

Diagnóstico prenatal no invasivo de aneuploidías cromosómicas fetales a través del análisis de ácidos nucleicos en el plasma materno[§]

Y.M. Dennis Lo,* Rossa W.K. Chiu*
Traducción: EBC Luz Elena Alcántara Gómez

RESUMEN

Antecedentes: El descubrimiento de ADN fetal libre circulando en el plasma materno ha abierto nuevas posibilidades para el diagnóstico prenatal no invasivo. El potencial aplicativo de esta nueva tecnología para la detección prenatal no invasiva de aneuploidías cromosomales es un aspecto de este campo que está siendo investigado de manera activa. El principal reto del trabajo en esta área es el hecho de que el ADN fetal libre representa una mínima fracción del total de ácidos nucleicos en el plasma materno. **Métodos y resultados:** Llevamos a cabo una revisión bibliográfica, la cual reveló que los investigadores han aplicado métodos basados en el enriquecimiento físico y molecular de ácidos nucleicos fetales obtenidos a partir del plasma materno. El primero incluye la separación por tamaño del ADN plasmático y el uso del polémico método de tratamiento con formaldehído. El último ha sido posible mediante el desarrollo de marcadores epigenéticos y de ARN fetales. La aneuploidía fetal ha sido explorada a través del uso del análisis de las relaciones alélicas de los marcadores epigenéticos y de ARN en el plasma fetal. La PCR digital ha demostrado tener alta precisión para los análisis de razón alélica y los análisis de la dosis relativa de cromosomas. **Conclusiones:** Después de una década de trabajo, la posibilidad teórica y práctica de detección prenatal de aneuploidías cromosómicas fetales por medio del análisis de ácidos nucleicos plasmáticos ha sido demostrada en estudios utilizando grupos de pocas muestras. Es necesario llevar a cabo estudios independientes a gran escala para validar estas observaciones iniciales. Si estos estudios son exitosos, es de esperarse que con el desarrollo de nuevos

ABSTRACT

Background: The discovery of circulating cell-free fetal nucleic acids in maternal plasma has opened up new possibilities for noninvasive prenatal diagnosis. The potential application of this technology for the noninvasive prenatal detection of fetal chromosomal aneuploidies is an aspect of this field that is being actively investigated. The main challenge of work in this area is the fact that cell-free fetal nucleic acids represent only a minor fraction of the total nucleic acids in maternal plasma. **Methods and results:** We performed a review of the literature, which revealed that investigators have applied methods based on the physical and molecular enrichment of fetal nucleic acid targets from maternal plasma. The former includes the use of size fractionation of plasma DNA and the use of the controversial formaldehyde treatment method. The latter has been achieved through the development of fetal epigenetic and fetal RNA markers. The aneuploidy status of the fetus has been explored through the use of allelic ratio analysis of plasma fetal epigenetic and RNA markers. Digital PCR has been shown to offer high precision for allelic ratio and relative chromosome dosage analyses. **Conclusions:** After a decade of work, the theoretical and practical feasibility of prenatal fetal chromosomal aneuploidy detection by plasma nucleic acid analysis has been demonstrated in studies using small sample sets. Larger scale independent studies will be needed to validate these initial observations. If these larger scale studies prove successful, it is expected that with further development of new fetal DNA/RNA markers and new analytical methods,

* Centre for Research into Circulating Fetal Nucleic Acids, Li Ka Shing Institute of Health Sciences, and Department of Chemical Pathology, The Chinese University of Hong Kong, Prince of Wales Hospital, Shatin, New Territories, Hong Kong SAR, China.

Correspondencia:

Y.M. Dennis Lo

Department of Chemical Pathology,

The Chinese University of Hong Kong, Room 38061, 1/F, Prince of Wales Hospital, Shatin, New Territories, Hong Kong SAR, China. E-mail loym@cuhk.edu.hk.

§ Artículo publicado en: Clin Chem. 2008; 54: 461-6, con autorización de *Clinical Chemistry* para traducción y republicación.

Apoyo financiero: Los autores fueron apoyados por el Área de Fondos de Excelencia del Comité de Fondos de la Universidad de Hong Kong, el Consejo para Fondos en Investigación de Hong Kong, Fondo de Tecnología e Innovación y la Fundación Li KA Shing.

marcadores de ADN/ARN fetal y nuevos métodos analíticos, el diagnóstico molecular prenatal no invasivo de las principales aneuploidías cromosómicas pudiera llegar a ser una práctica rutinaria en un futuro cercano.

Palabras clave: Aneuploidías, diagnóstico prenatal, ácidos nucleicos, plasma materno.

molecular noninvasive prenatal diagnosis of the major chromosomal aneuploidies could become a routine practice in the near future.

