



Fundación
J. L. Castaño

Para el desarrollo del Laboratorio clínico

EDUCACIÓN CONTINUADA EN EL LABORATORIO CLÍNICO

Ed Cont Lab Clín; 28: 88-100

SEQC^{ML}

Sociedad Española de Medicina de Laboratorio

2016-2017

DIAGNÓSTICO PRENATAL NO INVASIVO.

Irene Rosas.

Bioquímica Clínica. Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona.

Grupo de Trabajo de Diagnóstico Prenatal de la SEQC.

Hada Macher.

Bioquímica Clínica. Hospital Virgen del Rocío. Sevilla.

Grupo de Trabajo de Diagnóstico Prenatal de la SEQC.

1. Introducción

En el año 1997, Lo y colaboradores fueron los primeros en descubrir que, en sangre periférica de mujeres embarazadas, existe una fracción de DNA fetal extracelular (cffDNA, del inglés cell-free fetal DNA) mediante la detección de secuencias específicas del cromosoma Y. Este hallazgo evidenció la posibilidad de detectar con fiabilidad la existencia de un gen o una mutación del feto que fuese inexistente en la madre, mediante la extracción y amplificación por PCR (del inglés *Polimerase Chain Reaction*) bien a tiempo real o digital, según la sensibilidad necesaria. Desde entonces, numerosas investigaciones han tratado de desarrollar métodos de diagnóstico prenatal no invasivo (NIPD, del inglés *Non-Invasive Prenatal Diagnosis*) para la práctica clínica. Actualmente, se distingue entre NIPD cuando la técnica es lo suficientemente eficiente para no necesitar confirmación por amniocentesis (como es el caso de búsqueda de genes o mutaciones heredables del padre y ausentes en la madre) y NIPT (del inglés *Non-Invasive Prenatal Test*) cuando la técnica no invasiva no es lo suficientemente específica y, por tanto, requiere confirmación por amniocentesis de los casos identificados como potenciales patológicos (es el caso del estudio de aneuploidías cromosómicas o mutaciones heredables de la madre).

El cffDNA es de origen placentario y proviene mayoritariamente de trofoblastos apoptóticos. Es detectable a partir de la cuarta semana de gestación, llegando a constituir el 3-6 % del DNA total presente en sangre materna a partir de la semana 10 y pudiendo alcanzar niveles hasta de un 10-20 %. Diversos estudios han demostrado que la vida media del cffDNA es corta y que desaparece poco después del parto, por lo que no es posible confundir el cffDNA de un embarazo en curso con el de un embarazo anterior.

Las técnicas de biología molecular aplicables a su detección han de tener en cuenta dos factores limitantes que influyen en los resultados:

- la mayoría del DNA fetal que circula en sangre materna está fragmentado, lo que obliga a buscar amplicones de menos de 150 pares de bases
- la concentración de DNA en plasma materno es inferior a 5 ng/mL y la fracción fetal varía según la edad gestacional, constituyendo, en promedio, el 2,5 – 14 % del DNA total (1,25 – 7 %, si el objeto de estudio es una mutación heredada del padre). Esto implica utilizar más de 40 ciclos de PCR para su detección, pues la fracción fetal empieza a amplificar entre los ciclos 35 y 42 de la PCR.

2. Detección de genes ausentes en la madre

Las aplicaciones más instauradas en la práctica clínica son el diagnóstico prenatal no invasivo del sexo y del gen *RHD* fetales en el plasma materno desde la semana 10 de gestación.

2.1. Determinación del gen *RHD* fetal

Actualmente, la determinación del Rh fetal tiene una amplia aplicación clínica tanto en Estados Unidos como en algunos países de Europa. La importancia de la determinación del Rh durante el embarazo se centra en el manejo de embarazadas RhD (-). Si el padre es RhD(+) heterocigoto, existe un 50 % de probabilidad que el feto sea RhD(+). La incompatibilidad del grupo RhD entre la madre y el feto puede dar lugar a la aloinmunización materna, y los anticuerpos anti-D pueden atravesar la placenta y atacar a los eritrocitos fetales causando, en el peor de los casos, anemia hemolítica fetal o neonatal y finalmente la muerte.

Para prevenir una posible enfermedad hemolítica en el recién nacido, se lleva a cabo un tratamiento de inmunoprofilaxis en las gestantes RhD(-) con inmunoglobulina D (anti-D) de origen humano. Este tratamiento se ofrece a todas las mujeres embarazadas con grupo RhD negativo, a pesar de que en España se ha descrito que al menos el 38 % de estas gestantes portan feto RHD negativos, por lo que no sería necesario exponerlas a los riesgos asociados con la administración de productos derivados de sangre humana.

