário onde o sexo gonadal é definido e assim há o desenvolvimento do sexo embrionário em feminino ou masculino.

A fecundação de um ovócito (X) por um espermatozoide (X ou Y) pode originar embriões XY ou XX.

A partir da década de 50 o papel do cromossomo Y começou a ser pesquisado, entendia-se que a presença do cromossomo Y era o suficiente para que fosse determinado o desenvolvimento dos testículos, entretanto após experimentos demonstraram que em certas ocasiões mesmo como a presença

do cromossomo Y o testículo não se desenvolvia e gerava mulheres com genótipo XY e que se houvesse ausência do cromossomo Y poderia originar homens com genótipos XX.⁴

O canal de Wolff percorre o sistema urogenital, enquanto que o canal de Muller deriva de uma invaginação do epitélio superficial, nas mulheres o canal de Wolff regride e o canal de Muller origina o oviduto, o útero e o terço superior da vagina, nos homens o canal de Muller regride por ação do hormônio anti-mulleriano (AMH) que é secretada pelas células de sertoli e o canal de Wolff diferencia-se em epidídimo, canal deferente e vesícula sob ação da testosterona, secretada pelas células de Leydig.⁵

Sob influência da gonadotrofina coriônica humana (HCG) secretada pela placenta, as células de Leydig fetais passam a produzir testosterona, todo esse processo ocorre no início de 8 semanas de gestação seguindo no máximo até 12 semanas de gestação.

A diferenciação da gônada masculina inicia-se pela 8ª semana gestação e a indução do desenvolvimento das gônadas femininas ocorre a partir da 12ª semana de gestação.⁴

Na gestação precoce, ou seja, abaixo de sete semanas de gestação há pouco material fetal disponível no plasma materno, quanto maior o tempo de gestação aumenta o material fetal no plasma aumentando a viabilidade para realização do exame.⁵

Procedimento laboratorial

Para execução da determinação do sexo fetal são coletados 10 mL de sangue periférico materno em tubo com anticoagulante EDTA e o mesmo é centrifugado para que o plasma seja separado após a separação do plasma, este plasma é colocado em tubo de PCR e congelado á temperatura - 20°C quando a manipulação do material não é imediata o mesmo é mantido em uma geladeira até 48 horas no máximo.^{5;9;10}

O plasma que foi separado em tubo de PCR será centrifugado novamente e o que ficou sobrenadante é colocado em novos tubos de PCR, dos quais é separado 4 mL para a extração do DNA fetal.^{5;9;10}

A PCR amplifica rapidamente a molécula de DNA para os genes relacionados a determinação do sexo masculino sejam encontrados, o fundamento do sistema de PCR em tempo real combina um termo-ciclador que detecta uma fluorescência emitida a cada ciclo. Atualmente o método TaqMan[®] é utilizado em todo mundo, neste método é utilizado uma sonda que contém uma molécula fluorescente (fluoróforo) e outra de apagamento intramolecular (quelante = quencher) e pares de primers⁵. A sonda contém sequência-alvo entre os primers que vão analisar o plasma materno em duas regiões genômicas, uma região comum para ambos os sexos (beta-globina) e outra específica da região do cromossomo Y (DYS-14).^{5;9;10}

A região beta-globina tem como função de controlar a amplificação e descartar a possibilidade de obter um resultado falso-negativo devido a inibidores do PCR, já na região DYS-14 a amplificação ocorre em uma região com 147 pares de base quando o sexo fetal é masculino.^{5;9;10}

Quando se trata de sexo fetal feminino a região beta-globina é amplificada e nada é detectado a região específica do sexo masculino o PCR em tempo real, por este motivo é excluído a possibilidade do sexo fetal ser masculino, portanto sexo fetal é feminino. O diagnóstico do sexo fetal masculino obrigatoriamente as duas regiões mostram amplificação de DNA.^{5;9;10}

Quando se trata de gravidez gemelar (gêmeos), se gêmeos idênticos chamados de univitelinos o resultado será válido para ambos os fetos e para gêmeos fraternos (presença de duas placentas) garante que pelo menos um dos fetos possui DNA masculino. Tratando-se de resultado ausente de sequência gene masculino, será sexo feminino ambos os fetos são do mesmo sexo.¹⁴

Para maior eficácia este processo é realizado novamente antes que o resultado seja liberado para garantir segurança no resultado obtido onde na segunda duplicata o resultado da primeira seja repetido.¹⁴

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A determinação do sexo fetal é uma técnica recente que promete determinar precocemente o sexo fetal de forma não invasiva, antes mesmo que o sistema reprodutor seja desenvolvido, trazendo benefícios ao corpo clínico e satisfazer as necessidades das mães já que desejam realizar exames que não tragam risco para o bebê, sendo considerada uma grande vantagem.

