



Diagnóstico prenatal no invasivo de aneuploidía fetal en sangre materna

Non-invasive prenatal diagnosis of fetal aneuploidy in maternal blood

Zamora Palma Alberto*

Palabras clave:

Aneuploidía,
síndrome de Down,
secuenciación,
diagnóstico prenatal
no invasivo, cariotipo,
amniocentesis,
cribado combinado,
ADN libre fetal,
mosaicismo.

Keywords:

*Aneuploidy,
Down syndrome,
sequencing, non-
invasive prenatal
diagnosis, karyotype,
amniocentesis,
combined screening,
fetal free DNA,
mosaicism.*

RESUMEN

El término aneuploidía hace referencia al cambio en el número cromosómico de una célula. En la actualidad, se sabe que 50% de los abortos espontáneos son debido a alteraciones cromosómicas no detectadas. La proporción de embarazos en mujeres de 35 años o más ha pasado de 5% a más de 15%, por lo tanto, también se ha incrementado la frecuencia con la que los productos nacen con alguna aneuploidía. De manera tradicional, el diagnóstico de estas alteraciones se ha hecho con el uso del cariotipo, cribado simple o combinado, o con técnicas invasivas como la amniocentesis, la cual tiene como consecuencia riesgo de la pérdida fetal. Las nuevas técnicas de diagnóstico no invasivo se realizan con una muestra de sangre de la madre, sin el riesgo que tienen las técnicas invasivas. La identificación del ADN libre fetal por medio de la secuenciación masiva se perfila como el método más seguro y confiable, por su alta sensibilidad, especificidad y valor predictivo negativo.

ABSTRACT

The term aneuploidy refers to the change in the chromosomal number of a cell. It is currently known that 50% of spontaneous abortions are due to undetected chromosomal abnormalities. The proportion of pregnancies in women 35 years of age or older has increased from approximately 5% to more than 15%; therefore, the frequency of products born with some aneuploidy has also increased. Traditionally the diagnosis of these alterations has been made with the use of the karyotype, simple or combined screening, or with invasive techniques such as amniocentesis, which results in risk of fetal loss. The new non-invasive diagnostic techniques are performed with a blood sample from the mother, without the risk of invasive techniques. The identification of fetal free DNA through mass sequencing is emerging as the safest and most reliable method, due to its high sensitivity, specificity and negative predictive value.

* Director Médico.
Laboratorio
DENATBIO.
Desarrollos
Especializados en
Biotecnología y
Diagnóstico Molecular,
S.A. de C.V.

Correspondencia:
**Alberto Zamora
Palma**
Av. Arneses Núm. 335,
Col. Valle del Sur,
09819,
Alcaldía Iztapalapa,
Ciudad de México.
Teléfono:
5510139572
E-mail: patologia@
denatbio.mx
albertoz100@hotmail.
com

Recibido:
09/08/2019
Aceptado:
20/09/2019

INTRODUCCIÓN

El término aneuploidía hace referencia al cambio en el número cromosómico de una célula, también puede decirse que es un error en la división celular que da lugar a dos células «hijas» que tienen un número incorrecto de cromosomas.

Las causas a las cuales se atribuye con frecuencia la aneuploidía son variadas, dentro de las cuales se encuentran: un error en la disyunción celular durante la mitosis, causas ambientales como la infección por virus, algunos medicamentos y el consumo de alcohol, por lo que la aneuploidía se puede considerar una alteración de causa multifactorial.¹

En condiciones normales, el huso mitótico se localiza desde el extremo distal de la célula madre hasta el extremo proximal de la célula

hija, de manera que al momento de la distribución del material genético la división celular se realiza con una cantidad idéntica entre la célula madre y la célula hija; en cambio, cuando este mecanismo se realiza de manera errónea, el huso mitótico se ubica de un extremo a otro dentro de la misma célula madre, de manera que la distribución del ADN es incorrecto, por lo que la célula madre se queda con la mayor parte o con todo el material genético, y la célula hija con poco o ninguno (Figura 1).²

ESTADÍSTICA

En la actualidad, se sabe que 50% de los abortos espontáneos son debido a alteraciones cromosómicas, también sabemos que muchas veces los restos óvulo-placentarios producto de legrado uterino no son analizados

en el Departamento de Patología de los hospitales, lo cual complica el diagnóstico oportuno de este tipo de alteraciones.

