



Prueba prenatal no invasiva (NIPT) en sangre materna a través de secuenciación masiva paralela (MPS). Experiencia inicial en mujeres mexicanas y revisión de la bibliografía

Mariana Hernández-Gómez¹

Eva Ramírez-Arroyo²

Ricardo Meléndez-Hernández³

Luz María Garduño-Zarazúa³

Dora Gilda Mayén-Molina⁴

¹ Médico especialista en genética.

² Biología molecular.

³ Citogenética.

⁴ Jefe de la unidad.

Unidad de Genética, Hospital Ángeles Lomas, Huixquilucan, Estado de México.

RESUMEN

Antecedentes: a partir del descubrimiento del ADN fetal libre (cffDNA) en sangre materna por Lo y colaboradores en 1997, se abrió la posibilidad de realizar una prueba prenatal no invasiva (NIPT). La utilidad clínica de esta prueba radica en el análisis de las tres aneuploidías más frecuentes y la identificación del sexo del feto. Mediante la secuenciación masiva paralela (MPS) se amplifica y detecta el origen de cada secuencia, lo que permite la exploración de la sobrerepresentación o disminución de algún cromosoma fetal en el plasma materno. Esta técnica ha sido validada y facilita la detección de las trisomías 13, 18 y 21 a partir de la semana 10 de gestación. Se espera que con la aplicación de esta prueba se realicen menos estudios invasores y que disminuya el riesgo de pérdida fetal que conllevan.

Objetivo: comunicar la experiencia inicial de la Unidad de Genética del Hospital Ángeles Lomas en la aplicación de la prueba prenatal no invasiva a través de secuenciación masiva paralela como método de tamiz para aneuploidías y determinación del sexo fetal.

Método: estudio observacional, descriptivo y prospectivo de una base de datos de pacientes a quienes se realizó la prueba prenatal no invasiva (prueba Harmony®) de agosto de 2013 a la enero de 2015 en la Unidad de Genética del Hospital Ángeles Lomas, lo encontrado se correlacionó con lo reportado en la bibliografía. Las muestras de sangre materna se analizaron en Ariosa Diagnostics San José, California, Estados Unidos.

Resultados: se efectuaron 42 pruebas. El promedio de edad materna fue de 37.1 años, la edad gestacional de 13.3 semanas y el porcentaje de la fracción de DNA fetal de 12.7%. Se encontraron dos casos con riesgo alto de trisomía 18 y dos para monosomía del cromosoma X. Sólo en un caso se aplicó la prueba para detectar el sexo del feto debido a que la madre padecía la enfermedad de Wiskott Aldrich (W-A), que está ligada al cromosoma X. En todos los casos de bajo riesgo el resultado se corroboró al momento del nacimiento, y el sexo fetal concordó con lo reportado en el estudio.

Recibido: febrero 2015

Aceptado: marzo 2015

Correspondencia

Dra. Dora Gilda Mayén-Molina

dgmayan32@gmail.com

Este artículo debe citarse como:

Hernández-Gómez M, Ramírez-Arroyo E, Meléndez-Hernández R, Garduño-Zarazúa LM, Mayén-Molina DG. Prueba prenatal no invasiva (NIPT) en sangre materna a través de secuenciación masiva paralela (MPS). Experiencia inicial en mujeres mexicanas y revisión de la bibliografía. Ginecol Obstet Mex 2015;83:277-288.

Conclusiones: en esta serie la indicación más frecuente fue la edad materna mayor a 35 años. El peso de las mujeres es importante porque se trata de un factor relacionado con el porcentaje de cffDNA. En los casos con alto riesgo de monosomía X, en los que el resultado citogenético fue 46,XX, se consideraron diversas causas, como disomía uniparental, mosaicismo y contaminación materna antes de confirmar un resultado falso positivo. En el caso en que se aplicó la prueba para conocer el sexo fetal por antecedente de enfermedad de Wiskott Aldrich, se confirmó en líquido amniótico. En los casos de resultados de alto riesgo antes de tomar una decisión obstétrica, es indispensable la confirmación con un método invasivo. Aún se requieren más estudios para validar esta prueba a través de diferentes técnicas moleculares y en diversos grupos de pacientes.

Palabras clave: prueba prenatal no invasiva, ADN libre fetal, tamiz prenatal.

Non invasive prenatal test (NIPT) in maternal blood by parallel massive sequencing. Initial experience in Mexican women and literature review

ABSTRACT

Background: Discovery of cell-free fetal DNA (cffDNA) in maternal blood in 1997 by Lo et al. has opened the possibility of a non-invasive prenatal test (NIPT). Currently, it is employed in the analysis of aneuploidies and fetal sex determination. Massive parallel sequencing (MPS) detects the origin of each amplified sequence, and analyses over-representation of sequences or any decrease in the fetal chromosomes in maternal plasma. This technique has been validated and allows assessment of trisomies 13, 18 and 21, obtaining the result in about a week from 10-weeks of gestational age. By using NIPT, we expect a reduction in the number of invasive studies and the risk of fetal loss.

Objective: To communicate the experience obtained at Genetics Clinic of the Hospital Angeles Lomas, in the use of NIPT by MPS as a method of prenatal screening for aneuploidies and fetal sex determination.

