

Determinación del sexo fetal

Estudio preliminar *

Por los Dres.:

LIANE BORBOLLA,^{°°} MIRIAM RODRÍGUEZ,^{°°}
Técnica ANTONIA DELGADO^{°°}

Borbolla, L. et al. *Determinación del sexo fetal. Estudio preliminar*. Rev. Cub. Ped. 46: 4, 1974.

Se realiza estudio preliminar del sexo prenatal, en el que se determina la cromatina sexual de las células del líquido amniótico de 41 embarazadas en el último trimestre de su gestación, obtenido por punción transabdominal. Se destaca que dos muestras no sirvieron; por tanto, los fetos estudiados suman 40, al ser gemelar, uno de los embarazos. Se clasifican 25 varones cromatín-negativos y 15 hembras cromatín-positivos. Al nacer, 24 eran del sexo masculino y 16 del femenino. El sexo cromatínico no coincidió con el fenotipo en siete casos. Se analizan las causas de estas discrepancias y se estima que la prueba es valiosa y segura, si se siguen criterios rígidos y estrictos de selección nuclear. Se discute la importancia de esta determinación como complemento del cariotipo fetal y en la posible prevención de enfermedades hereditarias ligadas al X si el feto es varón.

La amniocentesis ha abierto un campo nuevo para el diagnóstico y prevención de enfermedades hereditarias y cromosómicas al permitir realizar análisis bioquímicos, inmunológicos y citogenéticos del "liquor amnii".

En citogenética, se utilizan diferentes métodos: prueba de la cromatina sexual; obtención del cariotipo fetal por cultivo; empleo de técnicas de fluorescencia y autorradiografía.

En 1956, varios autores^{1,4,8,9,14,16} publican trabajos de cromatina sexual de células amnióticas. Riis y Fuchs¹² opinan que la determinación prenatal del sexo puede ser útil en la prevención de enfermedades hereditarias mendelianas ligadas al X y

si el feto es varón, sugieren la interrupción profiláctica del embarazo. Papp y cols.¹¹ en 1970 reportan sus resultados del sexo cromatínico, en amniocentesis hechas en diversos períodos de gestación de 120 embarazadas.

En este trabajo preliminar del sexo fetal, por método citológico, en 40 casos, nuestro propósito ha sido adquirir experiencia y estimamos que sea posible lograr un máximo de aciertos, siguiendo criterios diagnósticos que discutiremos después.

MATERIAL Y METODO

Se practicó amniocentesis por vía transabdominal a 41 embarazadas, procedentes de La Habana y Marianao, en el servicio de Obstetricia del hospital docente "Enrique Cabrera", Altahabana, en un período de un año (1972-1973). A todas se les tomaron sus datos generales, especialmente su edad (Cuadro I) y su dirección.

* Trabajo presentado en el IV Seminario del CNIC laboratorio de citogenética del hospital docente infantil "William Soler" Altahabana.

°° Responsable del laboratorio de citogenética. Hospital "William Soler", Altahabana.

CUADRO I
DISTRIBUCION POR EDADES DE LAS
EMBARAZADAS

Edad en años	Gestantes No.
18 - 22	16
23 - 27	3
28 - 32	5
33 - 37	6
38 - 42	5
Total	40

Nota. En una de las gestantes no se obtuvo el dato.

Es importante recalcar que nunca la amniocentesis fue hecha con el propósito único de conocer el sexo fetal, sino que, por lo contrario, se aprovechó parte del líquido obtenido con fines esencialmente obstétricos (Cuadro II), para nuestras pruebas.

CUADRO II
INDICACIONES DE AMNIOCENTESIS

Embarazo prolongado	9
Cesárea anterior	6
Diabetes y prediabetes	4
Toxemia leve	4
Hipertensión	2
Disfunción placentaria	2
Anemia	2
Signo de +	1
Embarazo gemelar prolongado	1
Total	31

Nota. En 10 no se pudo recoger datos.