2.1.1. Genética molecular del factor Rhesus

Los genes *RHD* y *RHCE*, que presentan un 93,8 % de homología, codifican los antígenos del sistema Rh. Ambos están localizados en el cromosoma 1p36.11, estrechamente vinculados pero en orientación opuesta. Cada gen consta de 10 exones. Las proteínas RhD y RhCE pueden diferir entre 31 y 35 aminoácidos, dependiendo del alelo RHCE.

Habitualmente el fenotipo RhD(-) es debido a la ausencia total del gen *RHD*, siendo el RhD el antígeno eritrocitario más inmunogénico en la incompatibilidad materno-fetal.

Por el contrario, la proteína RhCE está casi siempre presente. En la población negra africana, alrededor del 67 % tiene al menos una copia del *RHD* ψ , gen *RHD* desactivado por una duplicación de 37 pb en el exón 4 y una mutación sin sentido en el exón 6. Otro 15 % de esta población, presenta genes híbridos RHD-CE-D que, por ser genes antiparalelos, al combinarse no producen Antígeno D en la membrana eritrocitaria.

Debido a que el gen *RHD* no siempre está completamente delecionado y a que el diagnóstico del *RHD* fetal en plasma materno es genético, inevitablemente existen falsos positivos en los casos de conservación de algunos exones del gen objeto de estudio. Por ello, se eligen los exones que más frecuentemente son delecionados al recombinarse los genes *RHD* y *RHCE*, como son el 5 y el 7 para la población europea. Con todo, se considera más importante que no existan falsos negativos para que ninguna gestante que la necesite se quede sin la inmunoprofilaxis anti-D.

| Molecular structure | Allele | Haplotype | Phenotype |
|---------------------|----------------------------------|------------------------|------------|
| | <i>RHCE(1-9)-D</i> | <i>cdE</i> | D negative |
| | <i>RHD-CE(2-9)-D</i> | <i>Cdc</i> | D negative |
| | <i>RHD-CE(2-7)-D</i> | <i>Cde</i> | n.d. |
| | <i>RHD-CE(2-9)-D₂</i> | <i>Cde</i> | D negative |
| | <i>RHD-CE(2-7)-D₂</i> | <i>Cde</i> | D negative |
| | <i>RHD-CE(3-7)-D</i> | <i>Cde^s</i> | D negative |
| | <i>RHD-CE(4-7)-D</i> | <i>cdE</i> | D negative |
| | <i>RHD-CE(4-7)-D₂</i> | n.d. | D negative |
| | <i>RHD-CE(8-9)-D</i> | <i>Cde</i> | D negative |

Figura 1: Representación esquemática de la estructura molecular para diversas combinaciones de alelos híbridos, con su designación, haplotipo asociado y fenotipo. Cada exón *RHD* se representa por una caja, mientras que los intrones y los polimorfismos del promotor investigados se muestran como círculos. Los símbolos blancos indican la presencia de secuencias específicas de *RHD*, mientras que los símbolos en negro representan los exones del gen *RHCE* intercalados en el gen *RHD* que imposibilitan su expresión fenotípica.

Los exones 1, 2 y 8 se muestran en gris, ya que son idénticos en los alelos *RHD* y algunos *RHCE*.

Tomado de Wagner FF et al (2001).

2.1.2. Análisis del Rh en el laboratorio.

El análisis de RhD mediante cffDNA se puede llevar a cabo tanto en suero como en plasma materno. El momento idóneo de la gestación para efectuar el análisis ha sido motivo de controversia, si bien varios estudios sugieren que los resultados obtenidos en muestras tomadas durante el primer trimestre de gestación son similares a los de muestras de la segunda mitad del embarazo.

Existe mayor consenso en la técnica emplear, siendo la PCR en tiempo real (RT-PCR) la tecnología de elección. Los estudios iniciales determinaron que esta técnica proporciona la plataforma óptima para una detección robusta y de confianza del cffDNA, pero sin perder

de vista la complejidad del sistema Rh, descrita anteriormente. En este sentido, muchos protocolos llevan a cabo PCR multiplex, en los cuales se amplifica más de un exón (5, 7 y 10 habitualmente), con el fin de evitar falsos resultados por la presencia de variantes. Los primeros diseñados para los exones 5 y 7 no permiten la amplificación de la mayoría de los genes híbridos no funcionales RHD/RHCD que, según algunos autores, generan resultados positivos con el exón 10. A la hora de interpretar los resultados, un feto será clasificado como *RHD* positivo si amplifica cualquier exón estudiado del gen *RHD* en la PCR a tiempo real. Por el contrario, si no se observa amplificación, el feto será clasificado con genotipo RHD negativo. En el caso de que los duplicados no ofrezcan resultados concluyentes, se considerará que el feto es potencialmente RHD positivo y se le ofrecerá a la gestante la inmuno profilaxis anti-D.