Key words: Aneuploidy, prenatal diagnosis, nucleic acids, maternal plasma.

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico prenatal forma parte en la actualidad del cuidado obstétrico moderno. La detección de aneuploidías cromosómicas fetales es la principal razón por la que muchas mujeres embarazadas recurren al diagnóstico prenatal, sin embargo, este diagnóstico requiere obtener material del feto a través de procedimientos como amniocentesis y muestreo de vellosidades coriónicas. Estos métodos son invasivos y constituyen un riesgo para el feto. Para estratificar a las mujeres embarazadas de acuerdo al riesgo de llevar un feto afectado con aneuploidía cromosómica, se han desarrollado varios métodos de escrutinio, incluyendo ultrasonido y análisis bioquímico del suero materno.¹ Sin embargo, estos métodos tienen como blanco fenómenos epigenéticos asociados con aneuploidías cromosómicas en lugar de anormalidades moleculares, y tienen sensibilidad y especificidad limitadas con ventanas de edad gestacional estrictamente definidas durante las cuales se usarán pruebas muy específicas. Para salvar esas limitaciones, existe la necesidad de desarrollar una nueva generación de pruebas no invasivas cuyo blanco sea el centro de la patología molecular de la anormalidad cromosómica fetal.

El descubrimiento en 1977 de ADN fetal libre circulando en el plasma materno ofrece un nuevo acercamiento al diagnóstico prenatal no invasivo.^{1,2} A pesar de que este método puede ser eficientemente aplicado para la detección de blancos genéticos fetales únicos, por ejemplo, el cromosoma Y en un feto masculino³ y el Rh en el grupo sanguíneo, el gen anti D (RHD)[†] en un feto Rh-D positivo,⁴ el desarrollo de pruebas que permitan el uso de este descubrimiento para las aneuploidías cromosómicas fetales ha sido un reto.

Uno de los retos técnicos fundamentales es una consecuencia del hecho de que, entre las semanas 11 y 17 de gestación, el ADN fetal constituye sólo una

media de aproximadamente el 3% del total de ADN libre en el plasma materno,⁵ con la inherente implicación de que la mayoría del ADN en el plasma es de origen materno. De esta forma, la mayoría de los métodos moleculares usados para detectar aneuploidías, cuando son aplicados al plasma materno, estará midiendo esencialmente el estado cromosómico de la madre. Además, debido a que los ácidos nucleicos libres están circulando extracelularmente en el plasma materno, todos los métodos celulares para la detección de aneuploidías, por ejemplo, hibridización de fluorescencia *in situ*, no son aplicables. Esta revisión compila las investigaciones actuales en el uso de ácidos nucleicos libres circulantes en plasma materno para la detección prenatal no invasiva de aneuploidías cromosómicas.

Intentos para solucionar los problemas asociados a la baja concentración de ácidos nucleicos fetales

La concentración de la fracción de ADN fetal libre en plasma materno es determinada por la relación de la concentración absoluta de ADN fetal libre con respecto a la concentración absoluta de ADN libre total (materna y fetal). De tal forma que la fracción de ADN fetal libre puede incrementarse a través del enriquecimiento selectivo de ADN fetal, o a través de la disminución de ADN materno (de fondo). Un esquema de los principales intentos para aumentar la concentración de la fracción de ADN fetal libre se muestra en la *figura 1*.

Fraccionamiento del ADN plasmático por tamaño

El enriquecimiento selectivo de ADN fetal requiere del uso de características del ADN fetal que difieren del ADN materno en el plasma materno. Chan y cols., han demostrado que las moléculas de ADN fetal circulantes son generalmente más pequeñas que las moléculas de ADN materno.⁶ Li y cols., han demostrado que el enriquecimiento de ADN fetal puede llevarse a cabo seleccionando las moléculas de ADN

[†] Genes humanos: RHD, antígeno D del Rh del grupo sanguíneo; PLAC4, placenta-específico 4.

