



Servicio de Obstetricia y Ginecología
Hospital Universitario
Virgen de las Nieves
Granada

ESTUDIO DEL ADN FETAL EN SANGRE MATERNA.

Rebeca Benito Villena.

24/01/2019

INTRODUCCIÓN:

El cribado de aneuploidías comenzó en los años 80, cuando se descubrió la asociación entre un nivel bajo de alfa-fetoproteína sérica materna y la trisomía 21 (síndrome de Down). El síndrome de Down se ha convertido en el foco central del cribado prenatal, debido a su alta incidencia (es la trisomía autosómica más frecuente) y su relativa severidad.

Desde los años 80, el cribado del síndrome de Down ha ido refinándose. Inicialmente, se tenía en consideración solamente la edad materna y la determinación sérica de alfa-fetoproteína. Luego se añadió la fracción libre de B-HCG y el estriol (tripe cribado sérico) y después la inhibina (cuádruple cribado sérico). Posteriormente, se pasó a un modelo combinado (cribado combinado del primer trimestre), que tenía en cuenta la edad materna, los hallazgos ecográficos (medición de la translucencia nucal) y bioquímicos (Proteína A asociada al embarazo o PAPP-A y B-HCG). Los resultados del cribado combinado pueden mejorarse añadiendo 4 marcadores ecográficos secundarios: presencia o ausencia del hueso nasal, ángulo fronto-maxilar, flujo Doppler a través de la válvula tricúspide y flujo Doppler a través del ductus venoso.

El descubrimiento en 1997 de la presencia de ADN fetal circulante en sangre periférica materna abrió un nuevo campo de investigación, generando enormes expectativas acerca de la posibilidad de realizar diagnósticos prenatales sin necesidad de utilizar técnicas obstétricas invasivas. La demostración de la

existencia del ADN fetal libre se basó en la detección de secuencias del cromosoma Y en la sangre de la madre. Así es como surgió el primer test diagnóstico genético no invasivo: el diagnóstico del sexo fetal en sangre materna, basado en un criterio de presencia/ausencia del cromosoma Y.

Gracias al avance en los métodos de secuenciación genética, desde 2011 existe la posibilidad de utilizar el ADN fetal libre presente en sangre materna para realizar el cribado de las 3 trisomías autosómicas más frecuentes (trisomía 21 o síndrome de Down, Trisomía 18 o síndrome de Edwards y trisomía 13 o síndrome de Patau) y de las aneuploidías de los cromosomas sexuales.

BASES BIOLÓGICAS:

Cuando las células mueren y entran en apoptosis, todo el contenido intracelular (incluido el ADN) se vierte al exterior. De esta forma, fragmentos de ADN de 50-200 pares de bases llegan al plasma (ADN libre). Los diferentes órganos y tejidos producen diferentes cantidades de ADN libre, según el recambio celular de los mismos. Las células hematopoyéticas son la principal fuente de ADN libre en el ser humano. Las neoplasias, los trasplantes, las transfusiones sanguíneas y el embarazo también contribuyen de manera importante al ADN libre en plasma.

El ADN libre de origen gestacional procede en su mayor parte de la placenta (concretamente del sincitiotrofoblasto) y no del feto (pequeña contribución con el ADN de los eritroblastos). Como la placenta y el feto proceden del mismo cigoto suelen ser genéticamente idénticos pero no hay que olvidar que, tras el estadio de mórula, emergen 2 líneas celulares diferentes y puede haber diferencias genéticas entre ellas. La placenta humana tolera mejor los estados aneuploides que el feto. Mientras que la mayoría de fetos aneuploides sufren abortos espontáneos, una placenta con aneuploidía puede mantener un embarazo hasta el tercer trimestre.

La cantidad de ADN fetal libre en sangre puede detectarse a partir de la semana 5-7 de gestación. Se conoce como fracción fetal (FF) a la proporción de ADN fetal (ADN-f) en la sangre materna ($FF = \text{ADN-f libre} / \text{ADN libre total} \times$

100). Su concentración aumenta conforme avanza el embarazo, siendo un 13% del ADN libre materno total a finales del primer trimestre y llegando a alcanzar el 50% al término de la gestación. La FF aumenta a razón de 0.1%/semana hasta la semana 20 y a partir de ahí a razón de 1%/semana hasta el término. Una FF baja conlleva un mayor riesgo de falso negativo o resultado no concluyente ya que disminuye la capacidad de detectar la diferencia entre una disomía y una trisomía.

La vida media del ADN-f libre es de 1h en mujeres sanas y la mayoría se ha eliminado a las 48h del parto.

TECNOLOGÍA:

La muestra de sangre materna es extraída de forma periférica. No hay consenso en la literatura a la hora de especificar qué volumen de sangre es necesario extraer (las cantidades oscilan entre 1,6ml hasta 50 ml). A continuación, la sangre se centrifuga a 4°C durante 10 minutos para separar el plasma de los restos celulares (sobre todo leucocitos) y después se vuelve a centrifugar el plasma.