Otro dato importante es que alrededor de 10% de los recién nacidos vivos tendrán, en algún momento de su vida, alguna enfermedad o invalidez de origen genético. Y por último, es sabido que, debido al deseo de las mujeres de realizar estudios profesionales de postgrado o sólo por no querer estar embarazadas inmediatamente después del matrimonio, muchas mujeres postergan el embarazo, de manera que la proporción de embarazos en mujeres de 35 años o más ha pasado de 5% a más de 15%, como se muestra en la Figura 2.

TÉCNICAS TRADICIONALES PARA EL DIAGNÓSTICO DE ANEUPLOIDÍA

El diagnóstico de aneuploidía por lo general se ha realizado a través del uso del cariotipo con la técnica de bandas G; sin embargo, esta técnica en muchas ocasiones está

sujeta a la ejecución de una técnica impecable de fotografía, recorte y pegado de los cromosomas, y depende de la clasificación y agrupación subjetiva de los mismos (Figura 3).

Aunque se ha tratado de mejorar al emplear técnicas de bioinformática para mejorar la identificación del material genético, la técnica aún muestra inconsistencias (Figura 4).

CLÍNICA

Las personas con síndrome de Down muestran rasgos característicos como los que se presentan en la Tabla 1,⁴ pero debe considerarse que muchos no presentan los rasgos que caracterizan a la mayoría de estos, particularmente los que cursan con algún tipo de mosaicismo.

La misma situación diagnóstica se presenta en aquéllos con otro tipo de aneuploidías como son el síndrome de Edwards o síndrome de Patau, por mencionar sólo algunos de los más frecuentes.

AMNIOCENTESIS

Para identificar con mejor precisión estas alteraciones, se han intentado algunas técnicas invasivas como la amniocentesis, la cual se utilizó desde 1956 por los doctores Fritz Fuchs y Povl Riis, quienes empleaban agujas de alrededor de 19 cm para extraer líquido amniótico y examinarlo, en búsqueda de determinar el género del producto en etapa intrauterina.

La amniocentesis se realiza a partir de la semana 15 de la gestación, con la finalidad de obtener una muestra de líquido amniótico mediante punción abdominal, bajo control por ultrasonido. Es la técnica más frecuente con la menor tasa de pérdida fetal < 1%.

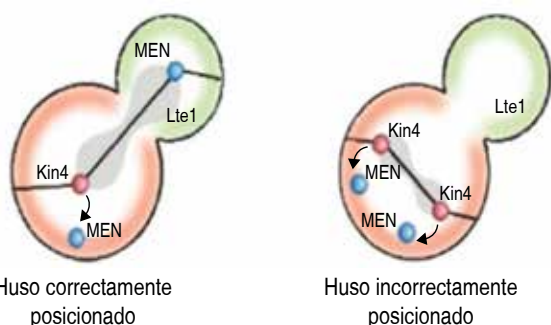
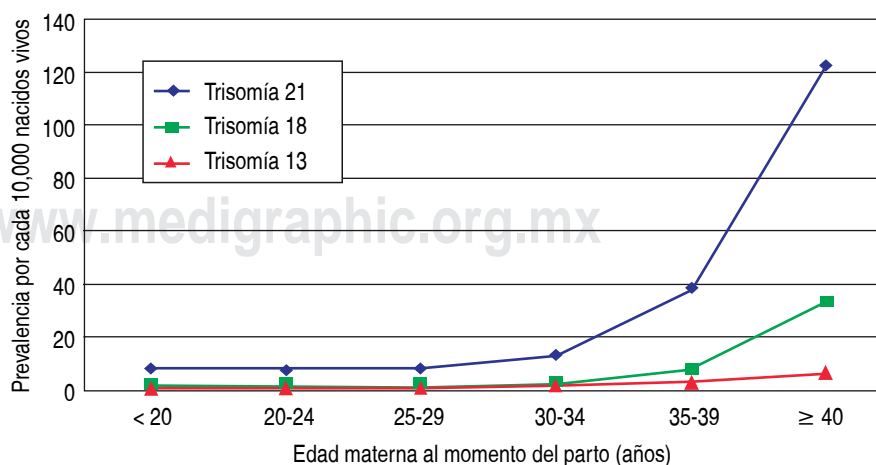


Figura 1: Posición del huso mitótico en el momento de la disyunción celular.