A

$$\% \text{ ADN Fetal} = \frac{\text{ADN Fetal}}{\text{ADN Materno} + \text{ADN Fetal}}$$

B

$$\uparrow \% \text{ ADN Fetal si } \frac{\uparrow \text{ADN Fetal}}{\text{ADN Materno} + \text{ADN Fetal}}$$

C

$$\uparrow \% \text{ ADN Fetal si } \frac{\text{ADN Fetal}}{(\downarrow \text{ADN Materno}) + \text{ADN Fetal}}$$

D

$$\uparrow \% \text{ ADN Fetal si } \frac{\text{ADN Fetal}}{\text{ADN Fetal}}$$

Figura 1. Representación esquemática de los principales enfoques para incrementar la concentración fraccional de ADN fetal libre. La concentración fraccional de ADN fetal en el plasma materno está dada por la razón de la concentración absoluta de ADN libre fetal y el ADN libre total en el plasma materno (A). Enfoques para incrementar la concentración fraccional de ácidos nucleicos fetales en el plasma materno pueden involucrar un enriquecimiento de ADN fetal selectivo (B), supresión del ADN materno de fondo (C), o eliminación de los ácidos nucleicos de fondo maternos por detección de ácidos nucleicos que son virtual y completamente feto-específicos, tales como los marcadores fetales epigenéticos o de ARN fetal (D).

más pequeñas como blanco.⁷ Este método se ha aplicado para favorecer la detección en el plasma materno de mutaciones fetales heredadas por la vía paterna.⁸ Sin embargo, aún es desconocido el grado de enriquecimiento que debería alcanzarse para permitir una detección directa de aneuploidías cromosómicas fetales. Así mismo, el método reportado para el fraccionamiento se basa en una separación por tamaño del ADN plasmático usando electroforesis en gel de agarosa, seguido por la extracción de ADN a través del corte manual de piezas del gel de agarosa conteniendo fracciones de diferente tamaño.⁷ Además de lo laborioso de la técnica, ésta es propensa a contaminación, de tal manera que es necesario que se desarrollen métodos de fraccionamiento de ADN plasmático nuevos y automatizables antes de que este método pueda llevarse a la práctica para el diagnóstico prenatal no invasivo.

Disminución del ADN materno (de fondo)

Con respecto a la disminución del ADN materno, Lui y cols., han demostrado en un modelo de trasplante

de médula ósea de entre sexos opuestos, que la mayoría del ADN plasmático es de origen hematopoyético.⁹ Se ha postulado que las células hematopoyéticas maternas pueden ser el tipo de células que contribuyen en mayor medida al contenido de ácidos nucleicos maternos en plasma.^{10,11} Dhallan y cols., establecen la hipótesis de que la adición de formaldehído podría ocasionar la estabilización de los leucocitos maternos después de la obtención de la muestra, reduciendo la liberación del ADN materno de tales células al plasma, un proceso que pudiera traer como resultado la dilución del ADN fetal en el plasma materno.¹² Aunque los datos iniciales presentados por Dhallan y cols., fueron impresionantes,¹² estos resultados no han sido reproducidos por grupos independientes.^{13,14} Una posible explicación a esta discrepancia en los resultados es el uso por parte de Dhallan y cols., de un método analítico impreciso que podría sobreestimar la fracción de ADN fetal en las muestras con formaldehído.¹⁵ Sin embargo, será interesante evaluar otros conservadores, además del formaldehído, para probar su habilidad de disminuir el ADN materno en el plasma sanguíneo.

Estrategias de enriquecimiento molecular: Marcadores epigenéticos y de ARN fetales

Otro intento por acceder a la baja proporción de ADN fetal es usar como blanco grupos de ácidos nucleicos seleccionados en el plasma materno que son virtualmente por completo feto-específico. Un método es identificar el *loci* que expresa una señal epigenética feto-específica. La epigenética es el campo que estudia los procesos moleculares que afectan la expresión de los genes sin alterar la secuencia del ADN.¹⁶ Uno de los procesos epigenéticos más estudiados es la metilación del ADN. En 2002, Poon y cols., postularon que el *loci* que expresa patrones de metilación diferentes entre tejido materno y fetal podría ser usado para desarrollar marcadores epigenéticos para la detección de ADN fetal en plasma materno.¹⁷ Chim y cols., han reportado que el gen SERPINB5, que codifica para maspin (inhibidor de la serpin peptidasa clase B), está hipometilado en el tejido placentario, mientras que está hipermetilado en las células sanguíneas maternas.¹¹ Debido a que la placenta es la principal fuente de ADN fetal en el plasma materno,^{18,19} y como se discutió en párrafos anteriores, las células hematopoyéticas maternas parecen ser la principal fuente de ADN materno en el plasma, la secuencia hipometilada de SERPINB5 puede servir como un marcador para ADN placentario en el plas-

ma materno. La aplicabilidad de este método epigenético para el diagnóstico prenatal no invasivo ha sido demostrado por la buena correlación entre las concentraciones de las secuencias de SERPINB5 hipometilado y las secuencias SRY de fetos masculinos en plasma materno y la eliminación de secuencias SERPINB5 del plasma materno después del parto.¹¹ La localización de SERPINB5 en el cromosoma 18 ha provisto de una oportunidad invaluable para probar la aplicabilidad de esta señal epigenética para la detección prenatal de aneuploidía cromosómica fetal, usando la trisomía 18 como un sistema modelo (ver en las secciones siguientes).²⁰