Una vez obtenido el plasma, es necesario aislar el ADN, para lo que existen diversos kits de laboratorio, y amplificarlo para poder estimar la probabilidad de anomalía cromosómica. La mayoría de los métodos usados hoy en día para la amplificación del ADN se basan en la PCR (*Polimerase Chain Reaction*). Para la amplificación se pueden llevar a cabo métodos de secuenciación masiva (amplificación de todo el ADN de la muestra) o de secuenciación selectiva (amplificación solo de secuencias de los cromosomas de interés).

Existen diferentes plataformas para detectar la aneuploidía mediante TPNI. Si bien, dada la globalización de la técnica, están surgiendo variaciones en los métodos de secuenciación y en los algoritmos bioinformáticos, las principales técnicas son las siguientes:

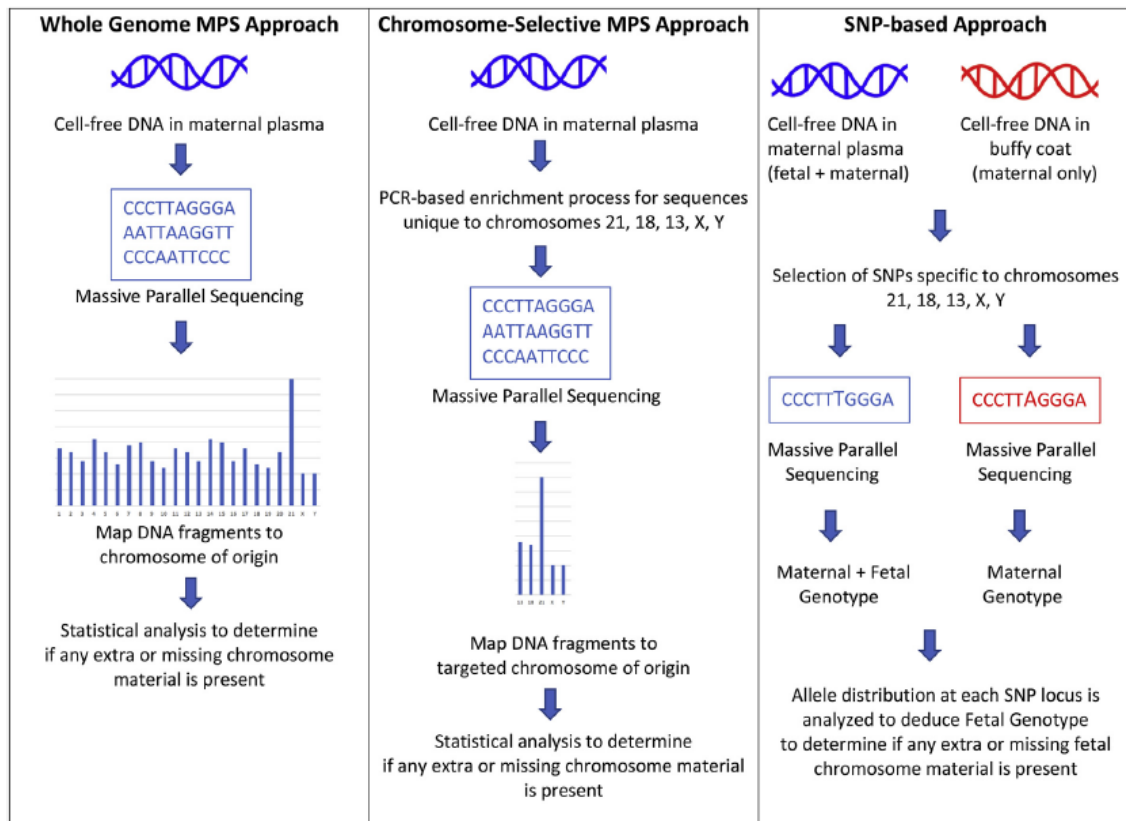
- Secuenciación masiva en paralelo (*MPS = Massively Parallel Sequencing*): consiste en la secuenciación simultánea de tramos cortos de ADN seleccionados al azar del ADN libre en plasma. Solo una fracción de cada fragmento de ADN se secuencia (normalmente un

tramo de 36 pares de bases) pero es suficiente para saber a qué cromosoma pertenece.

Posteriormente, se usan métodos estadísticos para calcular la desviación estándar de la cantidad de material de cada cromosoma encontrada respecto a la cantidad esperada y le asigna un z-score a cada cromosoma. Si el número de fragmentos de un cromosoma es mayor a 3 desviaciones estándar del esperado (z-score > 3), se considera un resultado de alto riesgo para trisomía.