Figura 2:

Frecuencia de trisomías asociadas con la edad materna. Se observa que a mayor edad de embarazo, mayor es la frecuencia de trisomías, con excepción de la trisomía del cromosoma 16, la cual es independiente de la edad materna.³



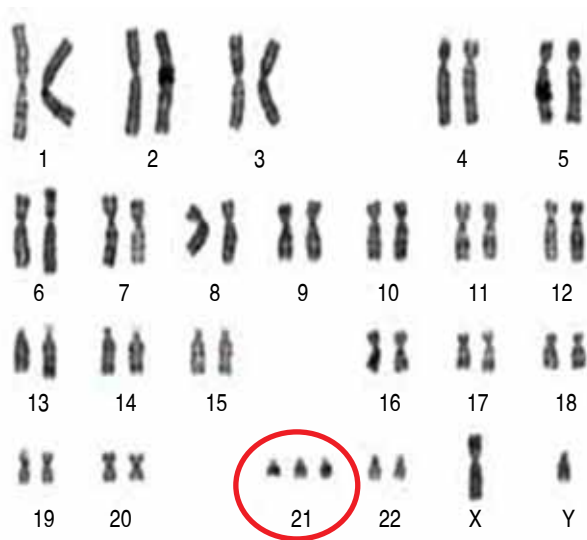


Figura 3: Cariotipo de un paciente con síndrome de Down, técnica de bandas G.

Otros procedimientos invasivos son:

Biopsia de vellosidades coriales, que permite obtener una muestra de las células de la placenta entre las semanas 10 y 15 de gestación, en el primer trimestre, y conlleva un riesgo que varía en función de la técnica empleada entre 1.5 y 3%.

Cordocentesis. Consiste en la obtención de sangre fetal y requiere la punción del cordón umbilical mediante el uso de ultrasonografía. Se realiza a partir de la semana 19 de gestación y es el procedimiento menos utilizado. Tiene índice de pérdida fetal cercana a 2%.⁵

Otras complicaciones relacionadas con el empleo de técnicas invasivas para obtener material genético se muestran en la *Tabla 2*.⁶

USO DEL CRIBADO COMBINADO

La sensibilidad general del cribado combinado alcanza 90% con un índice de falsos positivos de 5%. Las siguientes son algunas recomendaciones que el Colegio Canadiense de Ginecología y Obstetricia propone para la práctica y uso clínico del cribado combinado.

1. Independientemente de la edad de la paciente, siempre debe haber un consentimiento informado no dirigido.
2. Los procedimientos invasivos para análisis citogenético no deben ofrecerse sin resultados de marcadores múltiples de *screening*.

3. Los procedimientos de *screening* prenatal en el primer trimestre deben tener al menos un índice de detección de 75% y no más de 3% de falsos positivos.
4. Los procedimientos de *screening* prenatal en el segundo trimestre deben tener al menos un índice de detección de 75% y no más de 5% de falsos positivos.
5. Los estudios de imagen deben ser realizados por personal certificado.

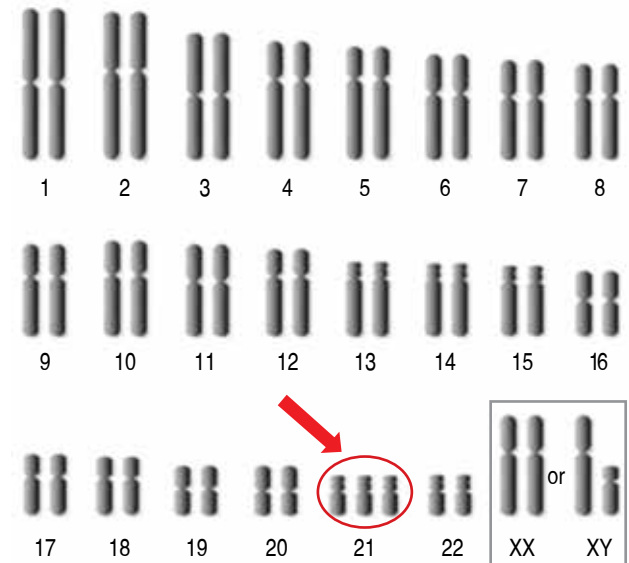


Figura 4: Cariotipo de un paciente con síndrome de Down con ayuda para su interpretación con un sistema de bioinformática.