Aunque la RT-PCR múltiple es ampliamente utilizada, algunos autores defienden el uso de la PCR digital (dPCR), al considerar que alcanza mejor sensibilidad para la determinación del sexo fetal y genotipado RHD en comparación con qPCR, particularmente para muestras que presentan bajas concentraciones relativas de DNA fetal (< 2 %).

2.2. NIPD del sexo fetal

Este test se ha convertido en una herramienta importante para el manejo de embarazos de madres portadoras de enfermedades recesivas ligadas a al cromosoma X, así como en familias con riesgo de desarrollar hiperplasia adrenal congénita. Antes del desarrollo de estas pruebas diagnósticas, la determinación del sexo fetal se llevaba a cabo sobre material genético obtenido mediante procedimientos invasivos, tales como la biopsia de las vellosidades coriales, que conllevan cierto riesgo de pérdida de fetal, generalmente inferior al 1 %. Estos procedimientos se llevan a cabo habitualmente en las semanas 11-12 de gestación. Por otro lado, la determinación del sexo mediante pruebas no invasivas tales como la ecografía no se puede llevar a cabo durante el primer trimestre ya que el desarrollo de los genitales externos no es completo, por lo que la proporción de errores es bastante elevada.

La determinación del sexo fetal se basa en pruebas de presencia/ausencia de determinados genes del cromosoma Y. Habitualmente, las regiones amplificadas son secuencias del gen SRY o del marcador DYS14, localizado en el gen TSPY1 (del inglés *Testis-specific Y-encoded protein 1*). El gen SRY (del inglés *Sex-determining Region Y*) representa la mejor elección para la determinación del sexo, pero el DYS14, al encontrarse en tándem varias copias de este marcador, es más sensible y eficiente en el primer trimestre de embarazo, cuando el número de copias de cfDNA es bajo. Por esta razón, la determinación del sexo se puede hacer a partir de la semana 6 de gestación con la detección del DYS14, siendo la sensibilidad de la prueba al combinarla con la detección del SRY en la 10 semana cercana al 100 %.

La presencia de secuencias del cromosoma Y determina que el feto es varón, por lo que en este caso sería necesario llevar a cabo una técnica invasiva para confirmar la presencia o ausencia de la enfermedad. En caso contrario, se asumiría que el feto es femenino y que, por lo tanto, no sería necesario llevar a cabo el procedimiento invasivo. Sin embargo, un resultado negativo para la detección del cromosoma Y también puede obtenerse debido

a fallos en la amplificación del cffDNA o una baja concentración del mismo en el plasma materno. Por esto, es muy importante llevar a cabo la amplificación de las secuencias del cromosoma Y en paralelo a un control que certifique la presencia de cffDNA en la muestra, como secuencias paternas que no están presentes en el genoma materno, o secuencias de origen placentario con distinto patrón de metilación en la placenta y en la madre.

Como se ha comentado anteriormente, la determinación del sexo fetal es de gran importancia clínica en el manejo de embarazos de madres portadoras de enfermedades ligadas al cromosoma X, tales como la distrofia de Duchenne, hemofilia, retinosis pigmentaria, raquismo, entre otras. Destaca el interés de su detección precoz para orientar el manejo de la hiperplasia adrenal congénita, enfermedad autosómica recesiva cuya causa más frecuente se debe a mutaciones o deleciones en el gen CYP21A2, que provocan un déficit de la 21-hidroxilasa esteroidea. Este déficit enzimático conduce a una síntesis insuficiente de cortisol y aldosterona, así como un aumento en la producción de andrógenos adrenales. En caso de que el feto sea femenino, esta situación es especialmente problemática ya que da lugar a virilización de los genitales externos. Actualmente, es posible tratar la hiperplasia adrenal congénita prenatalmente, administrando dexametasona a la madre en torno a la semana 6-7 de gestación para suprimir la sobreproducción de andrógenos adrenales en el feto. Sin embargo, las estrategias disponibles hasta ahora, obligan a esperar incluso hasta la semana 14 para obtener el diagnóstico tras técnicas invasivas. Por otra parte, el tratamiento empírico con glucocorticoides resulta poco recomendable según algunos autores, ya que se ha descrito que puede resultar teratógeno para el feto y conllevar efectos secundarios a nivel cognitivo. La ventaja que aporta, en este contexto, el diagnóstico precoz del sexo fetal, es la posible racionalización del tratamiento con dexametasona, que se administraría sólo en caso de que el feto sea femenino.