- Secuenciación selectiva de los cromosomas (CSS = *Chromosome-Selective Sequencing*): este método se desarrolló para mejorar la eficiencia de la secuenciación. En un primer momento el plasma materno se somete a un proceso de enriquecimiento, de forma que solo los fragmentos preseleccionados de los cromosomas 21, 18, 13, X e Y son amplificados. Así pues, tras el enriquecimiento la muestra de ADN tiene una alta concentración de los cromosomas antes mencionados, reduciendo el coste y la duración de la secuenciación del ADN. El análisis estadístico utilizado en esta técnica es el FORTE (*Fetal Fraction Optimized Risk of Trisomy Evaluation*), que calcula una odds ratio del riesgo utilizando el riesgo de aneuploidía a priori de la gestante (basado en la edad materna y la edad gestacional), el número de copias de los cromosomas de interés y la fracción fetal. El resultado se da en forma de riesgo, considerándose alto riesgo a partir de 1/100.
- Método de análisis de SNPs: Los SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) son variaciones en un solo nucleótido en un tramo de ADN que se da en > 1% de la población. En este método, se analizan por separado dos muestras de ADN, el ADN materno obtenido de los leucocitos (separados del plasma durante la primera centrifugación) y el ADN libre obtenido del plasma (que contiene una mezcla del ADN materno y el fetal). Se amplifican y analizan de forma selectiva unos 20000 SNPs en los cromosomas 21, 18, 13, X e Y y se miden las variaciones de cada SNP. El genotipo fetal se deduce comparando los resultados de la secuenciación del ADN de los leucocitos maternos con los del ADN libre

en plasma. El cariotipo fetal se identifica comparando la distribución de SNPs del plasma con la distribución esperada.



Todos los métodos descritos han demostrado ser igualmente efectivos para detectar aneuploidías fetales y son actualmente utilizados por diferentes casas comerciales. Cada método tiene sus ventajas y sus inconvenientes:

- El MPS permite detectar diferencias en cualquier cromosoma y, dependiendo de la profundidad de la secuenciación, puede detectar aneuploidías poco comunes y anomalías subcromosómicas (microdelecciones y duplicaciones). Como inconveniente, es una técnica más costosa, más lenta y genera muchos hallazgos incidentales.
- Los métodos de secuenciación selectiva (CSS y SNP) reducen el riesgo de hallazgos incidentales analizando solo los cromosomas asociados a las trisomías más comunes. Son técnicas más rápidas y baratas. El método de análisis de SNPs es el único que puede detectar casos de triploidía y de diferenciar el ADN-f de los distintos fetos en gestaciones gemelares. Sin embargo, no puede utilizarse en gestaciones en las que

haya en el plasma material genético adicional que pueda llevar a confusión (casos de ovodonación, gestación subrogada, trasplante de médula ósea o de órganos sólidos a la madre).

CRIBADO DE ANEUPLOIDIAS MEDIANTE TPNI:

Antes de hablar de este tema, conviene recordar algunos conceptos de epidemiología:

- Valor predictivo positivo (VPP): es la probabilidad de que un individuo que resulta positivo en una prueba esté enfermo o, dicho de otra manera, la proporción de enfermos entre los resultados positivos de la prueba. Su valor se relaciona de forma directa con la prevalencia.
- Riesgo Residual: probabilidad de que un resultado negativo de la prueba sea falso.
- Sensibilidad (S): proporción de individuos con una condición que dan positivo en una prueba o capacidad de acierto de una prueba para detectar enfermos (o individuos con una condición).
- Ratio de falsos positivos (RFP): proporción de individuos sanos que dan positivo en una prueba.

Basándose en múltiples meta-análisis se han consensuado los siguientes valores:

Condición	S	RFP
Trisomía 21	99.5 %	0.05 %
Trisomía 18	97.7 %	0.04 %
Trisomía 13	96.1 %	0.06 %
Monosomía X	90.3 %	0.23 %
Trisomías 47 XXX, 47 XYY, 47 XXY	93 %	0.14 %

Tabla resumen de la Sensibilidad (S) y Ratio de Falsos Positivos (RFP) para las distintas aneuploidías que se pueden cribar con el TPNI.

Es importante no confundir la sensibilidad con el valor predictivo positivo, puesto que este último depende de la prevalencia y del riesgo a priori. Por

tanto, un resultado positivo para trisomía 21 no quiere decir que la paciente tenga un riesgo de un 99.5% de tener un feto afecto de síndrome de Down. Por ello, el *American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)* y la *Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM)* recomiendan que los resultados del cribado con ADN-f incluyan un informe sobre el valor predictivo positivo y el riesgo residual.

Probabilidad pre-test	VPP	
	Trisomía 21	Trisomía 18
1 en 10	99%	99%
1 en 100	96%	95%
1 en 1000	71%	66%
1 en 10000	20%	16%

Tabla resumen del Valor Predictivo Positivo (VPP) del resultado de alto riesgo del TPNI para las diferentes trisomías cromosómicas cribadas según el riesgo a priori de la paciente

El resultado del TPNI puede ser alto riesgo, bajo riesgo o riesgo indeterminado. A las pacientes con resultado de alto riesgo se les ofrecerá una prueba diagnóstica invasiva (biopsia de vellosidades coriales o amniocentesis) seguida de cariotipo o microarray. A las pacientes con resultado de bajo riesgo no se les ofrecen pruebas diagnósticas invasivas (aunque hay que tener en cuenta que este resultado no elimina la posibilidad de un feto afecto).