Desde el desarrollo del marcador SERPINB5, se han descrito otros marcadores epigenéticos detectables en plasma materno, incluido el gen RASSF1A en el cromosoma 3^{21,22} y numerosos marcadores en el cromosoma 21.^{23,24} A través del uso de los marcadores de metilación específicos de ADN fetal en plasma materno, la señal detectada es prácticamente de origen fetal exclusivamente. Así, se puede conocer con certeza el número de cromosomas fetales en los cuales se localiza el marcador epigenético (ver secciones siguientes). A partir del examen sistemático del cromosoma 21,²⁴ se ha encontrado que los marcadores que dan mucha información para el diagnóstico prenatal no invasivo son relativamente abundantes. La principal limitación del uso de la metilación del ADN como blanco es que muchos de los métodos comúnmente usados para detectar marcadores de metilación de ADN, por ejemplo PCR específica para metilación,²⁵ están basados en la transformación del bisulfito. Se ha visto que la transformación del bisulfito ha dado como resultado una degradación masiva del ADN.²⁶ Esta característica indeseable va en detrimento de la detección de marcadores de ADN fetal circulante, ya que existe una cantidad relativamente limitada de moléculas blanco en una muestra en particular. Considerando esto, los marcadores que son hipermetilados en placenta e hipometilados en las células sanguíneas maternas tienen un valor particular debido a que se pueden utilizar enzimas de restricción sensibles a la metilación que pueden cortar secuencias hipometiladas y dejar secuencias hipermetiladas intactas para destruir de manera selectiva las secuencias maternas en el plasma materno.²² La extensión del enfoque basado en marcadores de enzimas de restricción que muestra un patrón inverso de la metilación del ADN diferencial, es decir hipometilado en la placenta e hipermetilado en las células sanguíneas de la madre, requerirá de métodos que permitan la detección selectiva de las secuencias restringidas (por

ejemplo hipometiladas). Uno de estos intentos ha sido descrito recientemente, que se basa en el uso de un primer de *stem-loop*.²⁷ Otro posible intento es a través del desarrollo de nuevas enzimas de restricción específicas para ADN metilado (materno) mientras que dejan el ADN hipometilado intacto (fetal).

Las moléculas de ARN representan otro grupo de ácidos nucleicos en el plasma materno que pueden ser usados como blanco de moléculas fetales específicas. El ARN fetal fue detectado en plasma materno por primera vez en el año 2000.²⁸ Este hallazgo fue seguido por un trabajo que demuestra la extraordinaria estabilidad de las moléculas de ARN en plasma,²⁹ posiblemente a través de su asociación con material particulado,³⁰ un fenómeno que ha sido postulado como protección del ARN contra la degradación de las ARNasas plasmáticas.³¹ Un importante hallazgo fue la demostración de que el ARN mensajero (ARNm) placentario representa una fuente importante de ARN fetal en el plasma materno.³² Este último descubrimiento, y el hecho de que las células hematopoyéticas maternas son las que contribuyen en mayor medida con ácidos nucleicos de origen materno en el plasma materno, han permitido el desarrollo de un microarreglo sistemático que permite la identificación de nuevos marcadores de ARNm placentarios adecuados para la detección en el plasma materno.¹⁰ Esta serie de hallazgos han permitido la demostración de que el ARNm proveniente de genes localizados en el cromosoma 21 pueden ser detectados en el plasma materno.^{33,34} Uno de estos genes para el ARNm en plasma materno que ha demostrado ser completamente feto-específico es el placenta-específico 4 (PLACA4).³⁴ Así, con la identificación de marcadores ARNm feto-específicos en plasma materno de un cromosoma involucrado en una aneuploidía cromosómica, lo único que queda es desarrollar una tecnología para obtener información del número de copias de tal marcador (ver en las siguientes secciones).

Una ventaja clave de los marcadores ARN plasmáticos es que hay un proceso de amplificación intrínseco en el cual un gen es transcrito en múltiples copias de ARNm. Otra ventaja es que los marcadores de ARN plasmático pueden ser detectados en la práctica por medio de una PCR usando transcriptasa reversa u otras tecnologías de amplificación. La principal desventaja es que en muchos procedimientos reportados, el plasma fue tratado con TRIZOL para estabilizar ARN plasmático durante el almacenamiento,³⁴ de tal forma que aquellos plasmas guardados que no hayan sido tratados de esta forma no son adecuados para el análisis del ARN plasmático.