3. Cribado de aneuploidías cromosómicas por secuenciación masiva

Actualmente, en España se ofrece el cribado de las trisomías más frecuentes (trisomías 21, 18 y 13) a todas las mujeres del sistema nacional de salud en el primer trimestre de gestación mediante un cribado combinado. En dicha estrategia, se cuantifica en el suero materno la fracción libre de la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana (beta hCG libre) y la proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A) y se mide la translucencia nucal en ecografía. Tras normalizar los tres marcadores, medidos en unidades múltiples de la mediana correspondiente para la edad gestacional, y teniendo en cuenta el riesgo a priori de la gestante (debido no sólo a la edad materna, sino también a diversos factores de riesgo), se determina el riesgo de que el feto esté afectado de uno de estos síndromes. El método tiene una sensibilidad superior al 85 % para un porcentaje de falsos positivos del 3-6 %, por lo que es necesario un diagnóstico invasivo para confirmar la sospecha de anomalía cromosómica. Los puntos de corte utilizados para considerar como positivo un test de cribado combinado en nuestro país varían entre 1:270 y 1:250 en más del 90 % de los programas, según una encuesta reciente del grupo de trabajo de Diagnóstico Prenatal de la SEQC. Adicionalmente,

las guías de práctica clínica del Sistema Nacional de Salud de 2014, recomiendan, con criterio “Fuerte”, ofrecer un cribado cuádruple entre las semanas 15⁺⁰ y 17⁺⁰ de gestación, cuantificando alfafetoproteína, estriol no conjugado, beta hCG libre e inhibina A, únicamente a aquellas gestantes que no hayan podido realizar cribado durante el primer trimestre.

3.1. El cribado genético en el DNA circulante del plasma de la gestante

Durante los primeros años tras el descubrimiento de que el DNA fetal circula en el plasma de la gestante, se desarrollaron técnicas para detectar genes o mutaciones existentes en el feto pero inexistentes en la madre, con el convencimiento de que sería inminente la posibilidad de ofertar un diagnóstico prenatal de aneuploidías universal, al disponer de un método no invasivo para analizar material genético fetal. No obstante, las aneuploidías cromosómicas son un cambio cuantitativo, no cualitativo. Ha sido necesaria una alta capacidad resolutive de la secuenciación (lo que nos lleva a la secuenciación masiva) y de los sistemas de cálculo bioinformáticos para poder distinguir porcentajes alterados, en los cromosomas objeto de estudio, entre el genotipo fetal y el materno.

Las técnicas más extendidas de secuenciación masiva para el diagnóstico de aneuploidías fetales en el plasma materno son dos:

- MPSS (del inglés *genome wide Massively Parallel Shotgun Sequencing*), donde se secuencia todo el genoma circulante y el análisis informático agrupa cada secuencia amplificada en base al genoma humano de referencia para identificar el cromosoma de origen; a su vez se diferencia el origen del DNA (fetal o materno), basándose en el análisis de la dosis relativa de haplotipos (Figura 2).