RESULTADOS NO CONCLUYENTES:

Entre el 1-5% de las pacientes que se someten al TPNI recibirán un resultado no concluyente o riesgo indeterminado. Los resultados no concluyentes pueden tener múltiples causas, siendo las más frecuentes:

- Cantidad insuficiente de ADN libre en sangre materna
- Baja fracción fetal (normalmente se considera aceptable una FF mayor al 4%). Es la causa más frecuente de resultado no concluyente. La baja FF puede deberse a:
 - o Edad gestacional temprana: aunque es posible detectar el ADN-f en la sangre materna a partir de la 5^o semana de gestación, la

cantidad del mismo suele ser insuficiente para realizar el TPNI por debajo de las 10 semanas. Cuando se sobreestima la edad gestacional es más probable que haya una baja FF.

- Obesidad materna: a mayor índice de masa corporal (IMC) materno, menor es la FF. Esto se debe al efecto dilucional producido por el mayor volumen plasmático en las pacientes obesas y por el aumento de ADN libre materno debido al aumento de la actividad inflamatoria. Aunque las mujeres obesas pueden someterse al cribado mediante TPNI, deben ser informadas del mayor riesgo de resultado no concluyente y de falsos negativos.
- Aneuploidía fetal: la FF está disminuida en las gestaciones con feto afecto por trisomía 13, trisomía 18, monosomía X y triploidías (mientras que está aumentada en la trisomía 21).
- Patologías maternas y medicación: algunas patologías y medicaciones disminuyen la FF por aumento del recambio celular materno sin afectar al placentario. Ejemplos de esto sería la deficiencia de vitamina B12, las enfermedades autoinmunes, la trombosis venosa profunda, el trombo-embolismo pulmonar, la colestasis intrahepática gestacional y el uso de heparina.
- Gestaciones conseguidas por técnicas de reproducción asistida (TRA)
 - Regiones de alta homocigosidad (regiones en las que las secuencias génicas son idénticas en los 2 cromosomas del par). Normalmente son debidas a disomía uniparental o a consanguineidad.
 - Resultados borderline. Algunos laboratorios cuando obtienen un resultado en el límite de la normalidad prefieren informar el resultado como no concluyente.
 - Plataforma de detección de aneuploidías utilizada: las tasas publicadas de resultados no concluyentes son mayores para las plataformas basadas en SNPs (6.4%) que en las plataformas que usan secuenciación masiva (1.6%)

Las pacientes con resultados no concluyentes tienen varias opciones:

- Repetir el TPNI si es posible (algunos fallos del test, como los debidos a largas regiones de homocigosidad, siempre causarán fallo y, por tanto, repetir el test no es una opción). El 80% de las pacientes que se repiten el test consiguen un resultado (ya sea alto o bajo riesgo).
- Realizar un cribado combinado del primer trimestre.
- Realizar una prueba invasiva (especialmente indicado en las pacientes con un alto riesgo a priori de aneuploidía).

FALLOS DE CRIBADO:

Falsos positivos: el TPNI tiene una tasa de falsos positivos para el síndrome de Down del 0.1%. La mayoría de falsos positivos son analíticamente correctos (realmente hay un aumento de material genético correspondiente a ese cromosoma) pero clínicamente incorrectos (ese aumento de material genético no procede del feto). Las causas más frecuentes de falsos positivos son:

- Mosaicismo placentario: el fenómeno de mosaicismo placentario hace referencia a la coexistencia de 2 líneas celulares diferentes en la placenta (una euploide y otra aneuploide). La incidencia del mosaicismo placentario es del 1%-2% en el primer trimestre de la gestación. Dado que la mayoría del ADN-f procede de la placenta, el mosaicismo placentario puede ser causa de falsos positivos. El mosaicismo placentario es más frecuente en los casos de monosomía X y de trisomía 13 que en los casos de trisomías 21 y 18. Por ello, en los casos de resultado de alto riesgo para trisomía 13 o monosomía X sin hallazgos ecográficos es preferible realizar una amniocentesis antes que una biopsia de vellosidades coriales. En los casos en que se realice una biopsia de vellosidades coriales (independientemente de la aneuploidía) y se demuestre mosaicismo placentario, habrá que realizar una amniocentesis para determinar si el feto está o no afecto.
- Gemelo evanescente: se estima que entre el 1% y el 3% de las gestaciones únicas proceden de una gestación múltiple con la pérdida

de un gemelo. El falso positivo se produce porque la placenta del gemelo evanescente sigue liberando ADN libre al torrente circulatorio de la madre.