Esfuerzos por determinar la cantidad (dosis) de cromosoma fetal en los ácidos nucleicos libres en plasma materno

Aunque los esfuerzos físicos o moleculares para el enriquecimiento de ácidos nucleicos fetales pueden hacer que la proporción de ácidos nucleicos fetales sea más fácilmente detectable en plasma materno, se requiere de métodos que permitan el cálculo del número de aneuploidías cromosómicas potenciales en el genoma fetal. Estudios previos han mostrado que la concentración de ARN fetal en plasma materno se incrementa en embarazo con ciertas aneuploidías fetales tales como trisomía 21.³⁵ Sin embargo, las grandes variaciones interindividuales en las concentraciones de ADN fetal y de ARNm de PLACA4 en plasma materno, han evitado el uso de la simple cuantificación como una medida robusta para la identificación de aneuploidías fetales.³⁴ De tal forma que se necesitan estrategias que permitan la determinación objetiva de la dosis de cromosoma fetal. Los principales métodos para esto se muestran en la *figura 2*.

Análisis de la razón alélica

Un intento para determinar la dosis de cromosoma fetal es por medio del análisis de la razón alélica de las variaciones genéticas en el locus detectado. Este método puede ser usado sólo si el feto es heterocigoto a este locus. Esta técnica puede ser utilizada en combinación con las mencionadas en la sección anterior, cuando las moléculas detectadas están suficientemente enriquecidas para tener blancos fetales. La ilustración más simple de este concepto es la búsqueda molecular de objetivos feto-específicos utilizando marcadores de metilación de ADN o marcadores de ARNm placentarios. Para los marcadores de metilación de ADN, la primera demostración es el uso de secuencias SERPINB5 hipometiladas como un blanco feto-específico en el cromosoma 18.¹¹ A través de la determinación de la razón alélica de un polimorfismo nucleotídico único (SNP³) en el promotor SERPINB5 hipometilado en fetos heterocigotos, la trisomía 18 puede ser detectada.²⁰ Este método es llamado razón alélica epigenética. Con el reconocimiento de los marcadores de

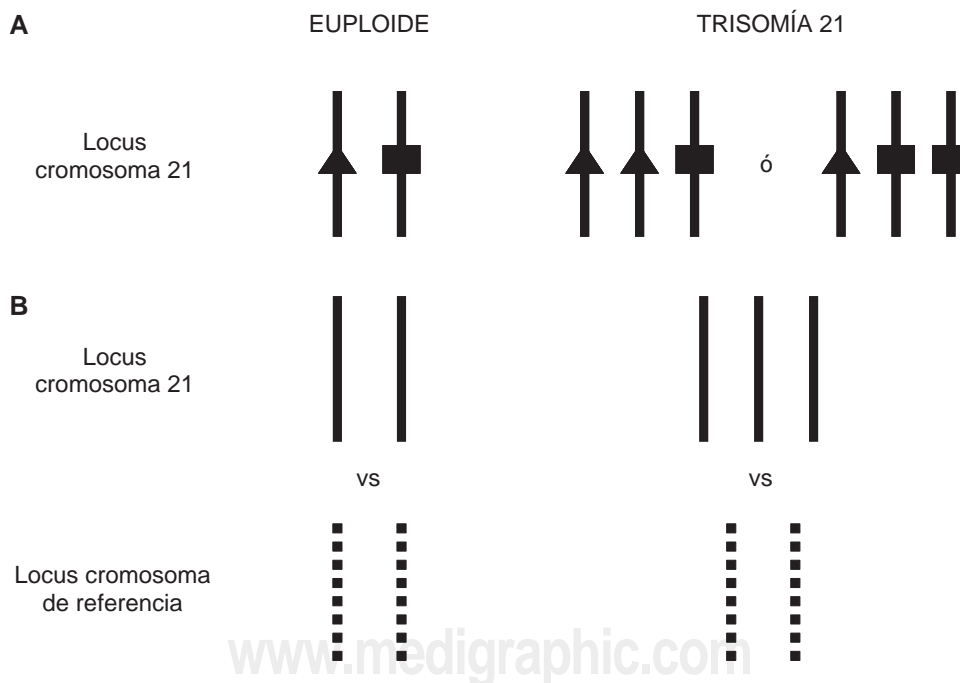


Figura 2. Enfoques para determinar la dosis de cromosomas fetales en ácidos nucleicos libres en plasma materno usando un ejemplo de trisomía 21. **(A)** El análisis de razón alélica involucra la determinación de la razón entre los alelos de un locus heterocigoto localizado en el cromosoma 21. La razón alélica de ese locus puede esperarse que sea 1:1 para un feto euploide, pero 2:1 o 1:2 para un feto trisómico. **(B)** El análisis de dosis cromosómica incluye la valoración de la razón entre un locus de cromosoma 21 y un locus de referencia no cromosoma 21. Puede esperarse que la razón entre las moléculas de ácidos nucleicos derivados del feto sea 2:2 para un feto euploide, pero 3:2 para un feto trisómico.

metilación de ADN en el cromosoma 21,²⁴ este método se puede aplicar potencialmente para la detección prenatal no invasiva de la trisomía 21.