Material and methods: A prospective, observational and descriptive study was carried out in order to develop a database of patients who underwent NIPT (Harmony test[®]) from August 2013 to date. Maternal blood samples were analyzed at Ariosa Diagnostics Inc. at San Jose California, USA.



Results: Non-invasive prenatal test was applied to 42 patients, with average maternal age of 37.1 years. The percentage of gestational age was 13.3 weeks and of fetal fraction was 12.7%. Two cases of high risk of trisomy 18 and two cases with high risk for X monosomy were obtained. In only one case the test was used for fetal determination, because of a story of Wiskott-Aldrich (W-A) disease. In all cases of low risk, the result was confirmed at birth and fetal sex was consistent with reports of literature.

Conclusions: NIPT is currently the screening test with the highest detection rate (greater than 98%, with a false negative rate lesser than 0.5% and a sensitivity and specificity close to 100%), although it can vary from one chromosome to another. It is indicated for women with a result of high risk for trisomy 13, 18 and 21. This test has not been validated for low risk women or multiple pregnancies. In our series, the most frequent indication was advanced maternal age. The weight of the patients is important because it is a factor related to the percentage of fetal DNA. In cases with high risk for X monosomy in which the cytogenetic result was 46,XX, it is important to consider as much causes as possible, such as uniparental disomy (UPD), mosaicism and maternal contamination. Only in a case with W-A story the test was conducted specifically for fetal sex determination and confirmed by amniocentesis. In the cases of high-risk results, confirmation by an invasive method, before an obstetric decision, is indispensable. Further studies are still needed to continue the validation of this test by different molecular techniques and in other groups of patients.

Key words: non-invasive prenatal test (NIPT), cell-free-fetal DNA (cffDNA), prenatal screening.

ANTECEDENTES

En México, como en otros países, el tamiz prenatal se debe ofrecer a toda mujer embarazada, en dos etapas: una en el primer y otra en el segundo trimestre para detectar las aneuploidías más frecuentes, antes de llevarla a un procedimiento invasivo para diagnóstico. En este momento el método de tamiz más utilizado para establecer un riesgo individual para trisomía 21 es el doble marcador combinado, que incluye dos marcadores séricos: la proteína A plasmática asociada al embarazo (PAPP-A) y la fracción beta libre de la hormona gonadotropina coriónica (hCG) combinada con la translucencia nucal y algunos otros

marcadores ultrasonográficos. Cuando la paciente tenga riesgo alto *a priori* por antecedentes personales de trisomías 13, 18 o 21 se debe indicar un método invasor como biopsia de vellosidades coriales, o amniocentesis para realizar cariotipo fetal. Estas técnicas invasoras tienen un riesgo de pérdida fetal aproximado de 0.6% en los siguientes 14 días del procedimiento y de 2% durante todo el embarazo.¹ Debido a este riesgo hay interés en el desarrollo de técnicas de detección no invasoras para aneuploidías que puedan efectuarse a edad gestacional temprana.

Desde el descubrimiento del ADN fetal libre (cffDNA) en sangre materna en 1997, debido

a Lo et al, la posibilidad de realizar una prueba prenatal no invasiva (NIPT, por sus siglas en inglés) ha sido ampliamente explorada. El porcentaje de *cffDNA* representa una fracción de 3 a 13% del total de ADN libre en sangre materna en el primer y segundo trimestres, y alcanza incluso 10 a 20% en el tercer trimestre.² El *cffDNA* circulante proviene sobre todo de la placenta y es eliminado rápidamente después del nacimiento.

La aplicación clínica inicial fue en desórdenes monogénicos, por lo que se denominó diagnóstico prenatal no invasivo; sin embargo, actualmente destaca su utilidad en la determinación del sexo fetal y el análisis de aneuploidías, pero hasta este momento no se considera prueba diagnóstica, sino de tamiz, por lo que se modificó su nombre a prueba prenatal no invasiva (NIPT).³⁻⁵

Por medio de la secuenciación masiva paralela (MPS por sus siglas en inglés) y de diversos métodos analíticos, se detecta el origen de cada secuencia amplificada y se analiza la sobrerepresentación o disminución de secuencias de cualquier cromosoma fetal en el plasma materno, infiriendo así el complemento cromosómico fetal de algunos cromosomas.^{3,4} Esta técnica ha sido validada y permite la evaluación de trisomías 13, 18 y 21; el resultado se obtiene aproximadamente en una semana a partir de la semana 10 de gestación. Con la aplicación de esta prueba, como un complemento del tamiz que actualmente se utiliza, se espera una reducción del número de estudios invasores y del riesgo de pérdida fetal que conllevan.⁶

El objetivo de esta investigación es comunicar la experiencia inicial de la Unidad de Genética del Hospital Ángeles Lomas en la aplicación de la prueba prenatal no invasiva a través de la secuenciación masiva paralela como método de tamiz para aneuploidías y determinación del sexo fetal.