- Anormalidad cromosómica materna: la mayoría de tecnologías empleadas en el TPNI valoran el ADN materno y el fetal juntos, asumiendo que la madre tiene un cariotipo normal, pero esto no siempre es así. Generalmente, los falsos positivos por anomalía cromosómica materna se deben a aneuploidías de los cromosomas sexuales (frecuentemente mosaicismo 45X/46XX, 47XXX o a la pérdida del cromosoma X inactivado de las células maternas). En torno al 8.6% de los resultados positivos para aneuploidía sexual se deben a mosaicismo materno. La presencia de mosaicismo materno se puede comprobar realizando un cariotipo.
- Variaciones en el número de copias de segmentos de ADN genómico (CNVs) en la madre: las tecnologías de análisis del ADN-f asumen que cada mujer porta la misma proporción de material genético en un cromosoma dado. Sin embargo, la cantidad de copias de ADN genómico puede variar entre individuos, lo que puede llevar a un falso positivo cuando el número de copias maternas está significativamente aumentado en los cromosomas de interés.
- Cáncer materno: las mujeres con cáncer pueden tener ADN libre circulante en sangre periférica con alteraciones cromosómicas procedentes de las células neoplásicas. Generalmente estas mujeres dan resultados positivos para múltiples anomalías cromosómicas o muestran una inestabilidad genómica generalizada. El 18% de las mujeres que dan positivo para múltiples anomalías cromosómicas en el cribado con TPNI con fetos euploides en el test diagnóstico tienen una neoplasia oculta. Los cánceres que con más frecuencia producen falsos positivos en el TPNI son el cáncer de mama, el cáncer colorrectal, las neoplasias neuroendocrinas, la leucemia y los linfomas.
- Trasplante de órganos (órganos sólidos o médula ósea): se pueden producir errores en la determinación del sexo fetal cuando la paciente ha recibido un trasplante de un varón.

- Transfusiones: se pueden producir errores en la determinación del sexo fetal cuando la paciente ha recibido una transfusión de un varón en las 4 semanas previas a la extracción de la sangre para la prueba.
- Baja prevalencia: la principal causa de falso positivo cuando se aplica el TPNI en población de bajo riesgo es la baja frecuencia de aneuploidías, que disminuye mucho el VPP. Por ejemplo, en una mujer de 20 años la prevalencia de trisomía 13 es de 1 en 11042, por lo que un resultado de alto riesgo para esta trisomía solo se corresponderá a un feto afecto en un 6% de las veces.
- Fallos de laboratorio.
- Probabilidad estadística.

Falsos negativos: los falsos negativos son, en general, poco frecuentes. Se producen con más frecuencia cuando la FF es baja y cuando hay mosaicismo placentario.

- Baja FF: cuando la fracción fetal es baja la diferencia entre la cantidad observada de fragmentos cromosómicos y la esperada es muy pequeña y puede no ser detectada. Las principales causas de baja FF se han descrito previamente.
- Mosaicismo placentario.
- Variaciones en el número de copias de segmentos de ADN genómico en la madre: pueden producirse falsos negativos si la madre tiene menos copias de segmentos de ADN genómico que la media. Esta situación es más rara que los falsos positivos por variaciones del número de copias.
- Fallos de laboratorio.
- Probabilidad estadística.

TPNI EN LAS GESTACIONES GEMELARES:

Uno de los retos de la aplicación del TPNI a las gestaciones múltiples es distinguir la contribución al ADN-f de cada gemelo. Aunque la cantidad total de

ADN libre en sangre materna es más alta en las gestaciones gemelares, la cantidad correspondiente a cada gemelo es menor que en las gestaciones únicas y puede ser diferente en las gestaciones dicigóticas.

El comité de opinión del ACOG de 2015, vigente actualmente, desaconseja el uso del TPNI en gestaciones gemelares alegando que los datos disponibles son limitados y que, aunque los resultados preliminares eran prometedores, es necesario llevar a cabo estudios prospectivos más potentes.

Este año, Gil y colaboradores publicaron una actualización de los resultados de la *Fetal Medicine Foundation (FMF)* y un meta-análisis de los mismos. Los resultados de dicho meta-análisis sobre la aplicación del TPNI en 997 gestaciones gemelares sugieren que los resultados para la trisomía 21 son iguales que en gestaciones únicas. El número de casos de trisomía 13 fue muy pequeño para poder valorar adecuadamente la sensibilidad del test.

	Gestaciones gemelares		Gestaciones únicas	
	Sensibilidad	RFP	Sensibilidad	RFP
Trisomía 21	98.2%	0.05%	99.7%	0.04%
Trisomía 18	88.9%	0.03%	97.9%	0.04%
Trisomía 13	x	0.19%	x	0.04%

Tabla resumen de la comparación de los resultados de los meta-análisis de la *Fetal Medicine Foundation* respecto a TPNI en gestaciones gemelares y únicas (Datos obtenidos de Gil et al, 2019)

El meta-análisis de la FMF, además, encontró asociación entre los resultados no concluyentes y las siguientes condiciones: raza negra o surasiática, FIV, peso materno elevado, dicorionicidad, nuliparidad, edad gestacional precoz, baja PAPP-A y BHCG. La tasa de resultados no concluyente es 3.3 veces superior en las gestaciones gemelares que en las únicas, lo que puede ser explicado por el hecho de que una alta proporción de gestaciones gemelares son secundarias a FIV y las mujeres suelen ser nulíparas.