Para los marcadores de ARN, la primera aplicación demostrada de la razón alélica fue para un SNP en la región que se expresa de PLACA4.³⁴ Este método es llamado el acercamiento ARN-SNP. Las primeras series usando el acercamiento ARN-SNP establecieron una sensibilidad del 90% y una especificidad del 96.5% para la detección de trisomía 21 fetal a partir de plasma materno.³⁴ Estos resultados sugieren que para los casos informativos (heterocigotos) el acercamiento ARN-SNP es por sí mismo el marcador prenatal no invasivo más exacto para detección de trisomía 21 fetal.

Los intentos para mejorar la sensibilidad y especificidad diagnóstica del acercamiento ARN-SNP aún están por realizarse. Se ha demostrado que la medición robusta de la razón alélica ARN-SNP requiere al menos 1,000 moléculas por reacción.³⁴ Se ha demostrado recientemente que a través del uso de PCR digital es posible reducir el número requerido de copias de las moléculas.³⁶ La PCR digital es un método para análisis molecular que se lleva a cabo en una muestra diluida a tal concentración que en promedio cada reacción contendrá ≤ 1 molécula blanco.³⁷ De esta manera, una proporción de las reacciones serán negativas, debido a la ausencia de la molécula blanco en una reacción dada. Para la serie de reacciones que dan como resultado una detección positiva, la mayoría de las reacciones serán positivas debido a la presencia de una molécula blanco única. Debido al uso de este método, el número de moléculas blanco puede ser calculado de manera exacta. En el contexto de la versión digital del análisis de la razón alélica ARN-SNP, el número de cada alelo ARN será contado. La aneuploidía fetal puede entonces ser detectada a través del análisis estadístico adecuado para determinar la probabilidad de que un alelo esté sobre-representado, por ejemplo, cuando la trisomía está presente.³⁶ Con la PCR digital, el estado de aneuploidía fetal puede ser determinado de manera muy exacta con sólo unos pocos cientos de moléculas, abriendo la posibilidad para la aplicación de este método en un estadio muy temprano de la gestación, al momento en el que las concentraciones de ARNm PLACA4 circulante en plasma materno es relativamente bajo.³¹ La principal desventaja de las técnicas basadas en PCR digital es la serie de requerimientos para llevar a cabo análisis de PCR múltiples por muestra probada, un proceso que es tedioso cuando se lleva a cabo manualmente. Sin embargo, con el desarrollo de estrategias auto-

matizadas para el análisis de PCR digitales, tales como microfluidos,³⁸ las variantes de la emulsión de PCR,^{39,40} y diversos enfoques para llevar a cabo el análisis de secuencias paralelas masivas,⁴¹ es posible que dicho sistema eventualmente podría ser utilizado de manera rutinaria en el diagnóstico.

Análisis de la dosis relativa de cromosomas

La principal desventaja del análisis basado en la razón alélica es la necesidad de que el feto sea heterocigoto para los polimorfismos genéticos que están siendo analizados. Para salvar este requerimiento, se necesita un método que mida directamente la dosis relativa de diferentes cromosomas. Sin embargo, los métodos convencionales para ello (PCR en tiempo real, por ejemplo,⁴² y la cuantificación de secuencias parálogas⁴³) no pueden ser utilizadas directamente debido a la baja concentración de la fracción de ADN fetal circulante. Una posible solución es combinar los métodos convencionales para el análisis de la dosis relativa de cromosomas con métodos para el enriquecimiento físico (por ejemplo fraccionamiento por tamaño del ADN plasmático⁷ y disminución del ADN materno de fondo⁴⁴) o el enriquecimiento molecular de ADN fetal (metilación específica de ADN fetal^{23,24}) como fue discutido previamente en este reporte.