MÉTODOS

Estudio observacional, descriptivo y prospectivo realizado como parte del programa integral de atención a mujeres embarazadas que solicitan la prueba prenatal no invasiva, que incluye asesoramiento genético previo y posterior a dicha prueba estudio confirmatorio de cariotipo en los resultados de alto riesgo para cualquiera de las aneuploidías detectadas y seguimiento al nacimiento. A todas las pacientes se les solicitó estudio de ultrasonido para verificar la edad gestacional y descartar marcadores fetales de cromosomopatía, dado que en este último caso la indicación es un estudio de diagnóstico a través de procedimiento invasor. Previo asesoramiento de un médico genetista se obtuvo consentimiento informado verbal y escrito, y se tomaron 20 mL de sangre periférica en tubos vacutainer, que se enviaron a temperatura ambiente para la extracción de *cffDNA* (Harmony®Prenatal Test; Ariosa Diagnostics, Inc, San José, California, EUA). El ADN se extrajo de la muestra materna y se realizó secuenciación selectiva con análisis digital de regiones específicas (DANSR®). El riesgo de aneuploidías, a partir de la fracción fetal, se evaluó mediante un algoritmo previamente diseñado para este fin (FORTE®). Los riesgos para trisomías 13, 18 y 21 se proporcionaron en porcentajes mayores de 99 y menores de 0.01%.

Se elaboró una base de datos de las pacientes a quienes se practicó la prueba prenatal no invasiva de agosto de 2013 a enero de 2015 en la Unidad de Genética del Hospital Ángeles Lomas y se correlacionó con lo reportado en la bibliografía.

RESULTADOS

Se realizaron 42 pruebas. La edad materna promedio fue de 37.1 años (límites de 23 y 46 años), edad gestacional de 13.3 semanas (lími-



tes 10.0 y 18.6), porcentaje de la fracción de ADN fetal de 12.7% (límites 0.0 y 21.9) y las indicaciones fueron: edad materna avanzada en 30 casos, decisión del médico tratante en 6, tamiz combinado positivo del primer trimestre en 3, entre ellos un caso de angustia materna por enfermedad recesiva ligada al cromosoma X, y pérdida gestacional recurrente en 3 pacientes. Del total de pruebas efectuadas, en un caso no fue posible detectar la fracción de DNA fetal, por lo que se ofreció repetir la prueba; sin embargo, el médico y la paciente optaron por realizar un estudio de marcadores bioquímicos y ultrasonido en el segundo trimestre de la gestación. En todos los demás casos se obtuvo el resultado en la primera toma, y en todos se mantuvo el seguimiento hasta la resolución del embarazo.

Cuatro pacientes mostraron riesgo alto de aneuploidías y 37 riesgo bajo. En estas últimas se confirmó el resultado al nacimiento, así como el sexo fetal, que hasta el momento es concordante en todos los casos. Entre los resultados con riesgo alto para aneuploidía se encontraron 2 casos para trisomía 18, en uno de ellos no fue posible realizar el estudio confirmatorio con cariotipo por pérdida gestacional, pero los datos ultrasonográficos y el tamiz bioquímico del primer trimestre correspondían a la probabilidad diagnóstica; y en el segundo caso se confirmó el resultado mediante amniocentesis 47,XX,+18. Se continuó el seguimiento al nacimiento, que se resolvió a las 31 semanas por preeclampsia y se corroboró nuevamente el resultado en sangre de cordón umbilical. También se detectaron dos casos con monosomía del cromosoma X. En el primero se realizó cariotipo fetal mediante amniocentesis, con resultado 46,XX, que se confirmó al nacimiento; y en el segundo se perdió el embarazo de forma espontánea 3 semanas después de la prueba prenatal no invasiva, y el cariotipo en tejido embrionario mostró células 45,X y 46,XX, aparentemente por contaminación con células maternas, determinado por marca-

dores de secuencias repetitivas en tandem (STR). Sólo en un caso se usó la prueba específicamente para detectar el sexo fetal debido a que la madre era portadora de la delección 229delG en heterocigosis en el exón 2 del gen *WAS* para la enfermedad de Wiskott Aldrich, que está ligada al cromosoma X. Posterior a la prueba prenatal no invasiva se confirmó por amniocentesis el sexo masculino del feto (Cuadro 1).

DISCUSIÓN

La indicación más frecuente de las pruebas realizadas fue que la madre tuviera más de 35 años (30 pacientes, 0.71), seguida de la solicitud por parte del ginecólogo tratante (0.14). Durante el asesoramiento previo a la prueba se informaron de manera explícita a las pacientes y a los médicos, cuando fue posible, las indicaciones ya validadas y los protocolos existentes para su aplicación, y a pesar de esto decidieron realizarla.