Se están desarrollando algoritmos para interpretar los datos procedentes del análisis del ADN libre procedente de gestaciones gemelares y las compañías que utilizan modelos basados en el análisis de SNPs puede que consigan generar diferentes perfiles de riesgo para cada feto. No obstante, siempre será

necesaria la confirmación diagnóstica mediante una prueba invasiva de ambos gemelos ya que es imposible saber cuál es el gemelo afecto (en caso de haberlo) basándonos solo en el TPNI.

COMPARACIÓN DEL TPNI CON EL CRIBADO COMBINADO DEL PRIMER TRIMESTRE:

El TPNI tiene una mayor sensibilidad, VPP y VPN y una menor RFP para las aneuploidías más frecuentes (trisomías 21, 18, 13 y aneuploidías sexuales) en comparación con el cribado combinado. Sin embargo, cuando consideramos a la cohorte completa de gestaciones cribadas, la superioridad del TPNI frente al cribado combinado para la población general no es tan clara, debido a la baja incidencia de cromosopatías, la incapacidad para detectar otras cromosopatías diferentes de las aneuploidías más frecuentes y la tasa de resultados no concluyentes del TPNI.

El TPNI solo ha demostrado ser útil para las aneuploidías más frecuentes. Sin embargo, estas anomalías solo representan el 80% de los cariotipos anormales. Si consideramos todas las anomalías cromosómicas, el cribado combinado es más sensible que el TPNI para detectar cromosopatías en la población general, además de permitir calcular el riesgo de complicaciones obstétricas como la preeclampsia o el CIR. Si solo se realizase el TPNI, esta información se perdería.

El valor de la ecografía del primer trimestre para el cribado de anomalías fetales y la detección de síndromes fetales no ha cambiado y no debería confundirse con el cribado del síndrome de Down.

APLICACIÓN A LA PRÁCTICA CLÍNICA:

La incorporación a la práctica clínica del TPNI ha ocurrido relativamente rápido, en parte impulsada por el marketing de los laboratorios. Sin embargo, desde su creación, ha habido mucho debate acerca del uso que debe darse a esta tecnología. Inicialmente, las guías de práctica clínica recomendaban limitar el TPNI a las poblaciones de alto riesgo. Sin embargo, ha habido un cambio en

esta práctica después de la publicación de estudios que demostraban que la sensibilidad y la especificidad de la prueba eran iguales en grupos de bajo riesgo (aunque el VPP era más bajo).

Se han propuesto varios modelos de incorporación del TPNI en los protocolos de cribado.

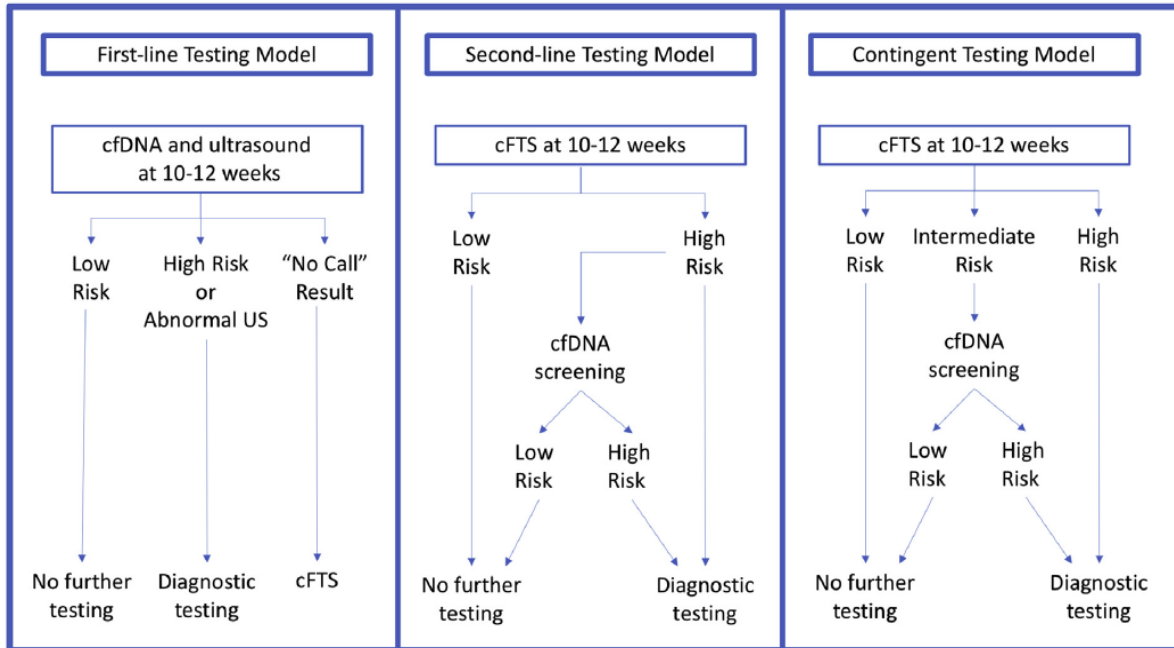
Cribado de primera línea: algunas guías de práctica clínica proponen que el TPNI sea la estrategia de cribado de primera línea ya que es la prueba con mayor sensibilidad para detectar las trisomías 21, 18 y 13 y la que menor tasa de falsos positivos tiene. No obstante, es una prueba muy cara, lo que ha limitado su aplicación en a la población general en muchos países. Además, es difícil realizar un consejo genético adecuado en la población general, lo que limita el valor de la prueba.