Tabla 1: Rasgos clínicos en síndrome de Down.

| |
|---|
| Cuello corto |
| Orejas pequeñas |
| Lengua que tiende a salirse de la boca |
| Manchas blancas diminutas en el iris del ojo |
| Estatura más baja en la niñez y la adultez |
| Retraso mental |
| Piel redundante en el cuello |
| Pliegues en epicanto |
| Perfil facial plano |
| Pliegue único palmar |
| Cardiopatías congénitas |
| Estenosis intestinal |
| Hernia umbilical |
| Hipotonía muscular |
| Hendidura entre el primero y segundo dedo del pie |
| Leucemia |

Tabla 2: Principales complicaciones por el uso de métodos invasivos.

| Complicaciones | n |
|-----------------------------------|-----------|
| Pérdida fetal | 0.50% |
| Corioamnionitis | < 1/1,000 |
| Ruptura prematura de membranas | < 1/1,000 |
| Muestra insuficiente o inadecuada | < 1% |
| Despegamiento corial | |
| Hematoma placentario | |

- Para mujeres que se hicieron *screening* en el primer trimestre, se recomienda alfa fetoproteína + ultrasonografía para descartar defectos de cierre del tubo neural.
- Debe proporcionarse siempre al laboratorio la edad gestacional por ultrasonografía, el peso materno, etnia, la diabetes mellitus insulinodependiente y técnica de reproducción asistida utilizada.
- Siempre se debe implementar un Programa de Evaluación Externa de la Calidad, y es conveniente siempre poder ofrecer en conjunto el estudio de ultrasonido, asesoramiento genético, educación a médicos, pacientes y proveedores, y se debe contar con recursos para administración, auditoría clínica periódica y gestión de datos.⁷

FUENTES DE OBTENCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO FETAL

El examen del material genético fetal es el mejor material para realizar el diagnóstico de aneuploidías al emplear técnicas moleculares; los sitios anatómicos de donde se puede obtener material genético fetal son los siguientes:

Detección de células nucleadas fetales (CF) en sangre materna: con este método se obtiene aproximadamente una célula fetal por cada 10,000-1,000,000 células maternas; \pm 20 CF: 20 mL de sangre materna, por lo que las cantidades obtenidas son ínfimas.

El material genético también se puede aislar de elementos celulares del trofoblasto fetal desde el canal endocervical con alta variabilidad de recuperación, la cual va de 4-80%, por lo que no hay consistencia con este método.

Por último, se puede hacer análisis del material genético del feto presente en la sangre materna por punción venosa, con molestias mínimas y sin riesgo de pérdida fetal o de otras complicaciones. Esto es posible ya que la

placenta es la principal fuente de ADN libre fetal (cffADN) en la sangre de la madre.

El ADN libre fetal está formado por fragmentos cortos de ADN de aproximadamente 200 pares de bases, la principal fuente proviene de células apoptóticas del trofoblasto.

ADN libre materna > ADN libre feto (placenta): células apoptóticas.

Se requiere un mínimo de cffADN para tener precisión (índice de ADN) 0.5%.⁸

Las pruebas genéticas prenatales no invasivas se conocen desde 1977, cuando se pudo identificar el ADN libre fetal en la sangre de la madre, siete años después la técnica se utilizó para la identificación intrauterina del género y el genotipo del sistema Rh del producto.

A partir de entonces, se ha visto una serie escalada de avances y mejoras en las técnicas desarrolladas por la industria del diagnóstico.

Con las pruebas de secuenciación de nueva generación se han podido identificar de manera confiable variantes de nucleótido único, inserciones y deleciones, así como variaciones de número de copia e inversiones grandes.