Las recomendaciones emitidas hasta el momento establecen que la prueba prenatal no invasiva está indicada en mujeres con riesgo alto, es decir, con indicación clínica para realizarse un estudio invasivo (Cuadro 2). La prueba prenatal no invasiva se utiliza actualmente como tamiz para algunas aneuploidías, por lo que no debe considerarse diagnóstica, y su utilidad clínica es la evaluación de mujeres con riesgo alto para trisomías 13, 18 y 21.^{6,7} En estudios retrospectivos que usaron muestras almacenadas de mujeres con riesgo elevado para estas trisomías se demostró una tasa de detección mayor de 98%, con una tasa de falsos positivos menor de 0.5%; sin embargo, en algunos estudios se encontró variación en los valores de sensibilidad (58.82 a 100%) y especificidad (83.3 a 100%).^{8,9} La unificación de los resultados obtenidos no ha sido posible debido a que se han utilizado diferentes técnicas moleculares. Si bien la mayor parte de los estudios se basa en secuenciación masiva paralela, existen dos variantes de esta

Cuadro 1. Resumen de resultados

Caso	Edad materna	Peso	Edad gestacional	% DNA fetal	Inicio	Resultado	Análisis de X y Y
1	32	-	15.2	13.3	Portadora XR	Bajo	M
2	36	-	14.3	14.1	Tamiz positivo 1 ^{er} trimestre	Bajo	M
3	39	-	10.3	10.6	EMA	Bajo	M
4	35	66	14	4.6	EMA	Bajo	F
5	42	56	12.4	14.1	EMA	Bajo	F
6	36	52	16.4	17.8	EMA	Bajo	F
7	34	54	15	8.9	Angustia materna	Bajo	M
8	36	63	18.1	15.57	EMA	Bajo	M
9	46	69	11.5	15.2	EMA y tamiz positivo	Elevado para TIS	F
10	39	-	15.4	9.5	EMA	Bajo	F
11	41	-	11.1	15.7	EMA	Bajo	M
12	39	-	14.4	14.9	EMA	Bajo	F
13	38	75	18.6	21.9	EMA	Bajo	F
14	39	67	10.2	12.4	EMA	Bajo	F
15	42	64	17.4	14.4	EMA	Bajo	F
16	38	57.5	10.4	7.8	EMA	Bajo	M
17	40	56	15.1	17.4	EMA	Bajo	F
18	36	72	13.5		Tamiz positivo 1 ^{er} trimestre	Bajo	F
19	43	62	10.5	5.5	EMA	Bajo	M
20	40	56	12.6	9.5	EMA	Bajo	F
21	27	112	12.5	9.9	Indicación GO	Bajo	M
22	45	53.2	14.2	13.1	EMA	Bajo	M
23	23	-	14.3	13.5	Indicación GO	Bajo	F
24	33	69.7	13.5	12.3	Indicación GO	Bajo	M
25	40	-	12.4	8	EMA	Bajo	M
26	45	56.6	11	16.1	EMA	Bajo	M
27	31	67	12	4	PGR	Bajo	Monosomia X
28	42	63	10.1	10.3	EMA: usg con anomalía en la posición de las manos	Elevado para TIS	
29	46	53.5	12	9.4	EMA	Bajo	M
30	41	64	16.1	19	EMA	Bajo	F
31	36	53	13	14.5	EMA	Bajo	M
32	35	58.9	10.5	17.3	EMA	Bajo	F
33	35	114	14	-	EMA	No se obtuvo resultado	
34	31	53	14	13.1	Indicación GO	Bajo	F
36	34	58	16	12.7	EMA	Bajo	M
37	27	49.2	10.2	9.2	Indicación GO	Bajo	F
38	37	80	13.2	9.4	EMA	Bajo	M
39	33	58	17.1	17.1	Indicación GO	Bajo	F
40	41	62	11.3	10.7	EMA	Bajo	F
41	36	59.3	13	19.3	EMA	Bajo	M
42	36	73.7	10	12.1	Aborto previo con trisomía 18 y EMA	Bajo	Monosomia X

*EMA: edad materna avanzada; F: femenino; M: masculino; Indicación GO: Indicación por parte del ginecólogo; *USG: ultrasonido.

Los resultados se reportan en términos de bajo y alto riesgo.



Cuadro 2. Indicaciones actuales para NIPT

- 1) Tener 35 años o más al momento del parto
- 2) Datos ultrasonográficos que incrementen el riesgo para alguna de las aneuploidías mencionadas
- 3) Tamiz de primer o segundo trimestre con resultado de alto riesgo para trisomías 13, 18 y 21
- 4) Antecedente de hijos con una de estas tres trisomías
- 5) Que alguno de los padres sea portador de una translocación robertsoniana que involucre a los cromosomas 13 o 21

Recomendaciones emitidas por NSGC, ACGM y ACOG.^{4,6-8}

técnica: una en la que la amplificación se lleva a cabo de forma generalizada, es decir, todo el DNA fetal y materno libre es amplificado; y otra técnica, llamada *shotgun*, en la que sólo se amplifican las secuencias cromosómicas de interés (cromosomas 13, 18, 21, X, Y), lo que hace más eficiente a la prueba, aunque deja de lado el análisis de otros cromosomas. En ambos casos después se categoriza y se cuentan (*counting*) las secuencias de los cromosomas específicos, y si existe un aumento en la representación normal (disómica) de una secuencia, el resultado se emite como riesgo alto para una trisomía de cierto cromosoma.^{6,10,11} Además, el análisis de los datos obtenidos, así como los puntos de corte para seleccionar a las mujeres con alto riesgo varían de un estudio a otro.