La técnica fue la siguiente: Asepsia de la piel con yodo y alcohol, previa evacuación de la vejiga. El sitio de la punción fue por delante de la presentación, cuando

la cabeza no estaba encajada y desplazada, tomando como referencia una línea que va del ombligo al punto medio del pubis, o bien, se localizó la cabeza y se puncionó en el lago nucal, o a 2 cm aproximadamente por fuera del ombligo, en el lado contrario del dorso fetal. Se usó un trocar de punción lumbar estéril número 20 ó 22, con bisel corto y romo. Se aspiró el líquido amniótico, después de sacar el mandril, con una jeringuilla estéril de 10 a 20 ml. Cuando el líquido era francamente hemorrágico, se veía muy turbio o carmelitoso, se descartó la muestra. Todas las amniocentesis fueron hechas en el último trimestre del embarazo (Cuadro III).

CUADRO III
DISTRIBUCION POR EDAD GESTACIONAL

Edad gestacional en semanas	Gestantes No.
30 - 32	1
33 - 35	6
36 - 38	9
39 - 41	13
42 - 44	10
Total:	39

Nota. En dos de las madres no se recogió el dato.

Para la determinación de la cromatina sexual fetal, tomamos directamente en un tubo de centrifuga, 5 ó 10 ml del líquido. Se centrifugó a 800-1 000 rpm, según técnica de Rook et al.¹³ Se descartó el sobrenadante con pipeta Pasteur, dejando sólo el sedimento que se mezcló y extendió sobre lámina. Se coloreó rápidamente con acetoorceína y se puso cubreobjeto. Se examinaron las células al microscopio óptico con lentes de inmersión. En cada muestra, se contaron 100 a 200; dos no fueron útiles por tener escaso número de ele-

mentos celulares. Se escogieron solamente núcleos aplanados, no arrugados, nítidos, bien teñidos, con membrana perfectamente definida, no rota y la cromatina finamente dispersa en su interior (Figs. 1, 2, 9 y 10).

Se consideraron impropios para el conteo aquellos núcleos que aparecen con mucha frecuencia en este material y presentan las siguientes alteraciones: vacuolización y acúmulos de cromatina; plegamiento, ruptura y discontinuidad de la membrana nuclear; distintos grados de pycnosis; depósitos de cromatina en la periferia y comienzo de cariólisis. Se pueden ver ejemplos en las figuras 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

Clasificamos cromatín-negativa toda célula en cuyo núcleo no se veía cuerpo de Barr alguno y cromatín-positiva, aquella en la cual se apreciaba la masa cromatínica bien visible, de diámetro mayor de por lo menos 1μ , que estuviera adosada a la cara interna de la membrana nuclear y planoconvexa (Figs. 1, 2, 9 y 10).

Cuando el sexo fenotípico, determinado al nacer por inspección de los genitales externos, no coincidió con el sexo cromatínico y pensando en la posibilidad de gonosomopatías donde el aspecto externo del sujeto es masculino o femenino pero hay alteraciones de la cromatina y de los cromosomas sexuales, citamos por telegrama a los niños y a todos que eran siete, se les hizo la prueba del frotis bucal. Por dicha técnica, hubo concordancia entre el sexo fenotípico y el cromatínico. Los conteos fueron hechos por un solo observador.

RESULTADOS

La edad de las 40/41 gestantes estuvo comprendida entre 18 y 42 años, pues en una no se obtuvo el dato. El mayor número de éstas se sitúa en el grupo de 18 a 22 años (Cuadro I). El tiempo de gestación osciló entre 30 y 44 semanas; en dos no se pudo averiguar. (Cuadro III).

Las indicaciones de la amniocentesis están recogidas en el Cuadro II; la más frecuente fue por embarazo prolongado. Hubo un parto gemelar y en dos gestantes la muestra no sirvió, por lo que obtuvimos 40 resultados del sexo prenatal. El diagnóstico fue correcto en 33 (82,5%).