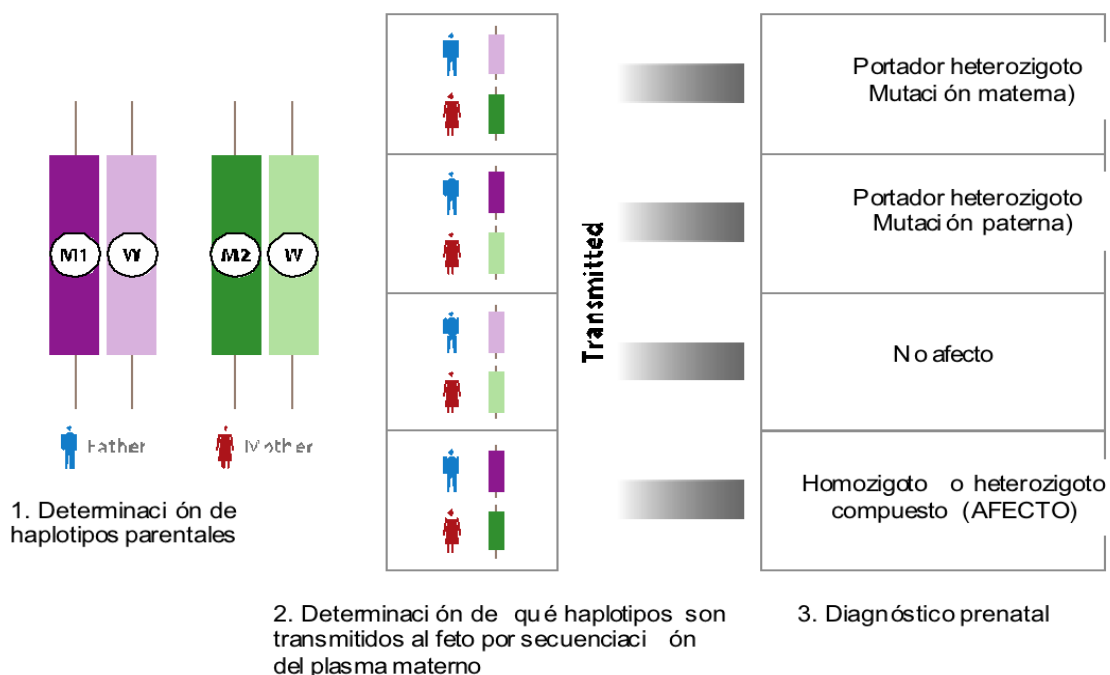


Figura 2: NIPD de enfermedades autosómicas recesivas. Se representan los haplotipos parentales (cajas en color) ligados al alelo silvestre (W) o mutante (M1, mutación paterna; M2, mutación materna).

Adaptado de Wong FCK et al (2001).

- **DANSR** (del inglés *Digital Analysis of Selected Regions*), donde la secuenciación va dirigida a amplificar zonas de interés pertenecientes a los cromosomas en estudio que después se analizan por “microarrays” (análisis informático) para diferenciar pequeños cambios en los nucleótidos entre el DNA fetal y el materno, pudiendo cuantificar de este modo el porcentaje de DNA perteneciente al feto.

Estas técnicas son cada vez más potentes y depuradas: hay compañías que están estudiando la posibilidad de incluir la caracterización de enfermedades con herencia mendeliana, el cribado de enfermedades complejas y la identificación de cambios en el número de copias, tanto en el caso de síndromes microdelecionales como en el caso de microduplicaciones. Incluso determinan patrones de DNA metilado para detectar tanto posibles patologías fetales como de la madre. No obstante, esta aproximación tan prometedora aún no está disponible en la práctica clínica (Figura 3).

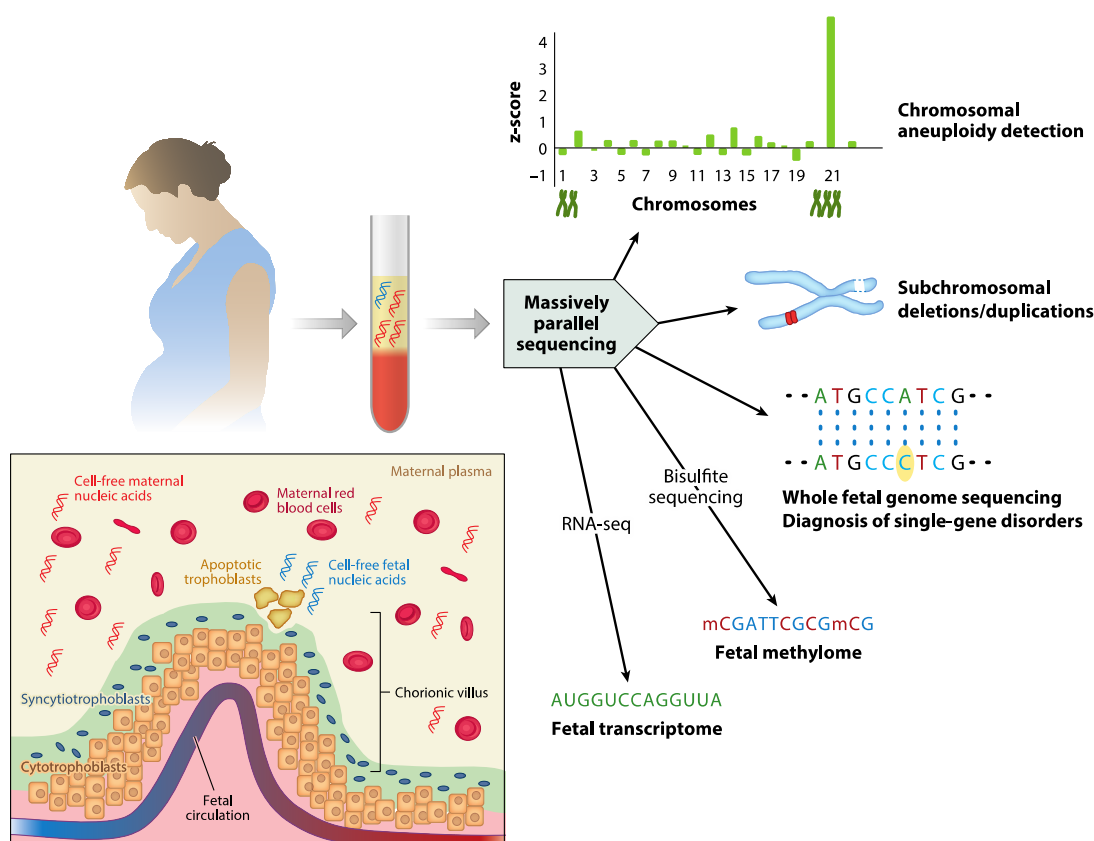


Figura 3: Esquema de las aplicaciones disponibles actualmente para NIPT basado en MPSS. Mediante esta tecnología, el análisis de cffDNA y RNA en plasma materno, procedente principalmente de los trofoblastos apoptóticos, permite conocer tanto el genoma fetal (no sólo a nivel cromosómico sino también subcromosómico e incluso para enfermedades de un único gen), como perfiles de metilación (metiloma) y de expresión génica (transcriptoma). Tomado de Wong FCK et al.