El tipo de análisis es, quizás, más importante que la técnica específica de secuenciación masiva que se utilice. Se han usado diferentes abordajes, como Z-Score, que refleja la desviación estándar de la proporción de lectura de un cromosoma determinado, pero no considera la diferencia del contenido de guanina y citosina (GC); Z-Score con corrección de guanina y citosina, con la que se elimina el sesgo por la proporción de guanina y citosina contenida en cada cromosoma; Z-Score con corrección de guanina y citosina y utilización de controles internos, con la que se han logrado tasas de detección de 100% para trisomías 13, 18 y 21; valor normalizado de cromosomas, que ayuda

a eliminar la variación intra e inter secuenciación. Finalmente la de soporte parental, que a diferencia de los análisis previos que son cualitativos, se basa en la medición de polimorfismos de nucleótido único, midiendo *loci* polimórficos, e incorporando la información materna y paterna mediante microarreglos, técnica que permite disminuir la variabilidad en la detección entre cromosomas y requiere menor fracción de *cffDNA*.^{6,12} Los estudios con gran número de pacientes y en los que se utilizó una técnica de secuenciación masiva paralela dirigida a secuencias específicas de los cromosomas de mayor interés clínico, mostraron más sensibilidad (98.58 a 100%) y especificidad (97.95 a 100%), con un estrecho intervalo de confianza del 95%. Debido a que la especificidad y sensibilidad no son uniformes para todos los cromosomas analizados, por el contenido de guanina y citosina en cada región,^{6,7} la tasa de detección para trisomía 21 es de alrededor de 99 a 100%, para trisomía 18 de 97 a 100% y para trisomía 13 de 79 a 92%, que es la más baja. Con las técnicas más recientes, que usan *loci* polimórficos, se logra eliminar este sesgo y ampliar el análisis a aneuploidías de sexocromosomas.^{4,6,12,13} La mayor ventaja de este estudio es su especificidad. Cuando se usa un tamiz con marcadores bioquímicos con un resultado de riesgo alto, sólo 2 a 4% serán verdaderos positivos confirmados mediante cariotipo; en cambio, mediante prueba prenatal no invasiva la mayor parte (>99%) de los resultados con riesgo alto son realmente casos positivos.⁶

El estudio diagnóstico confirmatorio es indispensable porque es importante señalar que aunque baja, existe la posibilidad de falsos positivos, por lo que ante una prueba con un resultado de riesgo alto se requiere la confirmación de dicho riesgo mediante cariotipo. Hay controversia acerca de la utilización de la biopsia de la vello-sidad coriónica o la amniocentesis para este fin, dado que el origen del *cffDNA* es trofoblástico.

Asimismo, un resultado de bajo riesgo no descarta la probabilidad de una alteración, por la existencia de falsos negativos. En las pacientes en las que se identifica alguna anomalía estructural por medio de ultrasonido se debe efectuar un estudio de diagnóstico invasivo, a pesar de un resultado de bajo riesgo obtenido en la prueba prenatal no invasiva. Igualmente, se sugiere seguir indicando, junto con el ultrasonido, la toma de alfa-fetoproteína para valorar los defectos abiertos del tubo neural, ya que la prueba fetal no invasiva no evalúa esta malformación.^{7,8} Esta prueba, por tanto, no reemplaza al ultrasonido de primer trimestre, de gran utilidad para el cálculo de la edad gestacional, ni la translucencia nucal, que brinda información muy importante acerca del riesgo fetal de aneuploidías, patología monogénica y patología no genética. Además, es mediante el ultrasonido que se identifican embarazos múltiples, anomalidades placentarias y otras anomalías congénitas.⁷

La prueba prenatal no invasiva no permite detectar aberraciones cromosómicas equilibradas, como translocaciones, ni las no balanceadas, como delecciones y duplicaciones. Tampoco es posible distinguir entre las diferentes variantes de las aneuploidías, por ejemplo no puede diferenciarse entre una trisomía 21 regular de un mosaico con alta proporción de la línea normal, de una debida a una translocación robertsoniana, que es fundamental para establecer el riesgo de recurrencia y brindar un adecuado asesoramiento genético.⁷

Hasta la fecha sólo se han realizado tres estudios en los que se evalúa la utilidad de la prueba prenatal no invasiva en mujeres de bajo riesgo.^{9,14} El estudio prospectivo, ciego, multicéntrico y observacional efectuado por Bianchi y colaboradores en 21 centros de Estados Unidos entre 2012 y 2013, en el que se recolectaron muestras de mujeres con embarazo con feto único, sin método de reproducción asistida, que iban