Encontramos 25 varones cromatín-negativos y 15 cromatín-positivos que clasificamos de hembras. Al nacer, 16 fueron de sexo femenino y 24 masculinos. El sexo cromatínico, diagnosticado por nosotros no coincidía con el fenotipo en siete casos (17,5%). En tres de los varones interpretamos la prueba como positiva y en cuatro de las hembras como negativa (Cuadro IV). La frecuencia de cuerpos de Barr, en

CUADRO IV

DIAGNOSTICO DEL SEXO CROMATINICO COMPARADO CON EL SEXO VERDADERO AL NACER

Sexo Cromatínico	Sexo verdadero		Total
	femenino	masculino	
positivo	12	3	15
negativo	4	21	25
Total:	16	24	40

conjunto fue más baja que la que obtenemos habitualmente en mujeres adultas sanas (33% de promedio) y en recién-nacidos de menos de 72 horas (16,4%) por técnica de frotis bucal.² En once la positividad fue de 10 a 23% y en cinco, de 4 a 8% (Cuadro V). No detectamos ma-

CUADRO V

PORCENTAJE DE CUERPOS DE BARR

Sexo verdadero	0	Cuerpos de Barr			23
		4-8	10-12	14-15	
masculino	21	2	1	—	—
femenino	4	3	5	3	1
Total:	25	5	7	3	1

sas cromatinicas en 24 fetos, de los cuales 21 efectivamente resultaron ser varones como lo habíamos pronosticado. En el grupo cromatín-positivo, 3 fetos, clasificados femeninos, 2 con positividad de 4 a 8% y 1 con 12%, resultaron ver varones al nacer. El que tiene 12% de cuerpos de Barr es uno de los gemelos, masculino, la otra fue hembra con la misma cifra (Cuadro I).

DISCUSION

En este estudio preliminar del sexo fetal en 41 grávidas, todas las amniocentesis fueron por vía transabdominal, en el último trimestre del embarazo. Otros autores^{3,8,12} utilizan la misma ruta pero al comienzo de la gestación. *Fuchs y Riis*⁴ predijeron el sexo antenatal del producto de la gestación de 13 mujeres, portadoras de hemofilia 11 y de distrofia muscular progresiva tipo Duchenne 2, con 14 a 18 semanas de embarazo, interrumpiéndolo en 8. *Papp y cols.*¹¹, en su trabajo, recomiendan que es mejor seguir la vía transvaginal, no teniendo complicación alguna, en 100 pacientes que pidieron el cese del embarazo, en Hungría, donde el aborto está autorizado legalmente, si la futura madre lo solicita. En el grupo de ellos,¹¹ el tiempo de gravidez fluctuaba entre 8 y 21 semanas. También hicieron amniocentesis en 10 mujeres por vía transabdominal y en otras 10 por vía transcervical en el último trimestre. De acuerdo a su experiencia, ellos estiman, que el mejor momento para la determinación del sexo prenatal está comprendido entre las 14-18 semanas, porque antes, el número de células es muy escaso y después, la interrupción del embarazo muy difícil y de mucho riesgo.

El origen de las células en el líquido amniótico es todavía objeto de controversia, pero está demostrado que su cantidad aumenta, a medida que progresa la gestación. Los elementos celulares son epite-

liales, procedentes de diferentes zonas del feto. *Hoyes*⁵ describe la ultraestructura en el líquido amniótico, en los dos primeros trimestres del embarazo, encontrando células, unas derivadas del epitelio amniótico y otras del peridermo fetal y de la capa superficial de la epidermis.

*Serri y Montagna*¹² han mostrado que, alrededor de la 3ra. semana de vida intrauterina, la epidermis está constituida por una sola hilera de elementos indiferenciados. A partir de la 4ta. semana, dos capas están presentes, una externa, de protección, el peridermo y la otra, interna basal el *stratum germinativum*. Este último prolifera ulteriormente, formando una capa intermedia que, más o menos en la 16 semana fetal, se estratifica, convirtiéndose en capa espinosa. El *stratum germinativum* también se desarrolla en dirección centripeta, originando grupos celulares que crecen dentro del dermis y que posteriormente se diferenciarán en crestas epidérmicas propiamente dichas y anexos (glándulas pilosebáceas y sudoríparas). A partir de la 17 semana, el peridermo desaparece gradualmente, siendo sustituido por las capas córnea, granulosa y el "stratum lucidum", este último en zonas de fricción, después del 4to. a 5to. mes. La capa córnea está recubierta por la vernix caseosa. El desarrollo de la epidermis no sigue el mismo ritmo en varias regiones del cuerpo fetal. La aparición de células que se tiñen de naranja con el sulfato azul de nilo, guarda relación con la queratinización progresiva de la capa córnea. *Nieland et al*¹⁰ investigan al microscopio electrónico, la población celular del líquido amniótico en el último trimestre, concluyendo que, en su mayoría, son epiteliales escamosas, derivadas fundamentalmente de la piel, aunque admiten que puedan ser de la boca y de la parte baja del tracto genitourinario.