Dentro de las aplicaciones se encuentran la resecuenciación dirigida para secuencias específicas y la resecuenciación de exoma para regiones codificantes; es posible hacer la secuenciación de genoma completo como se hizo con la codificación completa del genoma humano y, por último, con esta técnica se puede hacer la secuenciación de nueva generación utilizada en el diagnóstico prenatal de aneuploidías.⁹

Aunque existen varios tipos de secuenciación, en esencia tienen el mismo principio, en todos ellos el primer paso consiste en la detección del ácido nucleico, por lo que se requiere de una previa amplificación del fragmento a secuenciar para poder obtener muchas lecturas secuenciadas del mismo. Este proceso puede darse mediante una reacción de la polimerasa en cadena (PCR) en emulsión o por una PCR puente. En el primer caso, la mezcla de reacción consiste en una emulsión aceite-agua creada para encapsular complejos entre el ADN y nanoesferas, dentro de gotas pequeñas de agua. Después de la emulsión, el siguiente paso es la amplificación del fragmento, en este paso cada nanoesfera queda recubierta por varios miles de copias de la misma secuencia molde, lo que forma los cúmulos de replicación. Dependiendo de la plataforma NGS, estas nanoesferas se unen químicamente a la superficie de cristal (SOLID) o se depositan en los pocillos de las placas multipocillo empleadas en dicha plataforma. En el segundo caso, la secuenciación tiene lugar sobre una placa de vidrio, sobre la que están dispuestos adap-

tadores complementarios a los adaptadores anclados en las secuencias desnaturalizadas a secuenciar. Así, cada fragmento de ADN monocatenario se unirá por uno de sus extremos a uno de los oligonucleótidos complementarios presentes en la placa. Después de la acción de la polimerasa, que utiliza estos adaptadores como iniciadores, se sintetiza la cadena complementaria y después, tendrá un nuevo ciclo de desnaturalización, lo que provoca que las hebras desnaturalizadas formen puentes gracias a la unión de su extremo libre con otro de los adaptadores inmovilizados en la placa. Este proceso se repite varias veces, hasta formar lo que se conoce como *clusters*, una agrupación de secuencias idénticas inmovilizadas sobre una superficie sólida (Figura 5).¹⁰

Con el uso de tecnologías de bioinformática, en este paso es posible identificar y separar el ADN de la madre y del producto (Figura 6).

El análisis anterior puede reportar el tipo de aneuploidía encontrada, la probabilidad de que el producto presente la alteración y el riesgo, así como el porcentaje de ADN fetal libre (Figura 7).

Las pruebas genéticas prenatales son más seguras que el *screening* prenatal, sólo requieren de 5 mL de sangre materna tomada en un tubo especial, producen menos resultados falsos positivos con un índice de 1-3%, se utilizan menos procedimientos invasivos y por lo tanto eliminan el riesgo de aborto por procedimientos invasivos, aunque se puede identificar ADN libre fetal desde la semana siete, los resultados son más confiables después de la décima semana de gestación.

Algunas de las fuentes de error que el médico debe considerar en la interpretación de ese tipo de pruebas son las siguientes:

Edad gestacional materna: en etapa muy temprana, la cantidad de ADN libre puede ser insuficiente, esta con-

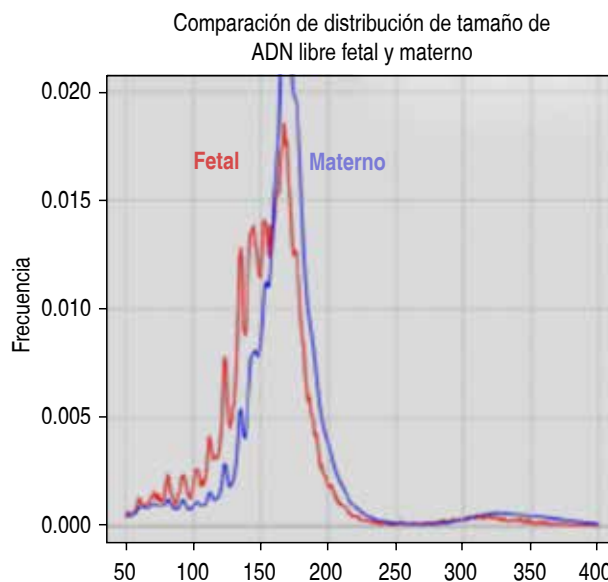


Figura 6: Separación del ADN de la madre y del producto empleando sistemas bioinformáticos. En este tipo de análisis, el ADN de la madre siempre debe ser mayor que el del producto.