Una solución alterna es el desarrollo de estrategias analíticas que puedan llevar a cabo un análisis relativo de cromosomas a pesar de la baja concentración de la fracción de ADN fetal circulante en plasma materno. En este sentido, la iniciativa basada en la PCR digital, que ha sido discutida previamente en esta revisión en el contexto de un análisis de la razón alélica, también puede ser aplicada para el análisis de dosis cromosómica, la llamada técnica digital para determinar la dosis relativa de cromosomas.³⁶ En este método, el análisis de PCR digital es llevado a cabo para uno o más blancos localizados en el cromosoma involucrado en la trisomía (por ejemplo cromosoma 21) y para uno o más blancos localizados en un cromosoma de referencia no involucrado en la trisomía. A través del uso de los procedimientos estadísticos adecuados para probar la presencia de una sobre-representación de reacciones, involucrando el cromosoma potencialmente aneuploídico, se ha demostrado que la medición de la dosis digital relativa de cromosomas posee el suficiente poder de discriminación como para detectar la presencia de ADN proveniente de un feto con trisomía, aun si el ADN trisómico constituye únicamente el 10% de la muestra probada.³⁶ Queda de manifiesto que la técnica digital para determinar la dosis relati-

va de cromosomas puede ser combinada con métodos físicos^{7,12} y moleculares^{11,23,24} para el enriquecimiento de ADN fetal descrito anteriormente. Se espera que el poder de discriminación de la PCR digital permita un sistema de detección de aneuploidías basado en un grado de enriquecimiento de ADN fetal, que de otra forma sería insuficiente para los sistemas de PCR no digitales convencionales.

CONCLUSIONES

Después de una década de investigaciones se ha demostrado que la detección prenatal no invasiva de aneuploidías cromosómicas puede ser llevada a cabo a través de análisis de ácidos nucleicos fetales libres en plasma materno. Hasta ahora, los estudios de factibilidad se han llevado a cabo utilizando grupos de experimentación de pocas muestras. Se requiere que en los próximos años se realicen estudios independientes a gran escala para validar estas observaciones iniciales. Se espera el desarrollo de nuevos marcadores de ADN/ARN y métodos analíticos que permitan que el diagnóstico molecular prenatal no invasivo de las aneuploidías cromosómicas principales sea una realidad práctica rutinaria, en un futuro cercano. Tales investigaciones harán que las pruebas prenatales sean más seguras y menos estresantes para los millones de mujeres embarazadas que cada año se las realizan.

Conflicto de intereses: Los autores tienen las patentes o bien está en trámite la patente del diagnóstico prenatal basado en ácidos nucleicos. YMDL es el asesor especializado para Sequenom, Inc. Sequenom tiene la licencia de propiedad intelectual en el diagnóstico prenatal no invasivo.

REFERENCIAS

- Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997; 350: 485-7.
- Lo YMD, Chiu RWK. Prenatal diagnosis: progress through plasma nucleic acids. *Nat Rev Genet*. 2007; 8: 71-7.
- Costa JM, Benachi A, Gautier E. New strategy for prenatal diagnosis of X-linked disorders. *N Engl J Med*. 2002; 346: 1502.
- Lo YMD, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med*. 1998; 339: 1734-8.
- Lo YMD, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet*. 1998; 62: 768-75.
- Chan KCA, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*. 2004; 50: 88-92.
- Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, Kang A, Holzgreve W, Hahn S. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin Chem*. 2004; 50: 1002-11.
- Li Y, Di Naro E, Vitucci A, Zimmermann B, Holzgreve W, Hahn S. Detection of paternally inherited fetal point mutations for beta-thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma. *JAMA*. 2005; 293: 843-9.
- Lui YYN, Chik KW, Chiu RWK, Ho CY, Lam CW, Lo YMD. Predominant hematopoietic origin of cell free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem*. 2002; 48: 421-7.
- Tsui NBY, Chim SSC, Chiu RWK, Lau TK, Ng EKO, Leung TN, et al. Systematic microarray-based identification of placental mRNA in maternal plasma: towards non-invasive prenatal gene expression profiling. *J Med Genet*. 2004; 41: 461-7.
- Chim SSC, Tong YK, Chiu RWK, Lau TK, Leung TN, Chan LYS, et al. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 14753-8.
- Dhallan R, Au WC, Mattagajasingh S, Emche S, Bayliss P, Damewood M, et al. Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered from the maternal circulation. *JAMA*. 2004; 291: 1114-9.
- Chung GTY, Chiu RWK, Chan KCA, Lau TK, Leung TN, Lo YMD. Lack of dramatic enrichment of fetal DNA in maternal plasma by formaldehyde treatment. *Clin Chem*. 2005; 51: 655-8.
- Chinnapapagari SK, Holzgreve W, Lapaire O, Zimmermann B, Hahn S. Treatment of maternal blood samples with formaldehyde does not alter the proportion of circulatory fetal nucleic acids (DNA and mRNA) in maternal plasma. *Clin Chem*. 2005; 51: 652-5.
- Chung GTY, Chiu RWK, Chan KCA, Lau TK, Leung TN, Chan LW, Lo YMD. Detrimental effect of formaldehyde on plasma RNA detection. *Clin Chem*. 2005; 51: 1074-6.
- Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002; 3: 415-28.
- Poon LLM, Leung TN, Lau TK, Chow KCK, Lo YMD. Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*. 2002; 48: 35-41.
- Flori E, Doray B, Gautier E, Kohler M, Ernault P, Flori J, Costa JM. Circulating cell-free fetal DNA in maternal serum appears to originate from cyto and syncytio-trophoblastic cells: case report. *Hum Reprod*. 2004; 19: 723-4.
- Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattah S, Avent N, Soothill PW. Free fetal DNA in maternal plasma in an embryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn*. 2007; 27: 415-8.
- Tong YK, Ding C, Chiu RWK, Gerovassili A, Chim SSC, Leung TY, et al. Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: theoretical and empirical considerations. *Clin Chem*. 2006; 52: 2194-202.
- Chiu RWK, Chim SSC, Wong IHN, Wong CS, Lee WS, To KF, et al. Hypermethylation of RASSF1A in human and rhesus placentas. *Am J Pathol*. 2007; 170: 941-50.
- Chan KCA, Ding C, Gerovassili A, Yeung SW, Chiu RWK, Leung TN, et al. Hypermethylated RASSF1A in maternal