Cualquiera que sea la procedencia, estas células se descaman, cayendo en el líquido amniótico, ya en vías de degeneración.

Muchas son anucleadas, otras muestran diferentes grados de alteración nuclear. Tal desprendimiento nunca es comparable al mecánico, por raspado con espátula de la mucosa bucal, método de cromatina sexual que más se utiliza después del nacimiento y que permite extraer células de capas más profundas, con núcleos bien conservados. De lo anteriormente expuesto, es razonable deducir que el número de elementos celulares que sirve es relativamente escaso, siendo necesario escogerlo con sumo cuidado. Si, a primera vista, nuestros resultados no parecen completamente satisfactorios, no es menos cierto que nos han permitido juzgar cuales son las dificultades inherentes a la selección de núcleos que deben ser idóneos a fin de evitar errores de interpretación.

Las opiniones están divididas con respecto al valor de la prueba de cromatina sexual prenatal. *Rook et al*¹³ creen que los resultados no son del todo concluyentes, haciendo falta mayor experiencia, aunque lo cierto es, que su número de observaciones, solamente ocho, es muy pequeño. *Jacobson y Barter*⁷ juzgan que sus hallazgos no son tan buenos como los de otros.^{1,12}

Analizaron 92 muestras, eliminando 17 por inadecuadas, aunque la predicción del sexo fue exacta en 71 de 75 (95%). A pesar de esto, defienden la prueba. *Amaro-set et al*¹ obtienen un 100% de aciertos en 11 determinaciones, hechas en 31 embarazadas Rh negativas. Cuatro observadores examinaron las células, contando gran número de ellas, 2 300 de promedio.

Otro punto que se presta a discusión es definir cuándo el feto debe ser catalogado varón o hembra en relación con la presencia o ausencia de cuerpos de Barr y si los hay cuántos deben ser. Nosotros hemos asentado que el sujeto es masculino cuando no tiene ninguna masa cromatínica. Surgen de nuevo discrepancias en la literatura. *Makowski et al*,⁹ en 1956, creen que son varones, fetos hasta con 10-15%

de cuerpos de Barr y hembras cuando el porcentaje es mucho mayor, no prestando a confusión (50 a 54%). *Papp et al*¹¹ aceptan que son masculinos con positividad hasta de 4% y femeninos de 12 a 26% (promedio 19%). Es bien sabido que la frecuencia de masas cromatínicas varía en cada laboratorio que se dedica a estas pruebas. Nuestros resultados muestran que de los 24 recién nacidos varones, habíamos precedido el sexo en 21. En los 3 con resultados positivos, el conteo fue bajo en 2, de 4 a 8% (Cuadro V). En uno solo fue de 12% pero se trataba de gemelos, uno de ellos hembra y la punción puede haber sido hecha en el mismo saco amniótico.

La negatividad de la prueba en 4 fetos, que al nacer resultaron ser femeninos, también merece ser discutida. Estimamos sea, por muestras inadecuadas e insuficientes, a pesar del cuidado que tuvimos al escoger los núcleos. Es fundamental aplicar aun criterios más rígidos de selección, nuclear si queremos conseguir nuestro propósito futuro, un 100% de observaciones acertadas en la predicción del sexo prenatal. La metodología expuesta por *Hsu y cols*,⁶ debe ser adoptada.

Estos autores⁶ demuestran que los frotis con gran cantidad de núcleos alterados tienen una frecuencia de cuerpos cromatínicos mucho más baja. También sugieren que sea factible que células cromatínicas positivas se transformen en "falsas negativas" cuando degeneran. Este "bias" puede ser reducido cuando los conteos se hacen siguiendo una reglamentación estricta.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, la determinación del sexo prenatal es de gran importancia como paso obligatorio previo, del estudio del cariotipo fetal por cultivo del líquido amniótico.