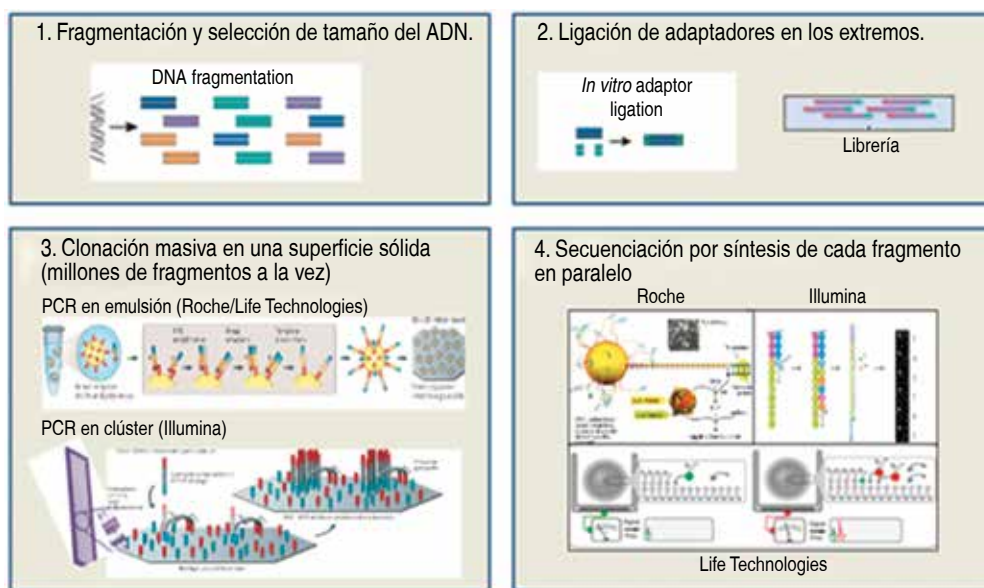


Figura 5:

Principales pasos del método de secuenciación.

| Conditions | Probability | Risk assessment |
|------------|-------------|-----------------|
| Trisomy 21 | 1/2359935 | Low risk |
| Trisomy 18 | 1/2970978 | Low risk |
| Trisomy 13 | 1/1936840 | Low risk |

Figura 7:

Ejemplo de resultado de ADN libre fetal por secuenciación masiva.

It is advised that high-risk results should be followed by confirmatory diagnostic testing

| | |
|------------------------|-------|
| Fetal cfDNA percentage | 5.36% |
|------------------------|-------|

Tabla 3: Diferentes tipos de mosaicismo, observe que algunos provocan resultados falsos positivos, mientras que otros pueden ser interpretados como falsos negativos.

| Nombre | Citotrofoblasto | Mesenquimal Core | Feto | Criterio |
|--------|-----------------|------------------|---------|----------|
| CPM | Anormal | Anormal | Normal | FP |
| CPM3 | Anormal | Normal | Normal | FP |
| GMDD | Normal | Anormal | Anormal | FN |
| CFM | Normal | Normal | Anormal | FN |

CPM = mosaicismo confinado a la placenta, CPM3 = mosaicismo confinado a la placenta tipo 3, GMDD = mosaicismo generalizado directo, CFM = mosaicismo confinado al feto, FP = Falsos positivos, FN = Falsos negativos.

dición genera un aumento de índice de falsos negativos, por esta razón la prueba no se recomienda antes de la décima semana de edad gestacional.

Obesidad materna: a mayor peso, se detecta un menor porcentaje de cfADN, aunque la causa no está bien entendida, pero se considera que el incremento en el índice de masa corporal juega un factor dilucional.

Embarazos múltiples: los estudios realizados en mujeres con embarazos bicoriales pueden generar discordancia de los resultados obtenidos.

Condiciones maternas: se presenta en caso de que la madre padezca otras alteraciones cromosómicas o neoplasias como las que se generan en el trofoblasto.