a realizarse un tamiz de primer trimestre con marcadores bioquímicos, con o sin medición de la translucencia nucal; la finalidad fue comparar la tasa de falsos positivos en la detección de trisomías 21 y 18, con el método de tamiz estándar en mujeres de bajo riesgo (promedio de edad 29.6 años). Para la prueba de *cffDNA*, la tasa de falsos positivos fue significativamente menor que la del tamizaje convencional (0.3 vs 3.6% para trisomía 21 $p < 0.001$; y 0.2 vs 0.6% para trisomía 18, $p = 0.03$). Mediante esta técnica se identificaron todos los casos de aneuploidías, con un valor predictivo negativo de 100% e intervalo de confianza de 95% (rango 99.8 a 100). Los valores predictivos positivos de *cffDNA* versus el tamiz estándar, con 45.5 vs 4.2% para trisomía 21, y 40 vs 8.3% para trisomía 18. Con estos resultados para las trisomías 21 y 18 si todas las mujeres embarazadas se practicaran la prueba de *cffDNA* como método inicial de tamiz, y si todas las que tuvieran un resultado de alto riesgo fueran asesoradas adecuadamente y decidieran un procedimiento invasor, habría una reducción de 89% en el número de procedimientos realizados.^{13,14} Aunque estos hallazgos sugieren la consideración de esta prueba como estudio de tamiz de primera línea, se requieren más estudios para emitir una recomendación al respecto; por lo tanto, en este momento no es una prueba indicada en mujeres con bajo riesgo, ya que aún se precisan estudios con mayor número de pacientes, prospectivos, aleatorizados y ciegos para ayudar a la validación de la prueba en este grupo.¹⁵

Un factor importante a considerar es el costo de la prueba porque en estos momentos no es accesible a toda la población como para establecerla como una prueba de tamiz a toda mujer embarazada, independientemente de su riesgo; se espera que los costos disminuyan con el tiempo en función de la demanda.⁷ En el estudio sólo en un caso no fue posible extraer *cffDNA* suficiente para realizar la prueba: la paciente pesaba 114



kg a las 14 semanas de gestación. El sobrepeso se ha descrito como un factor vinculado con un menor porcentaje de la fracción fetal de ADN; sin embargo, en otra paciente con 112 kg a las 12.5 semanas se logró obtener el resultado de la prueba, con una fracción de *cffDNA* de 9.9%, que si se compara con mujeres de menor peso y edad gestacional similar en esta casuística, es menor. (Cuadro 1)

Una de las limitaciones del estudio es que en 1.5 a 3.8% de las mujeres no es posible obtener un resultado^{8,16} (principalmente debido a que el porcentaje de *cffDNA* es inferior a 4%). Entre los factores relacionados con el porcentaje de *cffDNA* libre se encuentra el índice de masa corporal, ya que a mayor IMC menor es el porcentaje. Hace algún tiempo se consideraba que a mayor edad gestacional se incrementaba el porcentaje de *cffDNA*; sin embargo, en estudios recientes no se ha observado esta asociación.¹⁷ Esta limitación influirá de forma negativa en el tiempo y la obtención de un resultado oportuno para una adecuada toma de decisiones, por lo que deberá considerarse siempre el peso materno antes de llevar a cabo el estudio.⁷

En un caso se realizó la prueba a una madre con mutación en el gen *WAS* para la enfermedad de Wiskott-Aldrich, enfermedad recesiva ligada al cromosoma X, a las 15 semanas de gestación. El estudio mostró una alta probabilidad de cromosomas XY, por lo que se practicó amniocentesis como método confirmatorio, y extracción de ADN para buscar la mutación, en cuyo caso fue positivo y, por lo tanto, el feto estaba afectado.

Esto refleja otra de las aplicaciones clínicas de la prueba prenatal no invasiva, que es la determinación del sexo fetal a edad gestacional temprana y con mayor certeza que el ultrasonido tradicional. A través del ultrasonido, a partir de la semana 11 de gestación, puede conocerse el sexo del feto; sin embargo, no es del todo confiable, hay gran

variabilidad en los resultados reportados en los diversos estudios. De acuerdo con ellos, el sexo fetal no puede determinarse en 7.5 a 50% de los casos a la semana 11 de gestación, y de 3 a 24% en la semana 13. Se reporta de forma incorrecta incluso en 40% de los casos a la semana 11.¹⁵ El diagnóstico definitivo del sexo fetal hasta la fecha se efectúa a través de estudios invasores, con el riesgo implícito referido. En lugares en donde se usa la prueba prenatal no invasiva para este fin, se ha observado una disminución de 45% de los estudios invasores.¹⁸ Esta técnica ofrece la posibilidad de identificar el sexo fetal a menor edad gestacional con una alta sensibilidad, lo que tiene relevancia clínica para las familias con antecedentes de enfermedades ligadas al cromosoma X, en las que las mujeres son portadoras y los varones afectados. Con una madre portadora de una mutación para alguna de estas enfermedades, la probabilidad de tener un hijo varón afectado es de 50%. A pesar de la variabilidad observada entre los diferentes estudios, se estima que la sensibilidad es de 95.4% y la especificidad de 98.6% a partir de la séptima semana de gestación; antes de esta semana no son confiables.¹⁵