También es posible el análisis de las distribuciones de polimorfismos de nucleótido único (SNP) de los cromosomas estudiados en la madre y el feto.

Para la de detección de trisomías 21,18 y 13, durante el año 2015 se han realizado estudios multicéntricos, incorporando miles de casos con población no afectada, y el último meta-

análisis publicado ya habla de sensibilidades y especificidades para población general sin encontrar distinción de calidad entre los métodos MPSS y DANSR.

Las sensibilidades descritas fueron del 99,3 % (IC 95 %: 98,9 % a 99,6 %) para el Síndrome de Down, 97,4 % (IC 95 %: 95,8 % a 98,4 %) para el Síndrome Edwards, y 97,4 % (IC 95 %: 86,1 % a 99,6 %) para el Síndrome de Patau. Y la especificidad fue del 99,9 % (IC 95 %: 99,9 % a 100 %) para las tres trisomías. Dado que el porcentaje global descrito de falsos positivos es de 0,67 %, se recomienda no dar a estos estudios categoría de métodos diagnósticos, y confirmar los resultados positivos por amniocentesis.

Una parte de estos falsos positivos podría explicarse por causas biológicas, como son el mosaicismo placentario o materno, un gemelo evanescente o una neoplasia materna. También hay que tener en cuenta que hay una proporción de no resultado final relativamente elevada, que varía entre el 1 y el 7 %, según el método, después de repetir el test por un primer resultado no informativo.

Actualmente, no existe una recomendación oficial a nivel nacional en cuanto a la conveniencia de incorporar estas alternativas a los programas de cribado de aneuploidías. La creciente demanda de mayor fiabilidad diagnóstica y seguridad para el paciente, de la mano de estudios de coste-efectividad, probablemente modifiquen en un futuro próximo la realidad del diagnóstico prenatal en la sanidad pública española.

3.2. Limitaciones de la técnica NIPT

- El diagnóstico no invasivo de aneuploidías se considera una prueba de cribado por la existencia de falsos positivos.
- Se requiere una fracción de DNA fetal superior al 4 % en la circulación materna, lo que puede limitar la posibilidad de obtener un resultado concluyente en gestantes con obesidad considerándose menos fiable en gestantes que superan los 90 Kg de peso.

| Peso Materno (kg) | n | Embarazos con $\geq 4\%$ de cffDNA (%) |
|-------------------|------|--|
| <50 | 809 | 99.8 |
| 50-59 | 4825 | 99.6 |
| 60-69 | 6224 | 99.2 |
| 70-79 | 4313 | 98.8 |
| 80-89 | 2574 | 98.2 |
| 90-99 | 1608 | 96.3 |
| 100-109 | 92 | 93.9 |
| 110-119 | 508 | 89.8 |
| 120-129 | 298 | 87.9 |
| 130-139 | 172 | 81.4 |
| ≥ 140 | 132 | 71.2 |

Tabla 1: Proporción de embarazos con $\geq 4\%$ de cffDNA en una primera extracción de sangre (Adaptado de Wang E et al).

- Ciertas anomalías cromosómicas, como las translocaciones no equilibradas, las deleciones y las duplicaciones, no se detectan actualmente por NIPT.
- El NIPT no puede distinguir las formas específicas de la aneuploidía, por ejemplo, no puede distinguir si un síndrome de Down es debido a un cromosoma extranumerario o una translocación Robertsoniana que implique al cromosoma 21 o si existe un mosaicismo de alto grado.
- Algunos casos positivos han sido debidos a mosaicismos existentes en el tejido placentario sin que la patología afecte al feto.
- El NIPT tiene una menor sensibilidad en el caso de embarazos gemelares o múltiples.
- El NIPT no informa de la existencia de defectos de la formación del tubo neural, por lo que no excluye la realización del cribado bioquímico del segundo trimestre cuando proceda.
- Se han descrito falsos positivos en los que la madre era la portadora de una anomalía cromosómica que desconocía

4. Aplicación del NIPD al estudio de enfermedades monogénicas

El desarrollo del NIPD está permitiendo incorporar a la práctica clínica no sólo la determinación del sexo fetal y el RhD, sino también el diagnóstico de enfermedades monogénicas de herencia autosómica, que actualmente están siendo estudiadas.