Cribado de segunda línea: en este modelo se ofrece el TPNI a las pacientes de alto riesgo (aquellas que han tenido un resultado positivo en el cribado combinado, con hallazgos anormales en la ecografía, historia de aneuploidías en gestaciones anteriores, un miembro de la pareja con una translocación Robertsoniana...). La alta especificidad y VPN permiten reducir el número de pruebas diagnósticas invasivas innecesarias en mujeres de alto riesgo con TPNI negativo.

Modelo contingente: se realiza cribado combinado del primer trimestre a todas las gestantes y se establecen 2 puntos de corte. A las pacientes de alto riesgo se les ofrece una prueba invasiva, a las de riesgo intermedio se les ofrece TPNI y las de bajo riesgo no necesitan pruebas adicionales.

La SEGO aboga por este modelo de implantación y delimita los siguientes grupos:

- Bajo riesgo: riesgo en cribado combinado < 1:250
- Riesgo intermedio: riesgo entre 1:51 y 1:250
- Riesgo alto: riesgo entre 1:2 y 1:50, TN \geq 3.5mm o presencia de malformaciones fetales en la ecografía.



OTRAS APLICACIONES DEL ADN-f EN SANGRE MATERNA:

Determinación del sexo fetal: se basa en la amplificación de secuencias del cromosoma Y, concretamente las secuencias de los genes SRY y DYS14. El sexo fetal se diagnostica siguiendo un criterio de presencia/ausencia de estas secuencias en el ADN-f libre en plasma. Estos resultados tienen un papel importante en el contexto de los trastornos genéticos ligados al cromosoma X. De esta forma, se puede determinar el sexo fetal a través del estudio del ADN-f en sangre materna y realizar pruebas invasivas solo a los fetos de sexo masculino.

En embarazos con riesgo de padecer una enfermedad ligada al cromosoma X, el estudio no invasivo del sexo fetal junto con la ecografía han demostrado reducir el uso de pruebas invasivas a la mitad.

Determinación del factor RhD fetal: se basa en la amplificación de los exones 5, 7 y, ocasionalmente, 10 del gen RhD. Se utiliza la combinación de estos exones por la posibilidad que ofrecen de detectar algunas variantes Rh presentes en la población caucásica. Realizando esta prueba a las gestantes Rh negativo, podemos reducir la necesidad de inmunoprofilaxis de la isoimmunización Rh con gammaglobulina antiD. Además, en pacientes ya

inmunizadas frente al Rh permite que solo se realice el seguimiento para detectar anemia fetal en aquellos casos en los que el feto sea Rh positivo.

Según un estudio realizado en el Servicio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz en una población mayoritariamente caucásica, el test tiene una sensibilidad del 100% y una especificidad cercana al 98%. En Suecia, en 2013, un estudio estimó que la incidencia de isoimmunización Rh tras la implementación de la determinación del Rh fetal en gestantes Rh negativo y concluyó que disminuye de manera significativa la incidencia de nuevas inmunizaciones Rh.

NUEVOS HORIZONTES:

Estudio de enfermedades monogénicas:

Las enfermedades monogénicas representan una mayor proporción de las enfermedades genéticas que las aneuploidías. El diagnóstico prenatal de estas enfermedades ha necesitado históricamente de una prueba diagnóstica invasiva (amniocentesis o biopsia de vellosidades coriales). Actualmente, es posible su estudio mediante el análisis del ADN-f circulante en sangre materna aunque su aplicación es aún limitada en la práctica clínica habitual.

Es importante recordar que la mayoría del ADN libre en sangre materna procede de la propia madre, por lo que el objetivo de los estudios de enfermedades monogénicas inicialmente se centraba en la identificación de variantes de herencia paterna y a mutaciones de novo. Gracias a las técnicas de secuenciación de nueva generación, se está empezando a expandir la capacidad de estudio a mutaciones de herencia materna. No obstante, el diagnóstico de enfermedades dominantes de herencia materna, de enfermedades ligadas al cromosoma X y de enfermedades recesivas cuando ambos progenitores portan la misma mutación sigue siendo difícil.

En aquellas parejas en las que el varón es portador de una mutación asociada a una enfermedad autosómica dominante, la ausencia de dicho defecto en el ADN libre materno permite descartar la afectación del feto. A diferencia del estudio de aneuploidías, cuyos resultados “positivos” (alto riesgo) necesitan de pruebas invasivas para su confirmación, el estudio de enfermedades

monogénicas autosómicas dominantes mediante ADN-f se considera diagnóstico y no precisa pruebas adicionales. Las enfermedades monogénicas autosómicas dominantes causadas por una mutación de novo se asocian a edad paterna avanzada. Por ello, algunos laboratorios de EEUU y Reino Unido ofrecen paneles de diagnóstico de enfermedades monogénicas en casos de edad paterna avanzada. Aunque estos paneles tienen una sensibilidad del 99%, la prevalencia de estas enfermedades es baja en la población general. Además, el uso de estos paneles aún no está bien validado.