- plasma: a universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. *Clin Chem.* 2006; 52: 2211-8.
23. Old RW, Crea F, Puszyk W, Hulten MA. Candidate epigenetic biomarkers for non-invasive prenatal diagnosis of Down syndrome. *Reprod Biomed Online.* 2007; 15: 227-35.
 24. Chim SSC, Jin S, Lee TYH, Lun FMF, Lee WS, Chan LYS, et al. Systematic search for placental epigenetic markers on chromosome 21: towards noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 21. *Clin Chem.* 2008; 54: 500-11.
 25. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 9821-6.
 26. Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: E65-5.
 27. Tong YK, Chiu RWK, Leung TY, Ding C, Lau TK, Leung TN, Lo YMD. Detection of restriction enzyme-digested target DNA by PCR amplification using a stem-loop primer: application to the detection of hypomethylated fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem.* 2007; 53: 1906-14.
 28. Poon LLM, Leung TN, Lau TK, Lo YMD. Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem.* 2000; 46: 1832-4.
 29. Tsui NBY, Ng EKO, Lo YMD. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem.* 2002; 48: 1647-53.
 30. Ng EKO, Tsui NBY, Lam NY, Chiu RWK, Yu SC, Wong SC, et al. Presence of filterable and nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals. *Clin Chem.* 2002; 48: 1212-7.
 31. Hasselmann DO, Rapp G, Tilgen W, Reinhold U. Extracellular tyrosinase mRNA within apoptotic bodies is protected from degradation in human serum. *Clin Chem.* 2001; 47: 1488-9.
 32. Ng EKO, Tsui NBY, Lau TK, Leung TN, Chiu RWK, Panesar NS, et al. mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 4748-53.
 33. Oudejans CB, Go AT, Visser A, Mulders MA, Westerman BA, Blankenstein MA, van Vugt JM. Detection of chromosome 21-encoded mRNA of placental origin in maternal plasma. *Clin Chem.* 2003; 49: 1445-9.
 34. Lo YMD, Tsui NBY, Chiu RWK, Lau TK, Leung TN, Heung MMS, et al. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med.* 2007; 13: 218-23.
 35. Lo YMD, Lau TK, Zhang J, Leung TN, Chang AM, Hjelm NM, et al. Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clin Chem.* 1999; 45: 1747-51.
 36. Lo YMD, Lun FMF, Chan KCA, Tsui NBY, Chong KC, Lau TK, et al. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104: 13116-21.
 37. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 9236-41.
 38. Warren L, Bryder D, Weissman IL, Quake SR. Transcription factor profiling in individual hematopoietic progenitors by digital RT-PCR. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103: 17807-12.
 39. Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 8817-22.
 40. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102: 16368-73.
 41. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature (Lond).* 2005; 437: 376-80.
 42. Zimmermann B, Holzgreve W, Wenzel F, Hahn S. Novel real-time quantitative PCR test for trisomy 21. *Clin Chem.* 2002; 48: 362-3.
 43. Deutsch S, Choudhury U, Merla G, Howald C, Sylvan A, Antonarakis SE. Detection of aneuploidies by paralogous sequence quantification. *J Med Genet.* 2004; 41: 908-15.
 44. Dhallan R, Guo X, Emche S, Damewood M, Bayliss P, Cronin M, et al. A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study. *Lancet.* 2007; 369: 474-81.