Es importante que los laboratorios eliminan la posibilidad de falsos negativos (ej. asignación masculina a un feto femenino) debido a que ante un feto masculino deberá indicarse un estudio invasor, como en la paciente referida; por lo tanto, los esfuerzos deben encaminarse a aumentar la sensibilidad, y en caso de padecimientos como hiperplasia suprarrenal congénita, en donde ocurre virilización de los fetos femeninos, se deberá priorizar la especificidad.¹⁵ De acuerdo con la revisión sistemática y el metanálisis realizados por Devaney y colaboradores en 2011, y por Wright y colaboradores en 2012, la amplificación de marcadores del cromosoma Y (*SRY*, *DYS14*, entre otros) mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RTQ-PCR)) en sangre materna, indica que pueden llevarse a cabo entre la semana 7 y 12

de gestación, antes de lo que se puede hacer el ultrasonido. La sensibilidad observada es de 96 a 100%, con especificidad de 99 a 100%. Se ha observado que hay poca variación a lo largo de los tres trimestres del embarazo, lo que indica que este estudio es altamente confiable. La técnica más comúnmente utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real, y de acuerdo con el análisis de Wright, no hay diferencia significativa entre la amplificación de *SRY* y *DYS14*, pero sí con el uso de otros marcadores. En la mayor parte de los estudios se utilizó plasma materno, y hay poca evidencia acerca de que la extracción de *cffDNA* a partir del suero pueda aumentar ligeramente la sensibilidad y especificidad.¹⁸

Una desventaja del estudio es la necesidad de verificar el *cffDNA* para validar la asignación de sexo femenino del feto. La principal implicación clínica de esta prueba es la toma de decisiones a partir del resultado: un feto varón deberá ser indicativo de un estudio invasor y ante un feto femenino no se modificará el abordaje clínico en enfermedades ligadas al cromosoma X.¹⁸

En dos pacientes, el resultado de la prueba fue de alto riesgo para monosomía del cromosoma X. La conducta seguida en ambos casos fue realizar ultrasonido estructural para valorar los marcadores asociados con la monosomía; en segundo lugar, determinar el cariotipo en el feto para descartar mosaico placentario, y en tercer lugar, cariotipo materno para descartar mosaico materno. En el primer caso la amniocentesis y el cariotipo al nacimiento mostraron una fórmula cromosómica 46,XX; sin embargo, en la madre se identificaron células 45,X a través de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) en la mucosa oral, y no se encontró esta línea celular en el cariotipo en sangre, si bien se sospecha que existe mosaico materno. En el segundo caso, antes de la obtención del resultado de la prueba, el embarazo se perdió en forma espon-

tánea, por lo que se realizó cariotipo del tejido embrionario y las membranas, cariotipo materno e hibridación *in situ* con fluorescencia. El tejido del aborto mostró las líneas 45,X y 46,XX; sin embargo, a través de marcadores STR (short tandem repeat) se confirmó la contaminación con células maternas, además, el cariotipo materno y la hibridación *in situ* con fluorescencia en la mucosa oral fueron de complemento sexocromosómico normal.

Es importante hacer notar que en el momento de efectuar la prueba prenatal no invasiva en ninguno de los dos casos se había validado para aneuploidías de sexocromosomas, como se refirió en párrafos anteriores, ya que existe variabilidad en la tasa de detección de un cromosoma a otro; para sexocromosomas, la sensibilidad es de 85.7% y la de especificidad de 99%.^{19,20} Hay que descartar, también, antes de considerar este estudio como un falso positivo, una disomía uniparental (UPD) del cromosoma X.

De los dos casos con riesgo alto para trisomía 18, uno mostró una fuerte correlación con el doble marcador combinado de primer trimestre y los hallazgos ultrasonográficos, y el segundo con el cariotipo en líquido amniótico y en sangre de cordón umbilical al nacimiento.

CONCLUSIONES

La prueba de DNA fetal libre en sangre materna se considera, hasta este momento, una prueba de tamiz indicada para mujeres con riesgo alto de aneuploidías. Es segura para el feto y puede brindar información a menor edad gestacional, mediante una muestra de sangre materna. Esto ha permitido a los padres y a los médicos tomar decisiones con mayor certeza y en etapas tempranas del embarazo;³ sin embargo, no sustituye a las pruebas diagnósticas invasoras, como la amniocentesis, ni ofrece información genética adicional, es decir, sólo evalúa el riesgo de trisomías 13, 18



y 21.⁷⁻⁹ Algunas plataformas ofrecen la valoración de aneuploidías de sexocromosomas, aunque no han sido validadas, y aproximadamente 50% de las anomalías cromosómicas identificadas rutinariamente por amniocentesis no serán detectadas mediante esta técnica. La prueba prenatal no invasora en este momento es la de tamiz con la mayor tasa de detección (mayor a 98%, con una tasa de falsos negativos menor a 0.5%, con una sensibilidad y especificidad casi de 100%), aunque puede variar de un cromosoma a otro. A pesar de la alta sensibilidad y especificidad del estudio, no hay evidencias que permitan concluir que en este momento se deba utilizar de manera rutinaria en el cuidado obstétrico. Se requiere la validación mediante más estudios prospectivos multicéntricos para poder establecer la aplicación de cffDNA como una prueba de tamiz de primera línea, además de dilucidar su utilidad en pacientes de bajo riesgo y en embarazos múltiples.¹⁶

Se sugiere que el estudio se ofrezca entre las semanas 10 y 20 de gestación, lo que permite tener el tiempo óptimo para el seguimiento de resultados de alto riesgo y realizar el estudio confirmatorio. Algunos autores consideran que será razonable ofrecerlo después de la semana 20 sólo si la paciente desea obtener información referente a riesgo, atención obstétrica y pediátrica al momento del nacimiento.⁷

Es conveniente redactar el resultado en términos de riesgos porque la terminología puede confundir a las pacientes, por lo que es necesario recalcar que es una prueba de tamiz, no diagnóstica.