El estudio de enfermedades monogénicas se ha limitado, hasta ahora, a la detección de defectos congénitos de herencia paterna o mutaciones de novo no presentes en el DNA materno, con el fin de asegurar el origen fetal. Pero actualmente los estudios van dirigidos a la detección de mutaciones de origen materno, lo cual proporcionaría una importante información diagnóstica adicional. Estos estudios se basan por ejemplo, en el análisis de la dosis relativa de haplotipos, comentada anteriormente.

Son muchos los métodos que se emplean con este fin para la detección de alelos que no están presentes en la madre, la mayoría basados en la detección de sustituciones de una única base, o inserciones y deleciones. En la bibliografía aparecen numerosos estudios que utilizan distintas metodologías para llevar a cabo tests diagnósticos fiables. Estos estudios utilizan desde métodos biomoleculares básicos como la qPCR, QF-PCR, COLD-PCR junto con Sanger y MEMO qPCR, hasta metodología más sofisticada y costosa con la espectrometría de masas, MALDI-TOF-PCR/LDR/ electroforesis capilar, PCR digital microfluidica o la secuenciación masiva en paralelo.

La indicación de las pruebas genéticas para el estudio de estas enfermedades monogénicas en el feto se recomienda no sólo en las parejas en las que se ha establecido la mutación en la historia familiar, sino también en las que hallazgos ecográficos sugieren una etiología genética subyacente.

4.1. Enfermedades de herencia dominante.

Los estudios de enfermedades autosómicas con herencia dominante se basan en la presencia/ausencia en el plasma materno de alelo mutado. En el caso de padre portador de una mutación asociada a una enfermedad de herencia dominante, la ausencia del dicho defecto en el genoma materno nos permitirá llevar a cabo un diagnóstico, excluyendo la presencia de la enfermedad en el feto.

Algunos de los estudios llevados a cabo en enfermedades con un patrón de herencia dominante se resumen a continuación:

- **MEN2A:** subtipo de neoplasia múltiple endocrina (MEN2). Enfermedad autosómica dominante causada por la mutación del proto-oncogen c-RET tirosin-kinasa en el cromosoma 10q11.2. En este caso el diagnóstico se lleva a cabo mediante la detección de la mutación C634Y en el exón 11 del proto-oncogen mediante COLD –PCR seguida de HRM (High Resolution Melting.)
- **Corea de Huntington:** enfermedad neurodegenerativa de carácter progresivo que incluye tanto síntomas físicos como psiquiátricos y que actualmente es incurable. El patrón de herencia es dominante, asociado a la expansión de una región polimórfica formada por repeticiones del triplete CAG localizado en el exon 1 del gen *IT15*. El rango de repeticiones del triplete es de hasta 27 repeticiones en pacientes sanos, entre 27-35 en pacientes meioticamente inestables; entre 36 y 39 repeticiones está asociado con la enfermedad pero con penetrancia incompleta y con más de 40 repeticiones muestra una penetrancia completa. Este estudio se ha llevado a cabo en el primer trimestre de gestación por métodos directos (análisis de repeticiones GAC) en indirectos (marcador I1CAHD-S).

Otra de las opciones es llevar a cabo el NIPD en el caso de embarazos con sospecha ecográfica de enfermedades como la **acondroplasia**. Se trata de una enfermedad de herencia dominante, asociada a la edad paterna, habitualmente causada por mutaciones *ex novo*. Sin embargo el 95 % de los fetos afectados muestran una mutación prevalente (G1138A) en el gen *FGFR3*. En la mayoría de los casos el hallazgo se produce en la ecografía del tercer trimestre, confirmándose el diagnóstico en el nacimiento. Diferentes grupos han llevado a cabo DPNI mediante distintas estrategias para detección de esta mutación en plasma materno.

4.2. Enfermedades de herencia recesiva.

En el caso de enfermedades de herencia recesiva, para poder llevar a cabo el diagnóstico, ambos progenitores deben ser portadores de mutaciones distintas, de modo que se pueda detectar la mutación de origen paterno.

Al igual que en el caso anterior, el diagnóstico se basa en la presencia/ausencia de la misma pero no se puede llevar a cabo un diagnóstico completo del estado del feto. En este sentido, en caso de ausencia de mutación paterna, se puede concluir que el feto no presenta riesgo

de desarrollar la enfermedad pero no es posible conocer la condición de sano o portador del mismo. Aún así, de esta manera, la no presencia de la mutación paterna implicaría no tener que llevar a cabo un diagnóstico prenatal invasivo, disminuyendo el riesgo asociado para el feto.