En algunas enfermedades gonosómicas es necesario conocer el sexo cromatínico para una clasificación correcta de los cromosomas. Otra indicación que ya hemos

mencionado, son las enfermedades hereditarias ligadas al X y su prevención cuando pueda ser necesario discutir la interrupción del embarazo si el feto es varón, la enfermedad genética grave y la madre lo desea.

La técnica es sencilla y de poco costo, puede servir para *screening* y *surveys* puesto que la amniocentesis se practica cada vez más, no pareciendo presentar mayores riesgos para la futura madre y el feto.

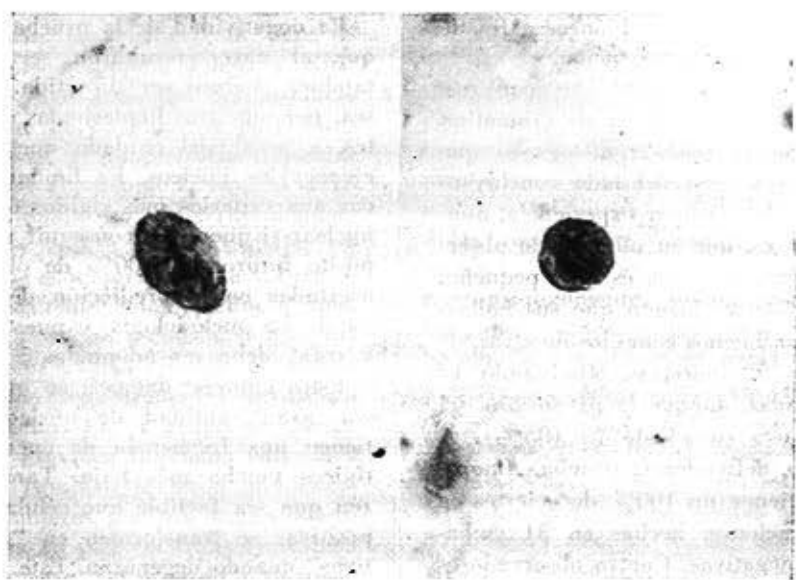


Fig. 1.—Células cromatín-negativas, no se visualiza cuerpo de Barr.



Fig. 2.—Célula cromatin-positiva en el sedimento del líquido amniótico, masa cromatinica bien visible, adosada a la cara interna de la membrana nuclear.



Fig. 3.—Vacuolización y acúmulos de cromatina.

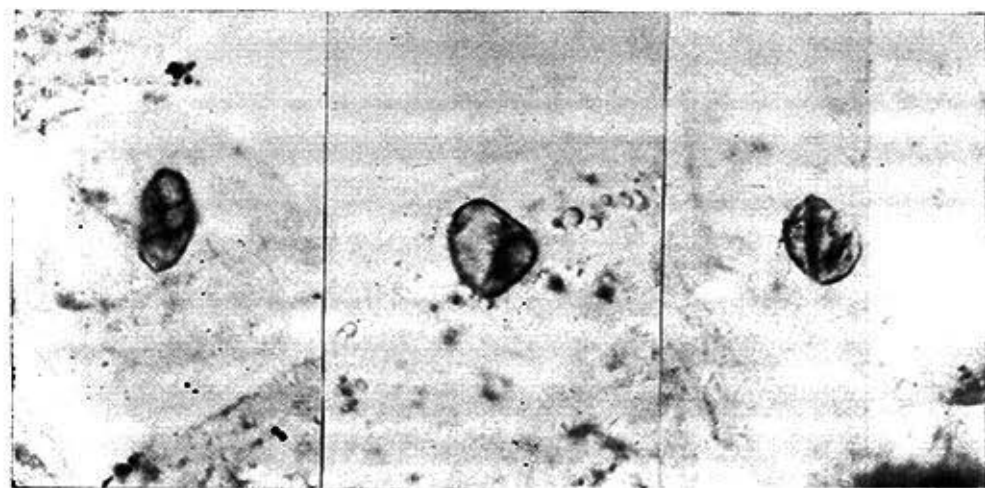


Fig. 4.—Arrugamiento del núcleo con acúmulos cromatinicos.