Esta prueba debe ofrecerse con asesoramiento previo en el que se especifique que hasta el momento es un estudio de tamiz, que sólo evalúa tres de las aneuploidías más frecuentes y que no aporta información acerca de otras alteraciones genéticas. Es importante contar con la historia familiar de la paciente para determinar si requie-

re un método diagnóstico específico a través de técnicas invasoras.^{4,8,9,21}

Posterior al estudio, ante un resultado de alto riesgo, la paciente deberá recibir asesoramiento genético y ofrecérsele un método de diagnóstico invasor para la confirmación del resultado, antes de la toma de decisiones obstétricas. En las pacientes en las que el resultado es de bajo riesgo también se sugiere asesoramiento genético, ya que debe reforzarse la posibilidad de un resultado falso negativo debido a mosaico placentario, y subrayarse que no se trata de una prueba diagnóstica. Cuando no sea posible obtener un resultado es importante considerar un estudio diagnóstico invasor.^{7,9}

Asimismo, se recomienda la firma de un consentimiento informado en el que se plasme por escrito lo mencionado.³

De acuerdo con la casuística de los autores, la indicación más frecuente es la edad materna avanzada. El peso de las pacientes es importante, ya que es un factor determinante en el porcentaje de DNA fetal que será detectado. La tasa de detección del sexo del feto es de 95.8% a partir de la séptima semana de gestación, y es superior a la del ultrasonido, lo que es de gran utilidad para enfermedades ligadas al cromosoma X. El uso de la prueba prenatal no invasora ha sido y será a lo largo de varios años sumamente dinámico; la tecnología cambia y mejora, por lo que la implantación de la prueba deberá ser flexible y su utilidad dependerá del nivel de evidencia vinculada con cada aplicación.^{5,10}

REFERENCIAS

1. Gil M, et al. Cell-free DNA analysis for trisomy risk assessment in first-trimester twin pregnancies. *Fetal Diagn Ther* 2013;35(3):182-189.
2. Mersy E, et al. Noninvasive detection of fetal trisomy 21: systematic review and report of quality and outcomes of diagnostic accuracy studies performed between 1997 and 2012. *Hum Reprod Update* 2013:dmt001.

3. Skirton H, Patch C. Factors affecting the clinical use of non-invasive prenatal testing: a mixed methods systematic review. *Pren Diagn* 2013;33(6):532-541.
4. Wilson K, et al. NSGC practice guideline: prenatal screening and diagnostic testing options for chromosome aneuploidy. *J Genet Couns* 2013;22(1):4-15.
5. Wright CF. Cell-free nucleic acids for non-invasive prenatal diagnosis. Report of the UK expert working group. Foundation for Genomics and Population Health, 2009.
6. Norwitz ER, Levy B. Noninvasive prenatal testing: the future is now. *Rev Obstet Gynecol* 2013;6(2):48-62.
7. Group TNPSW. ACMG statement on noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy. *Genet Med* 2013;15(5):395-398.
8. Obstetricians, ACo and Gynecologists. Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy. Committee Opinion No. 545. *Obstet Gynecol* 2012;120:1532-1534.
9. Benn P, et al. Prenatal detection of Down Syndrome using Massively Parallel Sequencing (MPS): a rapid response statement from a committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis, 24 October 2011. *Prenat Diagn* 2012;32(1):1-2.
10. Sparks AB, et al. Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenat Diagn* 2012;32(1):3-9.
11. Chiu RW, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ* 2011;342:c7401.doi: 10.1136/bmj.c7401.
12. Juneau K, et al. Microarray-based cell-free DNA analysis improves noninvasive prenatal testing. *Fetal Diagn Ther* 2014;36(4):282-286.
13. Bianchi DW, et al. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol* 2012;119(5):890-901.
14. Bianchi DW, et al. DNA sequencing *versus* standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med* 2014;370(9):799-808.
15. Devaney SA, et al. Non-invasive fetal sex determination using cell-free fetal DNA: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2011;306(6):627-636.
16. Verweij E, et al. Diagnostic accuracy of non-invasive detection of fetal trisomy 21 in maternal blood: a systematic review. *Fetal Diagn Ther* 2011;31(2):81-86.
17. Norton ME, et al. Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol* 2012;207(2):137,e1-137. e8.
18. Wright CF, et al. Non-invasive prenatal diagnostic test accuracy for fetal sex using cell-free DNA a review and meta-analysis. *BMC Res Notes* 2012; 5(1):476.
19. Jiang F, et al. Non-invasive Fetal Trisomy (NIFTY) test: an advanced noninvasive prenatal diagnosis methodology for fetal autosomal and sex chromosomal aneuploidies. *BMC Med Genomics* 2012;5(1): 57.
20. Mazloom AR, et al. Non-invasive prenatal detection of sex chromosomal aneuploidies by sequencing circulating cell-free DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2013;33(6):591-597.
21. Langlois SB. Current status in non-invasive prenatal detection of Down syndrome, trisomy 18, and trisomy 13 using cell-free DNA in maternal plasma. *J Obstet Gynaecol Can* 2013;35(2):177-181.