Mosaicismo placentario: probablemente una de las causas más importantes de resultados discordantes en la presencia de mosaicismo, entendido como una alteración genética en la que, en un mismo individuo, coexisten dos o más poblaciones de células con distinto genotipo, originadas a partir del mismo cigoto, lo que genera diferentes tipos de mosaicismo y que el médico debe tener en cuenta ya que tienen una interpretación diagnóstica distinta (Tabla 3).^{11,12}

Tabla 4: Criterios de confiabilidad comparando pacientes con embarazo sin riesgo, contra pacientes de alto riesgo.

| Tipo de embarazo | Sensibilidad % | Especificidad % |
|-------------------------|----------------|-----------------|
| Embarazo sin riesgo | | |
| Down | 95.9 | 99.9 |
| Edwards | 86.5 | 99.8 |
| Patau | 77.5 | 99.9 |
| Embarazo de alto riesgo | | |
| Down | 97 | 99.7 |
| Edwards | 93 | 99.0 |
| Patau | 95 | 99.9 |

CONFIABILIDAD DE LAS PRUEBAS PRENATALES NO INVASIVAS

Aunque existen revisiones previas de la confiabilidad de las pruebas prenatales no invasivas, la mayoría de los

autores no incluye una separación de la sensibilidad y especificidad entre la población de mujeres embarazadas sin riesgo y las pacientes con embarazo de alto riesgo.

El Comité Nacional de Evaluación del Reino Unido realizó una revisión para proporcionar un resumen de la precisión de las pruebas prenatales no invasivas para la detección de los síndromes de Down, Edwards y Patau en los embarazos del primer trimestre, los resultados de muestran en la *Tabla 4*.¹³

CONCLUSIONES

1. En la actualidad, las pruebas prenatales no invasivas son la alternativa diagnóstica más confiable y segura para detectar aneuploidías prenatales.
2. Puede detectar aneuploidías a edad gestacional temprana.
3. No es invasiva, por lo tanto no tiene riesgos.
4. Tienen alta sensibilidad, especificidad y valor predictivo negativo.
5. Puede emplearse en cualquier mujer embarazada, con o sin antecedentes de riesgo.

REFERENCIAS

1. Illanes SL, Pertossi EA, González ZML. Diagnóstico prenatal no invasivo. *Rev Med Clin Condes*. 2014; 25 (6): 887-893.
2. Campbell IW, Zhou X, Amon A. The Mitotic Exit Network integrates temporal and spatial signals by distributing regulation across multiple components. *Elife*. 2019; 8. pii: e41139.
3. Mora-Alferez AP, Paredes D, Rodríguez O, Quispe E, Chavesta F, de Zighelboim EK et al. Anomalías cromosómicas en abortos espontáneos. *Rev Peru Ginecol Obstet*. 2016; 62 (2): 141-151.
4. Disponible en: <https://www.cdc.gov/ncbddd/spanish/birthdefects/downsyndrome.html>
5. Fuchs F, Riis P. Antenatal sex determination. *Nature*. 1956; 177 (4503): 330.
6. Wulff CB, Gerds TA, Rode L, Ekelund CK, Petersen OB, Tabor A. Risk of fetal loss associated with invasive testing following combined first-trimester screening for Down syndrome: a national cohort of 147,987 singleton pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2016; 47 (1): 38-44.
7. Chitayat D, Langlois S, Wilson RD. No. 261-Prenatal screening for fetal aneuploidy in singleton pregnancies. *J Obstet Gynaecol Can*. 2017; 39 (9): e380-e394.
8. Taglauer ES, Wilkins-Haug L, Bianchi DW. Review: cell-free fetal DNA in the maternal circulation as an indication of placental health and disease. *Placenta*. 2014; 35 Suppl: S64-S68.
9. Rodríguez-de-Alba M, Bustamante-Aragón A, Perlado S, Trujillo-Tiebas JM, Díaz-Recasens J, Plaza-Arranz J Ramos C. Diagnóstico prenatal no invasivo: presente y futuro de mano de las nuevas tecnologías. *Diagn Prenat*. 2012; 23 (2): 67-75.
10. Disponible en: <https://revistageneticamedica.com/blog/ngs-secuenciacion/>
11. Russo ML, Blakemore KJ. A historical and practical review of first trimester aneuploidy screening. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2014; 19 (3): 183-187.
12. Van Opstal D, Srebniak MI, Polak J, de Vries F, Govaerts LC, Joosten M et al. False negative NIPT results: risk figures for chromosomes 13, 18 and 21 based on chorionic villi results in 5967 cases and literature review. *PLoS One*. 2016; 11 (1): e0146794.
13. 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 (1): e010002.