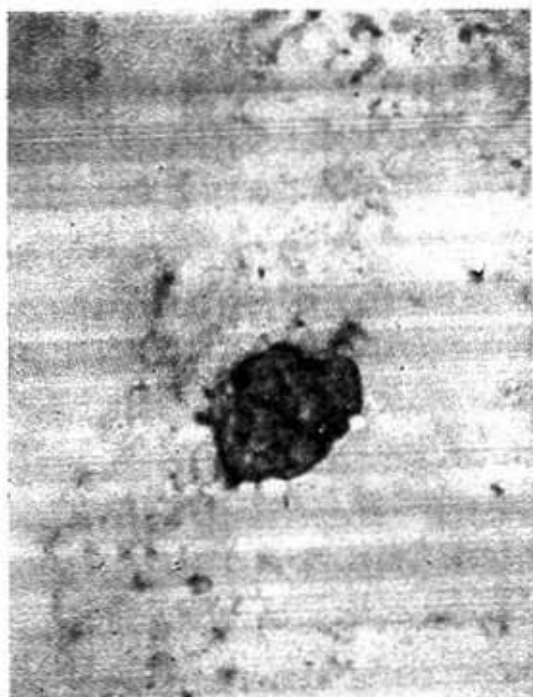


Fig. 5.—Las mismas alteraciones que se observan en la Fig. 4 pero con ruptura de la membrana nuclear.

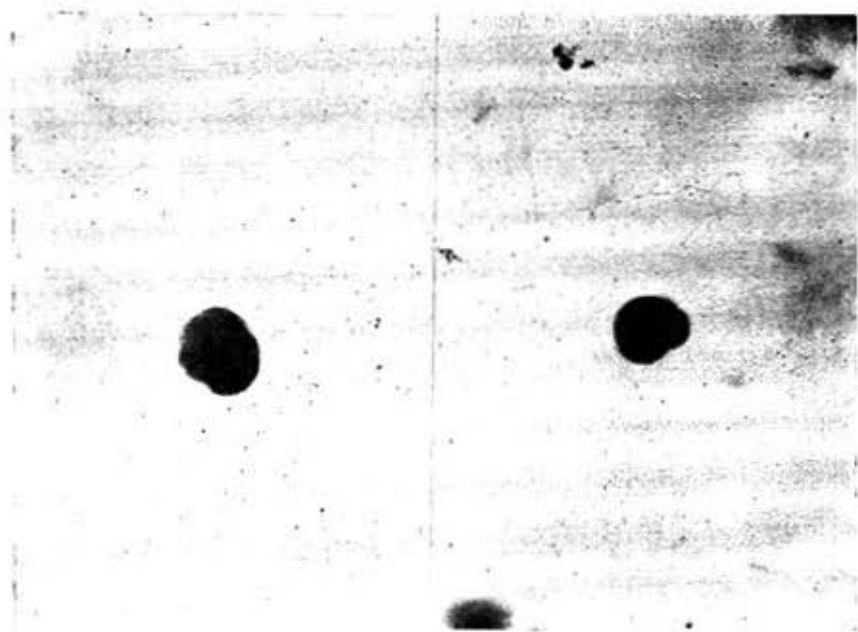


Fig. 6.—Diversos grados de picnosis nuclear.