A técnica é não invasiva e de fácil aplicação. A no Brasil esta técnica é apenas utilizada para determinar o sexo fetal, entretanto a estudos que a partir desta técnica é possível detectar cromossopatias relacionadas ao cromossomo X e trissomias possibilitando o tratamento ainda quando o feto está em desenvolvimento. Há relatos que esta técnica nos países da Europa está disponível a população através da saúde pública e não é utilizada apenas para descobrir o sexo fetal e sim para pesquisar cromossopatias citadas anteriormente entre outras patologias e quando é descoberta, o feto pode ser tratado ainda no seu processo de desenvolvimento no útero materno.

É técnica inovadora que garante sua especificidade a partir de oito semanas de gestação, pois sabe-se que a partir desta idade gestacional há expressão de genes que vão determinar o desenvolvimento do sistema genital masculino e, além de sua especificidade esta técnica pode trazer diversos benefícios.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Levi JE, Wendel S, Takaoka DT. Determinação pré-natal do sexo fetal por meio da análise de dna no plasma materno. Rev Bras Ginecol Obstet. 2003;25:687-90.
2. Sekizawa A, Saito H. Prenatal screening of single-gene disorders from maternal blood. Am J Pharmacogenomics. 2001;1:111-7.
3. Tsui NB, Akolekar R, Chiu RW, Chow KC, Leung TY, Lau TK, et al. Synergy of total PLAC4 RNA concentration and measurement of the RNA single-nucleotide polymorphism allelic ratio for the noninvasive prenatal detection of trisomy 21. Clin Chem. 2010;56:73-81.

4. Sá R, Sousa M, Barros A. Intersexo. I – Genes envolvidos na determinação do sexo masculino, *Nascer e Crescer* 2005, 14(4): 292 – 9
5. Martinhago CD, Oliveira RM, Canas MCT, Vagnini LD, Oliveira JBA, Petersen G et al. Determinação precoce do sexo fetal pela análise do DNA no plasma materno, *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2006; 28(3): 190-4
6. Chiu RW, Chan KC, Gao Y, Lau VY, Zheng W, Leung TY et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by assively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(51): 20458-63
7. Keith LM, Persaud TVN. *Embriologia Clínica.* 8ª ed. São Paulo. Saunders Elsevier. 2008; 264 -5.
8. Sekizawa A, Saito H. Prenatal screening of single-gene disorders from maternal blood. *Am J Pharmacogenomics.* 2001;1:111-7.
9. Sexagem Fetal, RDO Diagnósticos, Acesso em: <http://www.sexagemfetal.com.br>; disponível no ano 2013
10. Malta FSV, Torres PORB, Ferreira ACS, Pardini VC. Determinação do sexo do feto através de uma nova técnica não invasiva baseada em PCR. *RBAC* 2008; vol.40(3): 203-4
11. Romão RM, Levi JE, Carvalho MHB, Francisco RPCV, Filho AGA, Zugaib M. Utilização dos ácidos nucleicos fetais livres no plasma materno para o diagnóstico pré-natal: realidade do Brasil neste cenário. *Rev Assoc Med Bras* 2012; 58(5):615-619
12. Ramos ES. DNA livre fetal em plasma materno e diagnóstico pré-natal não invasivo. *Rev Latino-Am Enfermagem* 2006; 14(6):964-7
13. Damiani D, Dichtchekian V, Setian N. O enigma da determinação gonadal – O que existe além do cromossomo Y?. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2000; 44(3): 248-56
14. Informativo ao cliente 41. Determinação do sexo fetal; Registrado sob nº 337108 em 26/01/2006; MKT DASA IC-0041 11/10; Versão 3; CRM: 17427