En el caso de que la mutación paterna fuese detectada, sería necesario llevar a cabo una prueba invasiva, con el fin de conocer si el feto es también portador de la mutación materna, siendo en ese caso afecto, o portador sano, en el caso de que esta no esté presente.

Algunos estudios llevados a cabo se han centrado en el diagnóstico de distintas enfermedades como la fibrosis quística, β -talasemia, acidosis propiónica o la hiperplasia adrenal congénita.

5. A recordar

En la práctica clínica actual, las aplicaciones más sencillas del análisis de cffDNA en sangre materna se orientan al diagnóstico prenatal no invasivo del sexo y del Rh fetales, a partir de la semana 10 de gestación.

En otras áreas de diagnóstico prenatal, los métodos más empleados son la secuenciación masiva en paralelo, ya sea secuenciando fragmentos de todos los cromosomas para luego determinar el número de copias de unos cromosomas concretos (Shotgun Massive Parallel Sequencing), o bien estudiando únicamente regiones de los cromosomas de interés (Targeted Massive Parallel Sequencing), y el análisis de las distribuciones de polimorfismos de nucleótido único (SNP) de los cromosomas estudiados en la madre y el feto.

La sensibilidad para la detección de aneuploidías mediante del cffDNA ronda el 99,0 %, para una porcentaje global de falsos positivos del 0,67 %, por lo que no se puede considerar método diagnóstico y cualquier resultado positivo debe confirmarse mediante procedimiento invasivo. La proporción de no resultado final es aún relativamente elevada, entre el 1 y el 7 %, según el método. La cantidad de cffDNA en sangre materna aumenta con la edad gestacional y disminuye con el peso materno. Para obtener un resultado fiable se considera necesario que la fracción fetal de DNA aislado de sangre materna sea como mínimo del 4 %.

El estudio de enfermedades monogénicas mediante análisis de cffDNA se ha limitado, hasta ahora, a la detección de defectos congénitos de herencia paterna o mutaciones de novo no presentes en el DNA materno, con el fin de asegurar el origen fetal. Actualmente, los estudios van dirigidos a la detección de mutaciones de origen materno (analizando la dosis relativa de haplotipos), lo cual proporcionaría una importante información diagnóstica adicional.

BIBLIOGRAFÍA

Alcaine MJ, Aulesa C, Barrenechea E, Casals E, González C, Martín I, et al. Estado actual del cribado prenatal de cromosopatías en España: Resultados encuesta SEQC 2013. *Rev Lab Clin.* 2015;8:138-48.

Avent ND. RHD genotyping from maternal plasma: guidelines and technical challenges. *Methods Mol Biol* 2008;444:185-201.

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.

Gil MM, Akolekar R, Quezada MS, Bregant B, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: Meta-analysis. *Fetal Diagn Ther* 2014;35:156-73.

Lench N, Barrett A, Fielding S, McKay F, Hill M, Jenkins L, et al. The clinical implementation of non-invasive prenatal diagnosis for single-gene disorders: challenges and progress made. *Prenat Diagn* 2013;33:555-62.

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.

Nicolaides KH, Syngelaki A, Ashoor G, Birdir C, Touzet G. Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population. *Am J Obstet Gynecol* 2012;207:374.e1-6.

Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, Ehrich M, et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: An international clinical validation study. *Genet Med* 2011;13:913-20.

Sillence KA, Roberts LA, Hollands HJ, Thompson HP, Kiernan M, Madgett TE, et al. Fetal Sex and RHD Genotyping with Digital PCR Demonstrates Greater Sensitivity than Real-time PCR. *Clin Chem* 2015;61:1399-407.

Taylor-Phillips S, Freeman K, Geppert J, Agbebiyi A, Uthman OA, Madan J, et al. Accuracy of non-invasive prenatal testing using cell-free DNA for detection of Down, Edwards and Patau syndromes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 2016;6:e010002 (doi:10.1136/bmjopen-2015-010002).

Wagner FF, Frohmajer A and Flegel WA. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genetics*.2001;2:10.

Wang E, Batey A, Struble C, Musci T, Song K, Oliphant A. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2013;33:662-6.

Wong FCK and Lo YMD. Prenatal Diagnosis Innovation: Genome Sequencing of Maternal Plasma. *Annu Rev Med*.2016;67:419–32.

EDUCACIÓN CONTINUADA EN EL LABORATORIO CLÍNICO COMITÉ DE EDUCACIÓN

D. Balsells, B. Battikhi (*Residente*), R. Deulofeu, M. Gassó, N. Giménez, J.A. Lillo, A. Merino, A. Moreno, A. Peña (*Residente*), M. Rodríguez (*Presidente*), N. Rico, MC. Villà.

ISSN 1887-6463 – Abril 2017 (recibido para publicación Abril 2016).