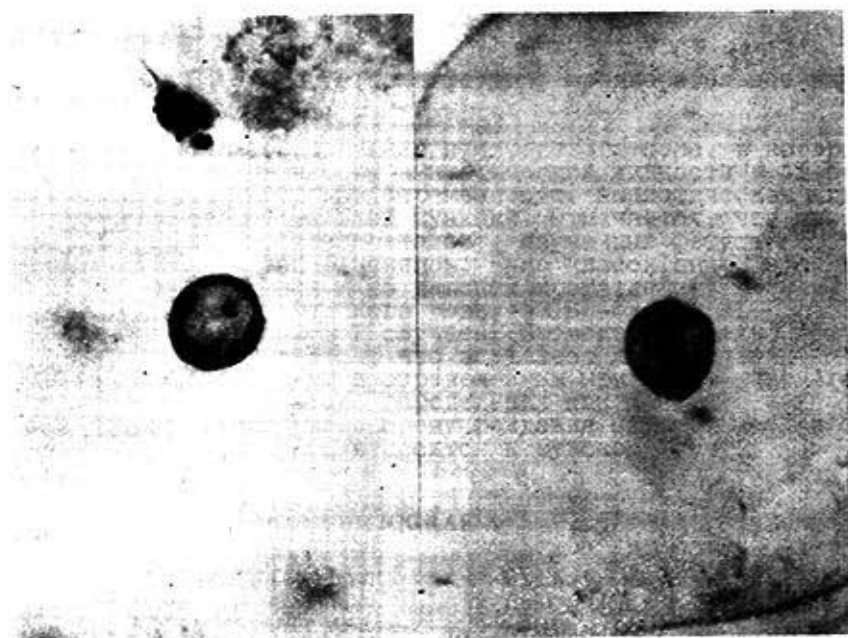


Fig. 7.—Acúmulos de cromatina en la periferia del núcleo.

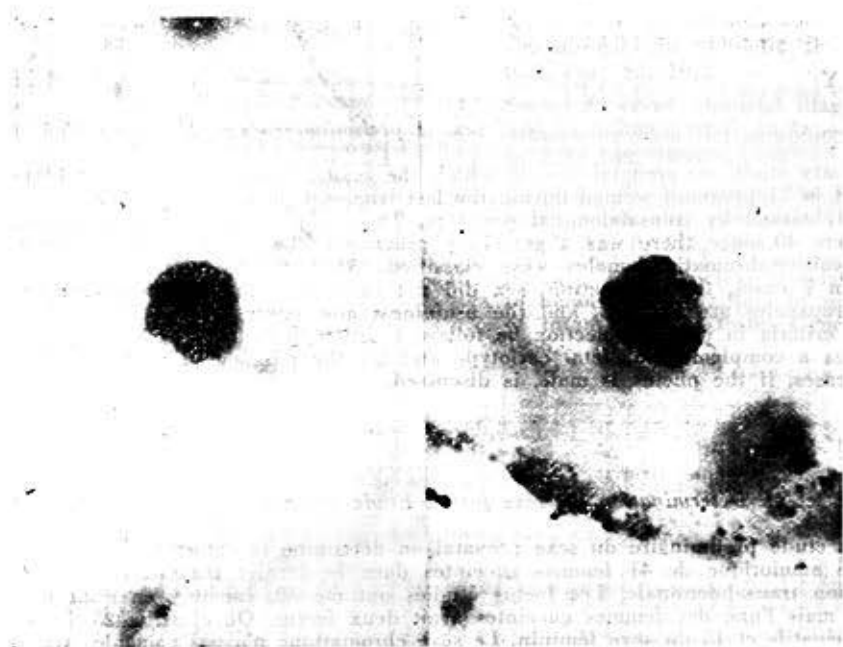


Fig. 8.—Comienzo de cariólisis con acúmulos cromatinicos.



Fig. 9.—Célula cromatín-negativa, se ve el núcleo a mayor aumento.



Fig. 10.—Célula cromatín-positiva, la masa cromatinica se aprecia a mayor aumento.

SUMMARY

Borbolla L., et al. *Determination of fetal sex. A preliminary study.* Rev. Cub. Ped. 46: 4, 1974.

A preliminary study on prenatal sex, in which the sexual chromatin of amniotic-fluid cells was determined in 41 pregnant women during the last trimester of pregnancy, is performed. Amniotic fluid was obtained by transabdominal puncture. Two samples were useless; therefore, fetuses studied were 40 since there was a gemellary pregnancy. Twenty five negative-chromatin males and 15 positive-chromatin females were classified. At birth, 24 infants were males and 16, females. In 7 cases, the chromatinic sex did not coincide with the phenotype. The causes of these discrepancies are analyzed, and the usefulness and safety of the test provided that rigid and strict criteria in nuclear selection be followed, are indicated. The significance of this determination as a complement of fetal cariotype and for the possible prevention of X-linked hereditary diseases, if the fetus is male, is discussed.

RESUME

Borbolla L. et al. *Détermination du sexe foetal. Etude préliminaire.* Rev. Cub. Ped. 46: 4, 1974.