El diagnóstico de enfermedades de herencia recesiva requiere una tecnología más sofisticada que las de herencia dominante. El estudio de enfermedades recesivas (tanto autosómicas como ligadas al cromosoma X) se ofrece cuando los progenitores portan mutaciones diferentes para el gen causante. En estos casos, el estudio de ADN-f libre nos informa de si el feto ha heredado la mutación del padre. En estos casos no podremos llegar a un diagnóstico completo de la condición fetal, al no poder saber si ha heredado la mutación materna. No obstante, el estudio de la mutación paterna evita la necesidad de pruebas diagnósticas invasivas en caso de que el feto no la haya heredado.

Enfermedades autosómicas dominantes	Acondroplasia Displasia tanatofórica Síndrome de Apert Distrofia miotónica Enfermedad de Huntington
Enfermedades autosómicas recesivas	Fibrosis quística Hiperplasia suprarrenal congénita Anemia de células falciformes B-Talasemia Atrofia músculo-espinal Enfermedad de Gaucher Enfermedad de Wilson
Enfermedades recesivas ligadas al cromosoma X	Hemofilia Distrofia muscular de Duchenne Distrofia muscular de Becker

Tabla: Enfermedades monogénicas para las que se usa más frecuentemente el diagnóstico por ADN-f libre en sangre materna.

Estudio de CNVs:

Las CNVs (“Copy Number Variants”) engloban tanto a las microdelecciones como a las microduplicaciones. Las CNVs patológicas se asocian a un riesgo significativo de discapacidad intelectual y/o problemas de salud a largo plazo. Los síndromes por CNVs están presentes en más del 1% de los fetos y recién nacidos y no se asocian a edad avanzada de ninguno de los progenitores.

Aunque se conocen más de 40 síndromes por CNVs con importante repercusión clínica, la mayoría de paneles solo incluyen 5-6 síndromes concretos con una prevalencia combinada de 1 en 2500. Además del limitado número de síndromes incluidos en los paneles, hay que tener en cuenta que las microdelecciones solo están presentes en una proporción de los individuos afectados (por ejemplo, la delección 22q11.2 causante del síndrome de DiGeorge aparece solo en el 65-75% de los pacientes), por lo que un resultado negativo no elimina el riesgo de enfermedad. El VPP para los síndromes de microdelección es limitado (aproximadamente 50%) ya que estos síndromes tienen una baja prevalencia individual y no se han llevado a cabo grandes ensayos clínicos. Por todo lo anteriormente expuesto, el ACOG y la SMFM no recomiendan el cribado rutinario de los síndromes por CNVs.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Cuckle H, Maymon R. Development of prenatal screening—A historical overview. *Seminars in Perinatology*. 2016;40(1):12-22.
2. Drury S, Hill M, Chitty LS. Chapter One - Cell-Free Fetal DNA Testing for Prenatal Diagnosis. En: Makowski GS, editor. *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier; 2016. p. 1-35.
3. Gerson KD, O’Brien BM. Cell-Free DNA: Screening for Single-Gene Disorders and Determination of Fetal Rhesus D Genotype. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. 2018;45(1):27-39.
4. Gil MM, Galeva S, Jani J, Konstantinidou L, Akolekar R, Plana MN, et al. Screening for trisomies by cfDNA testing of maternal blood in twin

- pregnancy: update of The Fetal Medicine Foundation results and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2019;53(6):734-42.
5. Goldwaser T, Klugman S. Cell-free DNA for the detection of fetal aneuploidy. *Fertility and Sterility.* 2018;109(2):195-200.
 6. Gratacós E, Nicolaides K. Clinical perspective of cell-free DNA testing for fetal aneuploidies. *Fetal Diagn Ther.* 2014;35(3):151-5.
 7. Gray KJ, Wilkins-Haug LE. Have we done our last amniocentesis? Updates on cell-free DNA for Down syndrome screening. *Pediatr Radiol.* 2018;48(4):461-70.
 8. Guseh SH. Noninvasive prenatal testing: from aneuploidy to single genes. *Hum Genet.* 2019
 9. Harris S, Reed D, Vora NL. Screening for fetal chromosomal and subchromosomal disorders. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2018;23(2):85-93.
 10. Hayward J, Chitty LS. Beyond screening for chromosomal abnormalities: Advances in non-invasive diagnosis of single gene disorders and fetal exome sequencing. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine.* 2018;23(2):94-101.
 11. Shaffer BL, Norton ME. Cell-Free DNA Screening for Aneuploidy and Microdeletion Syndromes. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America.* 2018;45(1):13-26.