Dans cette étude préliminaire du sexe prénatal on détermine la chromatine sexuelle des cellules du liquide amniotique de 41 femmes enceintes dans le dernier trimestre, lequel a été obtenu par ponction transabdominale. Les foetus étudiés ont été 40, car il y en avait deux qui n'ont pas servi, mais l'une des femmes enceintes avait deux foetus. On classifie 25 du sexe masculin chromatato-négatifs et 15 du sexe féminin. Le sexe chromatique n'a pas coïncidé avec le phénotype dans 7 cas. Les causes de ces différences sont analysées. On considère que l'épreuve est utile et sûre si l'on suit des critères strictes de sélection nucléaire. On discute l'importance de cette détermination comme complément du cariotype foetal, ainsi que la possible prévention des maladies héréditaires liées au "X" si le foetus est du sexe masculin.

РЕЗУМЭ

Борболла Л. и др. Определение пола фетуса. Предварительное изучение. *Rev Cub Ped* 46: 4, 1974.

Проводится предварительное изучение предродового пола, в котором определяется половой хроматин клеток амниотической жидкости у 41 беременной женщины в последнем квартале беременности. Амниотическая жидкость получена путем трансабдоминальной пункции. Отмечается, что две пробы оказались непригодными и, следовательно, изученные фетусы составляют 40, так как был один случай близнецов. Было классифицировано 25 мальчиков хроматин-отрицательных и 15 девочек хроматин-положительных. После рождения 24 оказались мужского рода, а 16 — женского. Хроматинный пол не совпадал с фенотипом в 7 случаев. Проводится анализ причин этого несоответствия и заключается, что этот тест является ценным и надежным, если следовать точным и определенным критериям ядерного подбора. Отмечается важность этого определения как дополнения карiotипа плода и как средства возможного предупреждения наследственных болезней, связанных с X, если плод относится к мужскому полу.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—Amarose, A. P. et al. Prediction of fetal sex from cytologic examination of amniotic fluid. *New Eng J Med* 275: 715, 1966.
- 2.—Borbolla Vacher, L., A. Delgado Morales. Cromatina sexual en el recién nacido. *Rev. Cub. Ped.* 44: 197, 1972.
- 3.—Dechurst, C. J. Diagnosis of sex before birth. *Lancet* 1: 471, 1956.
- 4.—Fuchs, F., P. Rüs. Antenatal sex determination. *Nature (Lond)* 177: 330, 1956.
- 5.—Hayes, A. D. Ultrastructure of cells in amniotic fluid. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 75: 949, 1968.
- 6.—Hsu, L. Y. F. et al. Influence of nuclear selection criteria on sex chromatin frequency in oral mucosa cells of newborn females. *Cytogenetics* 6: 371, 1967.
- 7.—Jacobson, C. B., R. H. Barter. Intrauterine diagnosis and management of genetic defects. *Am J Obstet Gynecol* 99: 796, 1967.
- 8.—James, F. Sexing foetuses by examination of amniotic fluid. *Lancet* 1: 202, 1956.
- 9.—Makowski, E. L. et al. Detection of sex of fetuses by the incidence of sex chromatin body in nuclei of cells in amniotic fluid. *Science* 123: 542, 1956.
- 10.—Nieland, M. L. et al. Ultrastructural observations on amniotic fluid cells. *Am J Obstet Gynecol* 108: 1030, 1970.
- 11.—Papp, Z. et al. Prenatal sex determination by amniocentesis. *Obstet Gynecol* 36: 429, 1970.
- 12.—Rüs, P., F. Fuchs. Antenatal determination of foetal sex in prevention of hereditary diseases. *Lancet* 2: 180, 1960.
- 13.—Rook, A. et al. Identification of Y and X chromosomes in amniotic fluid cells. *Nature* 230: 52, 1971.
- 14.—Sachs, L. et al. Prenatal diagnosis of sex using cells from the amniotic fluid. *Science* 123: 548, 1956.
- 15.—Serri, F., W. Montagna. The structure and function of the epidermis. *Pediatr Clin North Am* 8: 917, 1961.
- 16.—Shettles, L. B. Nuclear morphology of cells in human amniotic fluid in relation to sex of infant. *Am J Obstet Gynecol* 71: 834, 1956.

Recibido el trabajo: Febrero 6, 1974.